



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Cambios Químicos y Morfológicos Asociados a la
Disolución Ácida del Esmalte Irradiado con Láser
Er:YAG.”**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

MCO con Esp. en O. Jennifer Manuela Díaz Monroy

Comité de Tutores

Dra. en O. Rosalía Contreras Bulnes
Tutor Académico

Dr. en C. Ignacio Sánchez Flores
Tutor Interno

Dr. en C. M. Oscar Fernando Olea Mejía
Tutor externo

Toluca, Estado de México

2014



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Cambios Químicos y Morfológicos Asociados a la
Disolución Ácida del Esmalte Irradiado con Láser
Er:YAG.”**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

MCO con Esp. en O. Jennifer Manuela Díaz Monroy

Comité de Tutores

Dra. en O. Rosalía Contreras Bulnes
Tutor Académico

Dr. en C. Ignacio Sánchez Flores
Tutor Interno

Dr. en C. M. Oscar Fernando Olea Mejía
Tutor externo

Toluca, Estado de México

2014



ÍNDICE

	No. página
Resumen	1
Summary	3
1. Antecedentes	5
1.1. <i>Principios del Láser</i>	5
1.2. <i>Partes Fundamentales del Láser</i>	7
1.3. <i>Tipos de Láseres (Modo)</i>	8
1.4. <i>Sistemas de Láseres en Odontología</i>	9
1.5. <i>Historia del Láser</i>	11
1.6. <i>Láser Er:YAG</i>	13
1.7. <i>Interacción entre el Láser Er:YAG con Esmalte y Dentina</i>	15
1.8. <i>Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS)</i>	21
2. Planteamiento del Problema	23
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	26
5. Justificación	27
6. Material y Métodos	29
6.1. Diseño de estudio	29
6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	31
6.3. Procedimientos	31
6.4. Variables de Estudio	39
6.5. Implicaciones Bioéticas	41
6.6. Recolección de Datos	42
6.7. Análisis Estadístico	42
7. Resultados	43
7.1. Artículo aceptado y/o publicado	43
7.1.1 Página frontal del manuscrito	43
7.1.2 Carta de aceptación	45
7.1.3 Resumen	45
7.1.4 Abstract	46
7.1.5 Introduction	47
7.1.6 Materials and Methods	48

7.1.7	Results	52
7.1.8	Discussion	54
7.1.9	Conclusions	56
7.1.10	Acknowledgments	56
7.1.11	References	57
7.2.	Artículo aceptado y/o publicado	60
7.2.1	Página frontal del manuscrito	60
7.2.2	Carta de aceptación	61
7.2.3	Resumen	61
7.2.4	Abstract	62
7.2.5	Introduction	63
7.2.6	Materials and Methods	64
7.2.7	Results	67
7.2.8	Discussion	67
7.2.9	Conclusions	68
7.2.10	Acknowledgements	69
7.2.11	References	69
7.3.	Resultados adicionales	74
8.	Discusión General	80
9.	Conclusiones Generales	84
9.1.	Conclusiones	84
9.2.	Limitaciones	84
9.3.	Recomendaciones	85
10.	Referencias Bibliográficas	86
11.	Anexos	98
11.1.	Anexo 1-A	98
11.2.	Anexo 1-B	99
11.3.	Anexo 1-C	100

Resumen

Introducción: El láser Er:YAG fue aprobado para uso dental en 1997, diversos estudios han reportado un incremento en la resistencia ácida del esmalte dental aunado a efectos morfológicos inducidos por la irradiación con este tipo de láser. Sin embargo, existe escasa o nula información en relación a los cambios químicos asociados al incremento de esta resistencia ácida del esmalte, así como de los cambios morfológicos producidos por la disolución ácida en la superficie irradiada. **Objetivo:** Evaluar *in vitro* los cambios químicos asociados al incremento de la ácido resistencia del esmalte tratado con láser Er:YAG, así como los cambios morfológicos producidos por la disolución ácida en el esmalte dental irradiado. **Metodología:** 48 bloques de esmalte divididos en 4 grupos (n=12): GI o Control, GII (100mJ-12.7mJ/cm²), GIII (200mJ-25.5mJ/cm²), GIV (300mJ-38.2mJ/cm²). *Irradiación:* láser Er:YAG (OPUS DUO™, Luminex, Israel), λ 2.94 μ m, 10 Hz, distancia punta láser-superficie esmalte de 1 mm, sin irrigación. *Procedimientos:* Los cambios en los porcentajes atómicos (at.%) de C, P, Cl, Ca y O y la morfología del esmalte se evaluaron en la misma área durante 3 fases (antes y después de la irradiación y después del proceso de disolución ácida) mediante Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Para facilitar la localización de la misma zona durante la secuencia de evaluaciones, se marcó un punto de referencia en las muestras. La resistencia a la disolución ácida se evaluó mediante Espectrometría de Absorción Atómica (AAS). *Análisis estadístico:* Se utilizó el paquete estadístico SPSS 19 IBM (SPSS IBM, New York, NY, USA). Se aplicó la prueba Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de los datos. Las pruebas estadísticas de Friedman y Wilcoxon, se emplearon para comparar los porcentajes atómicos de los diferentes elementos. Así mismo, se utilizaron las pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney U, para evaluar las diferencias entre grupos con respecto a las concentraciones de Ca liberadas en la solución ácida. Todas las pruebas se realizaron a un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. **Resultados:** La

composición química de los grupos irradiados mostró diferencias estadísticamente significativa en todos los elementos analizados, a excepción del cloro. Los grupos irradiados mostraron reducción estadísticamente significativa en la liberación de calcio hacia la solución ácida. Se presentaron cambios morfológicos producidos por la erosión ácida del esmalte irradiado, especialmente en las áreas de los efectos no deseados inducidos por el láser. **Conclusiones:** Se observaron cambios químicos, asociados al incremento de la resistencia ácida del esmalte tratado con láser Er:YAG. Dichos cambios se caracterizaron por una disminución en el at.% de C y un incremento en el at.% de O, P, Ca, sin cambios en el at.% de Cl. También se observó un incremento en el radio Ca/P después de la irradiación, asociado a las densidades de energía más altas. Los cambios químicos producidos por la disolución ácida mostraron una tendencia similar entre los grupos experimentales. Se observó una estabilidad o un incremento en el radio Ca/P después de la disolución ácida en los grupos irradiados, con una disminución del Ca liberado en solución. Se presentaron cambios morfológicos producidos por la disolución ácida del esmalte irradiado, especialmente en las áreas de los efectos no deseados inducidos por el láser Er:YAG, los cuales fueron de leves a severos.

Summary

Background: The Er:YAG laser was approved for dental use in 1997. Several scientific reports have shown an increased in the acid resistance of dental enamel after irradiation, as well, effects on enamel morphology. However, there is lack of information regarding the chemical changes associated with increased acid resistance of the enamel as well as the morphological changes produced by the acid dissolution in the irradiated surface. **Objective:** To evaluate *in vitro* the chemical changes associated to acid resistance of enamel treated with Er:YAG laser, as well as the morphological changes produced by acid dissolution in Er:YAG laser irradiated dental enamel. **Materials and Methods:** Forty eight enamel samples were divided into 4 groups (n=12). GI the control group, received no treatment; Groups II, III and IV were irradiated with Er:YAG at 100 mJ (12.7 J/cm²), 200 mJ (25.5 J/cm²), and 300 mJ (38.2 J/cm²), respectively. **Irradiation:** Er:YAG laser system (Lumenis OPUS DUO™ Er:YAG + CO₂, Yokneam, Israel), λ 2.94 μ m, at 10 Hz, tip-sample distance was kept fixed at 1 mm, without water irrigation. **Procedures:** Changes in the atomic percentages of C, P, Cl, Ca and O and enamel morphology were evaluated in the same area during three phases (before and after irradiation and after the acid dissolution) by Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) and Scanning Electron Microscope (SEM). To facilitate the location of assessment area, a reference point was marked. The acid resistance was evaluated using Atomic Absorption Spectrometry (AAS). **Statistical analysis:** All data were analyzed using SPSS 19 IBM statistical package (SPSS IBM., New York, NY, USA). The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the data distribution. The Friedman and Wilcoxon test were performed to compare the atomic percentages of the different elements. The Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests were used to analyze the differences in the Ca concentrations released into solution among the groups. All analysis with a significance level of $p \leq 0.05$. **Results:** Significant differences in composition of irradiated groups, with the exception of chlorine, were observed. There were also significant differences in the amount of

calcium released from the enamel. Morphological changes produced by acid dissolution of irradiated enamel were produced, specifically on laser induced undesired effects. **Conclusions:** Chemical changes associated with an increase in acid resistance of enamel treated with Er:YAG laser showed a clear after-irradiation pattern characterized by a decrease in C at.% and an increase in O, P, Ca at.% and no changes in Cl at.%. An increased Ca/P ratio after Er:YAG laser irradiation was associated with the use of higher laser energy densities. Chemical changes produced by acid dissolution showed a similar trend among experimental groups. Stable or increased Ca/P ratio after acid dissolution was observed in the irradiated groups, with reduction of Ca released into the acid solution. The morphological changes produced were from mild to severe, depending on the presence of after-irradiation undesired effects.

1. Antecedentes

1.1. Principios del Láser

La luz es una importante fuente de energía para la mayoría de las formas de vida sobre la tierra. En la antigüedad los griegos y los romanos usaban la luz solar para ayudar a la recuperación de diversas enfermedades. Los egipcios también usaban fototerapia para tratar algunas enfermedades de la piel. ¹

La terapia con láser comenzó de manera empírica en los años 60's y desde entonces ha ido adquiriendo credibilidad y seguidores a través del mundo. En las últimas dos décadas miles de estudios han sido publicados en revistas científicas, lo cual ha permitido su uso clínico basado claro, en evidencia científica, lo que le ha abierto las puertas a la fototerapia en casi todas las áreas médicas, entre las que destacan: oftalmología, dermatología, ginecología y cirugía general. ^{1, 2.}

La **fototerapia** con láser (LPT, por sus siglas en inglés: Light Phototherapy), es una opción de tratamiento clínico que no provoca efectos térmicos sobre los tejidos y sus efectos biológicos promueven un ligero incremento en la temperatura (no mayor a 1°C). La magnitud de los efectos del láser depende de la reacción de las células, del estado fisiológico y/o la etapa clínica de evolución del padecimiento, previa a la irradiación. Estudios científicos han mostrado que el mecanismo primario de la fototerapia con láser propicia la **interacción entre fotones y moléculas en el tejido**, mientras que el mecanismo secundario está relacionado con el efecto de **inducir cambios químicos en el tejido**, estas reacciones generan en el tejido un **efecto analgésico y antiinflamatorio**. ¹

El láser es un dispositivo que emite una luz: a) monocroma, b) concentrada c) coherente y d) particularmente intensa. La pureza de color de la luz de un láser es varios órdenes de magnitud superior a la de la luz monocromática de cualquier otro origen, cualidad que la hace insustituible

en campos como el de la espectroscopía y para el estudio de reacciones químicas o de procesos biológicos. La longitud de onda de la luz que emite el láser está constituida principalmente por tres partes: una fuente de energía, un medio de emisión de láser activo y dos o más espejos que conforman una cavidad óptica o resonador.³

El láser utiliza uno de los efectos de la mecánica cuántica –la emisión inducida o estimulada de partículas o radiación- para generar un haz de luz coherente de un medio adecuado, con el tamaño, la forma y la pureza que deseemos. La **emisión estimulada** es el fenómeno por el cual se genera la luz del láser, esta se explica de la siguiente manera: imagina que un átomo que está en estado de excitación recibe un estímulo externo lo cual lo lleva a emitir fotones, en donde un fotón -que tiene cierto nivel de energía- transmite dicha energía de un átomo a otro generando un segundo fotón el cuál se dice está en fase –quiere decir que, se propaga en la misma dirección. Este segundo fotón pronto entra en contacto con otros dos átomos excitados, esta interacción da origen a otro par de fotones, viajando en la misma dirección y fase de excitación. Entre más átomos se exciten más fotones se generarán y este proceso puede continuar de manera indefinida. Los fotones que son emitidos de esta manera por el átomo estimulado poseen fase, energía y dirección similares a las del fotón externo que les dio origen. Esta emisión estimulada es la raíz de muchas de las características de la luz del láser, no sólo produce luz coherente y monocroma sino, también, “amplifica” la emisión de luz, ya que, por cada fotón que incide sobre un átomo excitado, se genera otro fotón.⁴

En los láseres dentales, la luz del láser se libera del láser al tejido que es el “objetivo”, por medio de un cable de fibra óptica. La longitud de onda y otras propiedades del láser están determinadas por la composición del medio activo que tenga el láser, el cuál puede ser gas, o bien un semiconductor en estado sólido.³

La energía de la luz producida por el láser puede tener cuatro diferentes interacciones con el tejido: reflexión, transmisión, dispersión y absorción. Ver Figura 1.^{5,6}

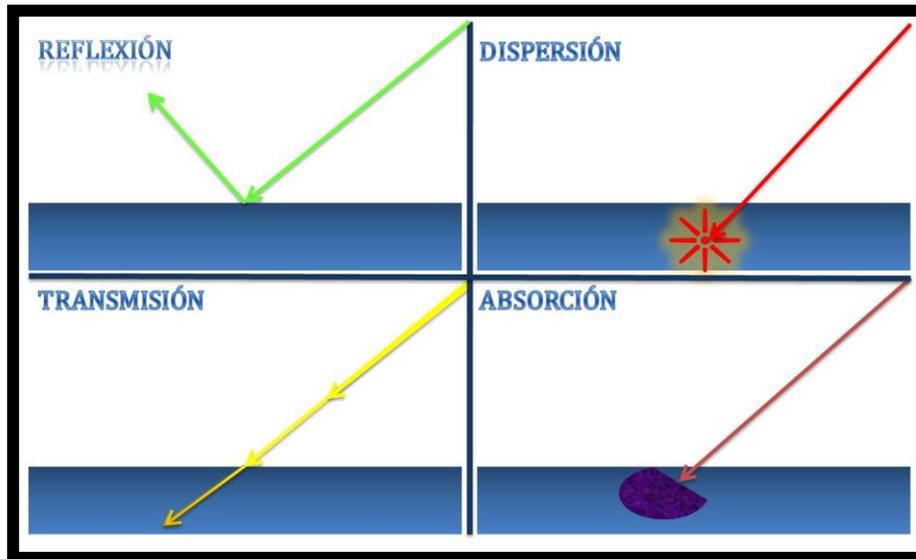


Figura 1. Efecto de la irradiación láser sobre los tejidos. En Stabholz et al. ⁷

Cuando la luz del láser es absorbida por el tejido, hay un incremento en la temperatura generando efectos fotoquímicos, los cuáles van a depender del contenido de agua de los tejidos. Cuando la temperatura alcanza los 100°C el agua de los tejidos se vaporiza y da lugar a un proceso denominado *ablación*. Está reportado en la literatura que a temperaturas menores a los 60°C, las proteínas presentes en el tejido comienzan a desnaturalizarse, sin que ocurra la vaporización, mientras que a temperaturas superiores a 200°C, el tejido sufre deshidratación inclusive se quema resultando en un efecto indeseable de la irradiación llamado *carbonización*. ³

1.2. Partes Fundamentales del Láser

Los láseres en general consisten de un medio activo y una fuente de bombeo encerrada en una cavidad óptica, la manera en la que funciona es la siguiente: La fuente de bombeo, bombea el medio activo de su estado fundamental denominado estado inactivo a un estado de excitación. Muchos flashes de luz intensos o bien descargas de luz bombean el medio activo del láser y crea una gran concentración de átomos en estado excitado, de esta manera el láser trabaja eficientemente. ⁸

Las partes fundamentales de un láser son:

1. Medio amplificador o medio activo sólido, líquido o gaseoso; el cual produce la emisión estimulada de luz (fuente de luz).
2. Cavity resonante u óptica; en donde se coloca el medio amplificador o activo, está generalmente está compuesta por dos o más espejos (u otro tipo de dispositivo reflector), enfrentados uno al otro.
3. Lámpara de bombeo u otro dispositivo; la lámpara de bombeo emite la luz inicial, la cual es reflejada por los espejos y magnificada por el amplificador –la luz se direcciona una y otra vez al amplificador , el cual incrementa la intensidad de la luz en los sucesivos pasajes a que da lugar dicha reflexión. Así la intensidad de la luz se hace progresivamente más grande y produce una concentración de energía en dicha dirección: el haz del láser emitido por el dispositivo.⁸

1.3. Tipos de Láseres (Modo)

1.3.1. Láseres pulsados

Estos emiten la luz en pulsos, en este caso uno de los espejos se fabrica de manera tal que deja pasar parte de la luz incidente siendo esa fracción de luz una vía de salida del láser, por lo que la inversión de población – cuando en un sistema predominan los átomos excitados, se logra suministrando energía al sistema, proceso que se conoce como bombeo y se realiza mediante una descarga eléctrica, una reacción química o absorción de luz del medio activo en la cavidad resonante se logra sólo por períodos cortos, pulsados.⁸

1.3.2. Láseres continuos

Emiten la luz de manera continua.⁸ Por otro lado, la emisión del láser puede contener gas o una barra de cristal sólido. La versión con gas de la emisión del láser se encuentra disponible en

el área dental actualmente como: Láser Argón y Láser CO₂. En los láseres de estado sólido generalmente se usa un granate de cristal hecho de itrio y aluminio y este tipo de sistemas se conocen como láseres YAG.⁸

1.4. Sistemas de láseres en odontología

Los recientes avances en el desarrollo de los diversos sistemas de láseres, con un amplio rango de longitudes de onda, han propiciado que investigadores evalúen el posible uso de esta tecnología en el tratamiento dental, aunque es una realidad que aún existen clínicos escépticos, que no cuentan con un panorama claro de las características y usos de los diferentes sistemas de láseres que hay en el mercado.⁸

Actualmente en el área odontológica, en general, existen dos escenarios, por un lado existen los láseres para tejidos duros, como el Dióxido de carbono (CO₂), Neodymium Yttrium Aluminum Garnet (Nd:YAG) y por otro, el láser Er:YAG el cual es considerado un láser versátil, ya que ofrece ambas aplicaciones tanto para tejidos duros como blando, aunque con sus limitaciones.^{9, 10.}

Otra característica importante de los láseres es el coeficiente de absorción [cm⁻¹] de agua, de sus longitudes de onda, de acuerdo a la literatura los láseres tipo Erbium, específicamente el láser Er:YAG (2,940 nm), posee el mejor coeficiente de absorción de agua en comparación con otros tipos de láseres como el tipo Argón, Nd:YAG y CO₂. Ver Figura 2.

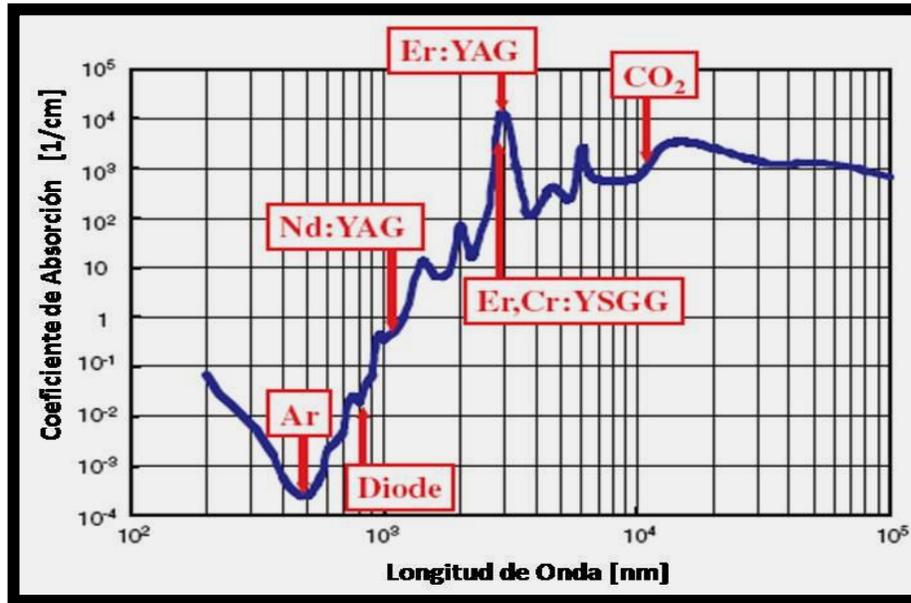


Figura 2. Espectro de absorción de agua. En Aoki et al. ¹¹

La longitud de onda del láser Er:YAG, se encuentra cerca de la frontera de inicio-infrarrojo y mitad-infrarrojo, una porción de su espectro es invisible. La luz coherente de este láser con una longitud de onda de 2,940 nm es altamente absorbida en agua. ¹² Teóricamente, la longitud de onda del láser Er:YAG es 10 veces mayor que la del CO₂ (longitud de onda de 10,600 nm) y 15,000-20,000 veces mayor que el láser Nd:YAG (longitud de onda de 1064 nm), ver Figura 3.

12, 13.

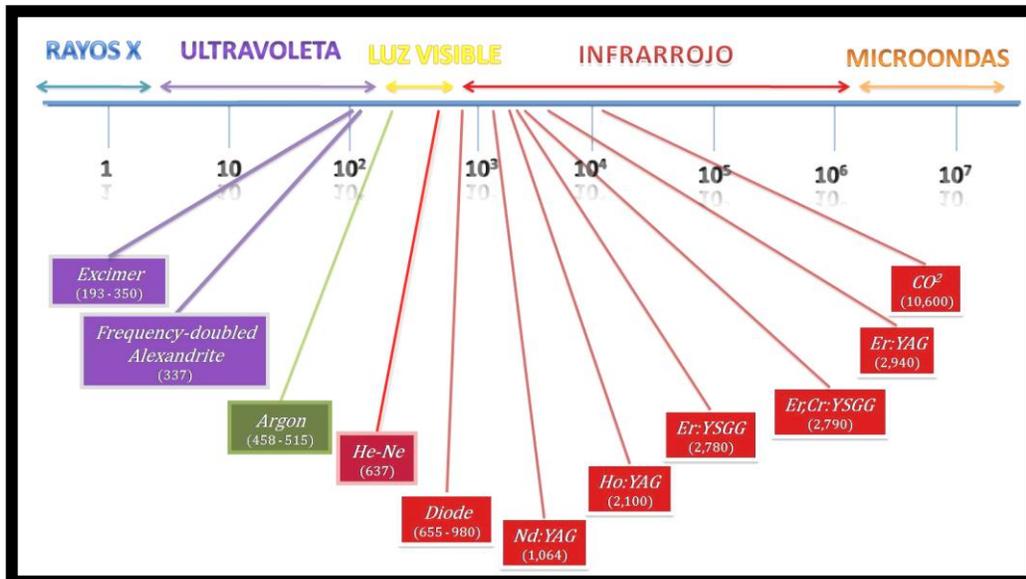


Figura 3. Espectro electromagnético y longitud de onda de diferentes láseres. En Aoki et al. ¹¹

Está reportado en la literatura que el esmalte y la dentina pueden removerse usando láseres con longitudes de onda que sean fuertemente absorbidas por los componentes estructurales de estos tejidos. En la banda de los rayos infrarrojos, esta absorción tan fuerte ocurre en las regiones entre: 2-3 μm y 9-11 μm . Estas dos regiones son alcanzadas rápidamente por los sistemas de láser como el Erbium [$\lambda= 2.94 \mu\text{m}$] y el CO₂ (dióxido de carbono) [$\lambda= 9.6$ y $10.6 \mu\text{m}$].¹⁴

1.5. Historia del Láser

En 1917, Albert Einstein estableció la Fundación para la invención del Láser y su predecesor, el “máser” (por teorizar que la amplificación fotoeléctrica puede emitir una sola frecuencia, o la emisión estimulada).³ El término **LÁSER** es un acrónimo de “Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation”, fue introducido por primera vez al público en 1959, en un artículo publicado por un estudiante de la Universidad de Columbia, llamado Gordon Gould. En 1960, el primer aparato de láser rubí fue creado por Theodor Maiman. En 1961, se desarrolló un láser constituido por cristales de itrio-aluminio-granate, tratado con 1-3% de neodimio (Nd-YAG). En 1962, se desarrolló el láser tipo argón, mientras que el láser de rubí comenzaba a ser el primer láser de uso médico básicamente en el área de oftalmología con procedimientos como la corrección de lesiones retínicas por coágulos.^{3,8}

La introducción del láser de rubí al área odontológica se le atribuye a Goldman et al.¹⁵ en 1964 y Stern y Sognnaes¹⁶ y Schulte¹⁷ Desde entonces, muchas longitudes de onda han sido investigadas para su aplicación en el área dental.¹⁸

Una vez que esta tecnología encontró un propósito en el área odontológica, en un principio únicamente con su aplicación en tejidos duros, muchas longitudes de onda han sido investigadas básicamente tratando de investigar su posible uso para el tratamiento contra la caries (eliminación de caries, preparación de cavidades), básicamente en la preparación de “tejido duro

dental”, todo esto con el propósito de sustituir el método convencional (pieza de mano), con esta nueva tecnología.^{18-21.}

También han sido objeto de estudio otros tipos de láseres, como el láser de pulso Nd:YAG, desarrollado por Myers y Myers y aceptado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (sus siglas en inglés FDA, Food and Drug Administration), en EU en 1989, diseñado para su aplicación en tejidos blandos, cirugía bucal, marcando el comienzo de la fabricación y aceptación de láseres en el área de la odontología. Este láser en particular tiene muy poca interacción con tejidos duros.¹⁸

En 1988, Hibst et al.²² en un trabajo pionero fueron los primeros en reportar el uso del láser Er:YAG para ablación del tejido duro dental. Paghdiwala²³ en 1989, preparó agujeros en esmalte y dentina, con energía de baja densidad y sin irrigación durante la irradiación, observó que el láser Er:YAG es capaz de ablacionar tejido duro dental. En 1989, Hibst y Keller,²⁴ reportaron remoción efectiva de esmalte y dentina con láser ER:YAG, inclusive reportaron profundidades y diámetros de los agujeros hechos con el láser. Keller y Hibst,²⁵ en 1989, demostraron en dientes extraídos que el esmalte y la dentina pueden ser removidos de manera efectiva con el mínimo daño térmico a los tejidos adyacentes. En 1989 y 1991 Kayano et al.,^{26,27} sugirieron que el láser Er:YAG podía ser usado para preparación de cavidades, demostrando su efectividad. Así mismo, Kumasaki M.²⁸ en 1995, reportó también seguridad en la aplicación del láser Er:YAG para la eliminación de caries. En 1997, Cozean C.,²⁹ también observó efectividad al ablacionar tejido duro dental y sin afección del tejido pulpar. En 1997, Ishikawa I.³⁰ reportó eficacia en la preparación de cavidades, además observó bajo microscopía electrónica de barrido (SEM), remoción efectiva de dentina cariada, señalando que no existió ninguna zona de tejido residual (con caries) en la zona irradiada. También en 1997, Pelagalli J.³¹ evaluó efectividad y seguridad, demostrando mediante SEM, que la morfología de la superficie y la habilidad de remover caries no mostró diferencias entre las muestras tratadas con láser Er:YAG y las muestras tratadas con el

método convencional (pieza de mano). Existen reportes en relación al primer sistema de láser Er:YAG (Kavo Key Laser, Kaltenbach and Voigt GmbH & Co., Biberach/Riss, Germany), el cual fue introducido al mercado médico en Alemania en 1992 y aceptado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (sus siglas en inglés FDA, Federal Drugs Administration), en los Estados Unidos hasta 1997, aprobado exclusivamente para remoción de caries, preparación de cavidades y grabado del esmalte. Aoki A.,³² en 1998, publicó que el láser Er:YAG era efectivo y seguro para la remoción de caries, con daños térmicos mínimos al tejido dental adyacente.

1.6. Láser Er:YAG

El primer láser Er:YAG con una longitud de onda de 2.94 μ m principalmente mostraba cierta habilidad en la preparación de cavidades Clase I, II, III, IV y V, así que jugaba cierto rol en la odontología restaurativa.^{8, 31, 33}

El láser Er:YAG es uno de los diversos láseres que existen en la actualidad en el área odontológica, este láser ha sido estudiado en los últimos 35 años.¹⁶ A mediados de los 1990's las investigaciones acerca de este láser se enfocaban en la seguridad y eficacia de su aplicación sobre tejidos duros, básicamente en la preparación de cavidades.^{25-27, 34-38}

La longitud de onda más estudiada que emite el láser Erbium:YAG (Er:YAG), es de 2.94 μ m o 2940nm.,⁸ la energía que genera esta longitud de onda es altamente absorbida tanto por el agua como por la hidroxiapatita, ambos componentes estructurales del diente, dando como resultado una remoción altamente eficiente del esmalte dental con el mínimo daño térmico en comparación con otros sistemas de láser como CO², Nd:YAG, entre otros.^{24, 25, 37, 39, 40}

A diferencia de otros sistemas de láseres, el láser Er:YAG es considerado un láser sumamente versátil ya que su aplicación es tanto para tejidos duros como para tejido blando,

dentro de sus ventajas podemos enumerar, que no genera carbonización del tejido irradiado, es muy fácil de manipular, es una opción para el tratamiento de eliminación de caries, se ha reportado que posee un efecto esterilizante, tiene la virtud de generar una incisión suave cuando es utilizado para cirugía bucal, aunque dentro de la incursión de este láser dentro de la subespecialidad de cirugía bucal, su principal desventaja radica en que posee una baja acción hemostática.⁸

Diversos autores han coincidido en sus hallazgos, con respecto al uso del láser Er:YAG con fines de eliminación de caries y preparación de cavidades, en los que coinciden en que este tipo de láser provee de una ablación precisa del esmalte y dentina cariados, sin causar daño térmico a la pulpa dental.¹⁸

Dentro de las potenciales aplicaciones del láser Er:YAG, también se encuentra reportado en la literatura que la irradiación con este tipo de laser tiene un efecto bactericida, por lo que, otras aplicaciones clínicas del láser Er:YAG en el área dental son: desinfección de canales endodóncicos y recientemente, su uso como una alternativa de la pieza de mano para remoción de hueso en el área de cirugía oral y maxilofacial. Además, recientes investigaciones han centrado el uso de distintas longitudes de onda, de los láseres dentales de tipo erbium, en el área de Periodoncia, incluyendo la remoción de cálculo dental.^{8, 18, 41-49}

Extensos estudios que realizó la FDA (estudios clínicos en humanos), complementados con hallazgos radiográficos, clínicos, histológicos, así como de coeficiente de penetración del láser Er:YAG (2.94 μ m) sobre, básicamente esmalte y dentina, mostraron que este tipo de láser posee las siguientes características:¹⁸

- No se compromete la vitalidad de la pulpa
- La estructura del diente parece similar en los grupos irradiados y el control, la morfología de la superficie sin cambios, excepto en el sitio de irradiación.

- Este láser es eficaz para ser usado en el tratamiento dental estándar: preparación de cavidades y grabado ácido del esmalte.
- Este láser puede remover caries completamente y de manera eficiente.
- La calidad de la preparación de una cavidad (antes de la restauración) realizada con este tipo de láser es equivalente a la calidad obtenida con el uso de la pieza de mano: evaluaciones a simple vista y utilizando Microscopía electrónica de barrido (SEM), muestran paredes bien definidas de las cavidades, estudios de penetración de tinción, muestran sellado entre los materiales de restauración y la estructura dental.¹⁸

Básicamente en los últimos años dos longitudes de onda han sido desarrolladas para su uso clínico sobre tejido duro dental. Estas incluyen el láser Er:YAG (2.94 μ m) y el láser Er, Cr:YSGG (sus componentes en inglés: erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet) con una longitud de onda de 2.78 μ m, ambos láseres cuentan con propiedades similares, según algunos investigadores.⁵⁰⁻⁵³

Estas dos longitudes de onda (Er:YAG y Er, Cr:YSGG) dominaron el mercado de láseres para tejido duro, según se estableció en el año 2004.¹⁸

1.7. Interacción del Láser Er:YAG con el Esmalte y Dentina

El esmalte dental está compuesto por 85% del volumen de carbonato de hidroxapatita, 12% agua y 3% proteína y lípidos.⁵⁴ Los cristales de hidroxapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, componen la estructura básica de la matriz mineral, tanto del esmalte como de la dentina.⁵⁴

La biofísica (efectos biológicos) que genera la luz del láser cuando entra en contacto con estos tejidos dentales, presenta muchos factores a considerar. Entre estos factores se encuentran la longitud de onda del láser, la densidad de energía, el tiempo de irradiación, así como, las

propiedades con las que cuenta el tejido que está interactuando con la luz del láser (absorción, transmisión, dispersión y reflexión de la energía del láser).¹⁸

La aplicación del láser en el tejido duro dental da lugar a interacciones complejas entre la luz del láser y los componentes biológicos de este tejido.⁵⁵ La longitud de onda del erbio:yttrium-aluminum-garnet (Er: YAG) de 2.940 μm , coincide con el pico principal de absorción del agua y es bien absorbida por los grupos hidroxilo y la hidroxiapatita presentes en la estructura dental, esto da como resultado una interacción óptima con los tejidos biológicos del diente, incluyendo al esmalte y la dentina.⁵⁶

Por otro lado, cuando la luz del láser entra en contacto con el tejido dental, la energía del láser se convierte en calor, induciendo un incremento en la temperatura sobre la superficie del diente, generando a su vez, cambios morfológicos y químicos. La magnitud de estos cambios va a depender sobre todo de los parámetros de irradiación previamente mencionados y del tipo de láser (modo continuo o pulsado), entre otros.^{57, 58.} Precisamente, estos hallazgos enumeran las virtudes y desventajas de esta nueva tecnología, en primera instancia, las alteraciones morfológicas reportadas en la literatura son diversas y coincidentes entre los diferentes autores.³⁴⁻³⁷

Desde un principio en un intento por evaluar la efectividad del láser de rubí para la preparación de tejido duro dental, en los resultados se observó la formación de cráteres y derretimiento (melting), de la dentina cuando se trataban áreas de caries profundas.¹⁹

En 1989, Paghdiwala²³ estudió la habilidad de la longitud de onda del láser Er:YAG para ablacionar tejido duro dental, por primera vez este láser fue utilizado para hacer preparaciones (hoyos), sobre esmalte y dentina utilizando bajas energías y bajo ciertas condiciones de irradiación entre las que destaca, que durante la irradiación de las muestras no se utilizó ningún tipo de irrigación, dentro de los hallazgos se observó, que no se generó el típico calentamiento el

cuál induce microfracturas y en algunas muestras se observó carbonización (charring) y en otras no. También se observó que la temperatura de la cavidad pulpar incrementó hasta alcanzar un promedio de 4.3°C, el cual se ubica dentro del margen de seguridad para la pulpa dental.

Existen estudios en los que se ha observado bajo microscopia electrónica de barrido (SEM), los efectos del láser Er:YAG sobre la superficie del esmalte, los cuales pueden considerarse como adversos, ya que muestran derretimiento y recristalización del tejido, superficies rugosas, exposición de los prismas del esmalte, microfracturas, formación de fisuras y diversos tamaños de cráteres como resultado del uso de diferentes densidades de energía. Ver Figura 4. ⁶⁰⁻⁶³

Apel et al., ⁶⁴ reportaron superficies de esmalte cubiertas con finas fisuras después de la irradiación con Er:YAG ($\lambda = 2.94 \mu\text{m}$, $\Phi = 6 \text{ J/cm}^2$), la profundidad de las fisuras fue de aproximadamente 100 μm .

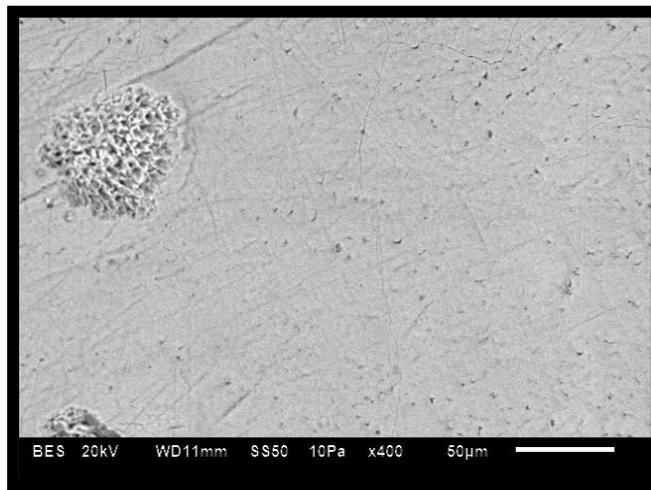


Figura 4. Micrografía mostrando formación de cráter en la superficie dental irradiada con láser Er:YAG a 100mJ, 12.7J/cm². **Fuente Directa.**

Es importante resaltar que la principal utilidad del láser Er:YAG, se enfoca en su posible uso para cortar tejido duro dental, desde sus inicios (1964) al área odontológica, su uso se ha venido investigando para la preparación de cavidades y es así como diversas investigaciones sustentan su efectividad para cortar y ablacionar el tejido duro dental con eficiencia. ^{24, 35, 37, 65-68}

Este gran potencial de ablación de tejidos duros que posee el láser Er:YAG debe estar relacionado con adecuados parámetros de irradiación, que permitan un uso seguro y efectivo.⁶⁹

Hibs y Keller,²⁴ y Sasaki et al.,⁷⁰ explicaron el mecanismo de ablación del tejido duro a través de la teoría de micro-explosiones, ver Figura 5. De acuerdo con esta teoría la energía del láser es absorbida de manera selectiva por el agua y otros componentes orgánicos hidratados, la presión del vapor que se genera en la superficie del esmalte comienza la ruptura de la substancia inorgánica antes de llegar al punto de fusión o derretimiento y aunque los efectos del láser Er:YAG no se encuentran explicados por completo, en cuanto a sus efectos térmicos, específicamente el daño en el tejido pulpar por el aumento de temperatura durante la irradiación, es mínimo a comparación del generado por otros sistemas de láseres como son el CO₂ y Nd:YAG.^{25, 71.}

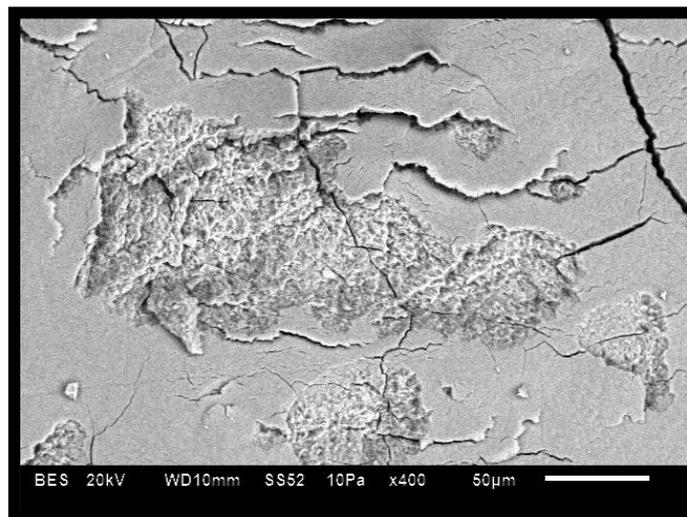


Figura5. Micrografía mostrando pérdida de tejido (ablación), en la superficie del esmalte dental irradiado con láser ER:YAG a 200mJ, 25.5J/cm². **Fuente Directa.**

De manera paralela, en muchos estudios se hizo evidente, que a menos que el daño estructural causado en el esmalte y la dentina, junto con el aumento no deseado en la temperatura pulpar, no fueran reducidos, el láser no se convertiría en un sustituto de la pieza de

mano de alta velocidad en la preparación y tratamiento de los dientes.⁷²⁻⁷⁴ Aunque, dentro de sus ventajas se encontraran la disminución o eliminación de las vibraciones, el ruido, así como inconformidades de muchos pacientes que generalmente se asocian al uso de la pieza de mano (método convencional utilizado para la preparación de tejido dental y eliminación de caries), también, permite la reducción del uso de anestesia local para muchos procedimientos, por ser menos invasivo y esta característica lo hace muy atractivo para pacientes con fobia a las agujas, inclusive para su uso en niños.^{18, 75.}

Al mismo tiempo y conforme se investigaba el uso del láser Er:YAG para fines de operatoria dental y en base a los resultados de previas investigaciones y como un **efecto secundario** se observó, que el láser Er:YAG, generaba resistencia a la dilución ácida en las zonas adyacentes a las ablacionadas, por lo que, en la actualidad, el enfoque preventivo del láser es el punto de interés de investigadores. Es por ello, que las investigaciones se han encaminado al estudio del empleo de diferentes tipos de láseres con sus respectivas longitudes de onda para la prevención de la caries dental.⁷⁶

En estudios realizados para establecer el grado de retención de cavidades preparadas en esmalte con el láser Er:YAG, usando parámetros ablativos, las superficies observadas revelaron patrones irregulares y microretentivos, fusión en algunas áreas con alcance variable, en la zona del esmalte se observó derretimiento y recristalización del tejido, lo cual disminuyó la permeabilidad del esmalte y aumentó su ácido resistencia.⁷⁷

Otros estudios indican que después de irradiar las superficies de los dientes con láser Er:YAG, el esmalte incrementó su resistencia, induciendo cierto grado de inhibición en el proceso de desmineralización por modificación de la composición química de su superficie.^{60, 78-}

81

Existen teorías que tratan de explicar el fenómeno en que se da dicho efecto preventivo, la teoría más aceptada en cuanto al mecanismo de acción por el cual la irradiación del láser mejora

la resistencia ácida del esmalte es la **reducción del carbono**, esto pasa cuando la superficie del esmalte se calienta y la temperatura oscila entre los 100 – 400°C.⁸² Una vez que el haz del láser interactúa con el tejido, genera calor y la temperatura aumenta, cuando esta se encuentra entre los 300 y 400°C, se manifiesta en la superficie del esmalte remineralización del tejido y una mínima solubilidad, observándose una menor profundidad en las lesiones cariosas en muestras sometidas a un proceso de desmineralización (caries artificial).⁵⁵

Cuando la temperatura de la superficie aumenta entre **100 y 650°C** los principales cambios químicos que ocurren en el diente son: el componente CO₃ (trióxido de carbono), en la posición del fosfato disminuye y los iones de fosfato ácido se condensan para formar iones de pirofosfato.

De **650 – 1, 100°C** ocurre una recristalización térmica, el tamaño del cristal crece, el pirofosfato reacciona con la apatita para formar PO₄ (fosfato, sal de ácido fosfórico, a altas temperaturas los fosfatos se condensan y forman pirofosfatos) a lo largo de la formación de β-TCP.

En temperaturas mayores a **1,100°C**, el principal cambio es que el β-TCP se convierte en α-TCP. Cuando la temperatura alcanza **1,430°C**, el α-TCP cambia a un polimorfo de alta temperatura. Los fosfatos tricálcicos (α y β) son potencialmente solubles en un medio ambiente ácido.^{54, 58}

La teoría del **bloqueo orgánico**, establece una modificación de la matriz orgánica del esmalte, esta alteración induce el mecanismo de prevención de caries por el láser.^{82, 83.}

Otra explicación de esta teoría es que, como también se ha observado que en las muestras irradiadas con láser Er:YAG la superficie del esmalte se altera morfológicamente, los cristales del esmalte reducen la permeabilidad de iones, por lo tanto se ha llegado a la conclusión de que la cristalinidad de los prismas del esmalte mejora después de su irradiación con láser, volviendo al esmalte resistente a la disolución ácida.^{60, 61, 84}

También, la disminución en el contenido de carbonato y formación de pirofosfato, descomposición de las proteínas que se observan en el esmalte irradiado con láser Er:YAG, resultan en bloqueos orgánicos para las vías de difusión durante el proceso de caries.⁷⁷

1.8. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS ó XEDS)

El microscopio electrónico tuvo sus orígenes en 1928, la idea de desarrollarlo surgió de la inquietud de proveerle a una imagen u objeto una resolución mucho mejor que la que proporcionaba el microscopio óptico.⁸⁵ También, existen reportes que en los años 1960-1980s el desarrollo de una resolución mayor permitía obtener imágenes directas de estructuras más profundas (tipo entramado) con una resolución de ~0.2nm, convirtiéndose en una herramienta clave en el estudio de las estructuras de los materiales modernos.^{86,87}

El microscopio electrónico de barrido (SEM), tiene una técnica que muestra la imagen de la superficie analizada con alta resolución, es un instrumento capaz de reproducir imágenes de las superficies de especímenes biológicos, con excelente resolución y contraste.^{88, 89}

Un microscopio electrónico de barrido (SEM), de ultra- alto vacío (siglas en inglés:UHV; ultra- high -vacuum), con una pistola de emisión de campo (siglas en inglés: FEG; field emission gun), funciona a energías (donde los electrones son la principal fuente) a partir de 100 eV (electrovoltio) a 30 keV (kiloelectrovoltio). El SEM, puede formar imágenes que contienen información de: composición química de la superficie, estado de enlace químico, o bien, a lo que se le llama: estructura electrónica y morfología de la superficie en una resolución microscópica de varios cientos de angstroms (Å), usando diferentes técnicas como: **microscopía electrónica de barrido de Auger** (efecto Auger, llamado así por quien lo descubrió, Pierre Auger en 1920 y

se refiere a electrones energéticos emitidos desde un átomo excitado después de una serie de eventos de relajación internos), microscopia electrónica de barrido de energía perdida y microscopia de difracción de electrones de barrido de baja-energía (LEED, por sus siglas en inglés), entre otros.⁹⁰

Al mismo tiempo se comenzaron a desarrollar otras técnicas analíticas, como la Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS), la cual es una herramienta analítica de gran alcance, ya que muestra la composición química de los materiales.⁹¹ Por medio de esta herramienta se pueden analizar los elementos químicos en los materiales y conocer la composición química del objeto/material analizado.⁸⁵ El “mapeo” es un procedimiento esencial para la caracterización a nano-escala de las propiedades químicas, como las interfaces y precipitados/partículas incrustadas en los materiales.⁹²

2. Planteamiento del Problema

Las enfermedades de la cavidad bucal deterioran la calidad de vida, causan incomodidad, dolor, así como limitaciones funcionales y tienen un impacto negativo en la salud en general.⁹³

La caries dental fue documentada en la primera y tercera Encuestas Nacionales de Salud y Examinación en Nutrición en los Estados Unidos como la enfermedad bucal crónica más común y con mayor prevalencia en la infancia y la adolescencia.⁹⁴⁻⁹⁶

En México, representa el problema de salud bucal número uno, ya que el 98% de los mexicanos padece esta enfermedad bucal: niños y adolescentes. Su prevalencia oscila entre 70 y 85% en la dentición secundaria a la edad de 12 años.⁹⁷

El principal elemento utilizado para la prevención de caries es el fluoruro, este elemento provee de un tratamiento efectivo contra la prevención de caries, ya que inhibe la desmineralización y promueve la remineralización del esmalte,⁹⁸ además reduce la actividad metabólica de las bacterias.⁹⁹

Este agente ha sido adicionado a diversos productos como dentífricos, enjuagues bucales, geles de uso odontológico profesional, agua de consumo y sal de mesa.^{100, 101} En México, principalmente se utilizan las pastas dentales adicionadas con flúor. El programa de fluoración de la sal se ha venido implementando por más de la mitad del siglo en Europa y más recientemente en América Latina.^{102, 103.} Específicamente, en México el Programa Nacional de Fluoración de la Sal de mesa (PNFS), se estableció en 1993.⁹³

Recientemente, con la introducción de nuevas tecnologías, como lo son terapias remineralizantes y el nuevo enfoque conservador en el área de la odontología restaurativa, el principal interés de investigadores y clínicos ha sido utilizar herramientas de detección y monitoreo oportuno de caries, como lo son los láseres de fluorescencia (por sus siglas en ingles QLF; Quantitative light-induced fluorescence).¹⁰⁴ A medida que incrementa el entendimiento

de clínicos por los procesos de prevención primaria y secundaria, la detección oportuna de lesiones de caries incipientes y la manera efectiva de combatirlas, así como implementar el uso de nuevas tecnologías entre las que destacan actualmente el tratamiento con láser (sistemas como el láser Er:YAG), para la prevención de caries, sobretodo en grupos de población vulnerables es la meta de investigadores y clínicos.

Los láseres dentales han demostrado tener un efecto preventivo contra la caries dental, ya que inhiben la desmineralización del esmalte ¹⁰⁹ y disminuyen la permeabilidad del esmalte.

106

Por otro lado, algunos estudios que han intentado determinar los efectos preventivos del láser Er:YAG, han mostrado que, el fenómeno que potencializa la resistencia del esmalte a la disolución ácida, así como las densidades de energía óptimas, son aún puntos de controversia y debate entre los grupos de investigadores.

Así mismo, además de los cambios químicos que genera el láser Er:YAG sobre la superficie del esmalte posterior a la irradiación, se ha reportado la presencia de cambios morfológicos, los cuales podrían considerarse como efectos adversos, como lo son la formación de cráteres y fisuras, los cuales pudieran ser sitios susceptibles para el acumulo de bacterias y el desarrollo de lesiones cariosas.

Es así como, el presente trabajo de investigación *in vitro*, pretende responder a la siguiente pregunta:

1. ¿Cuáles son los cambios químicos y morfológicos asociados a la disolución ácida del esmalte irradiado con láser Er:YAG?

3. Hipótesis:

Existirán cambios químicos específicos en el at.% de C, O, P, Ca y Cl y aumento de la relación Ca/P en la superficie del esmalte dental irradiado con láser Er:YAG, asociados a un incremento de su resistencia a la disolución ácida.

Los cambios morfológicos en la superficie del esmalte dental irradiada con láser Er:YAG estarán asociados a la densidad de energía utilizada.

Hipótesis nula

No existirán cambios químicos específicos en el at.% de C, O, P, Ca y Cl y aumento de la relación Ca/P en la superficie del esmalte dental irradiado con láser Er:YAG, asociados a un incremento de su resistencia a la disolución ácida.

Los cambios morfológicos en la superficie del esmalte dental irradiada con láser Er:YAG no estarán asociados a la densidad de energía utilizada.

Hipótesis alterna

Existirán cambios químicos específicos en el at.% de C, O, P, Ca y Cl, sin aumento de la relación Ca/P en la superficie del esmalte dental irradiado con láser Er:YAG, asociados a un incremento de su resistencia a la disolución ácida.

Los cambios morfológicos tales como cráteres, fisuras, fusión y recristalización sobre la superficie del esmalte irradiada con láser Er:YAG, serán más evidentes a mayores densidades de energía.

3. Objetivos General:

Evaluar *in vitro* los cambios químicos y morfológicos asociados a la disolución acida del esmalte dental humano irradiado con láser Er:YAG.

3.1. Objetivos Específicos:

- Analizar en Microscopía Electrónica de Barrido, SEM y Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía, EDS la superficie del esmalte previo a cualquier tratamiento.
- Evaluar la secuencia de cambios químicos del esmalte dental irradiado con láser Er:YAG y sometido a un proceso de disolución ácida.
- Establecer los cambios en el porcentaje atómico (at.%) de C, O, P, Ca y Cl durante las diferentes fases del estudio.
- Calcular el radio Ca/P, durante las diferentes fases del estudio.
- Determinar la concentración de Ca liberada por el esmalte dental irradiado hacia la solución ácida, por medio de Espectroscopía de Absorción Atómica, AAS.
- Evaluar los cambios morfológicos sobre la superficie del esmalte dental irradiado con láser Er:YAG y sometido a un proceso de disolución ácida.
- Comparar los cambios químicos y morfológicos entre los grupos experimentales durante las diferentes fases del estudio: antes - irradiación, después - irradiación y después - disolución ácida.

4. Justificación

Los láseres dentales han sido probados con el objeto de mejorar las características químicas y morfológicas del esmalte dental y aumentar su resistencia a la desmineralización.¹⁸ El láser Er:YAG ha mostrado proporcionar al esmalte cierto efecto preventivo.^{60, 61, 64} Esta nueva tecnología tiene cualidades que ofrecen la posibilidad de convertirse en una promesa de tratamiento efectivo en la lucha contra la caries dental, superando a los métodos tradicionales.

La caries dental sigue siendo un problema de salud oral prevalente en la mayoría de los países industrializados afectando entre el 60 y 90% de la población escolar y a la mayoría de los adultos.¹⁰⁷

La Organización Mundial de la Salud (OMS), espera que la incidencia de caries dental aumente en muchos países en vías de desarrollo, particularmente como resultado de un consumo cada vez mayor de azúcares y a la exposición inadecuada a los fluoruros.¹⁰⁸ En México considerado un país en vías de desarrollo dependiendo las zonas está incidencia oscila entre un 89% de la población.¹⁰⁹ Por lo que la caries dental está catalogada como el problema de salud bucal número uno, por encima de las parodontopatías, cáncer bucal y maloclusiones dentales. Es por ello, que la realización de estudios tanto in vitro como clínicos, proporcionen información suficiente que nos permitan entender a profundidad las cualidades en cuanto a ventajas y desventajas que ofrece esta nueva tecnología, dar a conocer resultados que revelen las características morfológicas y químicas de la superficie del esmalte dental irradiado proveerá de información valiosa que nos ayudará a determinar si el láser Er:YAG utilizado a determinadas densidades de energía puede convertirse en el método de prevención de caries número uno en el mundo.

El uso de los diferentes tipos de láseres en la Odontología han sido ampliamente estudiados, desde que se sugirió por primera vez el uso de láser de rubí con fines dentales.⁷⁵ El láser

Er:YAG ha demostrado ser un láser versátil, ya que puede ser usado, tanto para tejidos duros como para tejidos blandos.^{8, 11, 75, 110}

Es por ello que evaluar *in vitro* los cambios químicos producidos en la superficie del esmalte dental subsecuente a su irradiación con láser Er:YAG, nos permitirá ampliar el conocimiento que en la actualidad se conocen al respecto y así poder entender los efectos reales que este láser tiene sobre el esmalte y como estos favorecen la resistencia ácida del mismo.

6. Material y Métodos:

6.1. Diseño de Estudio

Tipo de estudio

Estudio experimental, ver diseño en Figura 6.

Método de muestreo

Por conveniencia

Universo

Premolares extraídos por indicaciones ortodóncicas de Instituciones de Salud Bucal: Clínica de Ortodoncia del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), en la Clínica Odontológica Morelos del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios, (ISSEMYM) y Clínicas privadas de atención bucal, donde brindan servicio especializado de Ortodoncia, en la ciudad de Toluca, Estado de México.

Tamaño de la muestra

En este estudio se incluyeron 24 premolares humanos extraídos por razones ortodóncicas, con previo consentimiento informado (Anexo 1-A y 1-B), obteniéndose un total de 48 bloques de esmalte de 2x5 mm.

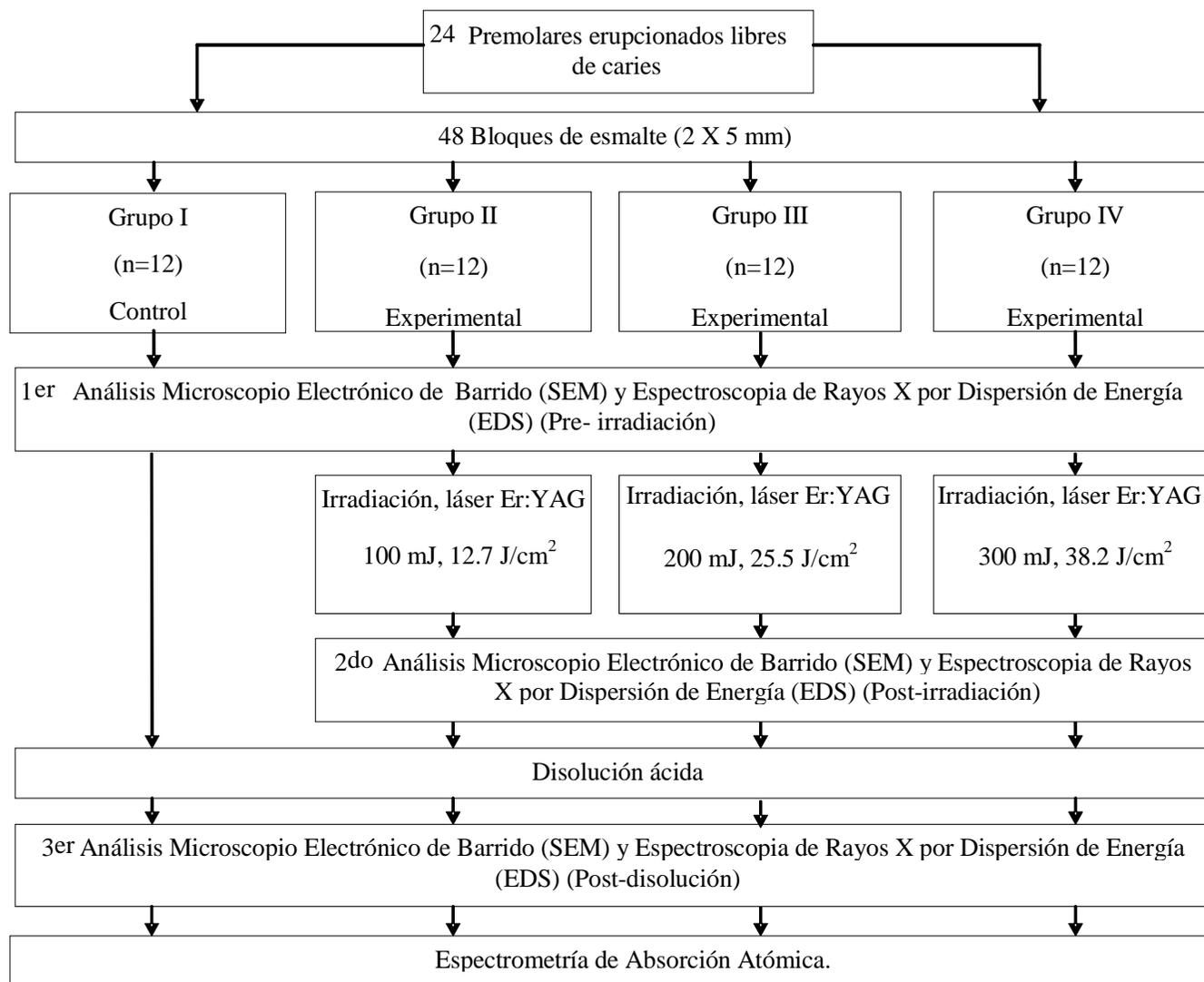


Figura 6. Diseño experimental del estudio.

6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de la muestra

Criterios de inclusión

Premolares extraídos por indicaciones ortodóncicas, con Valores DIAGNOdent (DIAGNOdent[®] pen, Kavo Dental Excellence, Kaltenbach & Voigt GmbH, Bismarckring 39, D-88400 Biberach), entre 0 y 13, equivalente a diente sano.

Sin restauraciones.

Sin fracturas de esmalte ocasionadas durante la extracción dentaria.

Sin descalcificaciones ni lesiones de mancha blanca.

Sin defectos de estructura y color en el esmalte de las superficies bucales.

Sin fluorosis dental.

Criterios de exclusión de la muestra

Toda muestra de aquel órgano dentario que no cumplió con los criterios de inclusión.

Criterios de eliminación de la muestra

Fueron eliminados todos aquellos órganos dentarios que sufrieron deterioro durante la obtención y preparación de la muestra.

6.3. Procedimientos

Recolección de la muestra

La recolección de la muestra se llevó a cabo en Instituciones de Salud Bucal: Clínica de Ortodoncia del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), en la Clínica Odontológica Morelos del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios, (ISSEMYM) y Clínicas

privadas de atención bucal, donde brindan servicio especializado de Ortodoncia, en la ciudad de Toluca, Estado de México.

Almacenamiento de la muestra

Inmediatamente después de la extracción, los premolares, fueron lavados con agua deionizada, eliminando todos los restos de tejido blando con un mango y hoja de bisturí No. 12 (Huaiyin Medical Instruments Co., LTD. Huaiyin, Jiangsu, China).

Posteriormente se almacenaron en frascos estériles de polietileno, cada frasco con: 25ml de solución deionizada y cristales de timol al 0.2%, para conservar e inhibir el crecimiento bacteriano en las muestras, fueron refrigerados a una temperatura de 4°C, hasta el inicio de la fase experimental.

Cortes

En primera instancia cada premolar se dividió, de tal manera que se separó la corona de la raíz, mediante un corte preciso en dirección transversal, siguiendo la unión amelocementaria (Cut-off Peq Grueso, Dentorium, New York, USA., Micromotor M2 Master, M25800011, Drillco, Miami, USA.), bajo constante irrigación de agua deionizada para evitar el calentamiento de la muestra, ver Figura 7.



Figura 7. División corona- raíz. Fuente Directa

Posteriormente la corona se fijó en una laminilla de vidrio (suplementos de laboratorio), de uso en laboratorio de microscopía, con resina epóxica (Allied, Rancho Dominguez, CA,

USA), de manera que la cara vestibular de la corona quedó orientada hacia la izquierda (viendo la laminilla de frente) y la cara oclusal hacia arriba y se realizó el primer corte para eliminar la cara lingual de la corona, ver Figura 8.

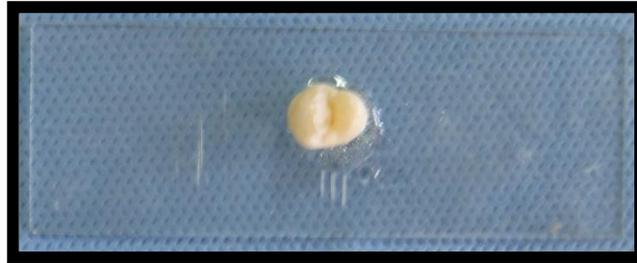


Figura 8. Fijado de la corona en la laminilla. Fuente directa

Los cortes se realizaron de manera sistematizada, utilizando un disco de diamante, montado sobre una cortadora (South Bay Technology, Inc., USA), ver Figura 9.



Figura 9. Disco montado en cortadora. Fuente Directa.

Posteriormente la corona fue desmontada de la laminilla para cambiar su orientación, ahora con la cara vestibular hacia arriba, como referencia la cara oclusal quedó orientada hacia la derecha del operador, ver Figura 10.

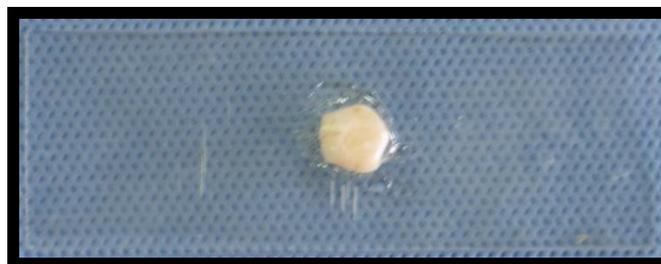


Figura 10. Orientación corona. Fuente directa.

Se realizó el segundo corte del diente para eliminar el tercio oclusal de la cara vestibular de la corona, con el tercer corte se eliminó el tercio cervical de la corona.

Nuevamente la muestra se desmontó de la laminilla de vidrio para cambiar su orientación, esta vez dándole un giro de 90°, de tal manera que el cuarto corte permitió eliminar lo correspondiente a una de las caras proximales de la corona, y el sexto corte eliminó la cara proximal restante. De esta forma se obtuvo un bloque de 4 x 5 mm, el cual se dividió con un corte final en dos partes iguales, cada uno con una superficie de 2 x 5 mm, ver Figuras 11 y 12.

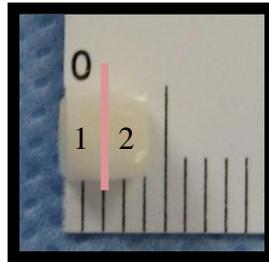


Figura 11. Bloque de esmalte antes de ser dividido para la obtención de las muestras. Fuente directa.

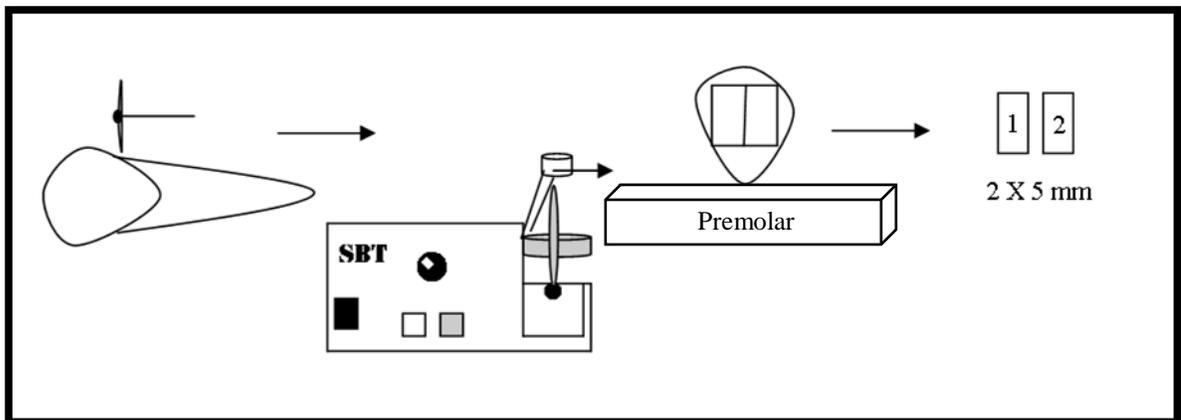


Figura 12. Esquema simplificado para la obtención de la muestra. Fuente Directa.

Posteriormente, las muestras se lavaron durante 10 seg. con agua deionizada, sin cepillarlas y se almacenaron en frascos estériles de polietileno, con 25 ml de solución deionizada y cristales de timol al 0.2% y un pH de 7, a una temperatura de 4°C, hasta comenzar la fase experimental.

Grupos experimentales

Las 48 muestras obtenidas fueron divididas de manera aleatoria en 4 grupos (n=12): GI sin irradiación o grupo control. GII, GIII y GIV fueron irradiados con 3 diferentes densidades de energía de 12.7, 25.5 y 38.2 J/cm², respectivamente.

La distribución de los grupos se muestra en la figura 1, correspondiente al diseño experimental del estudio.

Tratamiento con láser

Para el tratamiento con láser se utilizó un sistema de láser Er:YAG (Lumenis OPUS DUO™, Er:YAG + CO₂, Israel), con una longitud de onda de 2.94 μm a 10 Hz, con una duración de pulso de 250-450 μsec, a modo de no- contacto, sin agua. La energía de irradiación se calibró con el aditamento que para tal fin incluye el equipo, mientras que la energía liberada fue evaluada periódicamente con un medidor de potencia (Lasermater-P, Coherent Co., Santa Clara, CA, USA). Para el manejo de las muestras se utilizó una pinza para papel de articular de acero inoxidable, con sus partes activas cubiertas con un protector de látex para evitar el reflejo de los rayos láser. La irradiación se realizó manualmente^{55, 111} en una dirección, la punta de zafiro se colocó perpendicularmente a cada muestra, escaneando la superficie del esmalte. Cada muestra fue irradiada una sola vez a una distancia punta-muestra de 1 mm. Una lámina de acero inoxidable (23 mm x 5 mm x 0.5 mm) se colocó en la parte superior de la pieza de mano del láser para conservar dicha distancia. Para corroborar que tanto en diámetro de salida de la punta

de la punta de zafiro como el del haz del láser fueran iguales, se usó una placa sensible al infrarrojo (Lumitek International, Inc., USA).

Análisis de la Superficie del Esmalte con Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés)

Las 48 muestras (12 por grupo), se dejaron secar a temperatura ambiente y se colocaron en un porta-muestras (platina de aluminio), fijándolas con cinta adhesiva de carbón (SPI Supplies, USA), para su observación en el SEM (JEOL, JSM-5300, Japan), durante las diferentes etapas del experimento, considerando en cada análisis el punto de referencia marcado previamente para este propósito.

Caracterización química de la muestra (EDS, por sus siglas en inglés)

Para determinar la composición química de la superficie del esmalte dental, las muestras de cada grupo se dejaron secar a temperatura ambiente, se fijaron en una platina de aluminio con una cinta adhesiva de carbón (SPI Supplies, USA). Se determinó el porcentaje atómico (at.%) de carbono (C), oxígeno (O), fósforo (P), cloro (Cl) y calcio (Ca), mediante EDS.

Disolución Ácida

Previo a este procedimiento, el área no irradiada de cada una de las muestras se cubrió con barniz ácido-resistente. Posteriormente, cada muestra fue sumergida en 2ml de solución desmineralizante (ácido láctico 0.1M, pH 4.8)¹¹² y colocadas en una incubadora a 37°C y 100% de humedad, durante 24 hrs. Ver figura 1

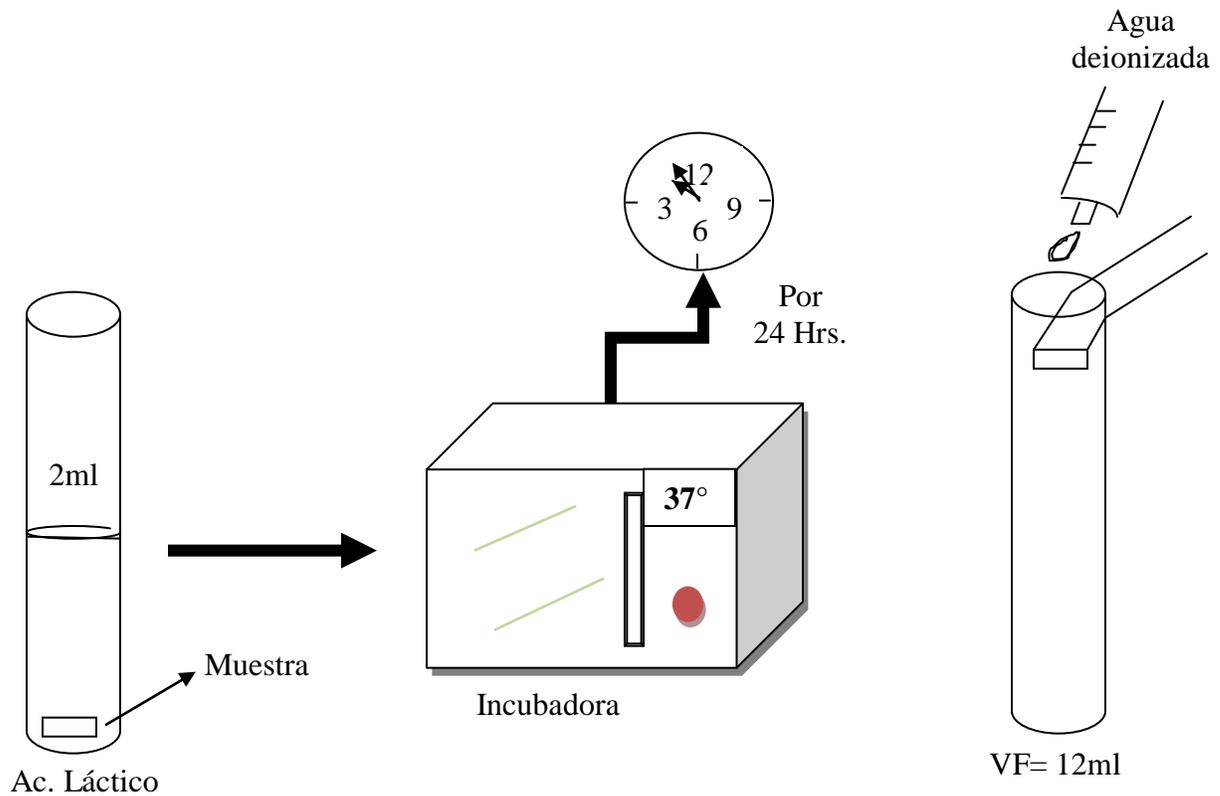


Figura 13. Diagrama de proceso de desmineralización Fuente Directa.

Después de la disolución ácida, las muestras se enjuagaron con agua deionizada dentro de los tubos de ensayo (hasta obtener un V_F de 12ml en cada tubo), con el propósito de remover los residuos de Ca de la superficie del esmalte, este procedimiento se realizó para poder obtener la concentración de Ca de las muestras mediante AAS.

Espectrometría de absorción atómica (AAS, por sus siglas en inglés)

La solución recolectada fue depositada en un matraz de 25 ml y los tubos de ensayo se enjuagaron con agua deionizada, la cual se agregó al matraz de cada muestra, colocando 2.5 ml de ácido nítrico 1-1 ultrapuro (Hach lote 26 EM, USA) y 2.5 ml de cloruro de potasio (Merck al 99.5 % lote K24252236, USA) como supresor de ionización. Cada matraz se selló (parafilm

"M", USA) y se dejó reposar 21 horas y posteriormente se aforó con 25 ml de agua deionizada, sellándose nuevamente con parafilm para su posterior homogenización. Se procedió a la calibración del espectrómetro (Varian SpectrAA, Australia), con soluciones patrón certificadas, partiendo de una de 1000 hasta llegar a las concentraciones deseadas.

Posteriormente se realizaron las lecturas de calcio, tomándose tres lecturas por cada muestra, se obtuvo el promedio y se verificó con una muestra valorada de concentración conocida. El procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Química de la UAEMéx.

6.4. Variables de Estudio

Independientes

Densidades de energía utilizadas

Dependientes

Porcentaje Atómico de C, O, P, Cl y Ca, relación Ca/P y morfología.

Tabla 1. Definición Conceptual y Operacional de variables.

<i>Variable</i>	<i>Definición Conceptual</i>	<i>Definición Operacional</i>	<i>Tipo de variables</i>	<i>Escala de Medición</i>	<i>Análisis Estadístico</i>
Densidad de energía	Se refiere a la cantidad total de energía por superficie de área que libera el láser Er:YAG, sobre la muestra.	Es la cantidad total de energía liberada por el láser Er:YAG, sobre un área específica de la superficie del esmalte dental, sus unidades de medición son: J/cm^2 .	Cualitativa Policotómica	GII: $12.7J/cm^2$ GIII: $25.5J/cm^2$ GIV: $38.2J/cm^2$	NA
Carbono	Elemento químico, su símbolo es C y su número atómico es 6.	Elemento que forma parte de la estructura del esmalte, el cual fue determinado por Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS).	Cuantitativa continua	Razón at. %	Friedman, Wilcoxon
Oxígeno	Elemento químico, su símbolo es O y su número atómico es 8.	Elemento que forma parte de la estructura del esmalte, el cual fue determinado por Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS).	Cuantitativa continua	Razón at. %	Friedman, Wilcoxon
Cloro	Elemento químico, su símbolo es Cl y de número atómico 17.	Elemento que forma parte de la estructura del esmalte, el cual fue determinado por Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS).	Cuantitativa continua	Razón at. %	Friedman, Wilcoxon
Calcio	Elemento químico, su símbolo es Ca y de número atómico 20.	Elemento que forma parte de la estructura del esmalte, el cual fue liberado a la solución ácida y se determinó a través de Espectrometría de Absorción Atómica. Además el Ca remanente en la superficie también se evaluó por Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS).	Cuantitativa continua	Razón mg/L at. %	Friedman, Wilcoxon; Kruskal Wallis, Mann-Whitney U
Relación Ca/P	Cantidad de Ca y P (at. %), presente en la densidad del contenido mineral del esmalte.	Resulta de dividir el at. % de Ca entre el at. % de P.	Cuantitativa continua	Razón at. %	Friedman, Wilcoxon; Kruskal Wallis, Mann-Whitney U
Morfología	Forma de la superficie del esmalte.	Apariencia de la superficie del área del esmalte determinada a través de Microscopía Electrónica de Barrido, (SEM). Características morfológicas de la superficie del esmalte: Presencia/Ausencia de prismas expuestos Presencia/Ausencia de prismas obliterados. Presencia/Ausencia de fracturas Presencia/Ausencia de cráteres Presencia/Ausencia de fisuras Presencia/Ausencia de fusión Presencia/Ausencia de recristalización	Cualitativa Dicotómica	Normal	NA

6.5. Implicaciones Bioéticas

Con lo que respecta a los aspectos éticos de la investigación en seres humanos y de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (48° Asamblea General de octubre del 2000) y vertidos en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, se contó con el conocimiento de los pacientes para la donación de sus órganos dentarios.

De acuerdo al artículo 13, prevaleció el criterio de respeto a su dignidad y la protección de sus derechos, así como el bienestar de los pacientes que aceptaron donar sus órganos dentarios.

De acuerdo al artículo 16, que respecto a las investigaciones en seres humanos, se protegió la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autoriza.

Considerando que esta investigación se encuentra en el esquema del Título Segundo, Capítulo 1, artículo 17, inciso II: Investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental, cuyo datos serán vertidos en los formatos específicos.

Por tratarse de una investigación con riesgo mínimo y de acuerdo al artículo 23 del Capítulo II, que menciona que en caso de investigaciones con riesgo mínimo, la Comisión de Ética, por razones justificadas, podrá autorizar que el consentimiento informado se obtenga sin formularse por escrito y tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensar al investigador la obtención del consentimiento informado.

En el presente trabajo se elaboró el consentimiento informado de acuerdo al artículo 22 del mismo capítulo que a la letra dice: "El consentimiento informado deberá formularse por escrito y deberá reunir los siguientes requisitos:

- I. Será elaborado por el investigador principal, indicando la información señalada en el artículo anterior y de acuerdo a la norma técnica que emita la secretaría;
- II. Será revisado y en su caso aprobado por la Comisión de Ética de la institución de atención a la salud;
- III. Indicará los nombres y direcciones de dos testigos y la relación que estos tengan con el sujeto de investigación;
- IV. Deberá ser firmado por dos testigos y por el sujeto de investigación o su representante legal en su caso. Si el sujeto de investigación no supiere firmar, imprimirá su huella digital y a su nombre firmará otra persona que el designe;
- V. Se extenderá por duplicado quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o su representante legal."

Mecanismo para la obtención del consentimiento informado.

Durante las citas de rutina se obtuvo el consentimiento para la donación de los órganos dentarios que les fueron extraídos a los pacientes por razones terapéuticas (Anexo I-A y I-B).

6.6. Recolección de Datos

Los resultados de las diferentes pruebas se integraron en hojas de control (Anexo II-IV).

6.7. Análisis Estadísticos

Los datos se analizaron en el paquete estadístico SPSS PSS 19 IBM (SPSS IBM., New York, NY, USA). Se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de los datos. Las pruebas estadísticas Friedman y Wilcoxon, se utilizaron para comparar los porcentajes atómicos de los diferentes elementos, así como, la relación Ca/P.

Kruskal-Wallis y Mann-Whitney fueron empleadas para analizar las diferencias en la concentración de Ca liberada a la solución ácida. Todas las pruebas se realizaron a un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

7. Resultados

7.1. Artículo Aceptado y/o Publicado

Chemical Changes Associated to Increased Acid Resistance of Er:YAG Laser Irradiated Enamel.

7.1.1. Pagina Frontal del manuscrito

Title

Chemical Changes Associated to Increased Acid Resistance of Er:YAG Laser Irradiated Enamel

Names of Authors: Jennifer Manuela Díaz-Monroy, D.D.S., M.S.D.,¹ Rosalía Contreras-Bulnes, D.D.S., Ph.D.,¹ Oscar Fernando Olea-Mejía, CH. E., Ph. D.,² Maria Magdalena García-Fabila, CH. E.,³ Ignacio Sánchez-Flores, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,¹ Laura Emma Rodríguez-Vilchis, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,¹ and Claudia Centeno-Pedraza, D.D.S., M.S.D.¹

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), Jesús Carranza Esq. Paseo Tollocan, Col. Universidad, C.P. 50130, Toluca, Estado de México, México, Telephone and fax 52 722 2 12 43 51 Ext. 118, 117, 113.

²Universidad Autónoma del Estado de México-Universidad Nacional Autónoma de México, Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS), Km 14.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, San Cayetano de Morelos, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, Telephone 52 722 276 6614. Ext 7732

³Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química, Laboratorio de Instrumental, Paseo Tollocan esq. Paseo Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México, Telephone and fax 52 722 2 17 38 90 Ext. 113

Running Title: Chemical Changes of Er:YAG irradiated Enamel

Key Words: Acid resistance, chemical changes, enamel, Er:YAG laser, EDS and AAS

Corresponding Author:

Dra. Rosalía Contreras Bulnes -E-mail: rcontrerasb@uaemex.mx or rcb0209@yahoo.com.mx

Telephone and, fax numbers and e-mail addresses:

Jennifer Manuela Díaz Monroy: Telephone and fax 52 722 2 4 80 33 83 jedimo@hotmail.com

Oscar Fernando Olea-Mejía: Telephone and fax 52 722 276 6611 Ext. 7732
oleaoscar@yahoo.com.mx

Maria Magdalena García-Fabila: Telephone and fax 52 722 2 17 38 90 Ext. 113
mmgafa@yahoo.com.mx

Ignacio Sánchez- Flores: Telephone and fax 52 722 2 12 43 51 Ext. 113 igsf@uaemex.mx

Laura Emma Rodríguez-Vilchis: Telephone and fax 52 722 2 12 43 51 Ext. 110
rovilaster@gmail.com

Claudia Centeno-Pedraza: Telephone and fax 52 722 2 12 43 51 Ext. 120
centenocla@yahoo.com.mx

7.1.2. Carta de Aceptación

501357: Your manuscript has been accepted ↑ ↓ ×

Para ver mensajes relacionados con este, [agrupar mensajes por conversación](#).

 Yomna Sassy (tswj@hindawi.com) [Agregar a contactos](#) 12/11/2013 |
Para: rcontrerasb@uaemex.mx
CC: jedimo@hotmail.com, oleoscar@yahoo.com.mx, mmgafa@yahoo.com.mx, igsf@uaemex.mx, rovilaster@gmail.com, centenocla@yahoo.com.mx

Dear Dr. Contreras-Bulnes,

The review of the Research Article 501357 titled "Chemical Changes Associated to Increased Acid Resistance of Er:YAG Laser Irradiated Enamel," by Jennifer Manuela Díaz-Monroy, Rosalía Contreras-Bulnes, Oscar F. Olea-Mejía, María Magdalena García-Fabila, Ignacio Sánchez-Flores, Laura E. Rodríguez-Vilchis and Claudia Centeno-Pedraza submitted to The Scientific World Journal, has been completed, and I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

Please login to the manuscript tracking system at <http://mts.hindawi.com/> in order to read the submitted review reports including any written commentary detailing changes that you may want to make in order to improve your manuscript before final publication. The production process of your manuscript will start upon the receipt of the electronic files. To upload the electronic files of your final accepted version to the MTS, please access your account and upload the following within the next 2-3 days:

- 1- Source file (Word or TeX/LaTeX).
- 2- Final PDF file of the accepted manuscript.
- 3- Editable Figure files (each figure in a separate eps/postscript/word file) if any, taking into consideration that tiff, jpg, jpeg, bmp formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to The Scientific World Journal.

Best regards,

Yomna Sassy
Journal Publishing Editor
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

7.1.3. Resumen

Antecedentes: El láser Er:YAG produce cambios estructurales y morfológicos, además de un incremento en la ácido resistencia en el esmalte irradiado. El propósito de este estudio fue evaluar los cambios químicos asociados a la ácido resistencia del esmalte tratado con láser Er:YAG. Métodos: Cuarenta y ocho muestras de esmalte se dividieron en 4 grupos (n = 12). GI (de control); Grupos II, III y IV fueron irradiados con el láser Er:YAG a 100 mJ (12,7 J/cm²), 200 mJ (25,5 J/cm²), y 300 mJ (38,2 J/cm²), respectivamente. Resultados: Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la composición química de los grupos irradiados, con excepción de cloro. También existieron diferencias estadísticamente significativas en la

concentración de Ca liberado del esmalte. Conclusiones: Los cambios químicos asociados a un incremento en la ácido resistencia del esmalte dental irradiado con láser Er:YAG, mostraron un claro patrón después de la irradiación, caracterizado por una disminución en el at.% de C y un incremento en el at.% de O,P y Ca, sin cambios en el at.% de Cl. Un incremento en el radio Ca/P después de la irradiación con láser Er:YAG, se asoció al uso de altas densidades de energía. Los cambios químicos producidos por la disolución ácida mostraron una tendencia similar entre los grupos experimentales. Se observó una estabilidad o un incremento en el radio Ca/P después de la disolución ácida en los grupos irradiados, con reducción del Ca liberado hacia la solución ácida.

7.1.4. Abstract

Background: An increase in the acid resistance of dental enamel, as well as morphological and structural changes produced by Er:YAG laser irradiation have been reported. The aim of this study was to evaluate the chemical changes associated to acid resistance of enamel treated with Er:YAG laser. **Methods:** Forty-eight enamel samples were divided into 4 groups (n=12). GI (control); Groups II, III and IV were irradiated with Er:YAG at 100 mJ (12.7 J/cm²), 200 mJ (25.5 J/cm²), and 300 mJ (38.2 J/cm²), respectively. **Results:** Significant differences in composition of irradiated groups, with the exception of chlorine, were observed. There were also significant differences in the amount of calcium released from the enamel. **Conclusions:** Chemical changes associated with an increase in acid resistance of enamel treated with Er:YAG laser showed a clear after-irradiation pattern characterized by a decrease in C at.% and an increase in O, P, Ca at.% and no changes in Cl at.%. An increased Ca/P ratio after Er:YAG laser irradiation was associated with the use of higher laser energy densities. Chemical changes produced by acid dissolution showed a similar trend among experimental groups. Stable or

increased Ca/P ratio after acid dissolution was observed in the irradiated groups, with reduction of Ca released into the acid solution.

Key Words: Acid resistance, chemical changes, enamel, Er:YAG laser, EDS and AAS

Abbreviations and Acronyms: C= Carbon, O= Oxygen, P= Phosphorus, Cl= Chlorine, Ca= Calcium, at.%= Atomic percentage, EDS= Energy dispersive spectroscopy, AAS= Atomic absorption spectroscopy

7.1.5. Introduction

Enamel is the hardest mineralized biological tissue, 96% by weight and 90% by volume is comprised of mineral in the form of crystallites of hydroxyapatite. The remaining non mineral component of enamel is comprised of about 3 wt.% water (8 vol.%), as well as 1 wt.% organic material (2 vol.%) [1].

At least 41 elements of the periodic table have been identified in the chemical composition of the human dental enamel [2], however the Ca is the most abundant [3].

The surface of enamel is, perhaps, its most clinically significant region as it is here that dental caries is initiated [1]. The use of different types of lasers for caries preventive purpose has been studied ever since Stern and Sognaes [4] first suggested the use of ruby laser irradiation.

In 1997, the Er:YAG laser was the first dental laser approved to be used for hard tissue ablation by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) [5]. It is a versatile, commercially available dental laser used in both hard and soft tissues, with multiple applications [5-8]. Additionally, an early report suggested that enamel adjacent to the ablated area by Er:YAG laser irradiation exhibited an increase in acid resistance [9]. It has been reported that caries preventive effects induced by Er:YAG laser treatment have been shown to depend on the energy density of the laser, the irradiation time, the focal distance, and the irrigation conditions [10-17].

Recently, there has been a growing interest in the chemical changes that occur in enamel after Er:YAG laser irradiation. Several spectroscopic characterization techniques, including Dispersive Spectroscopy (WDS) [18], X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) [19], X-Ray spectroscopy (EDX) [20], Fourier-transform Raman and infrared spectroscopy (FT-Raman and FTIR) [21-22] and energy- dispersive spectroscopy (EDS) [23] have been used to evaluate changes in the inorganic component of tooth enamel, differences in the calcium/phosphorus (Ca/P) ratio, changes in carbonate content, modifications in the organic material content and weight percentages (wt%) of several elements in enamel [19-21, 23]. However, further studies are required to clarify the action mechanisms of Er:YAG laser when enamel acid resistance is achieved.

There are no previous reports that evaluate the chemical composition of human dental enamel on the exact same area of the sample, before and after Er:YAG laser irradiation, as well as subsequent to acid dissolution. For this reason, the aim of the present study was to evaluate the chemical changes associated to acid resistance of enamel treated with Er:YAG laser.

7.1.6. Materials and Methods

Tooth selection and sample preparation

The study protocol was reviewed and approved by the Research and Ethics Committee at the Autonomous University of the State of Mexico. All subjects enrolled in this study signed an informed consent form. Twenty four caries-free bicuspid teeth were extracted for orthodontics reasons from patients aged 15-17 years, who reported no use of fluoride products, other than fluoride toothpaste. Teeth with caries, restorations, cracks, and defects in the structure or color of the enamel on the buccal surfaces or fluorosis were excluded. The teeth were stored in a 0.2 (w/v) thymol solution at 4°C during one month until the experiment was performed. Enamel fluorescence was evaluated with a DIAGNOdent pen (DIAGNOdent, KaVo, Biederach,

Germany), and only teeth with sound enamel (values of 0-13, according to the manufacturer's specifications) were included in the study [24-25].

The crown of each tooth was removed using a diamond disc (BesQual, New York, USA) mounted on a low-speed motor (Micromotor M2 Master, M25800011, Drillco Devices Ltd., Miami, FL, USA) under distilled water irrigation to prevent dehydration. The crown was fixed to a glass slide with thermoplasticized epoxy resin (Allied High Tech Products, Rancho Dominguez, CA, USA). Afterwards, a diamond wheel (South Bay Technology, Inc., San Clemente, CA, USA) mounted on a cutter (South Bay Technology, Inc., USA) was used to obtain the samples under constant irrigation. Each tooth was cut to obtain 2 blocks (2 x 5 mm) from buccal surface. A reference point was made on the enamel with a # ¼ round carbide bur (S.S. White, Lakewood, New Jersey, USA) and a high-speed handpiece (W&H Dentalwerk, Bürmoos, Austria), with continuous water spray. Finally, the samples were thoroughly washed with distilled water and dried at room temperature prior to EDS evaluation. A total of forty-eight samples were obtained (twelve samples per group) (Fig. 1).

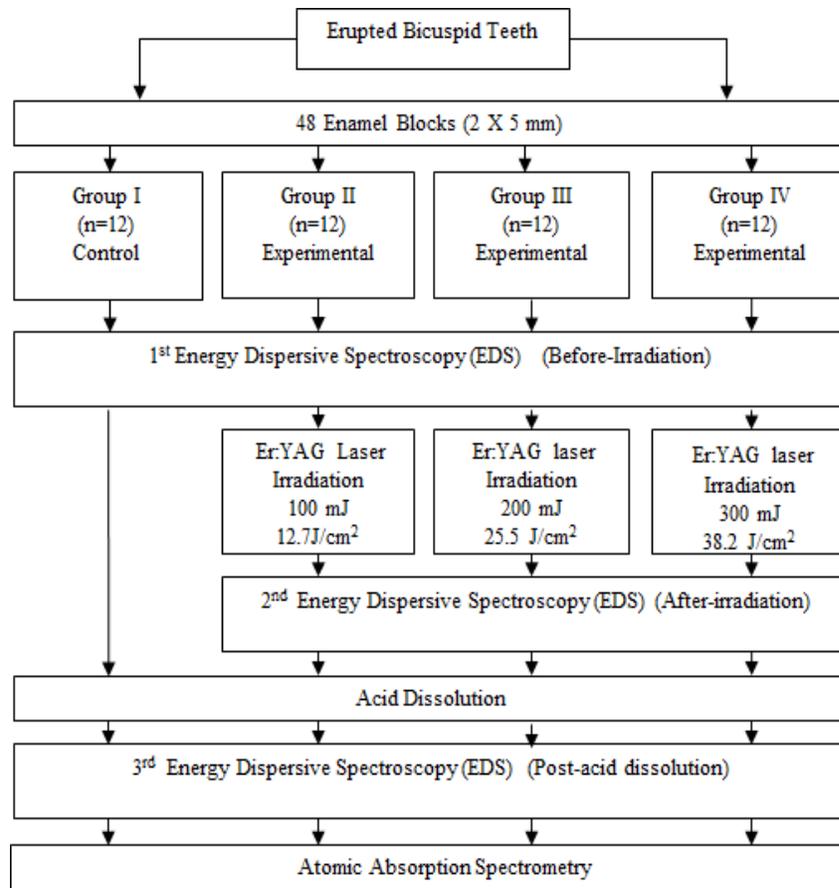


Fig. 1. Experimental design.

Er:YAG laser irradiation

An Er:YAG laser system (Lumenis OPUS DUO™ Er:YAG +CO₂, Yokneam, Israel) was used to irradiate the samples. We used a fixed wavelength of 2.94 μm, an energy pulse from 100 to 300 mJ (depending on the experimental groups), a pulse repetition rate of 10 Hz, a pulse duration of 250-400 μsec, and an exit sapphire tip with a diameter of 1.0 mm. The forty-eight buccal enamel samples were divided into four groups (n=12). Group I, control (no laser irradiation); Group II, irradiated at 100 mJ (12.7 J/cm²); Group III, irradiated at 200 mJ (25.5 J/cm²); Group IV, irradiated at 300 mJ (38.2 J/cm²). Energy levels were calibrated with the

calipers included with the equipment, and the energy delivered was measured periodically with a power meter (LaserMate-P, Coherent Co., Santa Clara, CA, USA).

Irradiation was performed manually from the reference point with a laser spot diameter of 1 mm along the whole sample, in one direction such that the tip was scanned smoothly, perpendicular to the enamel surface of the sample, and without water irrigation. Each sample was irradiated once for 15 s while the tip-sample distance was kept fixed at 1 mm, using the focused laser mode. A sheet of stainless steel (23 mm × 5 mm × 0.5 mm) was fixed to the top of the laser handpiece to ensure the appropriate tip-sample distance. At this tip-sample distance, the exit tip and laser beam had the same diameter, as confirmed by a laminated infrared sensor screen (Lumitek International, Inc., Ijamsville, MD).

Energy dispersive spectroscopy

After each SEM evaluation, the atomic percentages (at.%) of C, O, P, Cl, and Ca were determined by energy dispersive X-ray spectroscopy (ThermoNoran Superdry, USA), in an area of 310 x 210 µm.

Acid dissolution

Previous to this procedure, each surface of the sample was coated with an acid resistant varnish, except the experimental area of interest. Subsequently, all samples were individually demineralized in 2 ml of 0.1 M lactic acid, pH 4.8. The samples remained in the demineralization solution for 24 h in an incubator at 37°C and 100% humidity.

Atomic absorption spectroscopy

After acid dissolution, samples were rinsed with deionized water into test tube to remove Ca residues from the tooth surface. This procedure was followed in order to obtain the amount of Ca released from the samples by atomic absorption spectrometry (Thermo Elemental Solaar, Marietta, Ohio, USA).

Statistical analyses

All data were analyzed using SPSS 19 IBM statistical package (SPSS IBM., New York, NY, USA). The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the data distribution at a significance level of $p \leq 0.05$. The Friedman and Wilcoxon test were performed to compare the atomic percentages of the different elements, a significance level of $p \leq 0.05$.

The Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests were used to analyze the differences in the Ca concentrations released into solution among the groups.

7.1.7. Results

EDS evaluation

The at.% of C, O, P, Cl and Ca obtained by EDS for all groups are displayed in Table 1. There were statistically significant differences in element composition according to experimental stages in irradiated groups, with the exception of Cl which showed similar values in all groups. The atomic Ca/P ratios showed significant increases in groups III and IV.

TABLE 1. Mean Values and Standard Deviations of Elements Atomic Percentages and the Ca/P Ratio on the Irradiated Enamel Surface by Experimental Groups and Stages.

Element	Average value and Standard Deviation										
	Group I: Control		Group II: 100mJ			Group III: 200mJ			Group IV: 300mJ		
	Untreated surface	After-Acid Dissolution	Before-Irradiation	After-Irradiation	After-Acid Dissolution	Before - Irradiation	After - Irradiation	After -Acid Dissolution	Before - Irradiation	After - Irradiation	After -Acid Dissolution
Carbon C	8.04 ^A ±6.36	8.76 ^A ±4.75	9.31 ^A ±5.10	5.64 ^B ±1.87	14.34 ^C ±7.76	7.66 ^A ±5.06	0.52 ^B ±1.80	10.82 ^A ±3.32	20.81 ^A ±9.15	0.94 ^B ±2.24	11.26 ^C ±6.05
Oxygen O	57.98 ^A ±5.05	58.09 ^A ±4.95	62.8 ^A ±5.82	64.5 ^B ±4.11	57.13 ^C ±7.29	66.19 ^A ±3.94	69.70 ^B ±1.52	62.98 ^C ±2.41	53.65 ^A ±5.32	67.03 ^B ±4.62	59.35 ^C ±6.23
Phosphorus P	12.91 ^A ±1.98	12.69 ^A ±1.73	11.56 ^A ±1.25	12.35 ^B ±1.05	11.93 ^A ±4.00	11.18 ^A ±0.75	12.14 ^B ±0.54	10.65 ^A ±0.59	10.27 ^A ± 2.17	12.53 ^B ±1.29	11.02 ^A ±1.44
Chlorine Cl	0.41 ^A ±0.08	0.37 ^A ±0.10	0.31 ^A ±0.05	0.34 ^A ±0.05	0.32 ^A ±0.09	0.32 ^A ± 0.04	0.30 ^A ±0.15	0.32 ^A ±0.03	0.27 ^A ± 0.07	0.16 ^A ±0.17	0.26 ^A ±0.13
Calcium Ca	20.67 ^A ±6.19	20.10 ^A ±6.71	16.02 ^A ± 2.65	17.17 ^B ±2.39	16.24 ^A ±5.64	14.65 ^A ± 0.98	17.34 ^B ± 1.11	15.15 ^A ±1.13	15 ^A ± 4.09	19.34 ^B ±3.24	18.10 ^C ±2.79
Ca/P Ratio	1.60 ^A ±0.25	1.58 ^A ±0.33	1.38 ^A ±0.10	1.38 ^A ±0.08	1.36 ^A ±0.10	1.31 ^A ±0.02	1.43 ^B ±0.08	1.42 ^B ±0.07	1.45 ^A ±0.15	1.54 ^B ±0.12	1.65 ^C ±0.20

* Groups with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

AAS

All experimental groups showed significative lower amounts of Ca released from the enamel upon acid dissolution compared with the control group, which showed the highest amount of released Ca (Table 2).

TABLE 2. The Mean Values and Standard Deviations of Released Calcium into Acid Solution by Group.

<i>Group</i>	<i>N</i>	<i>Calcium (mg/L)</i>	<i>SD</i>
I	12	0.92 ^A	±0.47
II	12	0.27 ^B	±0.15
III	12	0.14 ^C	±0.03
IV	12	0.17 ^C	±0.08

Groups with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

7.1.8. Discussion

Over the last decades, many studies have reported that lasers can improve the resistance of human dental enamel to acid attacks [9, 11, 15, 17, 26]. In the present study, a lower amount of Ca in the acidic solution of irradiated groups showed that enamel acid resistance was increased under the experimental conditions employed. However, this expected effect was more evident for groups III and IV.

The chemical changes associated with increased acid resistance of human dental enamel treated with Er:YAG laser were evaluated by EDS analysis. It is worth mentioning that no reports in the current literature have established the concentration of various elements on the same enamel area during consecutive experimental phases (before-irradiation, after-irradiation and after-acid dissolution). Although the sequential EDS analysis for control group did not show

statistically significant differences for at.% after acid dissolution process, this group showed the highest values for released Ca in the acid solution, according to the atomic absorption spectrometry results. Probably, this element was released from enamel subsurface, beyond the sensibility of the EDS analysis.

In contrast to the control group, irradiated groups revealed statistically significant differences for at.% of most of the elements analyzed during the experimental phases. Only Cl did not exhibit a significant change, likely because Cl is found in minimal quantities in the enamel as reported by Losee et al. [2], and minor changes in Cl content are therefore not evident. Consistent with the increased acid resistance shown by AAS, a significant reduction in the at.% of C was observed after laser irradiation, probably resulting from a decrease in carbonate content. Liu and Hsu [21] have suggested the reduction of carbonate and modification of organic matter as mechanisms for dental caries prevention produced by Er:YAG laser irradiation.

Both O and P showed a significant increase in at.% after irradiation, probably by an increase in content of pyrophosphates, associated with heating of tooth enamel [27]. A significant increase in the at.% of Ca was also observed after irradiation, affecting the Ca/P ratio. Contrary to that reported by Mine et al. [19] and de Andrade et al. [20], this ratio did not show a decrease after Er:YAG laser irradiation. However, they did not examine the same enamel area before and after irradiation. In our study, the Ca/P ratio was significantly increased especially when higher energy densities were used, as in the case of groups III and IV. This ratio remained unchanged when a lower energy density was used (group II). Nevertheless, additional studies are recommended to evaluate the role of the energy density on the Ca/P ratio.

During the third phase of EDS analysis (after-acid dissolution), a similar trend was shown in the chemical changes produced by the acid dissolution on experimental groups. It was characterized by a decrease in the Ca, P and O at.%, as well as an increase of C at.% compared with after-irradiation values.

The chemical change after acid dissolution showed stable or increased atomic Ca/P ratio among irradiated groups, which showed reduction of Ca released into the acid solution, according to Cecchini et al. [15], who reported that groups irradiated with higher energies than those used in our study, presented an increment in enamel acid resistance, with lower amounts of calcium delivered in the solution in comparison to the control.

7.1.9 Conclusions

Chemical changes associated to increased acid resistance of enamel treated with Er:YAG laser showed a clear after-irradiation pattern characterized by a decrease in C at.% and an increase in O, P, Ca at.% and no changes in Cl at.%.

An increased Ca/P ratio after Er:YAG laser irradiation was associated with the use of higher laser energy densities.

Chemical changes produced by acid dissolution showed a similar trend among experimental groups, resulting in a decrease of Ca, P and O at.%, as well as an increase of C at.%.

Stable or increased Ca/P ratio after acid dissolution was shown by irradiated groups, with a reduction of Ca released into the acid solution.

7.1.10. Acknowledgments

We thank Dr. David Villanueva Jurado and Dr. Israel Ramírez López, Maxillofacial Surgeons from the Clínica Odontológica Morelos, Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMYM), for their assistance with obtaining the samples. This project was financed by Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

7.1.11. References

1. HCW Skinner, " Biominerals," *Mineralogical Magazine*, vol 69, no. 5, pp. 621-641, 2005.
2. F. L. Losee, T. W. Cutress, and R. Brown, "Natural elements of the periodic table in human dental enamel," *Caries Research*, vol. 8, no. 2, pp. 123-134, 1974.
3. R. A. Young, "Implications of atomic substitutions and other structural details in apatites," *Journal of Dental Research*, vol. 53, no. 2, pp. 193-203, 1974.
4. R. H. Stern, and R. F. Sognnaes, "Laser inhibition of dental caries suggested by first tests in vivo," *Journal of the American Dental Association*, vol. 85, no. 5, pp. 1087-1090, 1972.
5. J. G. Sulewski, "Historical survey of laser dentistry," *Dental Clinics of North America*, vol. 44, no. 4, pp. 717-752, 2000.
6. A. Aoki, K. M. Sasaki, H. Watanabe, and I. Ishikawa, "Lasers in nonsurgical periodontal therapy," *Periodontology 2000*, vol. 36, pp. 59-97, 2004.
7. D. N. Dederich, and R. D. Bushick, "Lasers in dentistry: separating science from hype," *Journal of the American Dental Association*, vol. 135, no. 2, pp. 204-212; quiz 229, 2004.
8. I. Ishikawa, A. Aoki, and A. A. Takasaki, "Potential applications of Erbium:YAG laser in periodontics," *Journal of Periodontal Research*, vol. 39, no. 4, pp. 275-285, 2004.
9. Kayano T, Ochiai S, Kiyono K, Yamamoto H, et al., " Effects of Er:YAG laser irradiation on human extracted teeth," *Kokubyo Gakkai Zasshi*, vol. 56, no. 2, pp. 381-392, 1989. [In Japanese, English abstract].
10. D. Fried, J.D.B. Featherstone, S.R. Visuri, W.D Seka, and J.T. Walsh, "Caries inhibition potential of Er:YAG and Er:YSGG laser radiation", in: H.A. Wigdor, J.D.B. Featherstone, J.M. White, and J. Neev (eds.). *Lasers in Dentistry II. Proceedings of SPIE*, vol. 2672 pp.73-78, 1996.

11. M. Hossain, Y. Nakamura, Y. Kimura, Y. Yamada, et al., "Caries-preventive effect of Er:YAG laser irradiation with or without water mist," *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, vol. 18, no. 2, pp. 61-65, 2000.
12. C. Apel, J. Meister, N. Schmitt, H. G. Graber, et al., "Calcium solubility of dental enamel following sub-ablative Er:YAG and Er:YSGG laser irradiation in vitro," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 30, no. 5, pp. 337-341, 2002.
13. C. Apel, L. Birker, J. Meister, C. Weiss, et al., "The caries-preventive potential of subablative Er:YAG and Er:YSGG laser radiation in an intraoral model: a pilot study," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 22, no. 4, pp. 312-317, 2004.
14. C. Apel, J. Meister, H. Gotz, H. Duschner, et al., "Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention," *Caries Research*, vol. 39, no. 1, pp. 65-70, 2005.
15. R. C. Cecchini, D. M. Zezell, E. de Oliveira, P. M. de Freitas, et al., "Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: morphological and atomic spectrometry analysis," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 37, no. 5, pp. 366-372, 2005.
16. J. F. Liu, Y. Liu, and H. C. Stephen, "Optimal Er:YAG laser energy for preventing enamel demineralization," *Journal of Dentistry*, vol. 34, no. 1, pp. 62-66, 2006.
17. C. S. Castellan, A. C. Luiz, L. M. Bezinelli, R. M. Lopes, et al., "In vitro evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 25, no. 2, pp. 85-90, 2007.
18. Y. H. Kwon, J. S. Lee, Y. H. Choi, J. M. Lee, et al., "Change of enamel after Er:YAG and CO₂ laser irradiation and fluoride treatment," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 23, no. 4, pp. 389-394, 2005.

19. A. Mine, Y. Yoshida, K. Suzuki, Y. Nakayama, et al., "Spectroscopic characterization of enamel surfaces irradiated with Er:YAG laser," *Dental Materials Journal*, vol. 25, no. 2, pp. 214-218, 2006.
20. L. E. H. de Andrade, J. E. P. Pelino, R. F. Z. Lizarelli, V. S. Bagnato, et al., "Caries resistance of lased human enamel with Er:YAG laser – morphological and ratio Ca/P analysis," *Laser Physics Letters*, vol. 4, no. 2, pp. 157-162, 2007.
21. Y. Liu, and C. Y. Hsu, "Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study," *Journal of Dentistry*, vol. 35, no. 3, pp. 226-230, 2007.
22. A. M. Correa-Afonso, L. Bachmann, C. G. Almeida, S. A. Corona, et al., "FTIR and SEM analysis of CO₂ laser irradiated human enamel," *Archives of Oral Biology*, vol. 57, no. 9, pp. 1153-1158, 2012.
23. L. E. Rodriguez-Vilchis, R. Contreras-Bulnes, O. F. Olea-Mejia, I. Sanchez-Flores, et al., "Morphological and structural changes on human dental enamel after Er:YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 29, no. 7, pp. 493-500, 2011.
24. T. Shinohara, Y. Takase, T. Amagai, C. Haruyama, et al., "Criteria for a diagnosis of caries through the DIAGNOdent," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 24, no. 1, pp. 50-58, 2006.
25. A. F. Zandona, and D. T. Zero, "Diagnostic tools for early caries detection," *Journal of the American Dental Association*, vol. 137, no. 12, pp. 1675-1684, 2006.
26. T. Morioka, S. Tagomori, and T. Oho "Acid resistance of lased human enamel with erbium:YAG laser" *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, vol.9,no.3, pp. 215-217,1991.
27. B. O. Fowler, and S. Kuroda, "Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility," *Calcified Tissue International*, vol. 38, no. 4, pp. 197-208, 1986.

7.2. Artículo Aceptado y/o Publicado

Morphological changes produced by acid dissolution in Er:YAG laser irradiated dental enamel.

7.2.1. Página frontal del manuscrito

Title: Morphological changes produced by acid dissolution in Er:YAG laser irradiated dental enamel.

Names of Authors: Jennifer Manuela Díaz-Monroy,¹ Rosalía Contreras-Bulnes,¹ Oscar Fernando Olea-Mejía,² Laura Emma Rodríguez-Vilchis,¹ Ignacio Sanchez-Flores¹

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), Jesús Carranza esq. Paseo Tollocan, Col. Universidad, C.P. 50130, Toluca, Estado de México, México. Telephone and fax: 52 722 2 12 43 51, Extensions 110, 111, 113, and 120

²Universidad Autónoma del Estado de México-Universidad Nacional Autónoma de México, Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS), Km 14.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, San Cayetano de Morelos, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. Telephone. 52 722 276 6614, Ext 7732

Running Title: Morphological Changes of Er:YAG irradiated Enamel

Corresponding Author:

Dr. Rosalía Contreras-Bulnes.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología

Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Jesús Carranza Esq. Paseo Tollocan. Col. Universidad. Toluca, Estado de México, México. C.P. 50130.

Telephone and fax: 52 722 2 12 43 51 Ext. 111. E-mail: rcontrerasb@uaemex.mx or rcb0209@yahoo.com.mx

Key Words: Enamel, Er:YAG laser, SEM, Morphological Changes, Acid Dissolution

Total number of pages: 12

Total number of figures: 3

7.2.2. Carta de Aceptación

<i>Preview</i>	
From:	mrt.diaspro@iit.it
To:	rcontrerasb@uaemex.mx, rcb0209@yahoo.com.mx
CC:	
Subject:	Microscopy Research and Technique - Decision on Manuscript ID MRT-13-340.R1
	08-Mar-2014
	Dear Dr. Contreras-Bulnes,
	It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Morphological changes produced by acid dissolution in Er:YAG laser irradiated dental enamel." in its current form for publication in Microscopy Research and Technique. The comments of the referee(s) who reviewed your manuscript are included at the bottom of this letter.
Body:	Your article cannot be published until you have signed the appropriate license agreement. Within the next few days you will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask you to log in and will present you with the appropriate license for completion.
	Thank you for your fine contribution.
	Sincerely,
	Prof. Alberto Diaspro Editor-in-Chief, Microscopy Research and Technique mrt.diaspro@iit.it, alberto.diaspro@iit.it

7.2.3. Resumen

Diversos trabajos de investigación han mostrado los efectos del láser Er:YAG sobre la morfología del esmalte. Sin embargo, existe escasa información en cuanto a las alteraciones morfológicas producidas por el ataque ácido de las superficies irradiadas. El propósito de este estudio fue evaluar los cambios morfológicos producidos por la disolución

ácida en esmalte dental irradiado con láser Er: YAG. Cuarenta y ocho muestras de esmalte se dividieron en 4 grupos (n = 12). GI (control); Grupos II, III y IV fueron irradiados con Er: YAG a 100 mJ (12,7 J/cm²), 200 mJ (25,5 J/cm²), y 300 mJ (38,2 J/cm²), respectivamente, a 10 Hz, sin irrigación. La morfología del esmalte se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM), antes de la irradiación, después de la irradiación y después de la disolución ácida. Se evitó el recubrimiento de las muestras y el análisis en SEM se realizó en modo de bajo vacío. Para facilitar la localización del área evaluada, se marcó en las muestras un punto de referencia. Se observaron cambios morfológicos producidos por la disolución ácida del esmalte irradiado, específicamente sobre los efectos no deseados producidos por el láser. Estos cambios morfológicos fueron de leves a severos, dependiendo de la presencia de efectos no deseados después - irradiación.

7.2.4. Abstract

Several scientific reports have shown the effects of Er:YAG laser irradiation on enamel morphology. However, there is lack of information regarding the morphological alterations produced by the acid attack on the irradiated surfaces. The aim of this study was to evaluate the morphological changes produced by acid dissolution in Er:YAG laser irradiated dental enamel. Forty-eight enamel samples were divided into 4 groups (n=12). GI (control); Groups II, III and IV were irradiated with Er:YAG at 100 mJ (12.7 J/cm²), 200 mJ (25.5 J/cm²), and 300 mJ (38.2 J/cm²), respectively, at 10 Hz without water irrigation. Enamel morphology was evaluated before-irradiation, after-irradiation and after-acid dissolution, by scanning electron microscopy (SEM). Sample coating was avoided and SEM analysis was performed in a low-vacuum mode. To facilitate the location of the assessment area, a reference point was marked. Morphological changes produced by acid dissolution of irradiated enamel were observed; specifically on laser induced undesired effects. These

morphological changes were from mild to severe, depending on the presence of after-irradiation undesired effects.

7.2.5. Introduction

The morphological features after laser irradiation is originated from the wavelengths of different types of lasers as well as tissue absorption characteristics. The Er:YAG laser has a 2.94 μm wavelength emission resonant with the vibration energy of the water molecule (Marraccini et al., 2005), resulting in a good absorption in all biologic tissues, including enamel and dentin (Colucci et al., 2012). In 1997, the Er:YAG laser was the first dental laser approved to be used for hard tissue ablation by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Sulewski, 2000).

It is a versatile dental laser that can be utilized in both hard and soft tissues, with multiple applications (Aoki et al., 2004; Dederich and Bushick, 2004; Ishikawa et al., 2004; Sulewski, 2000). Additionally, an early report suggested that enamel adjacent to the ablated area by Er:YAG laser irradiation exhibited increased acid resistance (Kayano et al., 1989). Since then, the utility of this laser system for caries prevention has been evaluated under different experimental conditions in order to achieve optimum irradiation parameters supposed to not ablate the enamel, but to change the morphological or chemical composition (Cecchini et al., 2005).

Several scientific reports have shown the effects of Er:YAG laser irradiation on enamel morphology (Apel et al., 2005; Cecchini et al., 2005; Colucci et al., 2009 Colucci et al., 2012; de Andrade et al., 2007; Delmé and De Moor, 2007; Hossain et al., 2000; Marraccini et al., 2005; Matson et al., 2002; Rodriguez-Vilchis et al., 2011; Tokonabe et al., 1999 Unal et al., 2013). A clean cut margin between the irradiated area and the nonirradiated area has been observed (Tokonabe et al., 1999). Effects such as exposed enamel prisms

(Cecchini et al., 2005; Delmé and De Moor, 2007; Hossain et al., 2000; Marraccini et al., 2005; Matson et al., 2002; Rodriguez-Vilchis et al., 2011; Unal et al., 2013), a rough surface (Cecchini et al., 2005; Colucci et al., 2009; de Andrade et al., 2007; Delmé and De Moor, 2007; Marraccini et al., 2005; Unal et al., 2013), craters (Cecchini et al., 2005; de Andrade et al., 2007; Rodriguez-Vilchis et al., 2011; Tokonabe et al., 1999), ruptured surfaces or fractures (Apel et al., 2005; Colucci et al., 2009; Colucci et al., 2012; Rodriguez-Vilchis et al., 2011), melting (Colucci et al., 2009; Colucci et al., 2012; Hossain et al., 2000; Matson et al., 2002), recrystallization (Matson et al., 2002; Delmé and De Moor, 2007), even carbonization (Colucci et al., 2009) have been attributed to Er:YAG laser irradiation. However, there is lack of information regarding the morphological alterations produced by the acid attack on the irradiated surfaces. For this reason, the aim of the present study was to evaluate the morphological changes produced by acid dissolution in Er:YAG laser irradiated dental enamel.

7.2.6. Materials and Methods

Tooth selection and sample preparation

The study protocol was reviewed and approved by the Research and Ethics Committee at the Autonomous University of the State of Mexico. All subjects enrolled in this study signed an informed consent form. Twenty four caries-free bicuspid teeth were extracted for orthodontics reasons from patients aged 15-17 years. The teeth were stored in a 0.2 (wt/vol) thymol solution at 4°C one month, until the experiment was performed. Enamel fluorescence was evaluated with a DIAGNOdent pen (DIAGNOdent, KaVo, Biederach, Germany), and only teeth with sound enamel (values of 0-13, according to the

manufacturer's specifications) were included in the study (Shinohara et al., 2006; Zandoná and Zero, 2006). Teeth with caries, restorations and defects in the structure or color of the enamel on the buccal surfaces or fluorosis were excluded, as well as teeth with enamel fracture detected under visual inspection and stereoscopy.

The root of each tooth was removed using a diamond disc (BesQual, New York, USA) (Cut-off Peq Thick, Dentorium, New York, USA) mounted on a low-speed motor (Micromotor M2 Master, M25800011, Drillco Devices Ltd., Miami, FL, USA) under distilled water irrigation to prevent dehydration. The crown was fixed to a glass slide with thermoplasticized epoxy resin (Allied High Tech Products, Rancho Dominguez, CA, USA). Afterwards, a diamond wheel (South Bay Technology, Inc., San Clemente, CA, USA) mounted on a cutter (South Bay Technology, Inc., USA) was used to obtain 2 central buccal surfaces with an edge length of 2×5 mm under constant irrigation. A reference point was marked on the enamel at the top of each sample with a # ¼ round carbide bur (S.S. White, Lakewood, New Jersey, USA) and a high-speed handpiece (W&H Dentalwerk, Bürmoos, Austria) with a continuous water spray. Finally, the samples were thoroughly washed with distilled water and dried at room temperature prior to the experiment. A total of forty-eight samples were obtained (twelve samples per group).

Er:YAG laser irradiation

An Er:YAG laser system (Lumenis OPUS DUO™ Er:YAG +CO₂, Yokneam, Israel) was used to irradiate the samples. The laser the study were used a fixed wavelength at 2.94 µm, an energy pulse from 100 to 300 mJ (depending on the experimental groups), a pulse repetition rate of 10 Hz, a pulse duration of 250-400 µsec, and an exit sapphire tip with a diameter of 1.0 mm. The forty-eight buccal enamel samples were divided into four groups

(n=12). Group I, control (no laser irradiation); Group II, irradiated at 100 mJ (12.7 J/cm²); Group III, irradiated at 200 mJ (25.5 J/cm²); Group IV, irradiated at 300 mJ (38.2 J/cm²). Energy levels were calibrated with the calipers provided with the equipment, and the energy delivered was measured periodically with a power meter (LaserMate-P, Coherent Co., Santa Clara, CA, USA).

Irradiation was performed manually (Apel et al., 2002; Castellán et al. 2007) from the reference point in an area of 1 mm along the whole sample, in one direction such that the tip scanned smoothly, perpendicular to the enamel surface of the sample, and without water irrigation. Each sample was irradiated once for 15 sec while the tip-sample distance was kept fixed at 1 mm, using the focused laser mode. A sheet of stainless steel (23 mm × 5 mm × 0.5 mm) was fixed to the top of the laser handpiece to ensure the appropriate tip-sample distance. At this tip-sample distance, the exit tip and laser beam had the same diameter, as confirmed by a laminated infrared sensor screen (Lumitek International, Inc., Ijamsville, MD).

Scanning electron microscopy analysis of the enamel surface

The forty-eight samples (twelve per group) were dried and attached to a testing ring with adhesive carbon paper (SPI Supplies, USA) for observation under a scanning electron microscope (SEM) (JEOL, JSM-5300, Japan) before-irradiation, after-irradiation and after-acid dissolution.

Acid dissolution

All samples were individually demineralized in 2 ml of 0.1 M lactic acid, pH 4.8. The samples remained in the demineralization solution for 24 h in an incubator at 37°C and 100% humidity.

7.2.7. Results

Figure 1 shows the micrographs series for control and experimental groups. Before-irradiation enamel surface showed exposed and closed prisms areas, as well as natural fractures, similar in all groups. After-irradiation micrographs showed craters and cracks, while surface erosion and tissue dragging were evident after acid dissolution. A representative before-irradiation morphological flaw in the enamel surface is observed in Figure 2. (a) A crater-like structural enamel defect, prior to laser irradiation (b) and fractures produced by Er:YAG laser irradiation at 100 mJ/10 Hz and 12.7 J/cm².

Effects of acid dissolution in an area of enamel, melting is showed in Figure 3. (a) After-irradiation at 300 mJ/10 Hz and 38.2 J/cm², a typical melting surface was observed, (b) a large area of melted enamel was removed after acid dissolution.

7.2.8. Discussion

In the present study, we evaluated the morphological changes produced by acid dissolution in Er:YAG laser irradiated dental enamel. Because the experimental design included three stages for SEM evaluation (before-irradiation, after-irradiation and after-acid dissolution), samples coating was avoided and SEM analysis was performed in a low-vacuum mode. To facilitate the location of the assessment area, a reference point was marked.

SEM evaluation revealed some morphological flaws in the enamel surface before-irradiation such as craters. Additionally, cracks were apparent as probably result of the cutting process or loss of residual moisture from the sample. Both morphological flaws could be erroneously attributed to irradiation. We suggest SEM assessments before treatment of samples as a useful tool for evaluation of morphological changes.

There were clear differences in the effects produced by different energy densities of Er:YAG laser irradiation. The findings for Group II (12.7 J/cm^2), were consistent with those reported in previous studies, such as the formation of small craters (Cecchini et al., 2005; de Andrade et al., 2007; Rodriguez-Vilchis et al., 2011; Tokonabe et al., 1999). As it was expected, the morphological changes were proportional to the energy density used and were more evident at higher energy densities.

In Group III (25.5 J/cm^2), the enamel surface became rough and exhibited larger craters and areas of superficial tissue loss. Some of the samples showed cracks, although the non-contact mode seemed to produce less negative effects on the irradiated enamel (Cecchini et al., 2005).

The samples in Group IV (38.2 J/cm^2), which were irradiated at the highest energy density used in this study, resulting in the formation of enamel blocks. In agree with those reported by Cecchini et al. (2005), greater morphological changes on the enamel surface was produced at higher irradiation energies. This phenomenon was consistent with SEM observations after acid dissolution. It has been reported that the irregular surface produced by this irradiation conditions seems to be more prone to the accumulation of bacteria (Bevilacqua et al., 2008; Rodriguez-Vilchis et al., 2011), increasing the risk of developing carious lesions, as also it was suggested by Apel et al. (2003) and Kantorowitz et al. (1998).

All groups showed morphological changes in the enamel surface due to acid erosion. These changes appear most severe in the irradiated group at higher energy density with larger undesired effects, resulting in the detachment of enamel blocks and melting areas after acid dissolution. However, there are no previous reports to compare our results.

7.2.9. Conclusions

Morphological changes produced by acid dissolution of irradiated enamel were observed, specifically on laser induced undesired effects.

These morphological changes were from mild to severe, depending on the presence of after-irradiation undesired effects.

7.2.10. Acknowledgments

We thank Dr. David Villanueva Jurado and Dr. Israel Ramírez López, Maxillofacial Surgeons from the Clínica Odontológica Morelos, Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMYM), for their assistance with obtaining the samples. This project was financed by Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

The authors have no conflict of interest to declare.

7.2.11. References

Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. 2004. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *J Periodontol* 2000 36:59-97.

Apel C, Meister J, Schmitt N, Gräber HG, Gutknecht N. 2002. Calcium solubility of dental enamel following sub-ablative Er:YAG and Er:YSGG laser irradiation in vitro. *Lasers Surg Med* 30:337-341.

Apel C, Schäfer C, Gutknecht N. 2003. Demineralization of Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser-prepared enamel cavities in vitro. *Caries Res* 37:34-37.

Apel C, Meister J, Götz H, Duschner H, Gutknecht N. 2005. Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. *Caries Res* 39:65-70.

Bevilacqua FM, Zezell DM, Magnani R, da Ana PA, Eduardo C de P. 2008. Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser. *Lasers Med Sci* 23:141-147.

Castellan CS, Luiz AC, Bezinelli LM, Lopes RM, Mendes FM, De P Eduardo C, De Freitas PM .2007. In vitro evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. *Photomed Laser Surg* 25:85-90.

Cecchini MRC, Zezell DM, De Oliveira E, de Freitas PM, Eduardo CP. 2005. Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: Morphological and atomic spectrometry analysis. *Lasers Surg Med* 37:366-372.

Colucci V, do Amaral FL, Pécora JD, Palma-Dibb RG, Corona SA. 2009. Water flow on erbium:yttrium-aluminum-garnet laser irradiation: effects on dental tissues. *Lasers Med Sci* 24:811-818.

Colucci V, do Amaral FL, Pécora JD, Palma-Dibb RG, Corona SA. 2012. Effects of water flow on ablation rate and morphological changes in human enamel and dentin after Er:YAG laser irradiation. *Am J Dent* 25:332-336.

de Andrade LEH, Pelino JEP, Lizarelli RFZ, Bagnato VS, de Oliveira OB Jr. 2007. Caries resistance of lased human enamel with Er:YAG laser- morphological and ratio Ca/P analysis. *Laser Phys Lett* 4:157-162.

Dederich DN, Bushick RD. 2004. Lasers in dentistry: separating science from hype. *J Am Dent Assoc* 135:204-212.

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

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Ito M, Matsumoto K. 2000. Caries-preventive effect of Er:YAG laser irradiation with or without water mist. *J Clin Laser Med Surg* 18:61-65.

Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. 2004. Potential applications of Erbium:YAG laser in periodontics. *J Periodont Res* 39:275-85.

Kantorowitz Z, Featherstone JD, Fried D. 1998. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc* 129:585-591.

Kayano T, Ochiai S, Kiyono K, Yamamoto H, Nakajima S, Mochizuki T. 1989. Effects of Er:YAG laser irradiation on human extracted teeth. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 56:381-392. [In Japanese, English abstract]

Marraccini T M, Bachmann L , Wigdor H A , J T Walsh Jr. J T , Stabholtz A, Zezell D M. 2005. Morphological evaluation of enamel and dentin irradiated with 9.6 μ m CO₂ and 2.94 μ m Er:YAG lasers. *Laser Phys Lett* 2:551-555.

Matson JR, Matson E, Navarro RS, Bocangel JS, Jaeger RG, Eduardo CP. 2002. Er:YAG laser effects on enamel occlusal fissures: An in vitro study. *J Clin Laser Med Surg* 20:27-35.

Rodriguez-Vilchis LE, Contreras-Bulnes R, Olea-Mejía OF, Sánchez-Flores I, Centeno-Pedraza C. 2011. Morphological and structural changes on human dental enamel after Er:YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation. *Photomedicine and Laser Surg* 29:493-500.

Shinohara T, Takase Y, Amagai T, Haruyama C, Igarashi A, Kukidome N, Kato J, Hirai Y. 2006. Criteria for diagnosis of caries through the DIAGNOdent. *Photomedicine and Laser Surgery* 24:50-58.

Sulewski JG. 2000. Historical survey of laser dentistry. *Dent Clin North Am* 44:717-752.

Tokonabe H, Kouji R, Watanabe H, Nakamura Y, Matsumoto K. 1999. Morphological changes of human teeth with Er:YAG laser irradiation. *J Clin Laser Med Surg* 17:7-12.

Unal M, Hubbezoglu I, Zan R, Kapdan A, Hurmuzlu F. 2013. Effect of acid etching and different Er:YAG laser procedures on microleakage of three different fissure sealants in primary teeth after aging. *Dent Mater J* 32:557-563.

Zandoná AF, Zero DT. 2006. Diagnostic tools for early caries detection. *J Am Dent Assoc* 137:1675-1684.

7.2.12. Figures and Legends

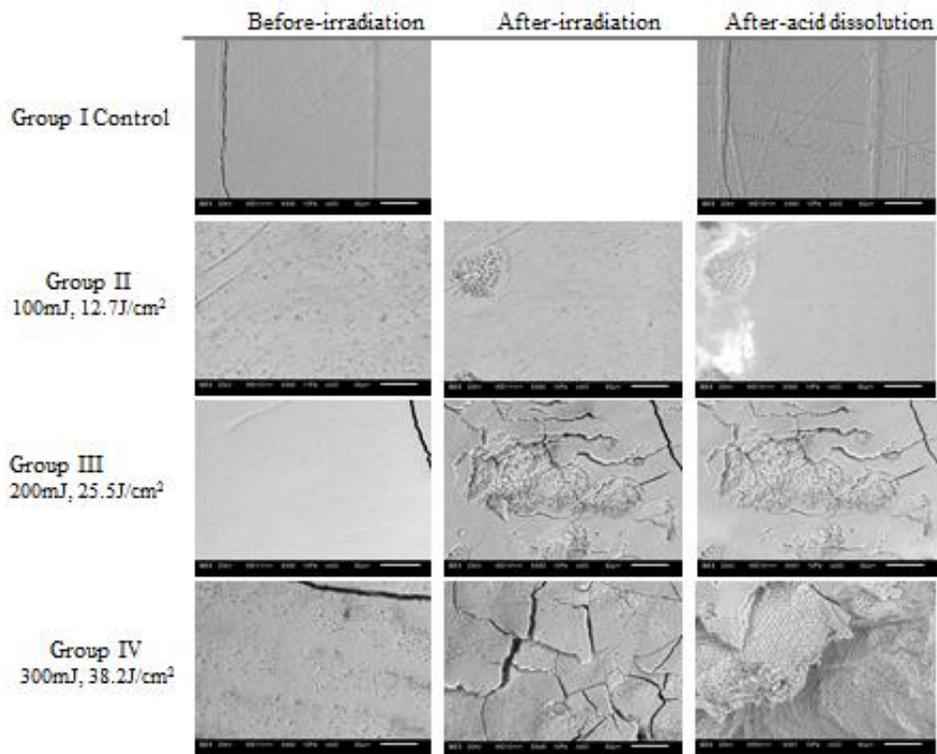


Fig. 1. Representative SEM micrographs sequence of control (no laser irradiation) and experimental (irradiated groups). Before-irradiation micrographs showed exposed enamel prism, wear grooves and cracks. After-irradiation, experimental groups showed morphological changes including cracks and craters, more evident at higher energy

densities. Microparticles and tissue dragging were caused by acid dissolution. Magnification: 400x; scale bar=50 μ m.

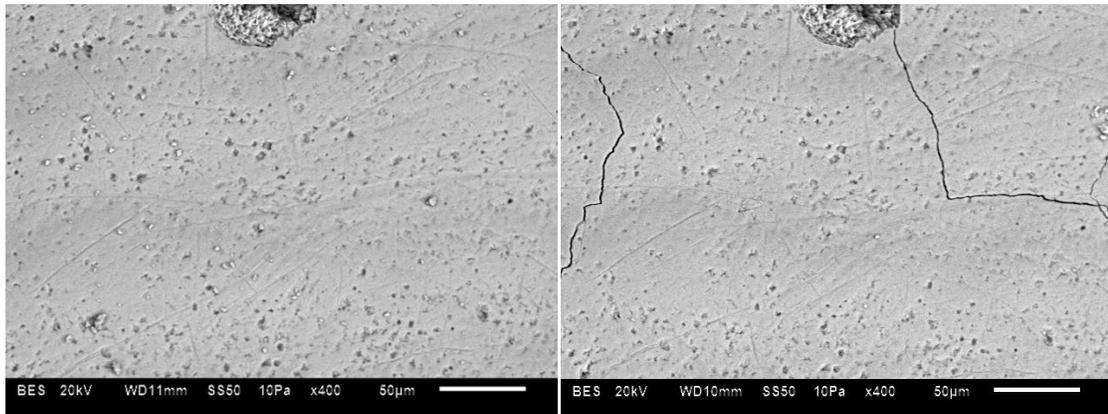


Fig. 2. SEM micrographs from structural enamel flaw. (a) The enamel surface shows exposed prisms and a crater-like defect, prior to laser irradiation. (b) Cracks produced on the same enamel surface by Er:YAG laser irradiation at 100 mJ/10 Hz and 12.7 J/cm². Magnification: 400x; scale bar = 50 μ m.

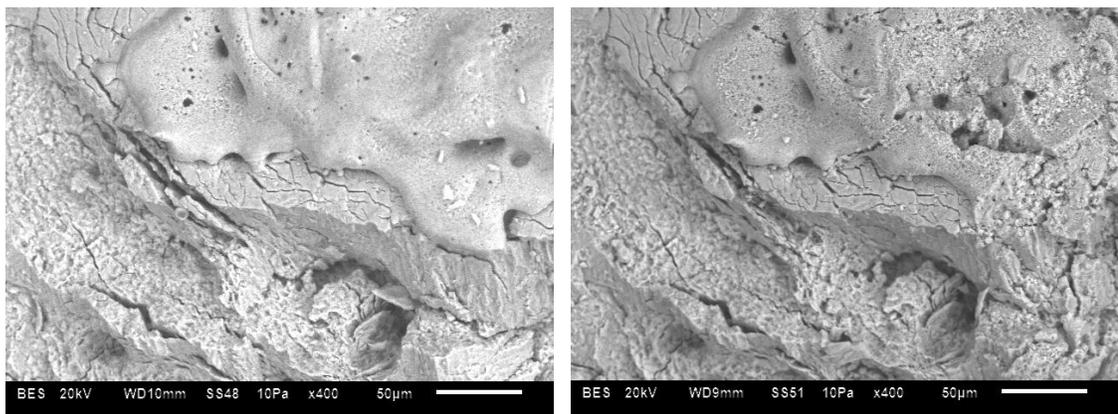


Fig. 3. SEM micrographs of an enamel surface irradiated by Er:YAG laser at 300 mJ/10 Hz and 38.2 J/cm². (a) After-irradiation, a deep crater, cracked areas and melting that looks like foam were observed. (b) A large area of melted enamel was removed by acid dissolution. Magnification: 400x; scale bar = 50 μ m.

7.3. Resultados Adicionales

En una segunda fase se decidió evaluar los cambios morfológicos y químicos producidos por remineralización del esmalte dental irradiado con láser Er:YAG y sometido a un proceso de disolución ácida. Ver Figura 14.

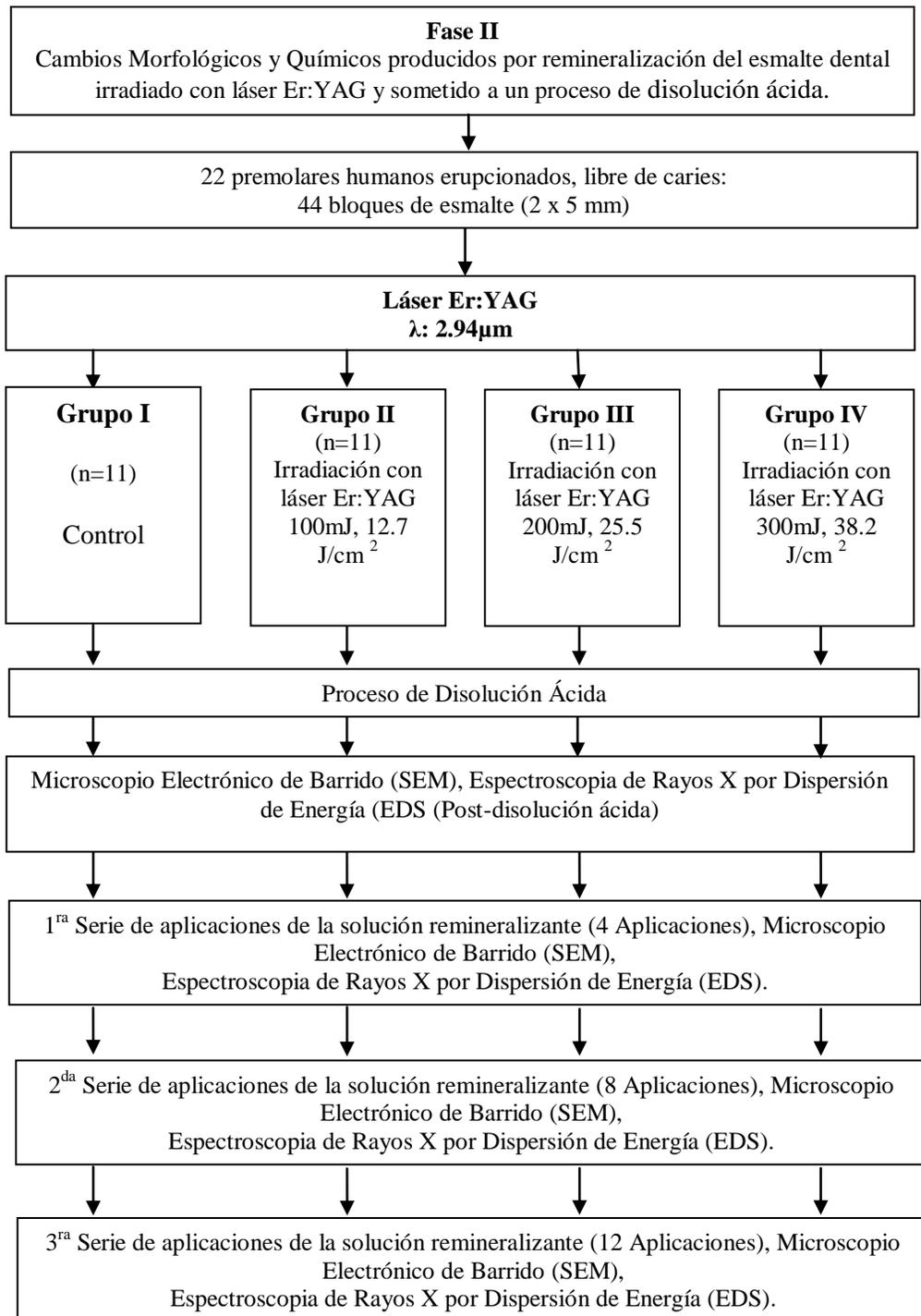


Figura 14. Diseño experimental

Proceso de remineralización

Posterior al proceso de desmineralización a todas las muestras se les aplicó Flúor (Fluor Protector Gel (Calcium+Phosphate+Fluoride, Ivoclar, Vivadent, Liechtenstein) de manera tópica, con un aplicador de uso odontológico. Durante la aplicación el gel se dejó actuar sobre la superficie del esmalte durante 5 minutos, después las muestras se sumergieron en saliva artificial en compartimentos individuales previamente etiquetados (Ivoclar, Vivadet, Liechtenstein), durante 6 horas. Pasado ese tiempo las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se repitió el procedimiento. Finalmente se realizaron 4 aplicaciones de flúor, en 24 horas. Ver Figura 15.

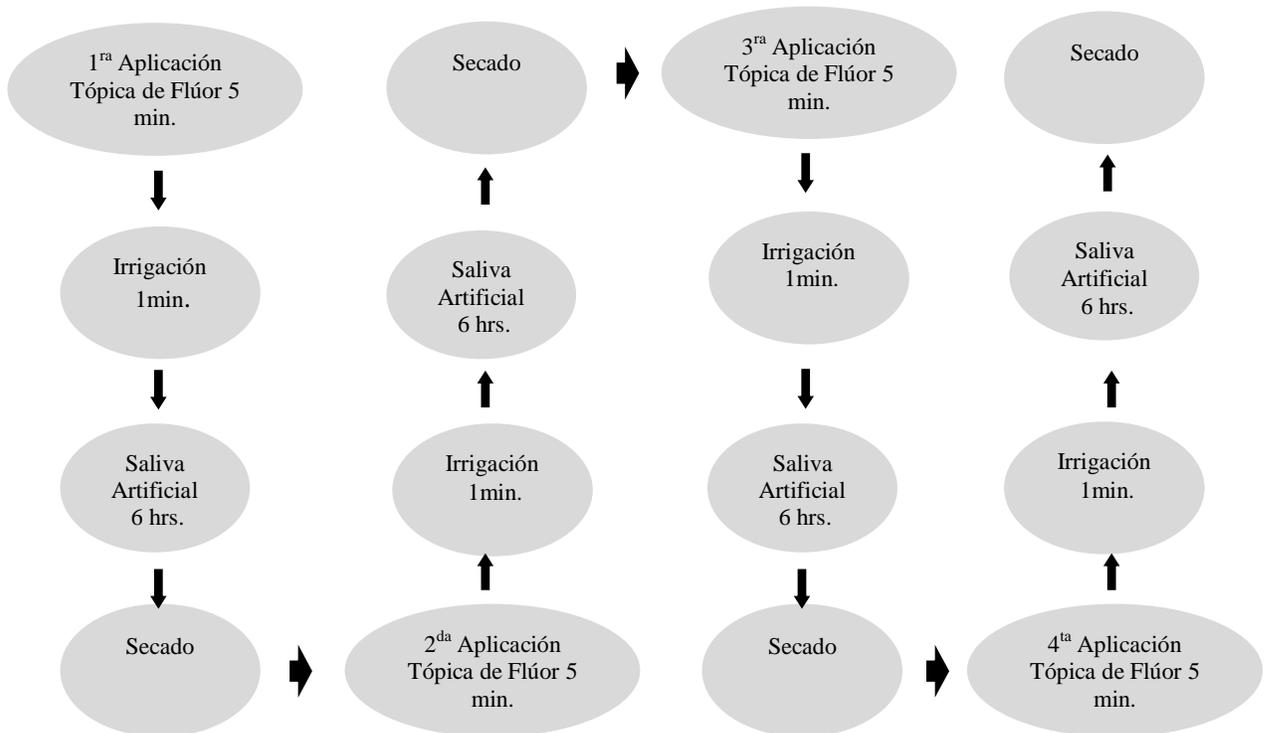


Figura 15. Ciclo del Proceso de Remineralización. Fuente Directa.

Cada muestra fue analizada en SEM y EDS de manera subsecuente posterior a las 4, 8 y 12 aplicaciones de flúor.

TABLA 2. Promedio y Desviación Estándar de los Diferentes Elementos Analizados Durante los Ciclos de Remineralización.

Grupo	Elemento	Control/Post-disolución ácida	1 ^{er} Ciclo (4 Ap.)	2 ^{do} Ciclo (8 Ap.)	3 ^{er} Ciclo (12Ap.)
GI	Oxígeno	68.41 ^A	67.11 ^B	67.14 ^C	67.76 ^A
	Fósforo	13.28 ^{A,B}	13.48 ^A	12.93 ^C	13.17 ^A
	Calcio	18.31 ^A	19.41 ^B	18.66 ^B	10.06 ^{A,B}
	Relación Ca/P	1.37 ^A	1.43 ^{B,D}	1.44 ^{B,C,D}	1.44 ^{B,C,D}
GII	Oxígeno	67.28 ^A	68.51 ^A	68.12 ^A	67.75 ^A
	Fósforo	13.88 ^A	13.25 ^A	13.19 ^A	13.28 ^A
	Calcio	18.84 ^A	18.25 ^A	18.69 ^A	18.96 ^A
	Relación Ca/P	1.35 ^A	1.37 ^{A,B}	1.41 ^C	1.42 ^B
GIII	Oxígeno	71.03 ^A	69.97 ^B	72.4 ^{A,B}	73.75 ^{B,C}
	Fósforo	11.99 ^A	11.88 ^{A,B}	11.19 ^B	10.85 ^B
	Calcio	16.98 ^A	17.21 ^{A,B}	16.41 ^{A,B}	15.40 ^B
	Relación Ca/P	1.42 ^A	1.45 ^B	1.47 ^B	1.42 ^A
GIV	Oxígeno	67.11 ^A	63.81 ^B	70.79 ^C	71.88 ^B
	Fósforo	12.34 ^A	12.45 ^{A,B}	10.87 ^C	10.59 ^B
	Calcio	20.56 ^A	20.68 ^{A,B}	18.33 ^C	17.53 ^B
	Relación Ca/P	1.66 ^A	1.65 ^A	1.68 ^A	1.65 ^A

*Letras diferentes muestran diferencias significativas entre grupos.

(Prueba de T pareada a un nivel de significancia de $p \leq 0.05$).

A continuación se muestran algunas micrografías representativas del Grupo I, Pre-irradiación, mostrando una superficie lisa del esmalte, con presencia de algunos defectos naturales, como surcos de desgaste, fracturas las cuáles podrían ser resultado de la función del diente en la boca o del corte de la muestra, no se aprecia exposición de prismas del esmalte. Post-Disolución ácida, en la micrografía correspondiente a la secuencia del Grupo I, se observó un aparente cierre de la fractura, así como defectos del esmalte más evidentes, cierta erosión en el área del surco (defecto natural), así como exposición de prismas expuestos del esmalte. Con respecto a la secuencia del Grupo I, correspondientes a la fase de remineralización a las 4, 8 y 12 aplicaciones de flúor, la secuencia de micrografías mostró una superficie del esmalte cada vez más lisa, los defectos naturales previamente evidenciados parecieron tener cierto desvanecimiento durante la secuencia de aplicaciones de flúor así como cada vez menor exposición de prismas del esmalte. (Ver figura 16).

En la secuencia de micrografías que se muestran correspondientes al Grupo II, se observan algunos prismas expuestos, así como la presencia de surcos naturales, previo al tratamiento con láser. Después de la irradiación con láser la micrografía de la secuencia correspondiente muestra una imagen típica de un cráter formado por la irradiación del láser Er:YAG a 100mJ/10Hz y 12.7 J/cm². Después del proceso de disolución ácida, se observó una superficie lisa del esmalte, subsecuente a lo que pudiera ser una especie de barrido químico de la subsuperficie del esmalte. En la secuencia de micrografías correspondientes a la segunda fase del experimento (Remineralización), se muestran imágenes a las 4, 8 y 12 aplicaciones de flúor, se aprecia una superficie del esmalte cada vez más lisa y con menos exposición de prismas del esmalte, ver figura 16.

La secuencia de micrografías en SEM, correspondientes al Grupo III, muestra una superficie lisa del esmalte sin exposición de prismas, con presencia de surcos de desgaste

naturales y fracturas antes del tratamiento con láser. Posterior a la irradiación con láser Er:YAG a 200mJ/10Hz, 25.5J/cm², se observó la formación de fracturas, cráteres de mayores dimensiones, con ciertas áreas de exposición de prismas del esmalte. La micrografía correspondiente a la fase posterior al proceso de disolución ácida mostró un barrido químico del tejido superficial y micropartículas de la superficie del esmalte. Con respecto a la secuencia de micrografías del Grupo III correspondientes a la segunda fase (Remineralización), posterior a las 4, 8 y 12 aplicaciones de flúor, prácticamente se observó una superficie del esmalte cada vez más tersa y con menos exposición de prismas del esmalte, ver figura 16.

En el Grupo IV, se observaron prismas del esmalte expuestos, así como fracturas, previos al tratamiento con láser. Posterior a la irradiación con láser Er:YAG a 300mJ/10Hz, 38.2 J/cm², se observaron patrones geométricos y fracturas con aparente desplazamiento de bloques de superficie y reducción de fracturas originales. La micrografía correspondiente a la fase posterior al proceso de disolución ácida reveló el desprendimiento o remoción de los bloques suspendidos en la superficie del esmalte, así como una gran porosidad de la subsuperficie, observándose un patrón típico de grabado del esmalte. En la secuencia de micrografías representativas del Grupo IV, referentes a la segunda fase de Remineralización con flúor, a las 4, 8 y 12 aplicaciones. La destrucción de la superficie que causó el láser Er:YAG, prácticamente no se pudo valorar visualmente ningún efecto del flúor sobre la superficie tratada, ver figura 16.

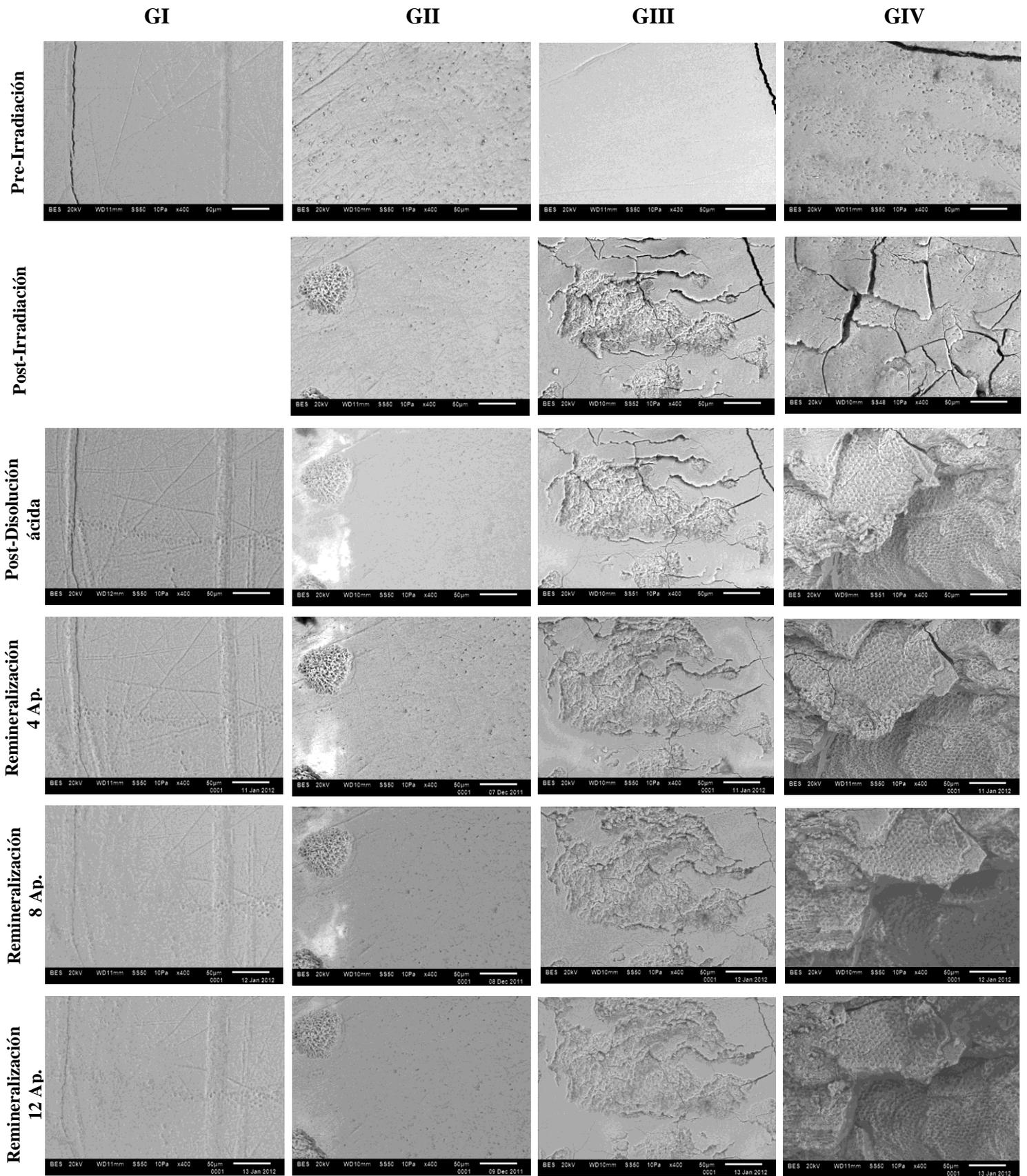


Figura 16. Secuencia de micrografías, a una Magnificación de 400x, Scale Bar=50µm.

8. Discusión General

En las últimas décadas, diversos estudios han reportado que los láseres pueden mejorar la resistencia del esmalte dental humano a la disolución ácida.^{26, 60, 111-113} En el presente estudio, una menor cantidad de Ca liberada por los grupos irradiados con láser Er:YAG mostró que la resistencia ácida del esmalte se incrementó con las condiciones experimentales empleadas, este efecto esperado fue más evidente en los grupos III y IV.

Los cambios químicos asociados con el aumento de la resistencia ácida del esmalte dental humano tratado con láser Er: YAG se evaluaron mediante EDS. Cabe resaltar que no hay informes en la literatura actual donde se establezca la concentración de diversos elementos en la misma zona del esmalte durante fases experimentales consecutivas (antes de la irradiación, después de la irradiación y después de la disolución ácida). Aunque el análisis consecutivo de EDS para el grupo control no mostró diferencias estadísticamente significativas para at. % después del proceso de disolución ácida, este grupo mostró los valores más altos en relación al Ca liberado, acorde a los resultados de la espectrometría de absorción atómica. Probablemente, este elemento fue liberado de esmalte de la sub-superficie, más allá de la sensibilidad del análisis EDS.

En contraste con el grupo control, los grupos irradiados revelaron diferencias estadísticamente significativas para at. % de la mayoría de los elementos analizados durante las fases experimentales. Sólo el Cl no mostró un cambio significativo, probablemente porque este elemento se encuentra en cantidades mínimas en el esmalte, como fue reportado por Losee et al.,¹¹⁴ por lo que menores cambios en el contenido de Cl no son evidentes. En concordancia con el aumento de la resistencia ácida del esmalte mostrado por los resultados de AAS, una reducción significativa del at. % en C fue observada después de la irradiación con láser Er:YAG, probablemente como resultado de una disminución en el contenido de los carbonatos. Liu y Hsu⁸² han sugerido la reducción de carbonatos y la modificación de la materia orgánica como

mecanismos para la prevención de la caries dental producida por la irradiación con láser Er:YAG.

Tanto el O como el P mostraron un aumento significativo en el at. % posterior a la irradiación, probablemente por un incremento en el contenido de pirofosfatos, asociado con el calentamiento del esmalte dental.¹¹⁵ Así mismo, se observó un aumento significativo en el at. % de Ca después de la irradiación, modificando la relación Ca/P. Contrario a lo reportado por Mine et al.¹¹⁶ y de Andrade et al.,¹¹⁷ este radio no mostró una disminución después de la irradiación con láser Er:YAG. Sin embargo, dichos investigadores no examinaron la misma zona de la superficie del esmalte antes y después de la irradiación. En nuestro estudio, la relación Ca/P fue significativamente mayor, específicamente cuando se utilizaron altas densidades de energía, como en el caso de los grupos III y IV. La relación Ca/P se mantuvo sin cambios cuando se utilizó una densidad de energía inferior (Grupo II). Sin embargo, se recomienda realizar estudios adicionales para evaluar el papel de la densidad de energía en la relación Ca/P.

Durante la tercera fase de análisis EDS (después de la disolución ácida) se observó una tendencia similar se muestra en los cambios químicos producidos por la disolución ácida en los grupos experimentales. Esta se caracterizó por una disminución en el at.% de Ca, P y O, así como por un aumento de at.% de C en comparación con los valores obtenidos después de la irradiación.

Los cambios químicos posteriores a la disolución ácida mostraron una relación atómica Ca/P estable o aumentada en los grupos irradiados, los cuales mostraron reducción del Ca liberado en la solución ácida, en concordancia con Cecchini et al.,⁶⁰ quien reportó que los grupos irradiados con densidades de energía mayores a las utilizadas en nuestro estudio, presentaron un incremento en la resistencia ácida del esmalte, con menores cantidades de calcio liberado en la solución, en comparación con el grupo control.

Así mismo, en el presente trabajo de tesis se evaluaron los cambios morfológicos producidos por la disolución ácida del esmalte dental irradiado con láser Er:YAG. Debido a que el diseño experimental incluyó tres etapas para la evaluación con SEM (antes de la irradiación, después de la irradiación y después de la disolución ácida), por lo que se evitó el recubrimiento de las muestras, realizando el análisis de SEM en un modo de bajo vacío. Así mismo, para facilitar la localización de la zona de evaluación, se marcó un punto de referencia.

La evaluación en SEM reveló algunos defectos morfológicos en la superficie del esmalte antes de la irradiación, tales como cráteres. Además, fueron evidentes fisuras probablemente como resultado del proceso de corte o pérdida de la humedad residual de la muestra. Ambos defectos morfológicos podrían ser erróneamente atribuidos a la irradiación, por lo que sugerimos que se realicen evaluaciones en SEM antes del tratamiento de las muestras, como una herramienta útil para la evaluación de los cambios morfológicos.

Existieron claras diferencias en los efectos producidos por diferentes densidades de energía irradiación con láser Er:YAG. Los resultados para el grupo II ($12,7 \text{ J/cm}^2$), fueron consistentes con los reportados en estudios anteriores, tales como la formación de pequeños cráteres.^{60, 117-119} Como se esperaba, los cambios morfológicos fueron proporcionales a la densidad de energía utilizada y fueron más evidentes a altas densidades de energía.

En el Grupo III ($25,5 \text{ J/cm}^2$), la superficie del esmalte se tornó rugosa, exhibiendo cráteres más grandes y las áreas de pérdida de tejido superficial. Algunas de las muestras presentaron grietas, aunque el modo de no contacto pareciera producir menos efectos negativos sobre el esmalte irradiado.⁶⁰

Las muestras en el Grupo IV ($38,2 \text{ J/cm}^2$), el cual fue irradiado a la más alta densidad de energía utilizada en este estudio, produjo formación de bloques de esmalte. De acuerdo con lo reportado por Cecchini et al.⁶⁰ se produjeron mayores cambios morfológicos en la superficie del esmalte cuando se emplearon energías más altas de irradiación. Este fenómeno es coherente con

las observaciones en SEM después de la disolución ácida. Se ha reportado que la superficie irregular producida por estas condiciones de irradiación podría ser más propensa a la acumulación de bacterias,^{95, 118} aumentando el riesgo de desarrollar lesiones de caries , como también ha sido sugerido por Apel et al.¹²⁰ y Kantorowitz et al.¹²¹

Todos los grupos mostraron cambios morfológicos en la superficie del esmalte como producto de la erosión ácida. Estos cambios parecen ser más severos en el grupo irradiado a mayor densidad de energía, con severos efectos no deseados, dando como resultado el desprendimiento de bloques así como de zonas de fusión de esmalte, después de la disolución ácida. Sin embargo, no hay reportes previos al respecto, que permitan comparar nuestros resultados.

9. Conclusiones Generales

9.1. Conclusiones

1. Los cambios químicos asociados a una mayor resistencia ácida del esmalte tratado con láser Er:YAG mostraron un claro patrón posterior a la irradiación, caracterizado por una disminución en el at.% de C y un aumento en O, P, Ca y ningún cambio en el at.% de Cl.

2. Un aumento de la relación Ca/P posterior a la irradiación con láser Er:YAG se asoció con el uso de mayores densidades de energía láser.

3. Los cambios químicos producidos por la disolución ácida mostraron una tendencia similar entre los grupos experimentales, resultando en una disminución del at.% de Ca, P y O, así como un aumento del at.% del C.

4. Se observó una relación Ca/P estable o mayor después de la disolución ácida en los grupos irradiados, con una reducción del Ca liberado en la solución ácida.

5. Se observaron cambios morfológicos producidos por la disolución ácida del esmalte irradiado, específicamente en los efectos no deseados inducidos por la irradiación láser. Estos cambios morfológicos fueron de leves a severos, dependiendo de la presencia de efectos no deseados posteriores a la irradiación con láser Er:YAG.

9.2. Limitaciones

En este trabajo de investigación se pretendió mostrar la secuencia de cambios químicos y morfológicos producidos en la superficie del esmalte dental humano irradiado con láser Er:YAG, debido a que la muestra es considerada un material biológico, una de las limitaciones podría ser el proceso de deshidratación de la misma no evidente a la inspección visual que pudiera influir en los resultados.

9.3. Recomendaciones

Este estudio mostró efectos químicos y morfológicos evidentes, producidos por el láser Er:YAG bajo las condiciones estudiadas, se sugiere, estudiar la secuencia de cambios químicos y morfológicos de la superficie del esmalte dental bajo otras condiciones de irradiación.

10. Referencias Bibliográficas

1. Brugnera Junior A. Laser Phototherapy in Dentistry. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009; 27 (4): 533-534.
2. Clarkson D McG, Thrush AJ, Brennen SE. Laser Exposure Timer. *Lasers in Medical Science*.1986; 1: 221-224.
3. Verma KS, Maheshwari S, Singh KR, Chaudhari KP. Laser in dentistry: An innovate tool in modern dental practice. *Natl J Maxilofac Surg*. 2012; 3(2):124-132.
4. Welch JA, Torres HA, Cheong F-W. Laser Physics and Laser-Tissue Interaction. *Physics. System. Design. Experimental Applications*.1989; 16(3); 141-149.
5. Carroll L, Humphreys TR. Laser-tissue interactions. *Clin Dermatol*. 2006; 24:2-7.
6. Sulieman M. An overview of the use of lasers in general dentist practice: Laser physics and tissue interactions. 2005; 32: 233-4.
7. Stabholz A, Zeltser R, Sela M, Peretz B, Moshonov J, Ziskind D, etal. The use of lasers in dentistry:principles of operation and clinical applications. *Compend Contin Educ Dent*.2003; 24: 935-48.
8. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Potential applications of Erbium:YAG laser in periodontics. *J Periodont Res*. 2004; 39: 275-285.
9. Walsh LJ. Dental lasers: Some basic principles. *Postgrad Dent*. 1994; 4:26-9.
10. Pick RM, Miserendino LJ. Chicago:Quintessence. *Lasers in dentistry*; pp. 17-25. 1995.
11. Aoki, A., Sasaki K.M., Watanabe, H., and Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol*. 2000; 36: 59-97.
12. Hale GM, Query MR. Optical constants of water in the 200-nm wavelength region. *Appl Optics*. 1973; 12: 555-563.
13. Robertson CW, Williams D. Lambert absorption coefficients of wáter in the infrared. *J Opt Soc Am*.1971; 61: 1316-1320.

14. Marraccini MT, Bachmann L, et al. Morphological evaluation of enamel and dentin irradiated with 9.6 μm CO₂ y 2.94 μm Er:YAG lasers. *Laser Phys Lett.*2005; 2 (11): 551- 555.
15. Goldman L, Gray JA, Goldman J, Goldman B, Meyer R. Effects of laser impacts on teeth. *J Am Dent Assoc.* 1965; 70: 601-6.
16. Stern RH, Sognaes RF. Laser beam on dental hard tissues. *J Dent Res.*1964; 43: 873
17. Schulte W. Präparation der Zahnhartsubstanzen mit dem Laser-Strahl? *Zahnärztl Mitt* .1964; 54: 892-894.
18. Glenn VA. Erbium lasers in dentistry *Dent Clin N Am.*2004; 48: 1017-1059.
19. Vahl J. Der Laser and seine bisherige Anwendung in der Zahnmedizin. *Hippokrates* .1971; 42: 488-506.
20. Chinelatti MA, Ramos RP, Chimello DT, Corona SA, Pecora JD, Dibb RG. Influence of Er:YAG laser on cavity preparation and surface treatment in microleakage of composite resin restorations. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24: 214-218.
21. Delme KI, Deman PJ, De Moor RJ. Microleakage of class V resin composite restorations after convencional and Er:YAG laser preparation. *J Oral Rehabil.*2005; 32: 676-685.
22. Hibst R, Keller U, Steiner R. Die Wirkung gepulster Er:YAG Laserstrahlung auf Zahngewebe. *Laser Med Surg.* 1988; 4: 163-165 (In German), [Abstract in English].
23. Paghdiwala AF. Application of the erbium:YAG laser on hard dental tissues: Measurement of the temperatura changes and depth of cut. In: *Laser Institute of America Proceedings (International Congress on Applications of Lasers and Electro-Optics).* 1989; 64: 192-201.

24. Hibst, R., and Keller, U. Experimental studies of the application of Er:YAG laser on dental hard substances: I Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg. Med.* 1989; 9: 338-344.
25. Keller U, Hibst R. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances. II. Light microscopic and SEM investigations. *Lasers Surg Med* .1989; 9: 345-351.
26. Kayano T, Ochiai S, Kiyono K, Yamamoto H, Nakajima S, Mochizuki T. Effects of Er:YAG laser irradiation on human extracted teeth. *Kokubyo Gakkai Zasshi*. 1989; 56: 381-392. [In Japanese, Abstract in English].
27. Kayano T, Ochiai S, Kiyono K, Yamamoto H, Nakajima S, Mochizuki T. Effect of Er:YAG laser irradiation on human extracted teeth. *J Clin Laser Med Surg*.1991; 9: 147-150.
28. Kumasaki M. Removal of hard dental tissue (cavity preparation) with the Er:YAG laser. In: Hong-Sai L, ed. *Proceedings of the 4th International Congress on Lasers in Dentistry*. Singapore: International Congress on Laser in Dentistry. 1995: 151-157.
29. Cozean C, Arcoria CJ, Palagalli J, Powell GL. Dentistry for the 21st century Erbium:YAG laser for teeth. *J Am Dent Assoc*. 1997; 128: 1080-1087.
30. Ishikawa I, Aoki A, Watanabe H et al. Erbium:YAG laser, promosing procedure for caries treatment. *Dent Jpn*. 1997; 33: 165-169.
31. Pelagilli J, Gimbel C, Hansen R, et al. Investigational study of the use of Er:YAG laser versus dental drill removal and cavity preparation. *Lasers Surg Med*.1997; 15: 109-15.
32. Aoki A, Ishikawa I, Yamada T et al. Comparison between Er:YAG laser and conventional technique for root caries treatment in vitro. *J Dent Res*. 1998; 77: 1404-1414.

33. Hibst R. Lasers for caries removal and cavity preparation: state of the art and future direction. *J Oral Laser Applic.* 2002; 2: 203-12. Paghdiwala AF, Vaidyanathan TK,
34. Paghdiwala MF. Evaluation of erbium:YAG radiation of hard dental tissues: analysis of temperatura changes, depth of cuts and structural effects. *Scanning Microsc.* 1993; 7 (3): 989-97.
35. Burkes EJ, Hoke J, Gomes E, Wolbarsht M. Wet versus dry enamel ablation by Er:YAG laser. *J Prosthet Dent.* 1992; 67: 847-51.
36. Dostalova T, Krejsa O, Jelinkova H, Hamal K. The evaluation of the cavity margings after Er:YAG laser ablation of the enamel and dentin In: Bown SG, Escourrou J, Frank F, editors. *Medical applications of lasers II. Proc SPIE.* 1993; 1880: 132-9.
37. Li ZZ, Code JE, Van De Merwe WP. Er:YAG laser ablation of enamel and dentin of human teeth: determination of ablation rates at various fluences and pulse repetition rates. *Lasers Surg Med.* 1992; 12: 625-30.
38. Paghdiwala AF. Application of the erbium:YAG laser on hard dental tissues: Measurement of the temperatura changes and depth of cut. In: *Laser Institute of America Proceedings (International Congress on Applications of Lasers and Electro-Optics).* 1989; 64: 192-201.
39. Soontag, K.D., Klitzman, B., Burkes, E.J., et al. Pulpal response to cavity preparation with the Er:YAG and Mark III free electron lasers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1996; 81: 695-702.
40. Young HK, Jin-Soo L, Youn-Hee CH, Jae-Mok L, and Keun-Bae S. Change of enamel after Er:YAG and Co2 laser irradiation and fluoride treatment. *Photomed and Laser Surg.* 2005. 23 (4):389-394.
41. Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect or erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. *Lasers Surg Med.* 1996; 19: 190-200.

42. Folwaczny M, Mehl A, Aggstaller H, Hickel R. Antimicrobial effects of 2.94 micron Er:YAG laser irradiation on root surfaces: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 73-78.
43. Kreisler M, Kohnen W, Marinello C et al. Bactericidal effect of the Er:YAG laser on dental implant surfaces: an in vitro study. *J Periodontol.* 2002; 73: 1292-1298.
44. Mehl A, Folwaczny M, Haffner C, Hickel R. Bactericidal effects of 2.94 microns Er:YAG-laser radiation in dental root Canals. *J Endod.* 1999; 25: 490-493.
45. Axelsson P. Diagnosis and risk prediction of periodontal diseases. Quintessence Publishing Co, Carol Stream, Illinois; USA. 2002.
46. Schwartz F, Sculean A, Georg T, Reich E. Periodontal treatment with an Er:YAG laser compared to scaling and root planing. A controlled clinical study. *J Periodontol.* 2001; 72: 361-367.
47. Schwartz F, Putz N, Georg T, Reich E. Effect of an Er:YAG laser on periodontally involved root surfaces: an in vitro and in vitro SEM comparison. *Lasers Surg Med.* 2001; 29: 328-335.
48. Watanabe H, Ishikawa I, Susuki M, Hasegawa K. Clinical assessments of the erbium: YAG laser for soft tissue surgery and scaling. *J Clin Laser Med Surg.* 1996; 14: 67-75.
49. Schwartz F, Sculean A, Berakdar M, Georg T, Reich E, Becker J. Clinical evaluation of an Er:YAG laser combined with scaling and root planning for non-surgical periodontal treatment. A controlled, prospective clinical study. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 26-34.
50. Rizoiu IM, DeShazer LG. New laser-matter interaction concept to enhance hard tissue cutting efficiency. *Laser Tissue Interaction V.* 1994; 2134A: 309-17.
51. Rizoiu IM, Kimmel AI., Eversole LR. The effects of an Er,Cr:YSGG laser on canine oral tissue. *Laser applications in medicine and dentistry. Proc SPIE.* 1996; 2922: 74-83.

52. Eversole LR, RizoIU IM. Preliminary investigations on the utility of an erbium, Chromium:YSGG laser. *J Calif Dent Assoc.* 1995; 23: 41-7.
53. Eversole LR, RizoIU IM, Kimmel A. Osseous repair subsequent to surgery with an erbium hydrokinetic laser system. Presented at the International Laser Congress, International Proceedings Division. Athens, Greece. 1996; Sep: 25-28.
54. Featherstone JDB, Fried D. Fundamental interactions of laser with dental hard tissues. *Med Laser Appl.* 2001; 16: 181-94.
55. Apel C, Meister J, Schmitt N, Gräber HG, and Gutknecht. Calcium solubility of dental enamel following sub-ablative Er:YAG and Er:YSGG laser irradiation invitro. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2002; 30: 337-341.
56. Wigdor HA, Walsh JT Jr, Featherstone JD, Visuri SR, Fried D, Waldvogel JL. Lasers in dentistry. A review. *Lasers Surg Med.* 1995; 16: 103-133.
57. Young HK, Jin-Soo L, Youn-Hee CH, Jae-Mok L, and Keun-Bae S. Change of enamel after Er:YAG and Co2 laser irradiation and fluoride treatment. *Photomed and Laser Surg.* 2005. 23 (4): 389-394.
58. Patricia Moreira de Freitas, Débora Soares-Geraldo, Ana Cristina Biella-Silva, Amanda Verna Silva, Bruno Lopes da Silveira, Carlos de Paula Eduardo. Intrapulpal Temperature Variations During ER, CR:YSGG Enamel Irradiation on Caries Prevention. *J Appl Oral Sci.* 2007; 16 (2): 95-9.
59. Dostalova T, Krejsa O, Jelinkova H, Hamal K. The evaluation of the cavity margins after Er:YAG laser ablation of the enamel and dentin In: Bown SG, Escourrou J, Frank F, editors. *Medical applications of lasers II.* Proc SPIE 1993; 1880: 132-9.
60. Cecchini MRC, Zezell DM, De Oliveira E, et al. Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: Morphological and atomic spectrometry analysis. *Laser in Surgery and Medicine.* 2005; 37: 366-372.

61. Matson JR, Matson E, Navarro RS, Bocangel JS, Jaeger RG, Eduardo CP. Er:YAG laser effects on enamel occlusal fissures: An in vitro study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20: 27- 35.
62. Esteves- Oliveira M, Zezell MD, Apel C, Turbino LM, Aranha CCA, Eduardo CdeP, Gutknecht N. Bond Strength of self-Etching Primer to Bur Cut, Er, Cr:YSGG, and Er:YAG Lased Dental Surfaces. *Photomed and Laser Surg.* 2007; 25 (5): 373- 380.
63. Sasaki KM, Aoki A, Ichinose S, et al. Scanning electron microscopy and Fourier transformed infrared spectroscopy analysis of bone removal using Er: YAG and CO2 lasers *J of Periodontology.* 2002; 73(6): 643- 652.
64. Apel C, Meister J, Götz H, Dushner H, Gutknecht N. Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. *Caries Res.* 2005; 39: 65- 70.
65. Visuri SR, Walsh JT Jr., Wigdor HA. Erbium laser ablation of dental hard tissue: effect of wáter cooling. *Lasers Surg Med.* 1996; 18: 294-300.
66. Wigdor HA, Walsh JT, Featherstone JDB, Visuri SR, Fried D, Waldvogel JL. Lasers in dentistry. *Lasers Surg Med.* 1995; 16: 103-33.
67. Walsh JT, Deutsch TF. Er:YAG laser ablation of tissue: measurement of ablation rates. *Lasers Surg Med.* 1989; 9: 327-37.
68. Paghdiwala AF. Does the laser work on hard dental tissue? *JADA.* 1991; 122: 79-80.
69. Kim ME, Jeoung DJ, Kim KS. Effects of wáter flow on dental hard tissue ablation using Er:YAG laser. *J Clin Laser. J Clin Laser Med Surg.* 2003; 21: 139-144.
70. Sasaki KM, Aoki A, Ichinose S, Ishiwawa I Ultrastructural analisis of bone tissue irradiated by Er:YAG laser. *Laser Surg Med.* 2002; 31: 322- 32.

71. Apel C, Birker L, Meister, et al. The caries-preventive potential of subablative Er:YAG and Er: YSGG laser irradiation in an intraoral model: a pilot study. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22 (4): 312-17.
72. Turkmen C, Gunday M, Karacoriou M, Basaran B. Effect of CO₂, Nd:YAG and ArF excimer laser son dentin morphology and pulp chamber temperatura: an in vitro study. *J Endod.* 2000; 26: 644- 8.
73. Gow AM McDonald AV, Pearson GJ, Setchell DJ. An in vitro investigated on the temperature rise produced in dentid by Nd:YAG laser light with and without water cooling. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 1999; 7: 71- 7.
74. Gaspirc B, Skaleric U. Morphology, chemical structure and diffusion processes of root surface after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 508-16.
75. Sulewski JG Historical Survey of laser dentistry. *Dent Clin North Am.* 2000; 44: 717-752.
76. Silva BB, Severo NB, Maltz M. Validity of diode laser to monitor carious lesions in pits and fissures. *J Dent.* 2007; 35: 679-82.
77. Chimello TD, Serra CM, Rodrigues-Júnior LA, Pécora DJ, Corona MAS. Influence of Er:YAG Laser on Microhardness of enamel adjacent to restorations submitted to cariogenic challenge in situ. *Photomed and Laser Surg.* 2008; 26 (4): 379- 385.
78. Wheeler RC, Fried D, Featherstone BD, et al. Irradiation of the dental enamel with Q-switched $\lambda=355$ -nm laser pulses: Surface morphology, fluoride adsorption, and adhesion to composite resin. *Lasers Surg Med.* 2003; 32 (4): 310-317.
79. Yuichi K, Wilder-Smith P, Marle A, et al. Effects of nanosecond pulsed Nd:YAG laser irradiation on dentin resistance to artificial caries-like lesions. *Laser Surg and Med.* 1997; 20: 15-21.

80. Hsu CYS, Jordan DN, Wefel JS. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J Dent Res.* 2000; 79 (9): 1725-30.
81. Ana PA, Bachmann L, Zezell DM. Lasers Effects on Enamel for Caries Prevention. *Laser Physic.* 2006; 16 (5): 865-875.
82. Liu YY, Hsu CYS. Laser -induced compositional changes on enamel: A FT-Raman study. *J Dent.* 2007; 35: 226- 230.
83. Liu J, Liu Y, Stephen HCY. Optimal Er:YAG laser energy for preventing enamel demineralization. *J Dent.* 2006; 34: 62-66.
84. Know YH, Lee JS, Choi YH, Lee JM, Song KB. Change of enamel after Er:YAG and CO₂ laser irradiation and fluoride treatment. *Photomedicine Laser Surg.* 2005; 23: 389-394.
85. Wang ZL Picoscale science and nanoscale engineering by electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy.* 2011; 60 (1): S269-S278.
86. Smith DJ Progress and perspectives for atomic-resolution electron microscopy. *Ultramicroscopy* .2008; 108: 159-166.
87. Wang ZL New developments in transmission electron microscopy for nanotechnology. *Adv. Mater.* 2003; 15: 1497-1514.
88. Goldberg MW. Immunolabeling for scanning electron microscopy (SEM) and field emission SEM. *Methods Cell Biol.* 2008; 88: 109-30.
89. Pawley J. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Scanning.* 1997.Aug; 19 (5): 324-36.
90. Ichinokawa T. Analytical scanning electron microscopy for solid surface. *J Electron Microscop Tech.* 1989.Jul; 12 (3): 219-27.

91. Newbury DE Advanced scanning electron microscopy and X-ray microanalysis (Plenum Press, New York). 1986.
92. Watanabe M. Microscopy Hacks: development of various techniques to assist quantitative nanoanalysis and advanced electron microscopy. *Microscopy*. 2013; 62 (2): 217-241.
93. Irigoyen ME, Mejía-Gonzalez A, Zepeda-Zepeda MA, Betancourt-Linares A, Lezana – Fernández MA, Álvarez-Lucas CH. Dental caries in Mexican schoolchildren: A comparison of 1988-1989 and 1998-2001 surveys. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012. Sep1; 17 (5): e825-32.
94. Villalobos-Rodelo JJ, Medina-solis CE, Molina-Frechero N, Vallejos-Sánchez AA, Pontigo-Loyola AP, Espinoza-Beltrán JL. Dental caries in schoolchildren aged 6-12 years in Navolato, Sinaloa, México: experience, prevalence, severity and treatment needs. *Biomedica*. 2006. Jun; 26 (2): 224-33.
95. Bevilacqua, M. F., Zezell, M.D., Magnani, R., Da Ana, A.P., and Eduardo, P de C. Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser. *Lasers Med Sci*. 2008; 23: 141-147.
96. Lima, Y.B.O., and Cury, J.A. Seasonal variation of fluoride intake by children in a subtropical region. *Caries Res*. 2003; 37: 335- 338.
97. Pine C, Harris R, editors. *Community oral health*. Germany: Quintessence. 2007: 173.
98. Wefel JS. Effects of fluoride on caries development and progression using intra-oral models. *J Dent Res*. 1990; 69 (Spec Iss): 626-636.
99. Pandit S, Kim JE, Jung KH, Chang KW, Jeon JG. Effect of sodium fluoride on the virulence factors and composition of *Spectrooccus mutans* biofilms. *Arch Oral Biol* . 2011; 56: 643-649.

100. Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents Cochrane Database Syst Rev. 2003; 3:CD002284.
101. Fejerskov O. Changing paradigms in concept on dental caries: consequences for oral health care. Caries Res. 2004; 38: 182-91.
102. Marthaler TM, Petersen PE. Salt fluoridation- an alternative in automatic prevention of dental caries. Int Dent J. 2005; 55: 351-8.
103. Gillespie GM, Baez R. Development of salt fluorination in the Americas. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2005; 115: 663-9.
104. Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. Detection of *in vitro* demineralization of primary teeth using quantitative light-induced fluorescence (QLF). International Journal of Pediatric Dentistry. 2002; 12: 158-167.
105. Fried D, Featherstone J, Visuri S, Seka W, Walsh J. The caries inhibition potential of Er:YAG and Er:YSGG laser radiation.SPIE. 1996; 2672: 73-78.
106. Maung NL, Wohland T, Hsu CY. Enamel diffusion modulated by Er:YAG laser, Part I, FRAP. J Dent. 2007; 35: 787-793.
107. Petersen PE. Continuous improvement of oral health in The 21st Century The World Oral Health Report. WHO. 2003.
108. Pan American Health Organization.XL.Meeting.Washington,D.C. sept. 1997.
109. Velázquez MO, Vera HH, Irigoyen CME, Mejía GA, Sánchez PTL. Changes in the prevalence of dental caries in schoolchildren in three regions of Mexico: surveys from 1987-1988 and 1997-1998. Rev Panam Salud Publica. 2003; 13: 320-6.
110. Parker S. Introduction, history of lasers and laser light production. Brit. Dent. J. 2007; 202: 21-31.

111. Castellan C. S., Luiz A. C., Bezinelli L. M., Lopes R. M., et al., In vitro evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007; 25(2): 85-90.
112. Hossain M., Nakamura Y., Kimura Y., Yamada Y., et al., Caries-preventive effect of Er:YAG laser irradiation with or without water mist. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*. 2000; 18 (2): 61-65.
113. Morioka T., Tagomori S., and Oho T. Acid resistance of lased human enamel with erbium:YAG laser. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 1991; 9 (3): 215-217.
114. Losee F. L., Cutress T. W., and Brown R. Natural elements of the periodic table in human dental enamel. *Caries Research*. 1974; 8 (2): 123-134.
115. Fowler B. O., and Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcified Tissue International*. 1986; 38 (4): 197-208.
116. Mine A., Yoshida Y., Suzuki K., Nakayama Y. et al. Spectroscopic characterization of enamel surfaces irradiated with Er:YAG laser. *Dental Materials Journal*. 2006; 25 (2): 214-218.
117. de Andrade L.E.H., Pelino J.E.P., Lizarelli R.F.Z., Bagnato V.S., et al. Caries resistance of lased human enamel with Er:YAG laser – morphological and ratio Ca/P analysis. *Laser Physics Letters*. 2007; 4 (2): 157-162.
118. Rodriguez-Vilchis LE, Contreras-Bulnes R, Olea-Mejía OF, Sánchez-Flores I, Centeno-Pedraza C. Morphological and structural changes on human dental enamel after Er:YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation. *Photomedicine and Laser Surg*. 2011; 29: 493-500.

119. Tokonabe H, Kouji R, Watanabe H, Nakamura Y, Matsumoto K. Morphological changes of human teeth with Er:YAG laser irradiation. *J Clin Laser Med Surg.* 1999; 17: 7-12.
120. Apel C, Schäfer C, Gutknecht N. Demineralization of Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser-prepared enamel cavities in vitro. *Caries Res.* 2003; 37: 34-37.
121. Kantorowitz Z, Featherstone JD, Fried D. Caries prevention by CO2 laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc.* 1998; 129: 585-591.

11. Anexos

11.1. Anexo 1-A



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO FACULTAD DE MEDICINA

Estimado paciente:

Hago de su conocimiento que la enfermedad bucal más común en la población tanto infantil como adulta es la caries dental, es tal su impacto que representa el problema de salud bucal de mayor incidencia en la población. Es por ello que la Universidad Autónoma del Estado de México, destina recursos para el desarrollo de proyectos de investigación, que tengan como objetivo no sólo, plantear la problemática actual de este problema de salud bucal sino que, estos estudios resulten en conocimiento nuevos que no sólo fortalezcan, sino que planteen un panorama nuevo de alternativas para un mejor encause de las medidas de prevención de caries. Por lo anterior, solicitamos con humildad y respetando en todo momento su individualidad, decisión e integridad tanto física como mental, su colaboración y autorización para que los órganos dentarios que le serán extraídos exclusivamente por indicaciones terapéuticas puedan ser donadas a este proyecto de investigación, en el que se estudiará *in vitro* el efecto de la irradiación con láser Er:YAG sobre la superficie del esmalte y si las densidades de energía estudiadas pueden ser efectivas para la prevención de caries.

Acepto., Nombre y firma del donante.

**Donar los órganos dentarios que me serán extraídos al proyecto de investigación:
Evaluación in vitro del láser Er:YAG y su efecto sobre el esmalte dental humano.
Nombre y Firma del padre, madre o tutor (únicamente para menores de edad en la cual el
padre, madre o tutor también deberá firmar.)**

Nombre y firma del padre, madre o tutor.

Nombre y firma del testigo

Dirección

Relación con la persona

Nombre y firma del testigo

Dirección

Relación con la persona _____



11.2. Anexo I-B
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

Estimado paciente de la Clínica Odontológica Morelos:
Hago de su conocimiento que la enfermedad bucal más común en la población tanto infantil como adulta es la caries dental, es tal su impacto que representa el problema de salud bucal de mayor incidencia en la población. Es por ello que la Universidad Autónoma del Estado de México, destina recursos para el desarrollo de proyectos de investigación, que tengan como objetivo no sólo, plantear la problemática actual de este problema de salud bucal sino que, estos estudios resulten en conocimiento nuevos que no sólo fortalezcan, sino que planteen un panorama nuevo de alternativas para un mejor encause de las medidas de prevención de caries. Por lo anterior, solicitamos con humildad y respetando en todo momento su individualidad, decisión e integridad tanto física como mental, su colaboración y autorización para que los órganos dentarios que le serán extraídos exclusivamente por indicaciones terapéuticas puedan ser donadas a este proyecto de investigación, en el que se estudiará *in vitro* el efecto de la irradiación con láser Er:YAG sobre la superficie del esmalte y si las densidades de energía estudiadas pueden ser efectivas para la prevención de caries.

Acepto., Nombre y firma del donante.

**Donar los órganos dentarios que me serán extraídos al proyecto de investigación:
Evaluación in vitro del láser Er:YAG y su efecto sobre el esmalte dental humano.
Nombre y Firma del padre, madre o tutor (únicamente para menores de edad en la cual el padre, madre o tutor también deberá firmar.)**

Nombre y firma del padre, madre o tutor.

_____	_____
Nombre y firma del testigo	Nombre y firma del testigo
Dirección	Dirección
_____	_____
Relación con la persona	Relación con la persona _____

11.3. Anexo I-C

Etiqueta de identificación y control de muestra

Nombre del paciente:	
Edad	
Sexo	
Fecha de exodoncias	
Número total de órganos dentarios presentes en boca superiores	
Número total de órganos dentarios presentes en boca inferiores	
Número total de órganos dentarios presentes en boca	