

LÍVIA TOSI TREVELIN

Influência de diferentes protocolos de irradiação do laser de Er:YAG na morfologia dentinária, na formação da camada híbrida e na resistência adesiva

São Paulo

2018

LÍVIA TOSI TREVELIN

Influência de diferentes protocolos de irradiação do laser de Er:YAG na morfologia dentinária, na formação da camada híbrida e na resistência adesiva

Versão Corrigida

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

Orientador: Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas Costa e Silva

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Trevelin, Livia Tosi.

Influência de diferentes protocolos de irradiação do laser de Er:YAG na morfologia dentinária, na formação da camada híbrida e na resistência adesiva / Livia Tosi Trevelin ; orientador Patricia Moreira de Freitas Costa e Silva. -- São Paulo, 2018.

85p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Lasers de estado sólido. 2. Preparo da cavidade dentária. 3. Microscopia eletrônica de transmissão. 4. Dentina. 5. Resistência de união (Odontologia). I. Silva, Patricia Moreira de Freitas Costa e. II. Título.

Trevelin LT. Influência de diferentes protocolos de irradiação do laser de Er:YAG na morfologia dentinária, na formação da camada híbrida e na resistência adesiva. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 05 / 12 /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Ana Karina Bedran-Russo

Instituição: Universidade de Illinois

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Roberta Tarkany Basting Hofling

Instituição: Universidade São Leopoldo Mandic

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Adriana Bona Matos

Instituição: Universidade de São Paulo FO-USP

Julgamento: Aprovado

Ao meu marido, Eduardo, meu grande companheiro ao longo de doze anos. A amizade mais sincera e verdadeira e o amor mais profundo. Seu apoio é essencial para meu crescimento e amadurecimento. Palavras não são suficientes para descrever o amor que sinto por você, obrigada por tornar minha vida especial e extremamente feliz! Amo muito você!

À minha mãe, Sueli, que não mede esforços para cuidar de mim, ajudar e aconselhar. Obrigada pelo apoio em todas as minhas decisões. Um exemplo de mulher, guerreira e vencedora. Amo você!

Ao meu irmão, Leopoldo, por todas as conversas, conselhos, amizade e principalmente por cuidar de mim. Um grande amigo, amo você.

Ao meu pai, Natanael, que está em meus pensamentos e em muitas lembranças. Saudades da sua filha que te ama tanto...

Aos meus sogros, Antonieta e Adelino, pelo apoio e dedicação ao longo de tantos anos. Agradeço pelo carinho, por me ajudarem e cuidarem de mim.

Ao Leonardo, pelo carinho e amizade ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

À minha co-orientadora Prof. ^a Dr^a. Adriana Bona Matos, meu agradecimento pela ajuda e aos inúmeros ensinamentos ao longo de cinco anos. Foram ótimos anos de convivência, importantes para meu crescimento. Obrigada por sua dedicação e amizade.

À minha orientadora Prof. ^a Dr^a. Patricia Moreira de Freitas, obrigada pela confiança depositada e pelo carinho que me recebeu. Sua dedicação e empenho foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Foi uma grande oportunidade trabalhar com você!

À minha orientadora no exterior Prof. ^a Dr^a. Ana Karina Bedran-Russo, por me receber em seu laboratório de pesquisa Dental Materials and Interfaces da Universidade de Illinois e por todo apoio e orientação durante minha estada em Chicago. Muito obrigada pelos inúmeros ensinamentos e por estimular diariamente minha percepção crítica, viabilizando a realização de todos os experimentos do meu projeto e os relacionados ao seu laboratório. É um exemplo de profissional, muito competente e uma grande amiga. Agradeço pelo carinho com que me recebeu, inclusive em sua casa com sua família. Você é muito especial para mim, muito obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Victor Arana-Chavez pela ajuda nas fases de elaboração deste trabalho. Sua contribuição e valiosos ensinamentos foram essenciais para realização deste estudo. Tenho uma profunda admiração por seu trabalho.

À Prof. ^a Dr^a. Ana Cecília Correa Aranha, por toda ajuda durante esses anos de pós-graduação e pelos bons momentos durante muitas clínicas de graduação. É um

exemplo de profissional, esposa e mãe! Tenho um profundo carinho e admiração por você, obrigada!

À Prof. ^a Dr^a. Ericka, pela oportunidade e confiança. Foi um prazer e uma grande oportunidade trabalhar com você e sua equipe de Pós-Graduação.

À Prof. ^a Dr^a. Allyne Simões, por todo o apoio e carinho enquanto estive em Chicago. Agradeço por ter me acolhido em sua casa e com seus familiares. Foi um período muito bom que passamos juntas! Muito obrigada.

Aos todos os professores do Departamento de Dentística, pela dedicação e por todos os ensinamentos.

A todos os colegas de pós-graduação. Desejo um caminho de sucesso para todos vocês.

À minha queridíssima amiga Beatriz, companheira de muitas horas de laboratório, almoços e jantares, momentos bons e ruins, facetime e whats app... Sua amizade e companheirismo foram essências para a realização desse trabalho e principalmente durante minha estadia em Chicago. Durante esses anos de Doutorado estreitamos nossa amizade que levarei para vida toda!

Um carinho especial às minhas amigas Sandra, Samira e Raquel que estão comigo desde o mestrado, e sem dúvidas fizeram com que esses anos fossem ainda mais especiais.

Aos meus queridíssimos amigos Thais Torralbo Lopez e João Paulo Capp, companheiros desde a graduação e fico muito feliz de compartilharmos este momento tão importante com vocês.

À Luciana Kfourir Siriani pelo companherismo e amizade durante os anos de Doutorado.

Á Camila Zamperini, um anjo que Deus colocou em meu caminho. Palavras são poucas para agradecer o quanto você me ajudou. Uma amizade verdadeira!

Á Yvette, minha parceira de horas e horas no laboratório, experimentos e muitos desafios. Nossa parceria vai além do laboratório! Foi um período muito bom que passamos em Chicago! Só tenho a agradecer! Desejo tudo de melhor para você!

Aos funcionários do Departamento de Dentística, da secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca da FOUSP, pela disponibilidade e pelo profissionalismo.

A Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia e à Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Dentística da FOUSP na pessoa da Prof. Dr. Celso Caldeira.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de Doutorado no País (2015/12651-1) e a bolsa no exterior na Universidade de Chicago, Illinois (2016/18118-6).

RESUMO

Trevelin LT. Influência de diferentes protocolos de irradiação do laser de Er:YAG na morfologia dentinária, na formação da camada híbrida e na resistência adesiva [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida

Este estudo longitudinal *in vitro* avaliou a ação de diferentes larguras de pulso empregadas no protocolo de preparo cavitário e pré-tratamento dentinário com o laser de Er:YAG sobre a ultramorfologia da dentina, a micromorfologia da interface adesiva e resistência de união. Cento e doze molares humanos foram seccionados, obtendo-se uma dentina de profundidade média e, em seguida, foram distribuídos de acordo com os protocolos de irradiação da superfície dentinária: preparo cavitário (200 mJ/20 Hz) e pré-tratamento (80 mJ/2 Hz). Os fatores em estudo foram a largura de pulso (50 μ s, 300 μ s e 600 μ s) e tempo de armazenamento (24 h e 1 ano). Para cada condição de tratamento de superfície (protocolo de irradiação), foi considerado um grupo controle, sem irradiação. Os espécimes foram avaliados por diferentes métodos, a saber: análise da ultramorfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (n=3); avaliação da micromorfologia da interface adesiva por meio de microscopia confocal (n=3); avaliação da matriz orgânica e fibrilas colágenas por meio da Segunda Gerção Harmônica (n=3). Foram realizadas também a avaliação da resistência de união por ensaio de microcisalhamento nos espécimes submetidos ao protocolo de pré-tratamento da dentina (μ SBS) (n=12) e por ensaio de microtração (μ TBS) (n=11) nos espécimes submetidos ao protocolo de irradiação de preparo cavitário. Os experimentos de microscopia confocal e resistência de união foram realizados utilizando um sistema adesivo autocondicionante (Scotchbond Universal, 3M ESPE, EUA) em conjunto a uma resina composta (Z350 XT, 3M ESPE, EUA). Estes espécimes foram analisados após 24 hs e 1 ano de armazenamento em saliva artificial. Os dados quantitativos obtidos nos ensaios de resistência de união foram analisados por meio do teste de ANOVA (dois fatores) e do teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os dados qualitativos foram comparados e descritos detalhadamente. Os resultados de resistência de união imediato dos grupos irradiados mostraram valores mais baixos quando comparados ao grupo controle, independente do protocolo empregado assim como da largura de pulso utilizada. Os baixos valores expressos nos ensaios de resistência de união podem ser justificados pelas alterações

na ultraestrutura da dentina irradiada com o laser de Er:YAG, que denotam uma clara alteração da matriz orgânica com desnaturação das fibrilas colágenas, como demonstrada pelas imagens de SGH e MET. Desta forma, as alterações nas estruturas orgânicas da dentina prejudicaram a formação da uma camada híbrida consistente que levou à degradação das interfaces adesivas e consequente redução dos valores de resistência de união em 24 h. Todos os espécimes ensaiados no teste de microtração apresentaram redução significativa após 1 ano de armazenamento em saliva artificial, independente do tratamento realizado. Entretanto, os espécimes ensaiados no teste de microcisalhamento não apresentaram redução significativa após o mesmo período de armazenamento (1-ano). Embora o protocolo de pré-tratamento tenha alterado os componentes orgânicos da dentina, essas alterações não foram suficientes para reduzir os valores de resistência de união após 1 ano de armazenamento. Sendo assim, o emprego do laser de Er:YAG, em ambos os protocolos investigados, resultaram em modificações permanentes nos componentes orgânicos da dentina, que influeu negativamente os valores de resistência de união a esse substrato.

Palavras-chave: Dentina. Laser de Er:YAG. Pré-tratamento dentinário. Preparo cavitário dentina. Microscopia Eletrônica de Transmissão. Microscopia Confocal. Resistência de União.

ABSTRACT

Trevelin LT. Er:YAG laser protocols influence on dentin morphology, hybrid layer formation and bond strength [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

This longitudinal *in vitro* study evaluated the action of different pulse widths employed in the protocol of cavity preparation and pre-treatment with the Er: YAG laser on the ultramorphology of dentin, the micromorphology of the adhesive interface and bond strength. One hundred and twelve human molars were sectioned to obtain a medium depth dentin and then distributed according to the dentin surface irradiation protocols: cavity preparation (200 mJ / 20 Hz) and pretreatment (80 mJ / 2 Hz). The factors under study were the pulse width (50 μ s, 300 μ s and 600 μ s) and storage time (24 h and 1 year). For each surface treatment condition (irradiation protocol), it was considered a control group, without irradiation. The specimens were evaluated by different methods, such as: ultramorphology analysis by transmission electron microscopy (MET) (n = 3); analysis of the adhesive-interfaces by confocal microscopy (n = 3); evaluation of the organic matrix and collagen fibrils by Second Harmonic Generation (n = 3). The bond strength was evaluated by micro-shear test in the specimens submitted to the pre-treatment protocol (μ SBS) (n = 12) and by microtensile test (μ TBS) (n = 11) in specimens submitted to cavity preparation's protocol. Confocal microscopy and bond strength experiments were performed using a self-etching adhesive system (Scotchbond Universal, 3M ESPE, USA) together with a composite resin (Z350 XT, 3M ESPE, USA). These specimens were analyzed after 24 h and 1 year of storage in artificial saliva. The quantitative data obtained in the bond strength tests were analyzed using the ANOVA test (two factors) and Tukey's multiple comparison test ($\alpha = 0.05$). Qualitative data were compared and described in detail. The results of immediate bond strength of the irradiated groups showed lower values when compared to the control group, regardless of the protocol used as well as the pulse width used. The low values expressed in the bond strength tests can be justified by the changes in the ultrastructure of the dentin irradiated with the Er: YAG laser, which denote a clear alteration of the organic matrix and collagen fibrils, as observed in SGH and MET images. In this way, the changes in the organic structures of dentin impaired the formation of a consistent hybrid layer that lead to the degradation of the adhesive-interfaces and consequent drop of bond strength values at 24 h. All specimens tested

in the microtensile test showed a significant reduction of bond strength after 1 year of saliva storage, regardless treatment performed. However, the specimens tested in the micro-shear test did not show significant reduction of bond strength after the same storage period (1-year). Although the pre-treatment protocol altered the organic components of dentin, these changes were not enough to reduce bond strength values after 1 year of storage. Thus, the use of the Er: YAG laser, in both protocols investigated, resulted in permanent modifications in the organic components of the dentin, which negatively influences the bond strength values to this substrate.

Keywords: Dentin. Laser of Er:YAG. Pretreatment. Cavity preparation. Transmission Electron Microscopy. Bond strenght.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Esquema ilustrativo do preparo das amostras	36
Figura 4.2 - Equipamento de Laser de Er:YAG - Fidelis III- Fotona	37
Quadro 4.1 - Delineamento experimental	38
Quadro 4.2 - Descrição dos materiais.....	42
Figura 5.1 - Micrografia obtida em TEM da superfície dentinária do grupo controle	47
Figura 5.2 - Micrografia obtida em TEM da superfície dentinária irradiado com o laser de Er:YAG com o protocolo de preparo cavitário	49
Figura 5.3 - Micrografia em TEM da superfície dentinária irradiado com o laser de Er:YAG com o protocolo de pré-tratamento.....	51
Figura 5.4 - Interface adesiva obtidas em Confocal e SGH da superfície dentinária do grupo controle	52
Figura 5.5 - Interface adesiva obtidas em Confocal e SGH da superfície dentinária irradiada com laser de Er:YAG para protocolo de preparo cavitário utilizando diferentes larguras de pulso	54
Figura 5.6 - Interface adesiva obtidas em Confocal e SGH da superfície dentinária irradiadas com laser de Er:YAG para protocolo de pré-tratamento dentinário utilizando diferentes larguras de pulso	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Resultado do teste de microcisalhamento em 24h e após 1 ano de armazenamento em saliva artificial...57
- Tabela 5.2 - Resultado do teste de microtração em 24h e após 1 ano de armazenamento em saliva artificial.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	camada de adesivo
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CaCl ₂	cloreto de cálcio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
Er:YAG	Érbio:ítrio-alumínio-granada
HEPES	ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico
HL	camada híbrida
HMDS	hexadimetilsilazane
Hz	Hertz
J/cm ²	joule(s) por centímetro quadrado
KCL	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotássico
LP	Long pulse
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro (s)
mM	milimolar
µm	micrômetro(s)
µs	microsegundo(s)
µSBS	micro-cisalhamento
µTBS	micro-tração
MSP	Medium short pulse
NaN ₃	azida de sódio
nm	nanômetro
RU	resistência de união
RT	tags de resina composta
SiC	carbeto de silício
SGH	segunda geração harmônica
SSP	Super short pulse

LISTA DE SÍMBOLOS

W	Watt(s)
n	Número de espécimes
°C	grau(s) celsius
h	hora(s)
M	Molar
s	segundo(s)
kV	Kilovolt
°	graus(s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO.....	83

1 INTRODUÇÃO

Em dentística, o *laser* de Er:YAG (Erbium:yttrium-aluminium-garnet) apresenta-se como uma opção para a realização de preparos cavitários, pré-tratamento/condicionamento de superfície dental e remoção de tecido cariado. Ainda considerando os preparos dentais, a redução da vibração, pressão e em alguns casos, prescindirem do uso de anestesia (Ando et al., 1996; Mehl et al., 1997; He et al., 2017) podem ser diferenciais exclusivos que conferem maior conforto aos pacientes.

Contudo, a literatura que avalia a resistência de união de restaurações RU adesivas realizadas sobre substrato dental irradiado é controversa (Kameyama et al., 2009; Ramos et al., 2010; Akin et al., 2012; Guven et al., 2015). Se por um lado autores observaram valores de resistência de união mais altos (Visuri et al., 1996a; Chousterman et al., 2010; Ferreira et al., 2010; Shahabi et al., 2013) ou iguais (Celik et al., 2006; Staninec et al., 2006; Amaral et al., 2008; Akin et al., 2012; Karadas et al., 2017) aos valores obtidos quando a adesão é realizada sobre dentina preparada pelos métodos convencionais, outros (Ceballos et al., 2002; Sassi et al., 2004; Barceiro et al., 2005; Ramos et al., 2010; Bahrami et al., 2011) observam menores valores de resistência de união. A grande diversidade de protocolos de irradiação dificulta a escolha mais apropriada que possa conferir subsídio científico para sua utilização clínica.

O aumento de temperatura é sempre citado pelos autores que encontraram reduzida RU, justificando que o dano térmico superficial causado pela irradiação pode se estender à dentina subsuperficial ocasionando a desnaturação de fibrilas colágenas (Ceballos et al., 2002; Sassi et al., 2004; Barceiro et al., 2005; Ramos et al., 2010). Estes efeitos térmicos restringem a difusão do sistema adesivo na subsuperfície da dentina e, conseqüentemente, comprometem a integridade da interface adesiva (Ceballos et al., 2002) tornando a penetração do sistema adesivo incompleta, o que pode prejudicar a formação da camada híbrida (Nakabayashi; Sami, 1996). Estas alterações de temperatura podem estar relacionadas ao calor residual

acumulado no interior dos tecidos irradiados e, quanto maior a largura de pulso, maior o calor residual durante a irradiação (Fried et al., 2001).

A largura de pulso é um parâmetro muito importante a ser considerado durante a irradiação por estar diretamente relacionada com a capacidade de ablação, a interação com o tecido (Brandão et al., 2012), os efeitos térmicos (Lukac et al., 2004; Staninec et al., 2006) e a característica morfológica do tecido ablacionado (Apel et al., 2002; Lukac et al., 2004; Trevelin et al., 2015).

A evolução tecnológica envolvendo o desenvolvimento dos equipamentos de *laser* de Er:YAG caminhou no sentido de produzir equipamentos com possibilidade de regulagem da largura de pulso para superar ou minimizar os efeitos termomecânicos gerados durante a irradiação (Carmelino et al., 2004). O emprego de pulsos mais curtos alcançam uma energia mais rápida, diminuindo o tempo. Estudos mostram que o uso de parâmetros inadequados no protocolo de irradiação pode gerar superaquecimento que resulta em alterações morfológicas, tais como vitrificação e trincas, causando: a modificação dos cristais de apatita, a formação de uma fase adicional de fosfato de cálcio (Delmè et al., 2006; Delmè; De Moor, 2007) e a formação de um novo composto como β -cálcio tri-fosfato (Carmelino et al., 2004). Todavia, não há relato na literatura de qual seria a influência destes novos compostos sobre a capacidade de interação com o sistema adesivo com a dentina irradiada

Não foram encontrados na literatura estudos que analisam a influência da largura de pulso na micromorfologia da interface adesiva e o efeito da irradiação na estabilidade das restaurações adesivas ao longo do tempo.

Desta forma, este trabalho longitudinal possui como proposta avaliar a ação de diferentes larguras de pulso empregadas em protocolos de preparo cavitário e pré-tratamento dentinário, na formação da interface adesiva e na resistência de união por meio de um sistema adesivo autocondicionante. Além disso, propõe avaliar a influência da irradiação nas características ultramorfológicas da dentina assim como na composição química e estrutural, com vistas à determinação de protocolos de irradiação que permitam a realização de restaurações adesivas de maior qualidade e, conseqüentemente, com maior durabilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A irradiação do tecido dentinário com o laser de Er:YAG vai ao encontro da filosofia de mínima intervenção uma vez que seu comprimento de onda de 2,94 μm coincide com o pico de absorção máxima da banda da água (3,0 μm) e dos grupos hidroxilas da hidroxiapatita (2,8 μm), proporcionando uma interação efetiva com o tecido dental duro (Hibst; Keller, 1989; Kuscer; Diaci, 2013).

O laser de Er:YAG atua sobre o substrato dental por meio da ablação termomecânica, na qual a energia incidente é altamente absorvida pelas moléculas de água da estrutura dental ocasionando um rápido aquecimento e evaporação da água no tecido, levando a um aumento da pressão interna seguido de sucessivas microexplosões com ejeção dos tecidos (Hibst; Keller, 1989; Kuscer; Diaci, 2013).

A irradiação com o laser de Er:YAG é considerado um procedimento seguro por produzir um pequeno aumento de temperatura ($<5.5^{\circ}\text{C}$) (Oelgiesser et al., 2003), gerando mínimo dano térmico à polpa e aos tecidos adjacentes (Hossain et al., 1999; Hossain et al., 2003; Armengol et al., 2002), especialmente quando irradiados com contínua irrigação com água/ar (Hibst; Keller, 1989; Kuscer; Diaci, 2013). Adicionalmente, a correta refrigeração do tecido durante a ablação está associada ao aumento da eficiência do corte (Burkes et al., 1992; Visuri et al., 1996b).

Os protocolos utilizados para a irradiação do tecido dental promove uma redução microbiana (Ando et al., 1996; Mehl et al., 1997) nas paredes cavitárias e, quando associada a um adequado selamento marginal, pode contribuir para um melhor prognóstico do tratamento restaurador e promover uma maior durabilidade das restaurações (Perdigão et al., 2014) adesivas.

A interação física entre o laser e o tecido depende da natureza do tecido, da quantidade de água e dos diversos parâmetros de regulação do equipamento empregado (Hibst; Keller, 1989). De acordo com os diferentes parâmetros, o laser pode remover tecido dental duro, realizando o preparo cavitário (Trevelin et al., 2015; Karadas et al., 2017) e pode promover o pré-tratamento da dentina (Trevelin et al., 2015) prévio aos procedimentos restauradores adesivos.

As superfícies dentinárias irradiadas com o laser de Érbio apresentam características morfológicas diferentes daquelas obtidas pelo método operatório tradicional (Aranha et al., 2007; Trevelin et al., 2015), caracterizado por cavidades extensas, com bordas delimitadas e

presença de *smear layer*. Em contraste, a dentina irradiada apresenta uma morfologia irregular e rugosa, com abertura dos túbulos dentinários, ausência de *smear layer* (Trevelin et al., 2015) e uma dentina peritubular mais evidente (Aoki et al., 1998; Freitas et al., 2007; Moretto et al., 2011; Baraba et al., 2013; Trevelin et al., 2015).

Essas características morfológicas geradas na superfície irradiada são fatores que supostamente podem contribuir com a difusão do sistema adesivo na dentina (Visuri et al., 1996a; Aoki et al., 1998), favorecendo procedimentos restauradores adesivos (Hibst; Keller, 1989; Visuri et al., 1996a; Aoki et al., 1998; Aranha et al., 2007) .

Entretanto, analisando a literatura referente à adesão em dentina irradiada, resultados inconclusivos e controversos são encontrados (Ramos et al., 2010; Firat et al., 2012; Guven et al., 2015; Karadas et al., 2017). Da mesma maneira que estudos revelam a superioridade do laser frente ao tratamento convencional, por exibirem valores de resistência de união iguais (Celik et al., 2006; Staninec et al., 2006; Amaral et al., 2008; Akin et al., 2012) ou superiores (Visuri et al., 1996a; Chousterman et al., 2010; Ferreira et al., 2010; De Oliveira et al., 2013) aos métodos convencionais realizados com brocas e motores odontológicos, outros estudos revelam alterações termomecânicas geradas na superfície irradiada, resultando em alterações nas fibrilas colágenas da dentina, repercutindo em baixos valores de resistência de união (Ceballos et al., 2002; Sassi et al., 2004; Barceleiro et al., 2011; Ramos et al., 2013).

Durante o processo de irradiação, grande parte do calor gerado a partir da transferência de energia ao tecido é consumida durante o processo de ablação; no entanto, uma pequena fração dessa energia permanece no tecido na forma de energia residual ou calor residual (Hossain et al., 1999; Fried et al., 2001).

Desta forma, o risco de danos térmicos deve ser levado em consideração durante o processo de irradiação, pois o calor residual na dentina subjacente pode desnaturar as fibrilas de colágeno com perda do espaço interfibrilar (Ceballos et al., 2002; Schein et al., 2003), impedindo a adequada difusão dos monômeros resinosos dentre as fibrilas colágenas, interferindo negativamente na resistência da união (Ceballos et al., 2002; Schein et al., 2003; Giachetti et al., 2004; Jiang et al., 2013).

Ainda neste contexto, autores sugeriram que a dentina irradiada é mais ácido-resistente quando comparada com superfícies preparadas com o método operatório tradicional (Hossain et al., 2000). A remoção não preferencial da dentina peritubular pode criar um cristal derretido na dentina peritubular que funciona como uma barreira ácido-resistente contra a infiltração da resina, devido ao elevado teor inorgânico da dentina peritubular em contraste com a camada porosa criada na dentina intertubular, menos mineralizada (De Oliveira et al.,

2010). Consequentemente é possível que esses cristais gerados no processo de ablação reduzam a permeabilidade de sistemas adesivos, contribuindo para a redução da resistência de união (De Oliveira et al., 2010).

Neste sentido, esforços devem ser empreendidos para aumentar a resistência de união de materiais adesivos aos tecidos dentais duros, uma vez que a literatura enfatiza fortemente que a durabilidade da adesão é o fator chave para a determinação do sucesso das restaurações em materiais resinosos (Altunsoy et al., 2015). Ainda neste âmbito, a resistência de união é afetada por diversos fatores, dentre eles o tipo de sistema adesivo, o tipo de tecido (esmalte ou dentina) e o método de preparo da cavidade (Bakry et al., 2009; Ali et al., 2013).

O mecanismo de adesão envolve basicamente um processo de troca, nas quais os minerais removidos do tecido dental duro são substituídos por monômeros resinosos, formando ligações químicas e interligando micromecanicamente ao substrato dental. Este biopolímero formado é denominado de camada híbrida (Van Meerbeek et al., 2003; Van Meerbeek et al., 2011).

A adesão realizada em esmalte apresenta resultados confiáveis e duráveis (Cardoso et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Cechinn et al., 2018). Ocorre pela dissolução preferencial dos cristais interprismáticos, comumente realizados pelo ácido fosfórico, permitindo uma retenção micromecânica eficiente (Van Meerbeek et al., 2003; Bedran-Russo et al., 2017).

Entretanto, o grande desafio encontra-se na dentina, que é um tecido heterogêneo com uma natureza úmida, composta por aproximadamente 70% de conteúdo mineral, por 20% de matriz e 10% de água por peso, respectivamente (Arola; Reprogel, 2006; Bedran-Russo et al., 2017). Durante a adesão à dentina, os monômeros resinosos devem permear completamente as fibrilas colágenas expostas e desmineralizadas; caso contrário, levam à degradação da interface adesiva (Frasseto et al., 2016; Porto et al., 2018), resultando em uma camada híbrida inconsistente, uma vez que a profundidade de desmineralização é maior do que a infiltração dos monômeros resinosos (Li et al., 2016). Desta maneira, a interface resina-dentina é mais susceptível à degradação hidrolítica ocasionada ao longo do tempo (Breschi et al., 2010; Frasseto et al., 2016). Assim, torna-se fundamental que novas estratégias sejam investigadas para modificar esse cenário.

O desenvolvimento de novos sistemas adesivos alinhados à evolução tecnológica resultaram no surgimento de adesivos classificados como autocondicionantes, com o intuito de sanar as dificuldades encontradas com os sistemas do tipo Condicione e Lave.

Diferente dos adesivos do tipo Condicione e Lave, os adesivos autocondicionantes não requerem a aplicação prévia do agente condicionante; desta forma, a desmineralização do

substrato ocorre de maneira simultânea com a ação do *primer*. Nesta abordagem, ocorre a dissolução parcial dos cristais de hidroxiapatita e a *smear layer* formada é incorporada à camada híbrida. Assim, a extensão e profundidade da zona desmineralizada das fibras colágenas são, teoricamente, incorporadas pelos monômeros resinosos (Favarão et al., 2017).

Esta técnica tem grande aceitação na Odontologia Restauradora devido à simplicidade de aplicação (menor tempo de aplicação e menos etapas) além de reduzir a sensibilidade do operador quanto ao grau de umidade da dentina (Akimoto et al., 2007; Peumans et al., 2005, 2010; Van Dijken et al., 2007). Outro benefício clínico importante dos adesivos autocondicionantes é a menor incidência de sensibilidade pós-operatória experimentada pelos pacientes (Perdigão et al., 2003; Tay et al., 2002).

Os sistemas autocondicionante são subdivididos em duas categorias, sistemas de dois passos (ou dois frascos) ou passo único. A diferença reside no fato de no primeiro o componente hidrofílico estar associado ao ácido, em que os ésteres fosfatados são adicionados aos grupamentos carboxílicos dos monômeros resinosos, possibilitando a desmineralização do tecido dental duro e a infiltração dos componentes na dentina. O segundo passo, consiste na aplicação da resina hidrofóbica de baixa viscosidade para formar a camada híbrida. Já os sistemas de passo único combinam todos os componentes (ácido, *primer* e *bond*) em uma única solução (Van meerbeek et al., 2011; Favarão et al., 2017).

Estudos que comparam a resistência de união dessas duas categorias de sistemas autocondicionantes revelaram uma superioridade do sistema autocondicionante de dois passos (Peumans et al., 2005; Van Meerbeek et al., 2010). Tal fato pode ser justificado pela grande quantidade de componentes hidrofílicos presentes no sistema de passo único, que induz a absorção de água como resultado da substituição dos monômeros resinosos hidrofílicos mesmo após a polimerização, que leva à degradação hidrolítica ao longo do tempo (Sauro et al., 2009; Malacarne et al., 2006; Yiu et al., 2004; Tay et al., 2004; Ito et al., 2005). Adicionalmente, numerosos estudos relataram um aumento da nanoinfiltração na interface adesiva (Favarão et al., 2017), formação de microbolhas, formação de “árvores de água”, baixa conversão de polimerização e separação de fases quando esse sistema é empregado (Suppa et al., 2005). Isso ocorre devido a grande quantidade de água (Van Landuyt et al., 2008; Sauro et al., 2009) necessária para a desmineralização do tecido dental duro e para ionização dos monômeros ácidos presentes no sistema autocondicionante (Hashimoto et al., 2011).

Neste mesmo contexto de simplificação da técnica operatória e o desafio de proporcionar uma interface dentina-resina mais estável, surgiu uma nova classe de sistemas

adesivos, conhecidos como universais, que podem ser utilizados no formato autocondicionante e condicione e lave, podendo ser aplicado em esmalte, dentina, materiais restauradores diretos e indiretos.

O adesivo universal é classificado como adesivo do tipo suave, na qual forma camada híbrida de aproximadamente 0,5 μm de espessura (pH 2; profundidade de interação de 0,5-1 μm) (Van Meerbeek et al., 2011; Boushell et al., 2016; Vermelho et al., 2017). Os adesivos dentro desta faixa de pH desmineralizam parcialmente a dentina, deixando uma quantidade substancial de cristais de hidroxiapatita em torno das fibrilas de colágeno (Tay; Pashley, 2001). O diferencial do sistema universal reside na capacidade de reidratar as fibrilas colágenas, pela presença do monômero fosforilado 10-MDP, que promove a acidez e torna seu mecanismo autocondicionante (Yoshida et al., 2012).

O sistema adesivo universal ainda contém em sua formulação o copolímero do ácido polialcenóico (Vitrebond), que promove uma adesão química decorrente da sua ligação com o cristal de hidroxiapatita que permaneceu em torno do colágeno parcialmente exposto (Yoshida et al., 2004; Inoue et al., 2005; Waidyasekera et al., 2009; Peumans et al., 2010; Yoshida et al., 2012). Mais de 50% dos grupos carboxílicos presentes no copolímero Vitrebond são capazes de se unir à hidroxiapatita, substituindo os íons de fosfato presentes no substrato e realizar ligações iônicas com o cálcio (Perdigão et al., 2014; Bedran-Russo et al., 2017), formando nanocamadas que resultam na formação de uma camada híbrida diferenciada. Isso pode contribuir para a estabilidade e durabilidade das interfaces adesivas ao longo do tempo (Van Meerbeek et al., 2011; Boushell et al., 2016; Tsujimoto et al., 2017).

É importante ressaltar que poucos estudos clínicos, assim como ensaios laboratoriais longitudinais, utilizando este sistema adesivo foram encontrados na literatura (Mena-Serrano et al., 2013; Perdigão et al., 2014; Boushell et al., 2016). Quando se avalia tecido irradiado, quer seja a cavidade preparada com o laser ou apenas o pré-tratamento da superfície, apenas um estudo foi encontrado até a presente data (Azevedo et al., 2018).

Recentemente, surgiu um novo equipamento de laser que permite a regulagem da largura de pulso, assim como o emprego de pulsos mais curtos objetivando minimizar os danos térmicos comumente observados quando pulsos longos são empregados (Trevelin et al., 2018). A eficiência dos pulsos curtos é devido ao aumento da potência pico durante a irradiação, que diminui o limiar da frequência para alcançar a ablação; consequentemente a velocidade de ablação é maior que a velocidade de difusão do calor para dentro do tecido (Krmek et al., 2009). Adicionalmente, ao empregar pulsos mais curtos, o tempo efetivo de irradiação é diminuído (Bahrami et al., 2011), resultando em uma ação localizada que

concentra a energia absorvida no sítio irradiado e culmina com a microexplosão e ejeção deste tecido, não havendo a perda de calor por condução durante o pulso do laser (Majaron et al., 1996; Lukac et al., 2004).

Recentemente, autores (Trevelin et al., 2015) avaliaram, por meio de MEV, o efeito de pulsos curtos em dentina e revelaram que esta largura de pulso gera uma topografia mais irregular quando comparado a maiores larguras de pulso, com ausência de *smear layer*, túbulos dentinários abertos e uma dentina peritubular evidente. Dessa maneira, acreditamos que resultados interessantes possam surgir da combinação do laser com menores larguras de pulsos, que produz uma morfologia microrretentiva e rugosa (Trevelin et al., 2015) e, portanto, favorável à retenção mecânica, com adesivos universais, que devido a sua ligação química com o substrato permitirá a formação de uma camada híbrida diferenciada.

Assim, este trabalho possui como proposta avaliar a ação de diferentes larguras de pulso do laser de Er:YAG na ultramorfologia da dentina (matriz orgânica e fibrilas colágenas), com vistas à determinação de protocolos de irradiação (pré-tratamento e preparo cavitário) que permitam a obtenção de restaurações adesivas de maior qualidade e com conseqüente maior durabilidade.

3 PROPOSIÇÃO

Pretende-se analisar a influência da largura de pulso do laser de Er:YAG com protocolos de preparo cavitário e pré-tratamento dentinário sobre:

- 1) A ultramorfologia das fibrilas colágenas da dentina (MET);
- 2) As características da interface adesiva (Microscopia Confocal) em 24 h e após 1 ano de amazemento em saliva artificial;
- 3) Qualidade da malha colágena da dentina (Segunda Geração Harmonica) em 24 h e após 1 ano de amazemento em saliva artificial;
- 4) A resistência de união, por meio do teste de microcisalhamento, dos espécimes irradiados com o protocolo de pré-tratamento, em 24 h e após 1 ano de amazemento em saliva artificial.
- 5) A resistência de união, por meio do teste de microtração, dos espécimes irradiados com o protocolo de preparo cavitário, em 24 h e após 1 ano de amazemento em saliva artificial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Cento e doze molares foram examinados em lupa estereoscópica digital (MiniView UBS Digital Microscope, Chinavision Wholesale, Guangdong, CN) para detectar defeitos e/ou lesões de cárie, sendo que a presença destes determinaram a exclusão do elemento da amostra. Os dentes selecionados foram limpos com curetas periodontais e com pasta de pedra pomes e estocados em solução supersaturada de timol a 0,1%, em período máximo de 6 meses, à temperatura de 4°C até o momento do uso (Gilmour et al., 1990).

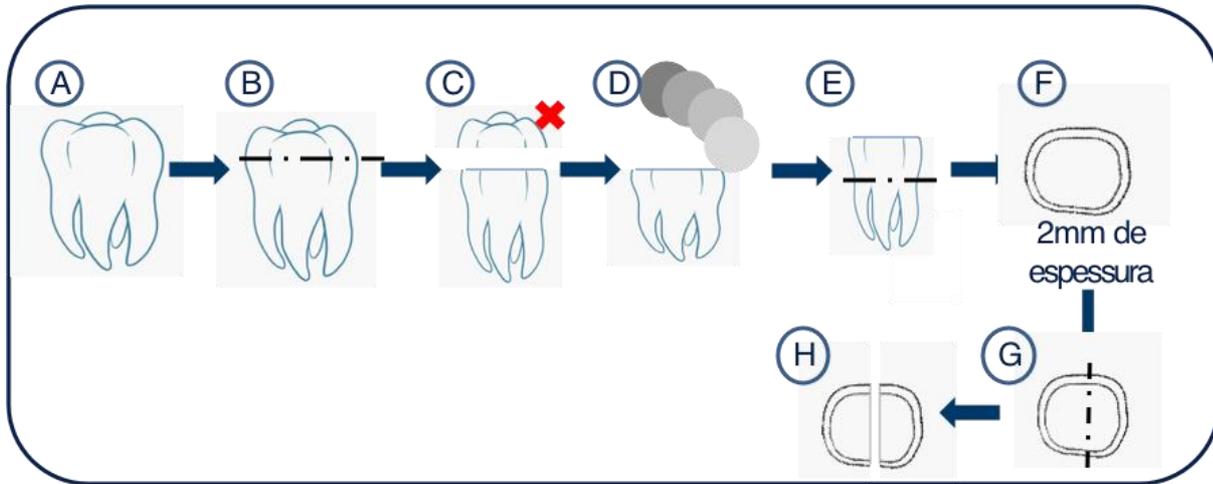
4.1.2 Aspectos Éticos

Todos os dentes que foram utilizados no experimento proposto foram doados pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por meio do consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa da mesma Instituição, com parecer de aprovação n. 048267/2015 (Anexo A).

4.1.3 Preparo das amostras

As faces oclusais dos dentes selecionados foram removidas com auxílio de um disco diamantado em cortadeira metalográfica, sob-refrigeração (Figura 4.1 A – C) (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Buff, IL, EUA) até a obtenção de dentina plana de profundidade média. Em seguida, foram lixados com auxílio da politriz (Ecomet 6/Automet 2 – Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) por um período de 60 s para padronizar a camada de esfregaço (Figura 4.1D). Em seguida, um segundo corte foi realizado no limite amelocementário (Figura 4.1E) para remoção da porção radicular, obtendo-se um disco de dentina (Figura 4.1F).

Figura 4.1 – Esquema ilustrativo do preparo das amostras



Fonte: a autora

4.1.4 Especificações do Equipamento de Laser de Er:YAG

O laser de Er:YAG (figura 4.2), modelo Fidelis III 1000 (Fidelis - Fotona - Eslovênia) pertencente ao Departamento de Dentística da FOUSP (Projeto FAPESP nº 2012/15141-6) possui comprimento de onda de 2,94 μm , largura do pulso regulável entre 50 e 1000 μs , taxa de repetição de 2 a 50 Hz, com potência média de 20 W, energia de 50 mJ a 1500 mJ, com um sistema de refrigeração (*spray* de ar/água) regulável e diâmetro do feixe de 0,9 mm e distância focal estabelecida a 7 mm da lente de saída do feixe até o tecido irradiado.

Figura 4.2 – Equipamento de Laser de Er:YAG (Fidelis III- Fotona)



Fonte: <https://fotona.com.br/>

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Delineamento experimental

Este estudo foi realizado em dentina hígida de molares humanos, subdivididos em dois grupos: protocolo de irradiação para preparo cavitário (200 mJ/ 20 Hz) e protocolo de irradiação para pré-tratamento da superfície dentinária (80 mJ/ 20 Hz). Para cada uma dessas condições, foram considerados dois fatores em estudo: a largura de pulso (50 μ s - super short pulse - SSP; 300 μ s - medium short pulse - MSP e 600 μ s - long pulse - LP) e o tempo de armazenamento, subdividido em 24 h e 1 ano de armazenamento em saliva artificial.

As variáveis de resposta estão descritas abaixo, no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Delineamento experimental

Fatores em estudo	1.Largura de pulso	1.1) SSP - 50 μ s 1.2) MSP -300 μ s 1.3) LP - 600 μ s
	2.Tempo de armazenamento	2.1) 24h 2.2) 1 ano
Unidade experimental	Dentina oclusal de molares humanos	
Variáveis de Reposta	1) Análise ultramorfológica da dentina (MET) (n=3); 2) Análise da micromorfologia da interface adesiva (Microscopia Confocal) (n=3) em 24 horas e 1 ano; 3) Segunda geração Harmônica (n=3) em 24 horas e 1 ano; 4) Resistência de União (μ SBS) (n=12) em 24 horas e 1 ano - espécimes submetidos ao protocolo de irradiação para pré-tratamento da dentina; 5) Resistência de União (μ TBS) (n=11) em 24 horas e 1 ano - espécimes submetidos ao protocolo de irradiação para preparo cavitário da dentina.	

Fonte: a autora

4.2.2 Divisão dos grupos experimentais

Os espécimes foram aleatoriamente distribuídos de acordo com os protocolos de irradiação (preparo cavitário - 200mJ/20 Hz e pré-tratamento - 80mJ/2 Hz), variando a largura de pulso em 50 μ s, 300 μ s e 600 μ s. Para cada condição de tratamento de superfície (protocolo de irradiação), foi considerado um grupo controle, sem irradiação.

4.2.3 Protocolo de irradiação

Para os grupos irradiados com o laser de Er:YAG, o sistema de refrigeração foi padronizado em 60% de água e 40% de ar, o que equivale a 21 ml/min de água. O espécime a ser irradiado foi fixado na base da plataforma e o translador motorizado de alta precisão (ESP301, Newport Corporation, Irvine, CA, EUA) foi acoplado ao computador para que, por meio de um *software* específico (*Newport, OPC Server Software 2.4.0*), fosse esquematizado um percurso de irradiação que foi realizado para todos os espécimes. Pelo comando do

computador, o translador movia-se no eixo X e eixo Y com velocidade constante de 0,8 mm/s. A peça de mão do laser foi posicionada perpendicularmente à superfície do espécime (incidência a 90°), a uma distância de 7 mm (distância focal).

Antes de iniciar a irradiação de cada um dos espécimes, a energia emitida pelo *laser* foi verificada por um medidor de potência (Coherent Field Master GS = Deletor LM45; Coherent CA, EUA) para garantir que a energia ajustada fosse a energia entregue pelo equipamento. A cada 3 espécimes, nova aferição de energia de saída foi realizada.

4.2.4 Ensaio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise em MET, foram utilizados 21 molares que foram preparados da mesma maneira como descrito no item 4.1.3, até a obtenção de um disco plano de dentina (Figura 4A- 4F). Em seguida, com o motor de alta rotação (W&H – Dentalwerk Burmoos GmbH, Austria) e uma ponta diamantada (KG – nº 4137 Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) todo o esmalte circundante do disco de dentina foi removido, com abundante irrigação. Finda esta etapa, os discos foram lixados com uma lixa de granulação #600, durante 60 segundos, para padronizar a camada de esfregaço (*smear layer*). Em seguida, foi realizada a irradiação dos espécimes de acordo com os grupos experimentais.

Imediatamente, os espécimes foram imersos em uma solução fixadora em 2% de glutaraldeído + 2,5% de formaldeíd com pH de 7,4 com 0,1 M de cacodilato de sódio, por um período de 6 h. Depois, foram lavados em uma solução tampão de cacodilato de sódio a 0,05 M e armazenados, individualmente, em cassetes para serem descalcificados em uma solução de 4,13% de EDTA por aproximadamente 55 dias. A solução de EDTA foi trocada 3 vezes na semana. Ao final deste período de descalcificação, os espécimes foram lavados com uma solução tampão de cacodilato de sódio a 0,05 M, pós- fixados a 1% em Tetróxido de Ósmio por 1 hora e, em seguida, desidratados em concentrações crescentes de etanol (30% - 100%) e finalizados em acetona absoluta. Depois, a resina do tipo Spurr (Dr Spurr, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) foi infiltrada e permaneceram *overnight* (12 horas). No dia subsequente, foi realizada a inclusão dos espécimes na resina e vertidos em moldes, onde permaneceram em estufa seca a 70°C, durante 3 dias, para completa polimerização da resina.

O fragmento foi fatiado em corte semifino em micrótomo e cortes de 1 μm foram examinados em microscópio de luz. Em seguida, foi realizado o corte das secções ultrafinas de 70 nm de espessura, com auxílio de uma navalha de diamante (ultra 45°, Diatome AG, Biel, Suíça) montada em um ultramicrótomo HM 360 (Micron Internacional GmbH., Walldorf, Alemanha), que foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1010, JEOL Ltd., Tóquio, Japão) operando a 80 Kv. Micrografias com aumento da ordem de 30.000X e 100.000X foram adquiridas da superfície da dentina irradiada.

4.2.5 Ensaio para análise da micromorfologia da interface adesiva

A avaliação morfológica da interface dente/restauração objetiva a visualização da distribuição dos componentes do agente de união na dentina através da incorporação de corantes nos sistemas adesivos (Watson, 1997). Assim, é possível caracterizar a micromorfologia da interface adesiva, a espessura da camada híbrida formada, a extensão dos prolongamentos (*tags*) de resina e avaliar possíveis alterações existentes na interface de união (D'Alpino et al., 2006), revelando informações mais precisas das correlações estruturais entre a dentina irradiada e o sistema adesivo.

Existem diversos tipos de corantes e, dentre eles, a Rodamina B é a mais utilizada nas pesquisas odontológicas. A Rodamina B é excitada ao utilizar uma luz verde (540 nm) e emite uma coloração vermelha (561nm), sendo eficaz em baixas concentrações e move-se livremente através da interface de união, sendo facilmente detectado em microscopia (Sidhu; Watson, 1998).

Sendo assim, para a avaliação qualitativa da interface adesiva dente/restauração, os espécimes dos 7 grupos experimentais foram preparados como descrito no item de número 4.1.3 (Figure 4.1A- 4.1F). Foi adicionado 0,0016 g/ml do corante Rodamina B ao frasco do adesivo Universal e mantido em um agitador por um período de 2 horas, para que ocorresse a completa dissolução do corante (esta concentração foi obtida de acordo com o estudo piloto realizado). O adesivo com o corante foi utilizado no formato autocondicionante e aplicado conforme instrução do fabricante, detalhada na Quadro 4.2. Em seguida, foram inseridos dois

incrementos de aproximadamente 1 mm de espessura de resina composta (Filtek Z350 XT) sobre a dentina e polimerizados por 20 segundos cada.

Finalizados os procedimentos restauradores, os espécimes foram mantidos em água destilada, em estufa calibrada a uma temperatura de 37°C, por 24 h. Em seguida, os espécimes foram seccionados (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Buff, IL, EUA) no sentido méso-distal, obtendo-se fatias de 1,0 mm de espessura. Cada dente permitiu a obtenção de aproximadamente 3 fatias (a quantidade de fatias variou de acordo com o tamanho do dente). Após limpeza em cuba ultrassônica, foram imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência com laser de 2 Fótons (Confocal Zeiss LSM 780-NLO). O laser utilizado foi o laser Hélio-Neônio 543 nm (excitação em vermelho). Foi utilizada uma lente objetiva EC Plan – Neofluar de 40X, com imersão em óleo de 1,3 DIC M 27 e os planos foram fatiados em 0,5 µm. A intensidade da fonte de excitação e amplificação fotomultiplicadora foi mantida constante durante todo o período.

Por meio de um programa de computador específico (ZEN 2 – Blue Edition), as imagens foram processadas e passadas para o programa Image J 1.48v (NIH, Bethesda, MD, USA), para padronizar o tamanho da imagem.

Após a obtenção destes resultados, os espécimes foram mantidos em saliva artificial, em estufa calibrada a uma temperatura de 37°C, por 1 ano. A saliva foi trocada a cada 14 dias e findo este período, foram analisados novamente utilizando os mesmos parâmetros citados. A saliva artificial utilizada consistiu em: 0,7 mM CaCl₂, 0,2 mM MgCl₂, 4 mM KH₂PO₄, 30 mM KCL, 0,3 NaN₃, 20 mM HEPES (Pashley et al., 2004).

Quadro 4.2: Descrição dos materiais e composição química

<i>Material</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Estratégia Adesiva</i>	<i>Composição Química</i>	<i>Instrução de Uso</i>
Adesivo Scotchbond Universal	3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil	Auto-condicionante	Álcool, sílica tratada com silício, água, 10-MDP, Bis-GMA, metacrilato de 2-hidroxietila, decametileno, dimetacrilato, copolímero de acrílico e ácido itacônico, canforoquinona, N,N-dimetilbenzocaína, metacrilato de 2-demetilamonoetilo, metil etil cetona, silano	Aplicar o adesivo sobre dentina seca, durante 20s e secar por 5s. Fotoativar por 10s
Filtek Z350 XT	3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil Lote #15119000505; 3M/ESPE	Não se aplica	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, PEGDMA e Bis-EMA, SÍLICA, ZIRCÔNIA	Polimerização pela exposição a uma luz halógena ou LED com intensidade mínima de 400mW/cm ² na faixa de 400-500nm. Dentina 40s.

Fonte: a autora.

4.2.6 Ensaio para análise da malha de colágeno – Segunda Geração Harmônica (SGH)

Para este ensaio, foram utilizados os mesmos espécimes empregados para análise da micromorfologia da interface adesiva. Os espécimes foram analisados pelo microscópio confocal (Zeiss LSM 780-NLO) para excitação de dois fótons que utiliza o laser multifóton titânio: safira Mai Tai DeepSee com 800 nm, na intensidade de 19,1% utilizando um filtro Chroma 400/40M 2P. Foi utilizada uma lente objetiva EC Plan – Neofluar de 40X, com

imersão em óleo de 1,3 DIC M-27. A intensidade da fonte de excitação e amplificação fotomultiplicadora foi mantida constante durante todo o período.

Por meio de um programa de computador específico (ZEN 2 – Blue Edition), as imagens foram processadas e analisadas pelo o programa Image J 1.48v (NIH, Bethesda, MD, USA) para padronização do tamanho da imagem mantendo a razão pixel/mm.

4.2.7 Ensaio de Resistência de União (RU)

Para o ensaio de resistência de união foram testadas duas metodologias diferentes, o ensaio de microcisalhamento (protocolo de irradiação para pré-tratamento da dentina) e o ensaio de microtração (protocolo de irradiação para preparo cavitário). Em ambos os ensaios, o grupo controle (sem irradiação) foi realizado para comparações.

4.2.7.1 Ensaio de Microcisalhamento - μ SBS - Espécimes submetidos ao protocolo de irradiação de pré-tratamento da superfície dentinária

Para o ensaio de μ SBS foram selecionados 48 dentes, com (n=12) que foram preparados, conforme descrito no item número 4.1.3 (Figura. 4.1A - 4.1D) e em seguida, cada espécime foi montado em anéis de PVC preenchidos com resina acrílica (AutoClear, Dent Bra, Pirassununga, SP, Brasil), expondo a superfície de dentina de profundidade média no topo do cilindro. Em seguida, foram novamente lixados com lixa de granulação #600 e limpos em cuba ultrassônica. Posteriormente, os espécimes foram randomizados em diferentes blocos de acordo com os grupos (controle e experimentais) para o tratamento das superfícies como descrito anteriormente.

O sistema adesivo Universal foi utilizado no formato autocondicionante, seguindo as orientações do fabricante, descritas no Quadro 4.2.

Em cada um dos 48 espécimes foram confeccionados de 8 a 9 cilindros de resina composta. Os cilindros de resina foram confeccionados sobre os espécimes de dentina com área delimitada, utilizando uma fita adesiva dupla face ácida resistente, de 0,05 mm de espessura (Tectaeo, Manaus, AM, BR), onde foram realizadas de oito a nove perfurações

(diâmetro de 1 mm) feitas por um perfurador de lençol de borracha (modelo Ainsworth, Wilcos do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, BR).

O sistema adesivo universal foi aplicado nestas perfurações conforme orientação do fabricante (Quadro 4.2); em seguida, um microtubo de silicone com dimensões de 1,0 mm de diâmetro interno e 1,0 mm de altura foi utilizado como matriz para a construção dos corpos de prova. Estas matrizes foram posicionadas de forma que seu diâmetro interno fosse coincidente com a perfuração da fita delimitadora. As matrizes foram adaptadas sobre as áreas delimitadas e foram fotoativadas de acordo com a recomendação do fabricante (Quadro 4.2). A seguir, a resina composta foi inserida com o auxílio de um calcador de Paiva nº 1 (Golgran, São Caetano do Sul, SP, BR). Os corpos de prova foram, então, imersos em água destilada a 37°C durante 1 h. Após esse período, as matrizes de silicone foram removidas com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 (Embramed, Jurubatuba, SP, BR) e, em seguida, os corpos de prova retornaram ao armazenamento por 23 hs. Após este período, os espécimes foram observados em lupa estereoscópica com um aumento de 40X para verificação da ausência de defeitos.

Os corpos-de-prova foram adaptados ao dispositivo para execução do teste de microcislamento em máquina de ensaio universal (Instron 5942, Canton, MA, EUA). Um fio metálico de 0.2 mm de diâmetro em contato com o semicírculo inferior dos cilindros faça simultaneamente esse cilindro e o prolongamento da célula de carga, sendo então realizado o ensaio de microcislamento com velocidade de 1 mm/min. Os valores de carga máxima suportada pela interface dentina/material restaurador foram obtidos em Newton e posteriormente convertidos a MegaPascal, dividindo-se a força máxima atingida no momento da fratura (N) pela área da interface adesiva (mm²).

No total foram realizados 400 corpos-de-prova, sendo que metade das amostras foi testada no ensaio de microcislamento 24 horas após a sua confecção, e a outra metade foi armazenada em saliva artificial, a 37°C, durante 1 ano para a análise longitudinal. Ressalta-se que a saliva artificial foi trocada a cada 14 dias (Pashley et al., 2004).

Após a realização do teste de microcislamento, o padrão de fratura de cada espécime foi avaliado com o auxílio de lupa estereoscópica (MiniView UBS Digital Microscope, Chinavision Wholesale, Guangdong, CN), com aumento de 50X. As fraturas foram classificadas por escores em: 1- adesivas (75% ou mais da área analisada interfacial entre substrato e material restaurador); 2 - coesivas em dentina (75% ou mais da área analisada com presença de tecido dentinário); 3 - coesivas em resina composta (75% ou mais da área

analisada com presença de material restaurador) e 4 - mistas (combinação de adesivas e coesivas).

4.2.7.2 Ensaio de Resistência de União por Microtração - μ TBS - Espécimes submetidos ao protocolo de irradiação de preparo cavitário da superfície dentinária

Para o ensaio de μ TBS foram selecionados 33 dentes, que foram preparados conforme descrito no item número 4.1.3 (Figura 4.1A- 4.1F). Em seguida, foram novamente lixados com lixa de granulação #600 e limpos em cuba ultrassônica. Posteriormente, os espécimes foram randomizados em diferentes blocos de acordo com os grupos, controle e experimentais (n=11).

O grupo com os parâmetros de 200 mJ/20Hz /600 μ s (maior largura de pulso) não foi ensaiado no teste de resistência de união, pois ao realizar o ensaio de micromorfologia da interface adesiva observou-se que não havia a formação da camada híbrida adequada. Com este mesmo parâmetro, a análise da ultramorfologia (MET) mostrou uma alteração importante das fibrilas colágenas e da matriz dentinária. Desta forma, este parâmetro não foi considerado adequado para realizar preparos cavitários com finalidade restauradora.

Após o tratamento das superfícies como descrito na Figura 4.1, o sistema adesivo universal foi aplicado de acordo com as especificações do fabricante (Quadro 4.2) e em seguida a resina composta foi inserida com auxílio de uma espátula de inserção nº 01 (Duflex) sobre a superfície de dentina. A resina composta foi inserida, por meio da técnica incremental, em duas camadas de 2 mm e a uma última camada de 1 mm, perfazendo um corpo de prova de 5 mm de altura. Cada incremento foi fotoativado por 40 segundos, com fonte de luz LED (Radii Plus, SDI Limited, Bayswater, Australia) com intensidade de 600 W/cm², medido pelo radiômetro.

Após 24 h de armazenamento em água destilada, os espécimes foram fixados a um dispositivo adaptado ao suporte da máquina de corte (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Buff, IL, EUA), de maneira que o dente ficasse paralelo ao disco. Inicialmente, o espécime foi seccionado com auxílio de um disco diamantado em planos paralelos, seguindo o longo eixo do dente. Posteriormente, cortes sequenciais, perpendiculares aos primeiros foram feitos, sob refrigeração constante, obtendo-se corpos de prova em forma de palito, com área de secção transversal de aproximadamente 1mm².

Os palitos das extremidades foram excluídos, sendo selecionados apenas os palitos centrais de cada grupo experimental. Em seguida, os palitos centrais foram observados em lupa estereoscópica com 50X de aumento (MiniView UBS Digital Microscope, Chinavision Wholesale, Guangdong, CN) para averiguar se a área de adesão encontrava-se perpendicular ao longo eixo do corpo-de-prova e se os mesmos tinham proporcionalidade em sua composição; caso contrário, o palito foi descartado. Os palitos selecionados foram divididos de forma que metade das amostras foi imediatamente tracionado, descrito detalhadamente a seguir, e a outra metade foi armazenada em saliva artificial, a 37°C, durante 1 ano para a análise longitudinal (Pashley et al., 2004). Ressalta-se que a saliva artificial foi trocada a cada 14 dias.

Os palitos selecionados foram posicionados no dispositivo Jig de Geraldeli de forma que a área de união resina/dentina ficasse centralmente posicionada. Os corpos-de-prova foram fixos com cola de cianocrilato gel (Locite 454, Henkel Ltda., Itapevi, SP, Brasil). Este conjunto foi levado à máquina de ensaio universal Instron 5942 (Instron Co, Canton, MA, EUA) para a realização dos testes de microtração em tracionamento a uma velocidade de 0,5 mm/min., até que ocorresse a fratura dos palitos, registrando assim um determinado valor em Newton (N). Após esta etapa, os corpos-de-prova fraturados foram analisados em lupa estereoscópica digital (MiniView UBS Digital Microscope, Chinavision Wholesale, Guangdong, CN) com 50x de aumento para que fosse feita a classificação quanto ao tipo de fratura. As fraturas foram classificadas da mesma maneira como descrito no ensaio de microcisalhamento.

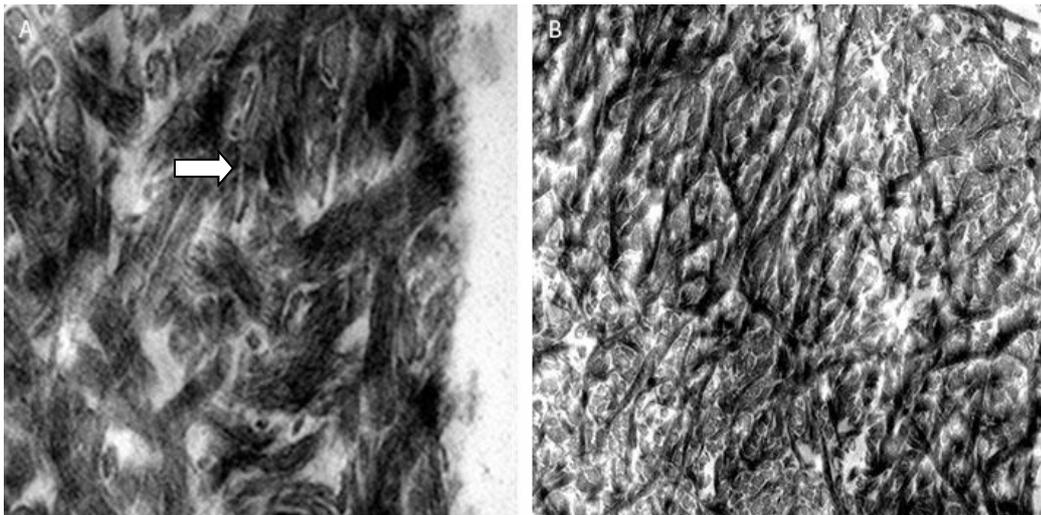
Os valores de resistência adesiva foram emitidos em N e transformados em MPa, dividindo-se a força atingida no momento da fratura (N) pela área da interface adesiva (mm²). Para o cálculo da área, o diâmetro da interface adesiva foi medido previamente ao teste de microtração com auxílio um paquímetro digital (Paquímetro Eletrônico Digital, Mitutoyo Sul America, Suzano, SP, Brasil). As ocorrências de fraturas durante o processamento das amostras, ou seja, antes do teste de microtração, foram consideradas como falhas pré-teste. Tais falhas não foram consideradas na análise estatística do grupo ao qual pertenciam.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As micrografias obtidas com o grupo controle mostraram a presença de uma matriz orgânica íntegra em toda a extensão, com a presença de fibrilas colágenas organizadas (seta branca) e separadas pelo espaço interfibrilar. Todas as fibrilas colágenas exibem o típico padrão de bandamento colágeno como pode ser observado na figura 5.1 (A e B).

Figura 5.1- Micrografia da superfície dentinária sem irradiação, controle (A- aumento de 100.000x; B - aumento de 30.000x)



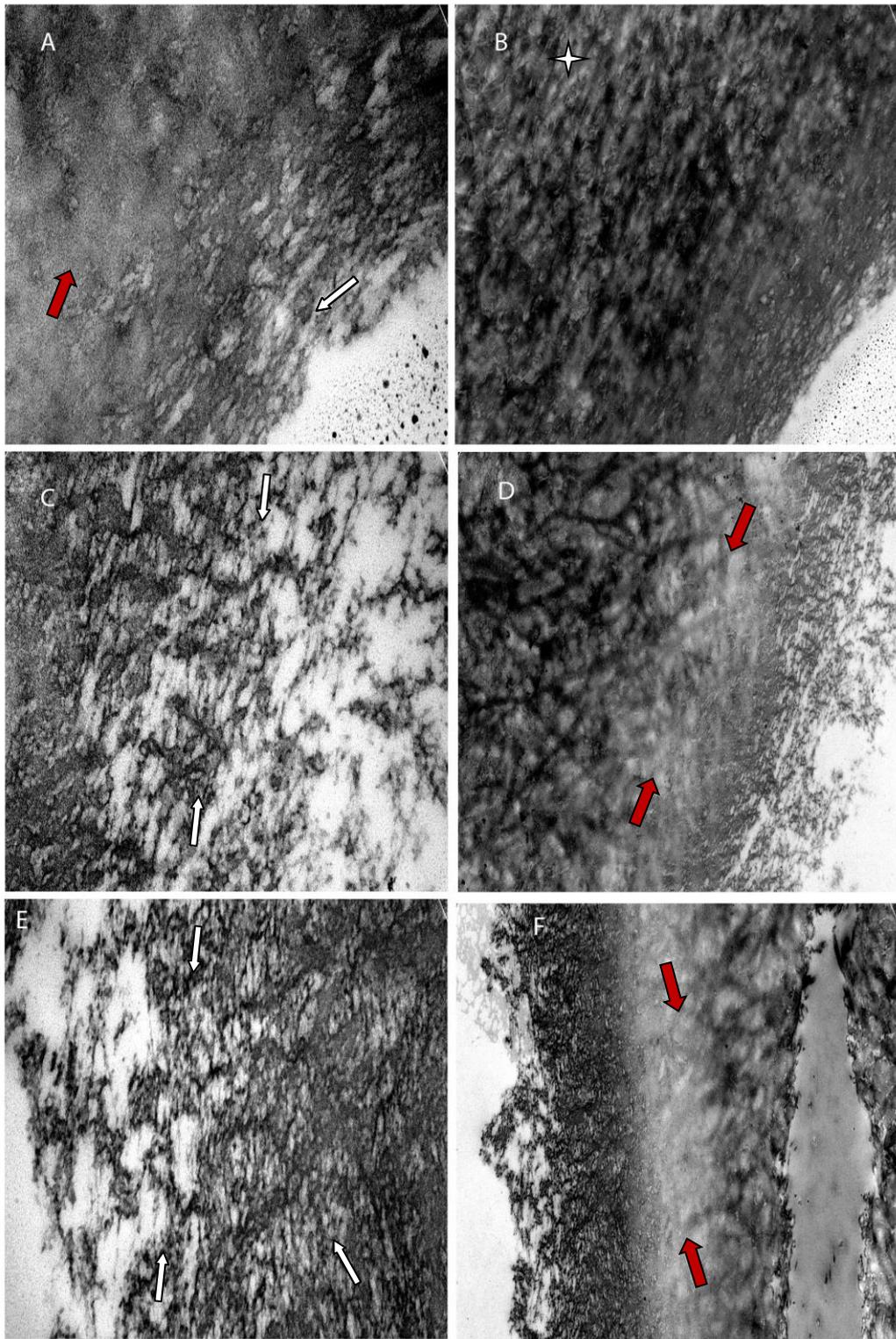
Fonte: a autora.

Ao analisar o protocolo de preparo cavitário (200 mJ/20 Hz), as micrografias da dentina irradiada com a largura de pulso de 50 μ s revelaram a presença de uma fina camada de carbonização na porção mais superficial da região irradiada (seta branca), seguida por uma zona mais extensa de fusão e derretimento das fibrilas colágenas com a matriz dentinária (seta vermelha). Essa zona alterada apresenta uma profundidade média de 4,5 μ m de espessura (figura 5.2 A e B). Gradativamente, ao longo desta camada, as alterações transformam-se em uma região íntegra com a presença de uma matriz orgânica organizadas com fibrilas

colágenas íntegras, sendo possível constatar o denso bandejamento colágeno na maioria das fibrilas colágenas (estrela).

Entretanto, ao analisar o emprego das maiores larguras de pulso, 300 e 600 μs , no mesmo protocolo de preparo cavitário, a extensão das alterações é maior, na ordem de 5,11 μm de espessura no grupo irradiado com 300 μs de largura de pulso (figura 5.2 C e D) e 6 μm de espessura no grupo com 600 μs (figura 5.2 E e F). Nestes grupos, a camada superficial é composta por multiplacas de material carbonizado (seta branca), mais denso e com aspecto granular que são separadas por microfissuras da camada subsuperficial. Essa camada mais porosa com a presença de microfissuras é mais evidente nos espécimes em que a maior largura de pulso foi utilizada, 600 μs . Imediatamente abaixo, a matriz orgânica e as fibrilas colágenas encontram-se fundidas, caracterizado pela perda do espaço interfibrilar (seta vermelha). Desta forma, identifica-se uma relação direta entre profundidade da camada alterada da dentina irradiada e o aumento da largura de pulso.

Figura 5. 2- Micrografia da superfície dentinária irradiada com o laser de Er:YAG no protocolo de preparo cavitário. (A, B, C – aumento de 100.000X; D, E, F – aumento de 30.000X)



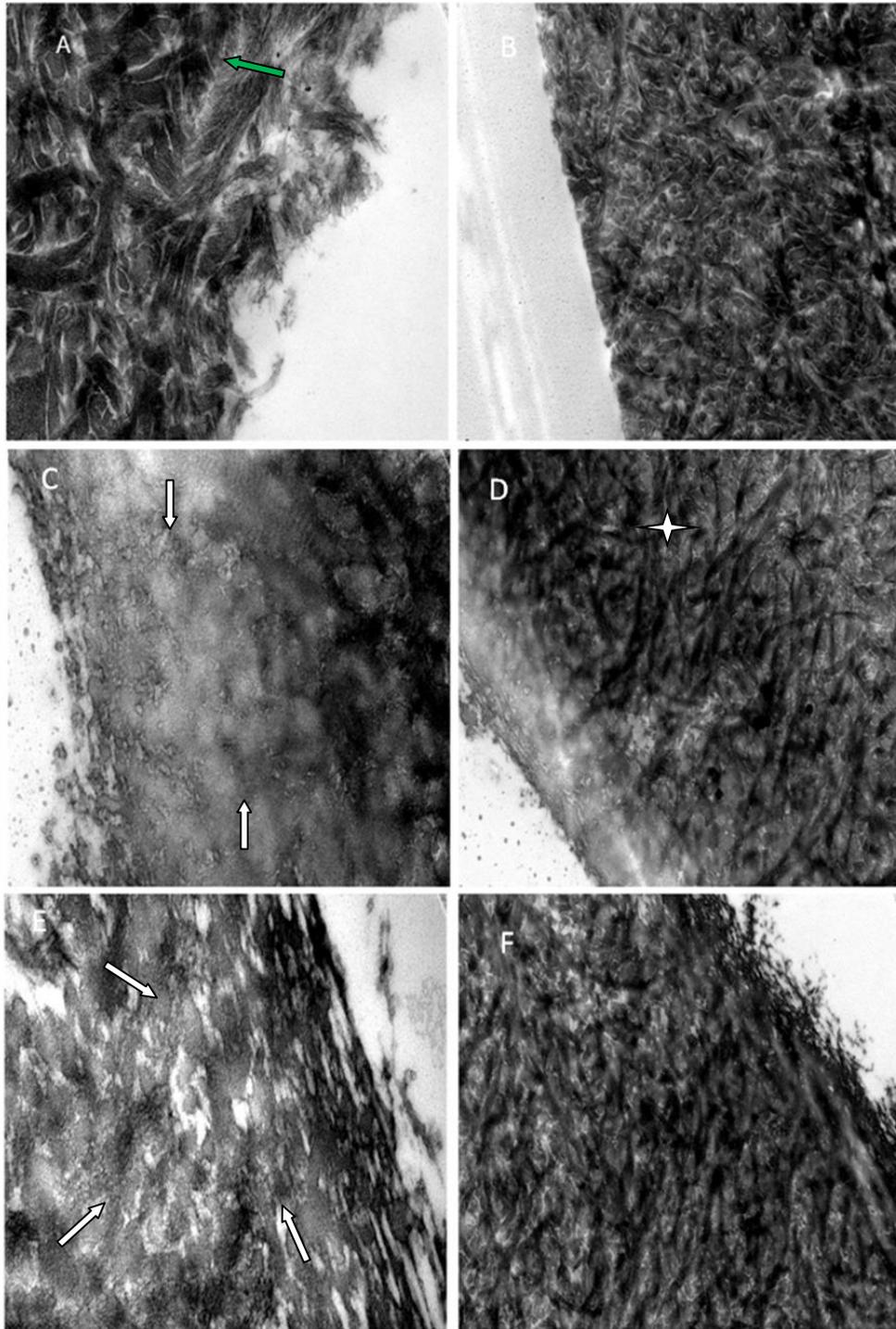
Fonte: a autora.

Ao analisar as micrografias do protocolo de pré-tratamento, com largura de pulso na ordem de 50 μs , observa-se uma região íntegra (Figura 5.3 A e B), sem sinais de carbonização ou derretimento, com a presença de fibrilas colágenas intactas (seta verde), assim como a presença de uma matriz extracelular inalterada e organizada, exibindo o bandejamento colágeno na maioria das fibrilas colágenas.

No grupo de pré-tratamento em que foi utilizada uma maior largura de pulso, da ordem de 300 μs (Figura 5.3 C e D) é possível observar que a superfície mais externa é composta por uma estreita faixa de carbonização, seguida por uma zona difusa onde a matriz orgânica e as fibrilas colágenas estão fundidas (seta branca). Após essa zona de alteração com profundidade média de 1,67 μm espessura, segue-se uma região inalterada de dentina (estrela branca).

Ao aumentar a largura de pulso para 600 μs (Figura 5.3 E e F), no mesmo protocolo de pré-tratamento, a porção superficial da dentina irradiada apresenta uma faixa de carbonização assim como na subsuperfície, uma extensa zona fusionada (seta branca). A profundidade média dessas alterações é de 2,33 μm de espessura. Nessas camadas não é possível identificar o espaço interfibrilar, onde as fibrilas colágenas foram parcialmente desnaturadas.

Figura 5.3- Micrografia da superfície dentinária irradiada com o laser de Er:YAG no protocolo de pré-tratamento. (A, B, C – aumento de 100.000X; D, E, F – aumento de 30.000X)



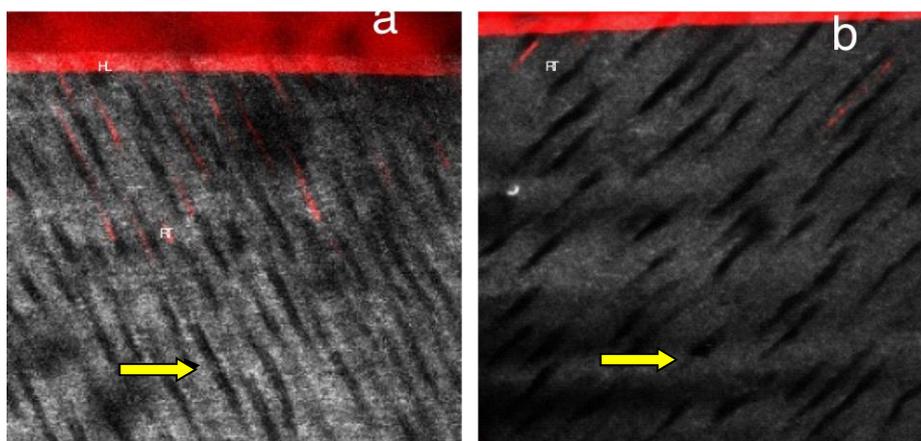
Fonte: a autora.

5.2 MICROMORFOLOGIA DA INTERFACE ADESIVA E SEGUNDA GERAÇÃO HARMÔNICA (SGH)

O corante Rodamina B empregado no sistema adesivo universal na concentração de 0,0016 mg/ml permitiu uma boa resolução e contraste das imagens, possibilitando a visualização de componentes importantes do complexo dente/restauração, tais como camada de adesivo, camada híbrida e *tags* resinosos. As regiões cinza, branca e preta das mesmas imagens referem-se aos resultados da SGH, em que o preto representa os túbulos dentinários; cinza, a dentina intertubular e branco indica a presença de fibrilas colágenas. As imagens mais representativas de cada grupo experimental, obtidas após 24 h e 1 ano, estão ilustradas e detalhadamente descritas nas figuras 5.4, 5.5 e 5.6.

Ao analisar o grupo controle, sem irradiação (Figura 5.4 A e B) a camada híbrida (HL) apresenta-se nítida em todas as imagens, com um aspecto uniforme e homogêneo por toda extensão. É observada a presença de poucos e esparsos *tags* de resina (RT), com formato cilíndrico e fino. O sinal intenso da SGH ilustra a presença de túbulos dentinários organizados e a matriz orgânica inalterada abaixo da zona da camada híbrida.

Figura 5.4 - Interface adesiva criada pelo sistema adesivo Universal com o corante Rodamina B (vermelho) aplicado na dentina sem irradiação, utilizado no formato autocondicionante. Grupo controle (a – 24 h; b – 1 ano de armazenamento em saliva artificial). HL - camada híbrida; RT – *resin tag* (*tag* de resina). Imagem da SGH – fibrilas de colágeno (seta branca); túbulo dentinário (seta amarela)

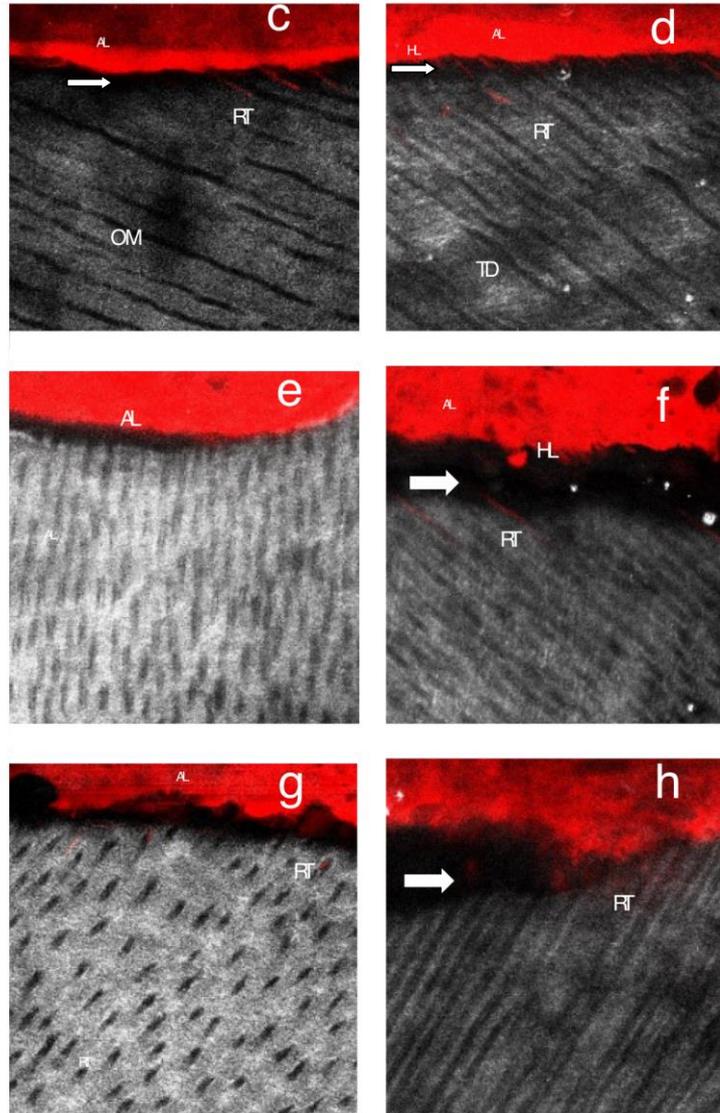


Fonte: a autora.

Ao analisar as imagens dos grupos preparados com o protocolo de preparo cavitário, observamos a presença da camada de adesivo (AL) irregular em todas as imagens (Figura 5.5C - H) assim como um sombreamento da dentina subjacente decorrente possivelmente do calor gerado durante a irradiação com o laser. No grupo em que foi utilizada a menor largura de pulso (50 μ s) (Figura 5.5 C e D), observa-se a presença de poucos *tags* resinosos (RT), curtos e bem finos. A camada híbrida, apresenta-se irregular por toda extensão e imediatamente abaixo, notamos um sombreamento preto da dentina, representado pelo fraco sinal emitido pela SGH. Este sombreamento preto apresenta o mesmo formato do pulso do laser (Figura 5.5 C-D - seta branca), indicando a deterioração da dentina adjacente à irradiação. Essa deterioração da dentina é proveniente possivelmente do calor gerado durante a irradiação. Nesta região não é possível observar a formação da camada híbrida. Ao analisar as imagens em que a largura de pulso de 300 μ s foi utilizada, (Figura 5.5 E - F), nota-se uma quantidade ainda menor de *tags* de resina (RT), sendo estes com aspectos irregulares. A camada de adesivo apresenta-se irregular, acompanhando a superfície rugosa gerada pelo laser. O fraco sinal de SGH indica um maior espaço preto que separa a camada de adesivo/camada híbrida da dentina subjacente, indicando degradação da dentina irradiada, onde não é observada a matriz orgânica nem as fibrilas colágenas. Já as imagens obtidas com os espécimes submetidos à irradiação com a maior largura de pulso (Figura 5.5 G e H) revelam uma camada híbrida irregular, seguindo a orientação do pulso do laser e, imediatamente abaixo, seguida por um grande sombreamento preto, com poucos e esparsos *tags* de resina. Quando comparado às menores larguras de pulso (50 μ s e 300 μ s), os *tags* resinosos (quando presentes) são mais curtos. Adicionalmente, nota-se uma grande deterioração da dentina subjacente (seta branca) causada pelo laser.

Após um ano de envelhecimento, nenhuma alteração significativa foi observada.

Figura 5.5 - Interface adesiva criada pelo sistema adesivo Universal com Rodamina B (vermelho) utilizado no formato autocondicionante aplicado sobre a dentina irradiada com o protocolo de preparo cavitário (200 mJ/ 20 Hz) variando a largura de pulso em 50 μ s (c - 24 h; d - 1 ano); 300 μ s (e - 24 h; f - 1 ano); 600 μ s (g - 24h; h - 1 ano). HL- camada híbrida; RT- *tag* de resina; AL – camada de adesivo. Imagem da SGH – OM - matriz orgânica; fibrilas de colágeno (linha branca); deterioração da matriz orgânica (seta branca)



Fonte: a autora.

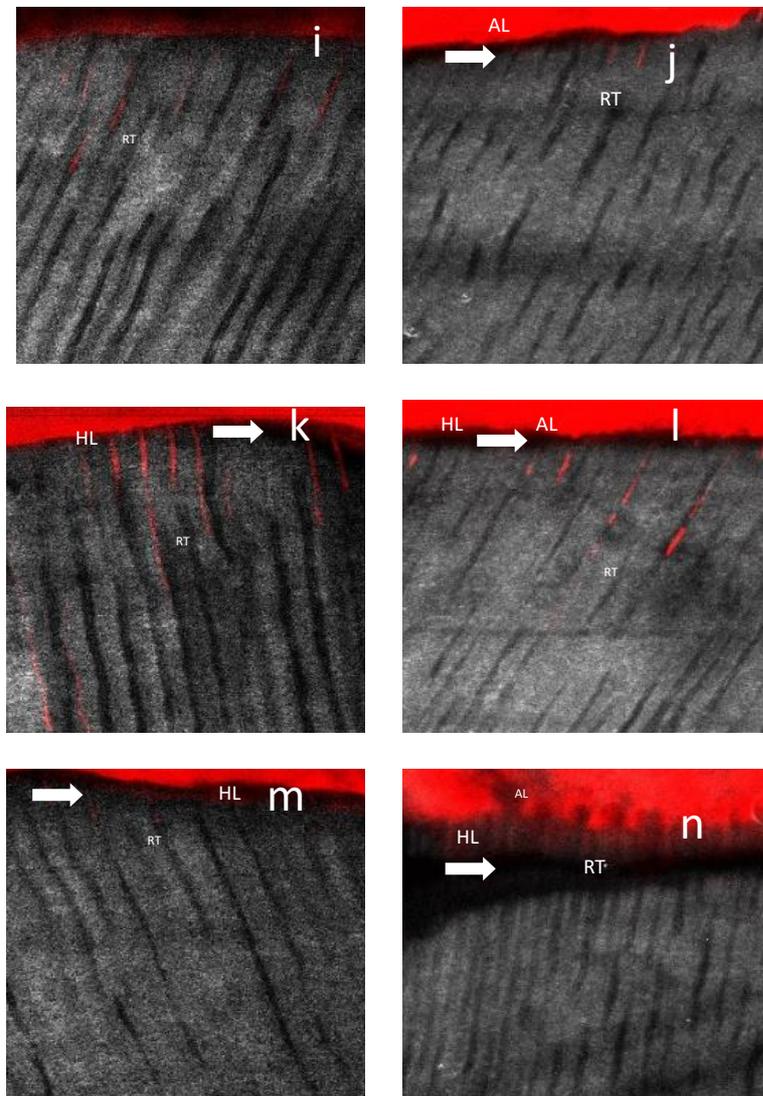
As imagens obtidas com o protocolo de pré-tratamento dentinário (figura 5.6) revelaram a presença de uma camada de adesivo (AL) em todas as imagens assim como a presença de uma fina camada híbrida (HL). As imagens obtidas com a menor largura de pulso (50 μ s - Figura 5.6 L e J) apresentam uma maior quantidade de *tags* de resina (RT), embora esses *tags* sejam bem finos e compridos, com aspecto cilíndrico e fino, assim como os encontrados no grupo controle (Figura 5.6 A). Da mesma forma que no protocolo de preparo

cavitário anteriormente descrito, o protocolo de pré-tratamento também alterou a dentina subjacente, embora em menor intensidade quando comparada com o protocolo de preparo cavitário. Essa alteração é caracterizada por uma faixa enegrecida, provavelmente decorrente do calor gerado pela irradiação.

Ao aumentar a largura de pulso para 300 μs (Figura 5.6 K e L), a quantidade de *tags* resinosos é menor, contudo, apresentam as mesmas características dos *tags* encontrados na menor largura de pulso (50 μs). Imediatamente abaixo da camada de adesivo (AL) é possível observar a presença de um escurecimento na dentina adjacente (Figura 5.6 K e L - seta branca) à irradiação em todas as imagens, característica esta que não foi observada no grupo controle (Figura 5.6 A e B). Esse escurecimento é a alteração da dentina provavelmente decorrente do calor gerado pela irradiação. Ao analisar a largura de pulso de 600 μs (Figura 5.6 M e N), os *tags* de resina estão presentes, porém em menor quantidade. Adicionalmente, são finos e curtos quando comparados às larguras de pulso de 50 e 300 μs . Da mesma forma, uma alteração da dentina subjacente (Figura 5.6 M e N - seta branca) à superfície irradiada é observada nos grupo irradiado com 600 μs .

Assim, é possível identificar uma crescente alteração da dentina subjacente com o aumento da largura de pulso. Esta afirmativa é válida tanto para os grupos tratados com o protocolo de preparo cavitário assim como nos grupos tratados com o protocolo de pré-tratamento. Adicionalmente, a camada híbrida formada nos grupos irradiados foi irregular, com pequena formação de *tags* resinosos, indicando não ser uma superfície muito favorável à formação da camada híbrida, provavelmente devido à alteração observada nas fibrilas colágenas. Após um ano de armazenamento em saliva, a degradação térmica das fibrilas colágenas e a interface adesiva foram acentuadas.

Figura 5.6 -Interface adesiva criada pelo sistema adesivo Universal com Rodamina B utilizado no formato autocondicionante aplicado sobre a dentina irradiada com o protocolo de pré- tratamento (80 mJ/ 2Hz) variando a largura de pulso em 50 μ s (i - 24 h; j - 1 ano); 300 μ s (k - 24 h; l - 1 ano); 600 μ s (m - 24 h; n - 1 ano). HL- camada híbrida; RT- *tag* de resina; AL – camada de adesivo. Imagem da SGH – fibrilas de colágeno (linha branca); deterioração da matriz orgânica (seta branca)



Fonte: a autora.

5.3 ENSAIO DE MICROCISALHAMENTO - μ SBS - ESPÉCIMES SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DENTINÁRIA

Os dados foram primeiramente avaliados quanto à normalidade na distribuição dos erros amostrais e quanto à homogeneidade das variâncias por meio do teste de aderência à curva normal e teste de Kolmogorov- Sminov.

Tendo em vista que a distribuição amostral testada foi normal, utilizou-se o teste ANOVA dois fatores (tratamento de superfície e tempo) e o teste de Tukey de comparações múltiplas para que possíveis diferenças estatísticas fossem encontradas entre os grupos experimentais testados, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada no programa Minitab®.

Tabela 5.1- Resultado do teste de microcisalhamento (μ SBS) em 24 h e após 1 ano de estocagem

Grupos	24h	12 meses
Controle	26,17 (3,78) A,a	24,97 (4,70) B,a
80 mJ/ 2 Hz/ 50 μs	22,14 (2,86) B,a	22,85 (2,95) B,a
80 mJ/ 2 Hz/ 300 μs	21,24 (3,03) B,a	22,12 (2,98) B,a
80 mJ/ 2 Hz/ 600 μs	20,61 (1,85) B,a	23,00 (2,94) B,a

Fonte: a autora

*Letras maiúsculas iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre linha ($p < 0,05$).

*Letras minúsculas iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre colunas ($p < 0,05$).

Análise dos dados revelou que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao fator tratamento ($p < 0,05$), embora não houve diferença estatística em relação ao fator tempo ($p > 0,05$) (Tabela 5.1). Considerando os efeitos do pré-tratamento dentinário com o laser de Er:YAG na adesão, a análise estatística mostrou que, em 24 h, todos os grupos experimentais apresentaram menores valores de resistência de união quando comparados ao grupo controle. No mesmo período, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos irradiados com o laser de Er:YAG empregando diferentes larguras de pulso.

Após 1 ano de armazenamento em saliva artificial, não houve diferença significativa dos valores de RU quando comparados aos valores obtidos em 24h em todos os grupos experimentais. A análise do padrão de fratura do grupo controle revelou exclusivamente fraturas do tipo mista, em ambos os tempos de análise, 24 h e 1 ano de armazenamento. Do mesmo modo, o grupo irradiado com a duração de pulso de 50 μ s exibiu o mesmo padrão de fratura do grupo controle, nos dois tempos de análise. Nos grupos irradiados com a largura de

pulso de 300 μ s e 600 μ s, houve predominância de fraturas do tipo mista (90% e 95%) respectivamente.

5.4 ENSAIO DE MICROTRAÇÃO - μ TBS - ESPÉCIMES SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO DE PREPARO CAVITÁRIO DA SUPERFÍCIE DENTINÁRIA

Os dados foram primeiramente avaliados quanto à normalidade na distribuição dos erros amostrais e quanto à homogeneidade das variâncias por meio do teste de aderência à curva normal e teste de Kolmogorov-Sminov.

Tendo em vista que a distribuição amostral testada foi normal, utilizou-se o teste ANOVA dois fatores (tratamento de superfície e tempo) e o teste de Tukey de comparações múltiplas para que possíveis diferenças estatisticamente fossem encontradas entre os grupos experimentais testados, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada no programa Minitab®.

Análise dos dados revelou que houve diferença estatisticamente significativa em relação aos fatores “tempo” e “tratamento” ($p < 0,05$) (Tabela 5.2). O grupo controle revelou valores mais altos de resistência de união em 24 h de análise, com diferença estatisticamente significativa quando comparado aos grupos irradiados. Não houve diferença significativa entre os grupos irradiados quando comparados entre si ($p > 0,05$).

Após 1 ano de armazenamento em saliva artificial, observa-se uma redução de valores de resistência de união em todos os grupos investigados. O grupo controle apresenta valores mais altos de resistência de união com diferença significativa quando comparado aos grupos irradiados ($p < 0,05$). Os grupos irradiados quando comparados, não apresentaram diferença significativa.

A análise do padrão de fratura do grupo controle revela uma predominância de fratura do tipo adesiva (43%), seguida de mista (42%), em 24h. Após um ano de armazenamento em saliva artificial, manteve-se uma predominância do padrão de fratura adesiva (45%) seguida pela coesiva (32%).

Nos grupos irradiados com durações de pulso de 50 e 300 μ s, a maior predominância de fratura encontrada foi do tipo misto (89%). Este mesmo padrão foi observado após 1 ano de armazenamento em saliva artificial.

Tabela 5.2-Resultado do teste de microtração (μ TBS) em 24 h e após 1 ano de estocagem

Grupos	N	24h	12meses
Controle	11	51.14 (7.15) A,a	34.73 (13.46) C,c
200 mJ/ 20 Hz/ 50 μs	11	29.17(7.08) B,b	13.55 (6.48) D,d
200 mJ/ 20 Hz/ 300 μs	11	23.52(4.5) B,b	11.22 (3.31) D,d

Fonte: a autora

* Letras maiúsculas iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre linha ($p < 0.05$).

* Letras minúsculas iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre colunas ($p < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

O laser Er:YAG é considerado uma ferramenta importante na Odontologia Minimamente invasiva para realizar preparos cavitários (Do Amaral et al., 2008) e para pré-tratar a dentina prévio aos procedimentos restauradores adesivos. Desta maneira, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de estabelecer protocolos adequados e seguros, visto que mudanças nos parâmetros tais como taxa de repetição, tempo de irradiação, distância focal, densidade de energia e refrigeração influenciam significativamente nas características morfológicas do tecido irradiado e, conseqüentemente nas características da adesão neste substrato.

Desta forma, foi realizado um levantamento bibliográfico em busca dos protocolos mais utilizados para a irradiação das superfícies dentinárias. Foi observado, por meio de microscopias, que o emprego de energias iguais ou superiores a 300 mJ para preparo cavitário em dentina, produziram uma superfície com sinais de vitrificação e trincas, sugerindo ser este um parâmetro alto que pode resultar em recristalinização dos cristais de apatita e formação de uma fase adicional de fosfato de cálcio (Delmè et al., 2006; Delmè; De Moor, 2007). Assim, o emprego de energias mais baixas é mais eficiente e minimiza as alterações na superfície dentinária irradiada (Freitas et al., 2007). Por conseguinte, optou-se por utilizar uma energia de 200 mJ, sendo este o parâmetro mais encontrado na literatura consultada (Chousterman et al., 2010; Bahrami et al., 2011; Raucci-Neto et al., 2011; Trevelin et al., 2015; Trevelin et al., 2018). Para o pré-tratamento da dentina são indicados parâmetros subablasivos, ou seja, parâmetros mais baixos que aqueles indicados para preparo cavitário. Nesta circunstância, foi observado que energia de 80 mJ é a mais utilizada na literatura consultada (Sassi et al., 2004; De Moor; Delmè, 2009; Bahrami et al., 2011; Firat et al., 2012; Baraba et al., 2013; Trevelin et al., 2015; Trevelin et al., 2018).

O processo de ablação é caracterizado pela absorção da radiação incidente na dentina, causando o aumento da pressão e a vaporização da água com sucessivas microexplosões e ejeções das partículas orgânicas e inorgânicas do substrato (Bornstein, 2003; Gimbel, 2000). Entretanto, nem todo o material ablacionado é ejetado da área irradiada. Assim, alguns minerais derretidos e desidratados que estão fracamente aderidos à superfície, podem ser recondensados, dificultando sua remoção e reduzindo à ablação dos pulsos subsequentes (Kuscer; Diaci, 2013). Esse material recondensado que permanece na superfície do tecido transfere a energia absorvida na forma de calor, reaquecendo o tecido (Fried et al., 2001).

Embora a irradiação seja considerada um procedimento seguro, por gerar mínimo dano térmico à polpa e aos tecidos circunvizinhos (Hossain et al., 1999; Hossain et al., 2003; Armengol et al., 2002), foi observado que o calor residual proveniente da transferência de energia durante o processo de ablação permanece na superfície e é subsequentemente conduzido para dentro do tecido (Hossain et al., 1999; Fried et al., 2001) alterando as fibrilas colágenas.

Em nossos estudos os dados obtidos da SHG revelaram que a irradiação com laser altera a matriz orgânica abaixo da superfície irradiada, representada pelo fraco sinal emitido. Essas alterações são caracterizadas por um sombreamento enegrecido abaixo da dentina irradiada indicando a degradação/ausência da matriz orgânica e das fibrilas colágenas. Essas alterações são mais evidentes no protocolo de preparo cavitário, em que o sombreamento abaixo da dentina irradiada apresenta o mesmo formato do pulso do laser. Esta deterioração da matriz orgânica (região enegrecida) aumenta conforme o aumento da largura de pulso utilizada. Correlacionando as imagens da SHG com as imagens de transmissão (TEM), a deterioração da matriz orgânica pode ser representada pela presença de placas de material amorfo geradas pelo aquecimento induzido pelo laser (Trevelin et al., 2018) decorrente dos altos parâmetros empregados no protocolo de preparo cavitário que resultaram em fraco sinal conforme observado em SHG.

Da mesma forma, ao analisar o protocolo de pré-tratamento, observamos uma faixa enegrecida abaixo da superfície irradiada indicando a deterioração dos componentes orgânicos da dentina. Embora as alterações geradas na matriz orgânica e nas fibrilas colágenas são menos intensas no protocolo de pré-tratamento quando comparadas ao protocolo de preparo cavitário, estas alterações foram suficientes para afetar negativamente os valores resistência de união, da mesma maneira como ocorrido no protocolo de preparo cavitário. Esses achados corroboram com estudos anteriores que mostraram que a irradiação com o laser Er: YAG produz mudanças físicas e químicas na composição e conformação da matriz orgânica da dentina, o que resulta em desnaturação da dentina e a degradação parcial do colágeno (Giachetti et al., 2004; Jiang et al., 2013). Os resultados deste estudo agregam valor aos achados de Trevelin et al. (2018), que demonstraram que as alterações orgânicas da dentina e a desnaturação das fibrilas colágenas são proporcionais aos valores de frequência, energia e a largura de pulso utilizada, visto que as maiores profundidades de alterações orgânicas são aquelas em altos parâmetros foram empregados.

O armazenamento em saliva artificial por um ano acentuou as alterações na matriz orgânica já existentes, representada pelo aumento do sombreamento abaixo da superfície

irradiada, uma vez que as fibrilas colágenas deterioradas pelo calor residual proveniente da irradiação, não permitiram a completa difusão dos monômeros resinosos durante a formação da camada híbrida. Desta forma, a degradação hidrolítica das interfaces adesivas foi facilitada como resultado da deterioração dos componentes orgânicos em conjunto com os componentes resinosos, favorecendo a degradação das camadas.

Apesar do uso do laser para o preparo cavitário atingir o objetivo da odontologia minimamente invasiva (Brulat et al., 2009), os resultados obtidos com o protocolo de preparo de preparo cavitário prejudicaram a formação de uma zona de hibridação consistente, como demonstrado nas imagens de micro-morfologia da interface adesiva, na qual mostra a formação de uma camada adesiva espessa e uma camada híbrida irregular que afetou negativamente os valores de resistência de união em 24h e após um ano de armazenamento de saliva quando comparado com a técnica convencional. Da mesma forma, a superfície rugosa criada após irradiação com o protocolo de preparo cavitário impediu a formação de camada híbrida homogênea, devido a uma distribuição desigual do estresse na interface adesivo-dentina (Cardoso et al., 2008). Ainda neste contexto, a grande quantidade de adesivo preso nas irregularidades criadas pela irradiação pode comprometer a evaporação do solvente e criar uma região não homogênea e com porosidades, o que pode aumentar a mobilidade das cadeias de polímeros, tornando os polímeros mais suscetíveis à sorção de água (Ito et al., 2005). Como resultado, ocorre uma degradação acelerada da adesão com uma propriedade mecânica enfraquecida, o que afeta de forma significativa a estabilidade da interface adesiva ao longo do tempo (Ceballos et al., 2002).

É importante ressaltar que o grupo controle do protocolo de preparo cavitário também sofreu uma redução dos valores de resistência de união após um ano de armazenamento em saliva artificial. A queda na resistência de união observada pode ser atribuída à formulação adesiva e/ou a ativação das enzimas metaloproteoinases (MMPs) endógenas presentes na dentina.

O sistema adesivo utilizado contém uma alta concentração de monómeros hidrofílicos que são altamente propensos à sorção de água (Malacarne et al., 2006) mesmo após a evaporação do solvente. A água remanescente pode reduzir o grau de conversão dos monômeros resinosos interferindo na polimerização do sistema adesivo e ainda, os monômeros não polimerizados são mais susceptíveis ao processo de lixiviação (Ito et al., 2005). Desta maneira, a interface adesiva parcialmente polimerizada comporta-se como uma membrana semipermeável, permitindo o movimento dos fluidos, podendo acelerar a absorção

de água e comprometer a integridade da união adesivo-resina ao longo do tempo (Cadenaro et al., 2009; Reis et al., 2007; Malacarne-Zanon et al., 2009; Carvalho et al., 2014).

As MMPs são um grupo de endopeptidases cálcio-zinco dependentes que permanecem presas na matriz dentinária durante o desenvolvimento dentário (Martin-de Las Heras et al., 2000) e quando ativadas, contribuem para a degradação precoce das ligações dentina-resina. Inicialmente, as MMPs são secretadas como pró-enzimas e tornam-se proteinases ativas quando expostas a uma condição de baixo pH (Tay et al., 2006). Assim sendo, os monômeros resinosos acídicos ativam formas latentes das MMPs pelo mecanismo de “cysteine-switch”, expondo os domínios catalíticos dessas enzimas que eram bloqueadas pelos pro-peptídeos (Carrilho et al., 2007; Breschi et al., 2010; Tjaderhane et al., 2013). Dessa forma, a atividade colagenolítica inicia nas regiões onde as fibrilas colágenas foram expostas na camada híbrida e não foram completamente encapsuladas pelos monômeros resinosos do sistema adesivo (Pashley et al., 2004; Tay et al., 2006). Ainda neste cenário, o baixo pH dos sistemas adesivos também pode induzir a ativação de cisteína-catepsinas da dentina, também envolvidas no processo de degradação da camada híbrida ao longo do tempo e no aumento da atividade gelatinolítica da dentina (Tersariol et al., 2010).

Os resultados de resistência de união obtidos com o protocolo de pré-tratamento também foram inferiores quando comparado ao grupo controle. Da mesma forma, os valores mais baixos de resistência de união obtidos com os grupos irradiados no ensaio de microcisalhamento podem ser explicados pela formação de uma camada laser modificada (Ceballos et al., 2002) representada por fibrilas colágenas desnaturadas com perda do bandeamento do colágeno (Ceballos et al., 2002; Schein et al., 2003). A fusão das fibrilas desnaturadas remanescentes resulta na perda do espaço interfibrilar que restringe penetração e permeabilidade dos monômeros resinosos do sistema adesivo, comprometendo a integridade da interface adesiva e gerando baixos valores de resistência de união (Ceballos et al., 2002; Giachetti et al., 2004; Jiang et al., 2013). Adicionalmente a este fato, é possível que os ácidos fracos presentes no sistema de autocondicionante não possam modificar suficientemente a superfície laser-modificada para promover a penetração do adesivo (De Oliveira et al., 2010) o que também contribuiu para a redução da resistência adesiva na dentina.

Ao analisar a menor largura de pulso empregada no protocolo de pré-tratamento observamos pequenas alterações na ultraestrutura assim como na matriz orgânica da dentina irradiada. Diversamente, ao empregar pulsos mais longos, a duração do pulso é maior que o tempo de relaxamento térmico requerido pelo tecido (Fried et al., 2001). Com isso, o tempo de interação da energia emitida com o tecido alvo é maior, permitindo que uma parte da

energia absorvida se difunda para regiões adjacentes e sítios mais distantes do tecido alvo irradiado. Como consequência, o calor residual acumulado nos tecidos e o aumento da temperatura são responsáveis pela formação de camadas alteradas com a degradação das fibrilas colágenas em diferentes profundidades da dentina (Trevelin et al., 2018). Além disso, as propriedades mecânicas e as análises moleculares mostraram a ocorrência de uma redução dos componentes orgânicos quando a dentina é irradiada com o laser de Er:YAG (He et al., 2017).

O maior componente da matriz orgânica da dentina são as fibrilas colágenas do tipo I, que fornecem viscoelasticidade ao tecido, formando uma estrutura rígida e forte (Butler, 1995; Cheng et al., 1996; Bertassoni et al., 2012). O calor gerado durante a irradiação promoveu a desnaturação térmica do colágeno, responsável por quebrar as ligações intramoleculares de hidrogênio que estabilizam as três cadeias de polipeptídeos da tripla estrutura helicoidal, resultando em uma transformação irreversível da molécula do colágeno em uma espiral. O rompimento da estrutura molecular leva ao encolhimento do colágeno (Wright; Humphrey, 2002). Apesar da degradação do colágeno ser em nível molecular (Sun et al., 2006), o colágeno tem um papel importante na estrutura arquitetônica da dentina e está intimamente relacionado com a formação e estabilidade da camada híbrida, estrutura formada pelo entrelaçamento das fibrilas colágenas com os monômeros resinosos do sistema adesivo promovendo uma retenção micromecânica (Bedran –Russo et al., 2010).

Na atualidade, nenhum dos sistemas adesivos ou técnica é capaz de produzir uma interface que seja absolutamente resistente à degradação, mas, esforços são dedicados a melhorar a durabilidade das restaurações (Van Meerbeek et al., 2010).

Do exposto, com base nos resultados obtidos nas metodologias testadas, o uso do laser de Er:YAG, independente do protocolo e da largura temporal de pulso utilizados, causaram alterações na micromorfologia da camada híbrida, expressa nos baixos valores de resistência de união quando comparados ao tratamento convencional, em ambos os tempos investigados. Da mesma maneira, as alterações na arquitetura do colágeno observada em microscopias eletrônicas de transmissão bem como alterações nas estruturas orgânicas detectadas pela SGH revelam claramente os danos térmicos gerados durante a irradiação da dentina com o laser de Er:YAG. Desta forma, não consideramos que o preparo cavitário, bem como o pré-tratamento dentinário com laser de Er:YAG proporciona benefícios adicionais no que se refere a adesão e sua durabilidade.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a extensa análise realizada em dentina irradiada e baseada nas limitações de um estudo *in vitro*, podemos concluir que os protocolos de irradiação aqui propostos, não melhorou à adesão a dentina quando comparado ao método operatório tradicional. Os baixos resultados de resistência de união dos grupos irradiados são atestados pelas alterações ultraestruturais da matriz orgânica e da desnaturação das fibrilas colágenas que impediram a formação de uma zona de hibridização consistente e estável ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS¹

Akimoto N, Takamizu M, Momoi Y. 10-year clinical evaluation of a self-etching adhesive system. *Oper Dent*. 2007 Jan-Feb;32(1):3–10. doi:10.2341/06-46.

Akin GE, S Herguner-Siso, M Ozcan, O Ozel-Bektas, Akin H. Bond strengths of one-step self-etch adhesives to laser-irradiated and bur-cut dentin after water storage and thermocycling. *Photomed Laser Surg*. 2012 Apr;30(4):214-21. doi:10-1089/pho.2011.3170.

Ali A, El Deeb H, Badran O, Mobarak E. Bond durability of self-etch adhesive to ethanol-based chlorhexidine pretreated dentin after storage in artificial saliva and under intrapulpal pressure simulation. *Oper Dent*. 2013 Jul-Aug;38(4):439-46. doi: 10.2341/12-251L.

Altunsoy M, Botsali MS, Sari, Onat H. Effect of different surface treatments on the microtensile bond strength of two self-adhesive flowable composites. *Lasers Med Sci*. 2015 Aug;30(6):1667-73. doi:10.1007/s10103-014-1640-2.

Amaral R M, Ozcan LF, Valandro I, Balducci, MA Bottino. Effect of conditioning methods on the microtensile bond strength of phosphate monomer-based cement on zirconia ceramic in dry and aged conditions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Apr;85(1):1-9. doi: 10.1002/jbm.b.30908.

Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. *Lasers Surg Med*. 1996;19(2):190–200. doi: 10.1002/(SICI)1096-9101(1996)19:2<190::AID-LSM11>3.0.CO;2-B.

Aoki A, Ishikawa I, Yamada T, Otsuki M, Watanabe H, Tagami J, Ando Y, Yamamoto H. Comparison between Er:YAG laser and conventional technique for root caries treatment in vitro. *J Dent Res*. 1998 Jun; 77(6):1404–14. doi: 10.1177/00220345980770060501.

Apel C, Franzen R, Meister J, Sarrafzadegan H, Thelen S, Gutknecht N. Influence of the pulse duration of an Er: YAG laser system on the ablation threshold of dental enamel. *Lasers Med Sci*. 2002;17(4): 253–7.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Aranha ACC, Eduardo CP, Gutknecht N, Marques MM, Ramalho KM, Apel C. Analysis of the interfacial micromorphology of adhesive systems in cavities prepared with Er,Cr:YSGG, Er:YAG laser and bur. *Microsc Res Tech*. 2007 Aug;70(8):745–51. doi: 10.1002/jemt.20459.

Armengol V, Jean A, Enkel B, Assoumou M, Hamel H. Microleakage of class V composite restorations following Er:YAG and Nd:YAP laser irradiation compared to acid-etch: na in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2002;17(2):93-100. doi: 10.1007/s101030200016.

Arola DD, Reprogel RK. Tubule orientation and the fatigue strength of human dentin. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(9):2131-40. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.005.

Azevedo CS, Carneiro PMA, Aranha ACC, Francisconi-dos-Rios LF, Freitas PM, Matos AB. Long-term effect of Er:YAG laser on adhesion to caries-affected dentin. *Lasers Dent Sci*. 2018 Apr;2(2):19–28. <https://doi.org/10.1007/s41547-017-0013-0>.

Bahrami B, Askari N, Tielemans M, Heyselaer D, Lamard L, Peremans A, Nyssen-Behets C, Nammour S. Effect of low fluency dentin conditioning on tensile bond strength of composite bonded to Er:YAG laser-prepared dentin: a preliminary study. *Lasers Med Sci*. 2011 May;26(2):187-91. doi: 10.1007/s10103-010-0767-z.

Bakry AS, Nakajima M, Otsuki M, Tagami J. Effect of Er:YAG laser on dentin bonding durability under simulated pulpal pressure. *J Adhes Dent*. 2009 Oct;11(5):361-68.

Baraba A, Dukić W, Chieffi N, Ferrari M, Anić I, Miletić I. Influence of different pulse duration of Er:YAG laser based on variable square pulse technology on microtensile bond strength of a self-etch adhesive to dentin. *Photomed Laser Surg*. 2013 Mar;31(3):116-24. doi: 10.1089/pho.2012.3286.

Barceleiro MO, de Mello JB, Porto CL, Dias KR, de Miranda MS. Hybrid layer thickness and morphology: Influence of cavity preparation with air abrasion. *Gen Dent*. 2011 Nov-Dec;59(6):e242-7.

Barceleiro Mde O, de Mello JB, de Mello GS, Dias KR, de Miranda MS, Sampaio Filho HR. Hybrid layer thickness and morphology: the influence of cavity preparation with Er:YAG laser. *Oper Dent*. 2005 May-Jun;30(3):304–10.

Bedran-Russo A, Leme-Kraus AA, Vidal CMP, Teixeira EC. An overview of dental adhesives systems and the dynamics tooth-adhesive interface. *Dent Clin North Am*. 2017 Oct;61(4):713-31. doi: 10.1016/j.cden.2017.06.001. Review.

Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jul;94(1):250-5. doi: 10.1002/jbm.b.31649.

Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix – limitations of restorative dentistry on the nanometer scale. *Acta Biomater*. 2012 Jul;8(7):2419-33. doi: 10.1016/j.actbio.2012.02.022.

Bornstein ES. Why wavelength and delivery systems are the most important factors in using a dental hard-tissue laser: a literature review. *Compend Contin Educ Dent*. 2003 Nov;24(11):837-8, 841, 843 passim; quiz 848.

Boushell LW, Heymann HO, Ritter AV, Sturdevant JR, Swift Jr EJ, Wilder Jr AD, Chung Y, Lambert CA, Walter R. Six-year clinical performance of etch-and-rinse and self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2016 Sep;32(9):1065-72. doi: 10.1016/j.dental.2016.06.003.

Brandão CB, Contente MM, De Lima FA, Galo R, Corrêa-Afonso AM, Bachmann L, Borsatto MC. Thermal alteration and morphological changes of sound and demineralized primary dentin after Er:YAG laser ablation. *Microsc Res Tech* 2012;75:126–132. doi: 10.1002/jemt.21034.

Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane L, Ruggeri Jr A, Tay FR, Dorigo Ede S, Pashley DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater*. 2010 Apr;26(4):320-25. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.153.

Brulat N, Rocca JP, Leforestier E, Fiorucci G, Nammour S, Bertrand MF. Shear bond strength of self-etching adhesive systems to Er:YAG-laser-prepared dentin. *Lasers Med Sci*. 2009 Jan;24(1):53-7. doi:10.1007/s10103-007-0519-x.

Burkes EJ, Hoke J, Gomes E, Wolbarsht M. Wet versus dry enamel ablation by Er:YAG laser. *J Prosthet Dent*. 1992 Jun;67(6):847-51.

Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res*. 1995;33(1-3):59-65. Review.

Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di Lenarda R, Carrilho M, Tay FR, Pashley DH. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Dent Mater*. 2009 Jan;25(1):39-47. doi: 10.1016/j.dental.2008.05.004. Epub 2008 Jun 20.

Camerlingo C, Lepore M, Gaeta GM, Riccio R, Riccio C, De Rosa A, De Rosa M. Er:YAG laser treatments on dentine surface: micro-Raman spectroscopy and SEM analysis. *J Dent*. 2004 Jul;32(5):399–405. doi:10.1016/j.jdent.2004.01.011.

Cardoso MV, de Almeida Neves A, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, Van Meerbeek B. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J*. 2011 Jun;56 Suppl 1:31-44. doi: 10.1111/j.1834-7819.2011.01294.x. Review.

Cardoso MV, Coutinho E, Ermis RB, Poitevin A, Van Landuyt K, DeMunck J, Carvalho RC, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Influence of Er,Cr:YSGG laser treatment on the microtensile bond strength of adhesives to dentin. *J Adhes Dent*. 2008 Feb;10(1):25–33.

Carvalho A, Carrilho MRO, Rueggeberg FA, Ambrosano GMB, Giannini M. Bond strength, biaxial flexural strength and flexural modulus of dentin bonding systems exposed to water. *Int J Adhes Adhes*. 2014;49:109–114. doi:10.1016/j.ijadhadh.2013.12.017.

Carvalho RM, Manso AP, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater*. 2012 Jan;28(1):72-86. doi: 10.1016/j.dental.2011.09.011. Review.

Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007 Jun;86(6):529-33. doi: 10.1177/154405910708600608.

Ceballos L, Toledano M, Osorio R, Tay FR, Marshall GW. Bonding to Er-YAG- laser-treated dentin. *J Dent Res*. 2002 Feb;81(2):119-22.

Cecchin D, Farina AP, Vidal C, Bedran-Russo AK. A novel enamel and dentin etching protocol using α -hydroxy glycolic acid: Surface property, etching pattern, and bond strength studies. *Oper Dent*. 2018 Jan-Feb;43(1):101-10. doi: 10.2341/16-136-L.

Celik EU, Ergucu Z, Turkun LS, Turkun M. Shear bond strength of different adhesives to Er:YAG laser-prepared dentin. *J Adhes Dent*. 2006 Oct;8(5):319-25.

Cheng H, Caterson B, Neame PJ, Lester GE, Yamauchi M. Differential distribution of lumican and fibromodulin in tooth cementum. *Connect Tissue Res*. 1996;34(2):87-96.

Chousterman M, Heyselaer D, Dridi SM, Bayet F, Misset B, Lamard L, Peremans A, Nyssen-Behets C, Nammour S. Effect of acid etching duration on tensile bond strength of composite resin bonded to erbium:yttrium-aluminium-garnet laser-prepared dentine. Preliminary study. *Lasers Med Sci.* 2010 Nov;25(6):855-9. doi:10.1007/s10103-009-07119-7.

D'Alpino PH, Pereira JC, Svizer NR, Rueggerberg FA, Pashley DH. Use of fluorescent compounds in assessing bonded resin-based restorations: a literature review. *J Dent.* 2006 Oct;34(9):623-34. doi: 10.1016/j.jdent.2005.12.004.

De Moor RJ, Delmé KI. Laser-assisted cavity preparation and adhesion to Erbium-lased tooth structure: Part 1. Laser-assisted cavity preparation. *J Adhes Dent.* 2009 Dec;11(6):427-38. doi: 10.3290/j.jad.a18136.

De Oliveira MT, Arrais CA, Aranha AC, De Paula Eduardo C, Miyake K, Rueggeberg FA, Giannini M. Micromorphology of resin-dentin interfaces using one-bottle etch&rinse and self-etching adhesive systems on laser-treated dentin surfaces: a confocal laser scanning microscope analysis. *Lasers Surg Med.* 2010 Sep; 42(7):662-70. doi: 10.1002/lsm.20945.

De Oliveira MT, Reis AF, Arrais CA, Cavalcanti AN, Aranha AC, de Paula Eduardo C, Giannini M. Analysis of the interfacial micromorphology and bond strength of adhesive systems to Er: YAG laser irradiated dentin. *Lasers Med Sci.* 2013 Jul;28(4):1069-76. doi: 10.1007/s10103-012-1157-5.

Delmé KI, De Moor RJ. Scanning electron microscopic evaluation of enamel and dentin surface after Er:YAG laser preparation and laser conditioning. *Photomed Laser Surg.* 2007 Oct;25(5):393-401.

Delmè KI, Deman PJ, Nammour S, De Moor RJ. Microleakage of class V glass ionomer restorations after conventional and Er:YAG laser preparation. *Photomed Laser Surg.* 2006 Dec;24(6):715-22. doi: 10.1089/pho.2006.24.715.

Do Amaral FL, Colucci V, de Souza-Gabriel AE, Chinelatti MA, Palma-Dibb RG, Corona SA. Adhesion to Er:YAG laser-prepared dentin after long-term water storage and thermocycling. *Oper Dent.* 2008;33(1):51-8. doi:10.2341/07-30.

Favarão J, Zanini MM, Coelho Sinhorette MA, Flores Abuna G, Girelli Júnior C, Camilotti V, Giannini M, Mendonça MJ. Immediate and 6-month bond strengths of different adhesives in the oral environment. *J Adhes Dent.* 2017 Dec 18:475-81. doi: 10.3290/j.jad.a39594.

Ferreira LS, Apel C, Francci C, Simoes A, Eduardo CP, Gutknecht N. Influence of etching time on bond strength in dentin irradiated with erbium lasers. *Lasers Med Sci* 2010; 25(6):849–54. doi: 10.1007/s10103-009-0715-y.

Firat E, Gurgan S, Gutknecht N. Microtensile bond strength of an etch-and-rinse adhesive to enamel and dentin after Er:YAG laser pretreatment with different pulse durations. *Lasers Med Sci*. 2012 Jan;27(1):15-21. doi: 10.1007/s10103-010-0830-9.

Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Cadenaro M. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability- A literature review. *Dent Mater*. 2016 Feb;32(2):e41-53. doi: 10.1016/j.dental.2015.11.007.Review.

Freitas PM, Navarro RS, Barros JA, Eduardo CP. The use of Er:YAG laser for cavity preparation: na SEM evaluation. *Microsc Res Tech*. 2007 Sep;70(9):803-8. doi: 10.1002/jemt.20470.

Fried D, Ragadio J, Champion A. Residual heat deposition in dental enamel during IR laser ablation at 2.79, 2.94, 9.6, and 10.6 microm. *Lasers Surg Med*. 2001;29(3):221-9.

Giachetti L, Scaminaci Russo D, Scarpelli F, Vitale M. SEM analysis of dentin treated with the Er: YAG laser: a pilot study of the consequences resulting from laser use on adhesion mechanisms. *J Clin Laser Med Surg* 2004 Feb;22(1):35-41. doi: 10.1089/104454704773660958.

Gilmour SM, Edmunds DH, Dummer PM. The production of secondary caries- like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using an in vitro microbial caries system. *J Oral Rehabil*. 1990 Nov;17(6):573-78.

Gimbel CB . Hard tissue laser procedures. *Dent Clin North Am*. 2000 Oct;44(4):931-53, viii.

Guven Y, Aktoren O. Shear bond strength and ultrastructural interface analysis of different adhesive systems to Er:YAG laser-prepared dentin. *Lasers Med Sci*. 2015 Feb;30(2):769-78. doi: 10.1007/s10103-013-1424-0.

Hashimoto M, Futami N, Kazuhiko E, Hiroki O. A review: Biodegradation of resin—dentin bonds. *Jap Dent Sci Rev*. 2011 Feb;47(1), 5-12. doi:10.1016/j.jdr.2010.02.001.

He Z, Chen L, Hu X, Shimada Y, Otsuki M, Tagami J, Ruan S. Mechanical properties and molecular structure analysis of subsurface dentin after Er:YAG laser irradiation. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017 Oct;74:274-82. doi:10.1016/j.jmbbm.2017.05.036.

Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of the Er: YAG laser on dental hard substances: I Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med*. 1989;9(4):338-44.

Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Kimura Y, Nakamura G, Matsumoto K. Ablation depths and morphological changes in human enamel and dentin after Er:YAG laser irradiation with or without water mist. *J Clin Laser Med Surg*. 1999 Jun;17(3):105–9. doi:10.1089/clm.1999.17.105.

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Ito M, Matsumoto K. Caries-preventive effect of Er: YAG laser irradiation with or without water mist. *J Clin Laser Med Surg*. 2000 Apr;18(2):61-5. doi:10.1089/clm.2000.18.61.

Hossain M, Yamada Y, Nakamura Y, Murakami Y, Takami Y, Matsumoto K. A study of surface roughness and microleakage test in cavities prepared by Er: YAG laser irradiation and etched bur cavities *Lasers in Med Sci*. 2003;18(1) 25-31. doi:10.1007/s10103-002-0235-5.

Inoue S, Koshiro K, Yoshida Y, De Munck J, Nagakane K, Suzuki K, Sano H, Van Meerbeek B. Hydrolytic stability of self-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2005 Dec;84(12):1160-4. doi:10.1177/154405910508401213.

Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, Rueggeberg FA, Foulger S, Saito T, Nishitani Y, Yoshiyama M, Tay FR, Pashley DH. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity *Biomaterials* 2005; 26(33):6449-59. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.052.

Jiang Q, Chen M, Ding J. Comparison of tensile bond strengths of four one-bottle self-etching adhesive systems with Er: YAG laser irradiated dentin. *Mol Biol Rep*. 2013 Dec;40(12):7053-9. doi: 10.1007/s11033-013-2826-6.

Kameyama A, Aizawa K, Kato J, Hirai Y. Tensile bond strength of single-step self-etch adhesives to Er:YAG laser-irradiated dentin. *Photomed Laser Surg*. 2009 Feb;27(1):3-10. doi: 10.1089/pho.2007.2170.

Karadas M, Çağlar İ. The effect of Er:YAG laser irradiation on the bond stability of self-etch adhesives at different dentin depths. *Lasers Med Sci*. 2017 Jul;32(5):967-974. doi: 10.1007/s10103-017-2194-x.

Krmek SJ, Miletic I, Simeon P, Mehicić GP, Anić I, Radisić B. The temperature changes in the pulp chamber during cavity preparation with the Er:YAG laser using a very short pulse. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):351-5. doi: 10.1089/pho.2008.2247.

Kuscer L, Diaci J. Measurements of erbium laser-ablation efficiency in hard dental tissue under different water cooling conditions. *J Biomed Opt.* 2013 Oct;18(10):108002. doi: 10.1117/1.JBO.18.10.108002.

Li B, Zhu X, Ma L, Wang F, Liu X, Yang X, Zhou J, Tan J, Pashley DH, Tay FR. J Dent. Selective demineralisation of dentine extrafibrillar minerals-A potential method to eliminate water-wet bonding in the etch-and-rinse technique. *J Dent.* 2016 Sep;52:55-62. doi: 10.1016/j.jdent.2016.07.008.

Lukac M, Marko M, Ladislav G. Super VSP Er:YAG pulses for fast and precise cavity preparation. *J Oral Laser Applic.* 2004 Fall;4(3):171-3.

Majaron B, Lukac M, Sustercic D, Funduk N, Skaleric U. Threshold and efficiency analysis in Er:YAG ablation of hard dental tissue. *Proc SPIE.* 1996;2922:233-42. doi:https://doi.org/10.1117/12.260.676.

Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater.* 2006 Oct;22(10):973-80. doi:10.1016/j.dental.2005.11020.

Malacarne-Zanon J, Pashley DH, Agee KA, Foulger S, Alves MC, Breschi L, Cadenaro M, Garcia FP, Carrilho MR. Effects of ethanol addition on the water sorption/solubility and percent conversion of comonomers in model dental adhesives. *Dent Mater.* 2009 Oct;25(10):1275-84. doi: 10.1016/j.dental.2009.03.015.

Martin-de Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase a in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000 Sep;45(9):757-65.

Mehl A, Kremers L, Salzmann K, Hickel R. 3D Volume-ablation rate and thermal side effects with the Er:YAG and Nd:YAG laser. *Dent Mater.* 1997 Jul;13(4): 246-51. doi: 10.1016/S0109-5641(97)80036-X.

Mena-Serrano A, Kose C, De Paula EA, Tay LY, Reis A, Loguercio AD, Perdigão J. A new universal simplified adhesive: 6-month clinical evaluation. *J Esthet Restor Dent.* 2013 Feb;25(1):55-69. doi: 10.1111/jerd.12005.

Moretto SG, Azambuja N, Arana-Chavez VE, Reis AF, Giannini M, Eduardo CP, Freitas PM. Effects of ultramorphological changes on adhesion to laser-irradiated dentin- scanning electron microscopy and transmission electron microscopy analysis. *Microsc Res Tech*. 2011 Aug;74(8):720-6. doi: 10.1002/jemt.20949.

Nakabayashi N, Sami Y. Bonding to intact dentin. *J Dent Res*. 1996 Sep;75(9):1706-15. doi: 10.1177/00220345960750091401.

Oelgiesser D, Blasbalg J, Ben-Amar . Cavity preparation by Er-YAG laser on pulpal temperature rise. *Am J Dent*. 2003 Apr;16(2):96-8.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004 Mar;83(3):216-21. doi: 10.1177/154405910408300306.

Peumans M, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. *Dent Mater*. 2010 Dec;26(12):1176-84. doi: 10.1016/j.dental.2010.08.190.

Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dent Mater*. 2005 Sep;21(9):864-81.

Perdigão J, Geraldini S, Hodges JS. Total-etch versus self-etch adhesive: effect on postoperative sensitivity. *J Am Dent Assoc*. 2003 Dec;134(12):1621-9.

Perdigão J, Kose C, Mena-Serrano AP, De Paula EA, Tay LY, Reis A, Loguercio AD. A new universal simplified adhesive: 18-month clinical evaluation. *Oper Dent*. 2014 Mar-Apr;39(2):113-27. doi: 10.2341/13-045-C.

Porto ICCM, Nascimento TG, Oliveira JMS, Freitas PH, Haimeur A, França R. Use of polyphenols as a strategy to prevent degradation in the dentin-resin interface. *Eur J Oral Sci*. 2018 Apr;126(2):146-158. doi: 10.1111/eos.12403.

Ramos AC, Esteves-Oliveira M, Arana-Chavez VE, de Paula Eduardo C. Adhesives bonded to erbium:yttrium-aluminum-garnet laser-irradiated dentin: transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and tensile bond strength analyses. *Lasers Med Sci*. 2010 Mar;25(2):181-9. doi:10.1007/s10103-008-06000-0.

Ramos TM, Ramos-Oliveira TM, Moretto SG, de Freitas PM, Esteves-Oliveira M, de Paula Eduardo C. Microtensile bond strength analysis of adhesive systems to Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser-treated dentin. *Lasers Med Sci*. 2013 Jan 26, 10.1007/s10103-012-1261-6.

Raucci-Neto W, Chinelatti MA, Ito IY, Pécora JD, Palma-Dibb RG. Influence of Er:YAG laser frequency on dentin caries removal capacity. *Microsc Res Tech*. 2011 Mar;74(3):281-6. doi: 10.1002/jemt.20902.

Reis AF, Bebran-Russo AK, Giannini M, Pereira PNR. Interfacial ultramorphology of single-step adhesives: nanoleakage as a function of time. *J Oral Rehabil*. 2007 Mar;34(3):213-21. doi: 10.1111/j.1365-2842.2006.01656.x.

Sassi JF, Chimello DT, Borsatto MC, Corona SA, Pecora JD, Palma-Dibb RG. Comparative study of the dentin/adhesive systems after treatment with Er:YAG laser and acid etching using scanning electron microscope. *Lasers Surg Med*. 2004; 34(5):385-90. doi: 10.1002/lsm.20064.

Sauro S, Mannocci F, Toledano M, Osorio R, Thompson I, Watson TF. Influence of the hydrostatic pulpal pressure on droplets formation in current etch-and-rinse and self-etch adhesives: a video rate/TSM microscopy and fluid filtration study. *Dent Mater*. 2009 Nov;25(11):1392-402. doi: 10.1016/j.dental.2009.06.010.

Schein MT, Bocangel JS, Nogueira GEC, Schein PAL. SEM evaluation of interaction pattern dentin and resin after cavity preparation using Er: YAG laser. *J Dent*. 2003 Feb;31(2):127-35.

Shahabi, S, N Chiniforush, H Bahramian, A Monzavi, A Baghalian and MJ Kharazifard. The effect of erbium family laser on tensile bond strength of composite to dentin in comparison with conventional method. *Lasers Med Sci*. 2013 Jan;28(1):139-42. doi:10.1007/s10103-012-1086-3.

Sidhu SK, Watson TF. Interfacial characteristics of resinmodified glass-ionomer materials: a study on fluid permeability using confocal fluorescence microscopy. *J Dent Res*. 1998 Sep;77(9):1749-59. doi: 10.1177/00220345980770091101

Staninec M, Gardner AK, Le CQ, Sarma AV, Fried D. Adhesion of composite to enamel and dentin surfaces irradiated by IR laser pulses of 0.5–35 micros duration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006 Oct;79(1):193–201. doi: 10.1002/jbm.b.30530.

Sun Y, Chen WL, Lin SJ, Jee SH, Chen YF, Lin LC, So PT, Dong CY. Investigating mechanisms of collagen thermal denaturation by high resolution second-harmonic generation imaging. *Biophys J*. 2006 Oct 1;91(7):2620-5. doi: 10.1529/biophysj.106.085902.

Suppa P, Breschi L, Ruggeri A, Mazzotti G, Prati C, Chersoni S, Di Lenarda R, Pashley DH, Tay FR. Nanoleakage within the hybrid layer: a correlative FEISEM/TEM investigation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Apr;73(1):7-14. doi: 10.1002/jbm.b.30217.

Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater*. 2001 Jul;17(4):296-308.

Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod*. 2006 Sep;32(9):862-8. doi: 10.1016/j.joen.2006.04.005.

Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesive are permeable membranes. *J Dent*. 2002 Sep-Nov;30(7-8):371-82.

Tay FR, Lai CN, Chersoni S, Pashley DH, Mak YF, Suppa P, Prati C, King NM. Osmotic blistering in enamel bonded with one-step self-etch adhesives. *J Dent Res*. 2004 Apr;83(4):290-5. doi: 10.1177/154405910408300404.

Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Salo T, Tjäderhane L. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod*. 2010 Mar;36(3):475-81. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.034.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater*. 2013 Oct;29(10):999-1011. doi: 10.1016/j.dental.2013.07.016.

Tsujimoto A, Barkmeier WW, Takamizawa T, Watanabe H, Johnson WW, Latta MA, Miyazaki M. Comparison between universal adhesives and twostep self-etch adhesives in terms of dentin bond fatigue durability in selfetch mode. *Eur J Oral Sci*. 2017 Jun;125(3):215-222. doi: 10.1111/eos.

Trevelin LT, Silva BT, Arana-Chavez VE, Matos AB. Impact of Er:YAG laser pulse duration on ultrastructure of dentin collagen fibrils.2018. *Lasers Dental Sci Jun*. 2018;2(2)73-9. doi:httpdoi.org/10.1007/s41547-017-0020- 1.

Trevelin LT, Marques MM, Aranha AC, Arana-Chavez VE, Matos AB. Effect of super short pulse Er:YAG laser on human dentin- scanning electron microscopy analysis. *Microsc Res Tech*. 2015 Jun;78(6):472-8. doi: 10.1002/jemt.22496.

Van Dijken JW, Sunnegardh-Gronberg K, Lindberg A. Clinical long-term retention of etch-and-rinse and self-etch adhesive systems in non-carious cervical lesions. A 13 years evaluation. *Dent Mater*. 2007 Sep;23(9):1101-7. doi: 10.1016/j.dental.2006.10.005.

Van Landuyt KL, Snauwaert J, Peumans M, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. The role of HEMA in one-step selfetch adhesives. *Dent Mater*. 2008 Oct;24(10):1412-9. doi: 10.1016/j.dental.2008.02.018.

Van Meerbeek B, De Munck J, Mattar D, Van Landuyt K, Lambrechts P. Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. *Oper Dent*. 2003 Sep-Oct;28(5):647-60.

Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011 Jan;27(1):17-28. doi: 10.1016/j.dental.2010.10.023.

Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, de Munck J. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater*. 2010 Feb;26(2):e100-21. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.148.

Vermelho PM, Reis AF, Ambrosano GMB, Giannini M. Adhesion of multimode adhesives to enamel and dentin after one year of water storage. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1707-1715. doi: 10.1007/s00784-016-1966-1.

Visuri SR, Walsh JT Jr, Wigdor HA. Erbium laser ablation of dental hard tissue: effect of water cooling. *Lasers Surg Med*. 1996b;18(3):294-300. doi: 10.1002/(SICI)1096-9101(1996)18:3<294::AID-LSM11>3.0.CO;2-6.

Visuri SR, Gilbert JL, Wright DD, Wigdor HA, Walsh Jr JT. Shear strength of composite bonded to Er:YAG laser prepared dentin. *J Dent Res* 1996a Jan;75(1):599-605. doi: 10.1177/00220345960750011401.

Waidyasekera K, Nikaido T, Weerasinghe DS, Ichinose S, Tagami J. Reinforcement of dentin in self-etch adhesive technology: a new concept. *J Dent*. 2009 Aug;37(8):604-9. doi: 10.1016/j.jdent.2009.03.021.

Watson TF. Fact and artefact in confocal microscopy. *Adv Dent Res*. 1997 Nov;11(4):433-41. doi: 10.1177/08959374970110040901. Review.

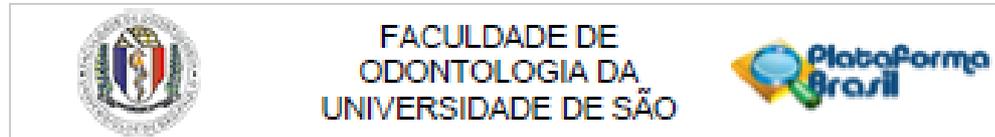
Wright NT, Humphrey JD. Denaturation of collagen via heating: an irreversible rate process. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002;4:109-28. doi: 10.1146/annurev.bioeng.4.101001.131546.

Yiu CK, King NM, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Carrilho MR, Tay FR. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials*. 2004 Nov;25(26):5789-96. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.026.

Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, Inoue S, Tagawa Y, Suzuki K, De Munck J, Van Meerbeek B. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res*. 2004 Jun;83(6):454-8. doi: 10.1177/154405910408300604.

Yoshida Y1, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, Osaka A, Meerbeek BV. Self-assembled nano-layering at the adhesive interface. *J Dent Res*. 2012 Apr;91(4):376-81. doi: 10.1177/0022034512437375.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da largura temporal de pulso do laser de Er:YAG na morfologia dentinária, na formação da camada híbrida e na resistência adesiva

Pesquisador: Lívia Tosi Trevelin

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45543415.7.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.121.858

Data da Relatório: 24/06/2015

Apresentação do Projeto:

A Odontologia minimamente invasiva preconiza a realização de preparos cavitários ultraconservadores e restaurações adesivas, porém o grande desafio desta abordagem é a pouca durabilidade dos tratamentos realizados, expressa na instalação do ciclo restaurador repetitivo. Toma-se, portanto, fundamental explorar ao máximo o potencial de novas tecnologias na sua interrupção.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é investigar a ação de diferentes parâmetros de irradiação com o laser de Er:YAG na morfologia e composição orgânica e inorgânica da dentina, na micromorfologia da interface adesiva e sua resistência de união. A dentina oclusal de 126 molares será planejada e irradiada com o laser de Er:YAG (SSP) de acordo com os fatores de variação: 1) indicação clínica do protocolo de irradiação utilizado-preparo cavitário (200mJ/20Hz) e pre-tratamento (80mJ/2Hz); e 2) largura temporal de pulso - 50, 300 e 600s, organizados em 7 grupos experimentais: G1-sem irradiação (controle); G2(200mJ/20Hz/50s); G3(200mJ/20Hz/300s); G4(200mJ/20Hz/600s); G5(80mJ/2Hz/50s); G6(80mJ/2Hz/300s) e G7(80mJ/2Hz/600s). Diferentes avaliações serão realizadas utilizando métodos distintos, a saber: análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (n=3); avaliação dos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina, por meio

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7914 E-mail: cepto@usp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.121.858

da espectroscopia micro-Raman (n=3); avaliação da micromorfologia da interface adesiva por meio de microscopia confocal (n=1); e avaliação da resistência de união por ensaio de microcisalhamento (n=11). Para montagem dos corpos de prova para os ensaios de microcisalhamento e de micromorfologia de interface serão utilizados um sistema autocondicionante (Scotchbond Universal, 3M ESPE, EUA) em conjunto a uma resina composta (Z350 XT, 3M ESPE, EUA). Assim, pretende-se avaliar a influência dos diferentes parâmetros de irradiação nos aspectos morfológicos, estruturais orgânicos e minerais e sua interação com o sistema adesivo, ao longo do tempo. Os dados quantitativos obtidos serão analisados estatisticamente (p0,05) e os qualitativos serão descritos comparativamente em relação ao grupo controle e aos demais grupos experimentais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios: a metodologia do trabalho inclui apenas o uso do LASER em dentes extraídos obtidos junto ao banco de dentes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão utilizados 126 dentes nesse estudo, acreditamos que resultados interessantes possam surgir da combinação do laser de pulso super curto, que produz uma morfologia microrretentiva e rugosa, portanto, favorável a retenção mecânica, com adesivos universais, que devido a sua ligação química com o substrato permitirá a formação de uma camada híbrida diferenciada sem a desmineralização da dentina, propiciando aumento da RU. Desta forma, este trabalho possui como proposta avaliar a ação do pulso super curto do laser de Er:YAG na ultramorfologia da dentina (fibrilas colágenas) e na composição química e estrutural dos tecidos dentais duros, com vistas a determinação de protocolos de irradiação que permitam a realização de restaurações adesivas mais eficiente e conseqüente maior durabilidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto - OK

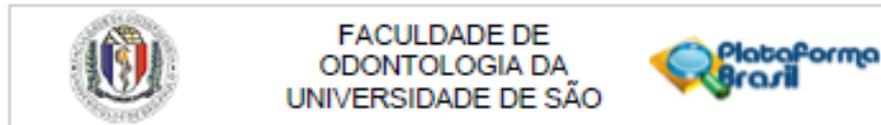
Banco de Dentes - OK

Projeto detalhado - OK

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7990 Fax: (11)3091-7914 E-mail: cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 1.121.858

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 24 de Junho de 2015

Assinado por:
Délio dos Santos Pinto Junior
 (Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7914 E-mail: cepfo@usp.br