FAUSTO MEDEIROS MENDES

**AVALIAÇÃO DO USO DE CORANTES FLUORESCENTES
ASSOCIADOS AO DIAGNODENT PARA DETECÇÃO DE PERDA
MINERAL DECORRENTE DA CÁRIE DENTÁRIA**

São Paulo

2005

Fausto Medeiros Mendes

**Avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao
DIAGNOdent para detecção de perda mineral decorrente da cárie
dentária**

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

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. José Nicolau

São Paulo

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mendes FM. Avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent para detecção de perda mineral decorrente da cárie dentária [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

São Paulo, / /2005

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, **Faustino e Manuela**

Obrigado pelos exemplos de amor, honestidade e dedicação,
que moldaram meu caráter da melhor forma.

Esse trabalho é uma pequena retribuição por tudo que fizeram
por mim. Tenho muita sorte de ter pais como vocês.

Amo muito vocês e obrigado por tudo.

Ao meu pai científico, **Prof. Nicolau**

O senhor me ensinou quase tudo que eu sei em ciência.

Levarei seus ensinamentos por toda a vida, e espero
poder passar tudo que aprendi, para sempre
perpetuar seus ensinamentos.

Ao meu irmão **Flávio** (um grande figura e
uma grande pessoa) e minha avó **Conceição**
(te amo muito, vó).

A minha amada esposa **Maria**, meu amor.

Tudo isso é muito pequeno diante do amor que
tenho por você. Obrigado por existir na minha vida
e me fazer o cara mais feliz do mundo.

"Se um dia nós se gostasse
Se um dia nós se queresse
Se nós dois se empareasse
Se juntim nós dois vivesse
Se juntim nós dois morasse
Se juntim nós dois drumisse
Se juntim nós dois morresse..." (Zé da Luz)

Te amo por toda minha vida.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que tem me fortalecido em todos os momentos de fraqueza, e tem sempre olhado por mim de forma especial.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Nicolau. “Gigantes são aqueles nos ombros dos quais me elevei”. Obrigado pela acolhida desde o Mestrado e por tudo que o senhor me ensinou. O senhor é responsável por quase tudo que estou conseguindo na vida. Serei eternamente grato.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Guedes-Pinto. Obrigado pela confiança que tem depositado em mim, desde a monitoria até os dias de hoje, sempre me orientando a seguir os próximos passos da minha vida.

À Profa. Dra. Célia Regina Martins Delgado Rodrigues, exemplo de professora e educadora, sempre disposta a ajudar todos. Se um dia souber um terço do que a senhora sabe de Cariologia, estarei satisfeito. A senhora é um exemplo e um modelo a ser seguido por todos na Odontopediatria.

Ao Prof. Dr. José Carlos Pettorossi Imparato. Obrigado pela confiança e principalmente pela amizade. Você me proporcionou as melhores oportunidades e é uma honra poder trabalhar ao seu lado. É um exemplo de professor, e espero ainda aprender muito com você. Obrigado por tudo.

À Profa. Dra. Maria Salete Nahás Pires Corrêa. Saiba que, se estou seguindo o caminho na Odontopediatria, a senhora foi a responsável. Obrigado pelo amor e carinho que sempre tem com os alunos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bonecker, pelas oportunidades e incentivo que sempre tem me dado, e também pela amizade e ensinamentos. Obrigado.

À Profa. Marcia Turolla Wanderley, exemplo de dedicação, que eu aprendo a imitar cada vez mais. Obrigado por tudo que fez por mim e pela Odontopediatria.

À Profa. Dra. Ana Estela Haddad, pela confiança depositada e pela amizade. Muito agradável trabalhar com a senhora, um exemplo de competência e seriedade.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Ciamponi, por seus ensinamentos e amizade ao longo da minha estada na Odontopediatria.

Ao Prof. Dr. Danilo Antonio Duarte. Apesar da distância e do pouco contato ultimamente, minha admiração por você é sempre crescente. Você me mostrou os primeiros passos, e nunca vou deixar de agradecer-lo por isso.

Ao Prof. Ricardo Simão Mathias (*in memoriam*). Sei que o senhor, onde estiver, ainda acompanha minha carreira, como fez no começo.

Aos meus irmãos do laboratório, que me ajudam desde que eu entrei lá, Douglas, Fernando, Mariana, Emily e Walter. A convivência com vocês e o ambiente de

trabalho que vocês proporcionam foi uma das coisas mais agradáveis que aconteceu durante a minha Pós Graduação. Saibam que ganharam um amigo para sempre. Obrigado também àqueles que entraram depois, Paula, Jonas, Alyne, Helena, e todos os que passaram por lá, que tiveram também a oportunidade de usufruir o ótimo ambiente de trabalho, reflexo da competência do nosso chefe.

Ao Douglas Nesadal Souza, pela ajuda nos conhecimentos químicos (principalmente nos cálculos), e por viabilizar todo meu trabalho da melhor forma possível.

À Paula Mochidome Yamaguti, pela revisão do resumo em inglês.

Aos meus colegas de curso, Adriana, Anna Paula, Fernanda Nahás, Daniela Forlin, Fernanda Moraes, Selma, Marise, Francisco (Chicão), Luciana Sanglard, Luciana Butini, Thiago, Monique, Sandra, Ricardo e Alessandra pela agradável convivência.

Aos colegas do curso antigo, especialmente Daniela Prócida Raggio, pela doçura e dedicação ao trabalho, e Rachel Rocha, por tudo que me ensinou sobre diagnóstico de cárie, ensinamentos fundamentais que me levaram a seguir esse caminho. Admiro muito vocês.

Especialmente, aos meus amigos de sempre, Monique, Luciana Butini e Thiago, por me ajudarem e me aconselharem muito nesses momentos difíceis.

Ao meu amigo Sérgio Luiz Pinheiro, pelas oportunidades e pela ótima convivência.

A todo pessoal da UNIARARAS, especialmente ao Prof. Ricardo Bozzo, por sempre ajudar e facilitar nossa vida, aos Professores Julio Vargas Neto, Sylvia Vedovello, Mário Vedovello e Waldocir Simões, pela ótima acolhida, e a alguns alunos do 4º ano, que me inspiram a seguir essa profissão de professor.

Aos meus amigos da UNIMES, Sérgio, Márcia, Tia Nadya e em especial, ao prof. Antônio Lucindo Bengtson. Obrigado pela oportunidade e pela confiança, o senhor é um exemplo de chefe e uma pessoa maravilhosa.

Ao Departamento de Materiais Dentários pela acolhida física da minha pessoa durante esses cinco anos, e pela permissão em utilizar os equipamentos. Aos professores de lá que foram importantes na minha formação, Profa. Rosa, Prof. Capel, Prof. Leonardo, Prof. Braga e especialmente ao Prof. Muench. Também aos amigos Sílvio, Antônio e Rosa Cristina por me auxiliarem toda vez que precisei.

Ao Departamento de Dentística pela permissão em utilizar os aparelhos do laboratório, especialmente à Profa. Adriana e à funcionária Soninha.

Ao pessoal da Geologia, Prof. Dr. Paulo César Fonseca Giannini, Prof. Isaac Jamil Sayeg e Cecília, pela permissão da utilização do microscópio e analisador de imagens do Laboratório de Petrografia Sedimentar (Processo FAPESP 97/10669-0). Vocês, meus amigos, têm me ajudado sempre, sem colocar nenhum obstáculo. Aprendi muito com vocês.

A Profa. Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria, do Instituto de Química, pela ajuda fundamental na escolha dos corantes. Sem o seu auxílio, talvez não seria possível nem começar esse trabalho.

À Profa Elisabeth de Oliveira, do Instituto de Química, pela ajuda essencial na avaliação do cálcio, sempre disposta a ajudar e só reclamando quando eu tinha poucas amostras para analisar. Muito obrigado pela ajuda e pela disposição em ajudar.

À Mariana Minatel Braga, pela ajuda essencial em alguns experimentos, deixando de lado suas coisas para me ajudar. Você tem um futuro brilhante, e espero retribuir a ajuda de alguma forma.

To Prof. Robert Gall for the donation of the DIAGNOdent. Your gift permitted that I performed my research with any difficulties. Thank you very much.

Ao meu irmão Flávio Manuel Medeiros Mendes, pelo auxílio na confecção das lâminas para microscopia.

Aos colegas da UNIRARAS e UNIMES, que me auxiliaram na fase final do trabalho, Mariana Walter, Marianinha, Maria Paula, Paulinha e Cecília.

Aos meus amigos da Odontopediatria, Julio, sempre atencioso, Fátima, pelos cafés e pelo bom humor, Conceição, e Clemência (Cleclé), uma grande figura, sempre

ajudando a melhorar meu mau humor. Poder trabalhar com vocês é um imenso privilégio.

À Marise Moraes de Paiva, por ter me agüentado durante esses anos, e mesmo assim esclarecido a todas minhas dúvidas. Obrigado por tudo.

A todos os funcionários do SDO pela estruturação, formatação, correção das referências e pela elaboração da Ficha Catalográfica. Obrigado também pela disposição em ajudar durante toda minha jornada na Faculdade.

A todos os funcionários e professores da FOU SP, que me ajudaram e foram responsáveis pela minha formação desde a graduação até hoje. Sou muito grato a essa minha segunda casa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante o curso.

A todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho e para minha formação.

O autor gostaria de declarar que não tem nenhum tipo de interesse comercial ou financeiro em nenhum produto ou empresa citados na pesquisa.

Mendes FM. Avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent para detecção de perda mineral decorrente da cárie dentária [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

Apesar de extensivamente estudado para utilização em superfícies oclusais, o DIAGNOdent tem demonstrado um desempenho insatisfatório para medição de pequenas alterações minerais. Isso se deve ao fato do aparelho provavelmente medir o aumento de fluorescência decorrente de alterações orgânicas decorrentes do processo carioso, ao invés das alterações minerais. Portanto, o objetivo do presente estudo *in vitro* foi propor a associação do DIAGNOdent com dois corantes fluorescentes e avaliar o desempenho do método na detecção de lesões de cárie em superfícies lisas e oclusais, avaliar a capacidade de detecção precoce da desmineralização e testar a capacidade dos métodos em quantificar a perda mineral de lesões de superfície lisa. Para todos os experimentos, dentes decíduos foram utilizados. Os corantes selecionados foram uma solução de tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (TMPyP) a 0,2 mM e uma solução de protoporfirina IX (PPIX) a 4 mM, dissolvida em dimetil sulfoxido e água (1:1). Lesões artificiais de cárie formadas até 16 dias e lesões artificiais de cárie formadas durante 12, 24, 48 e 96 h foram avaliadas com o DIAGNOdent sem e com os corantes para avaliar se havia correlação com perda mineral e melhora no desempenho na detecção dessas lesões. Estudos com os métodos em lesões naturais de cárie em superfície oclusal também foram realizados. A avaliação da perda mineral das lesões artificiais formadas até 16 dias foi determinada pela perda de cálcio pelas amostras, mensurada por espectrometria de emissão atômica, e pela profundidade das lesões,

avaliada em microscópio de luz polarizada. Nas lesões precoces, a perda mineral foi avaliada através da perda de cálcio, enquanto que a validação realizada nas lesões oclusais foi feita através de exame histológico. Correlação entre as leituras do aparelho com e sem os corantes e as avaliações realizadas na validação das lesões, bem como parâmetros para indicar o desempenho dos métodos na detecção dessas lesões foram calculados. A detecção das lesões artificiais de cárie foi feita de modo mais eficiente utilizando o DIAGNOdent com os corantes (principalmente com a TMPyP), comparado ao método do DIAGNOdent isolado. Já a quantificação das lesões foi mais adequada com o DIAGNOdent utilizado com PPIX. Para as lesões iniciais, a associação entre a TMPyP e o DIAGNOdent proporcionou uma detecção bastante precoce e uma boa quantificação da desmineralização, comparado aos outros métodos. Já para as lesões oclusais, não foram encontradas diferenças significantes entre os métodos. Em conclusão, a utilização do DIAGNOdent associado à TMPyP proporciona uma melhor performance na detecção de lesões artificiais de cárie de superfície lisa e na detecção precoce da desmineralização causada pela cárie dentária, enquanto que a associação do método com a PPIX obtém uma melhor quantificação das lesões artificiais de cárie em superfície lisa de dentes decíduos formadas em períodos maiores.

Palavras-Chave: Diagnóstico precoce – Porfirinas – Lasers – Fluorescência – Cárie dentária – Dente decíduo

Mendes FM. Evaluation of the use of fluorescent dyes associated with DIAGNOdent in detecting mineral loss from dental caries [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

Despite the DIAGNOdent has been extensively studied in occlusal surfaces, the device has presented unsuitable performance in the evaluation of the minor mineral changes. This is owing to the fact that the device probably measures fluorescence increase in caries lesions due to changes in the organic content of the lesions rather than mineral loss. Thus, the aim of the present *in vitro* study was to propose the association of the DIAGNOdent with two fluorescent dyes and to evaluate the performance of the methods in detecting smooth and occlusal surfaces caries lesions, to evaluate the capability of the detection of early demineralization, and to test the feasibility of the methods for quantification of mineral loss from smooth surface caries lesions. Primary teeth were used in all experiments. The selected dyes were a solution contained 0,2 mM tetrakis(N-methylpyridyl)porphyrin (TMPyP) and a solution with 4 mM protoporphyrin IX (PPIX) in water and dimethyl sulfoxide (1:1). Artificial caries lesions created for until 16 days and for 12, 24, 48 e 96 h were measured with the DIAGNOdent without or with the dyes to evaluate the correlation with mineral loss and the performance of the detection of these caries lesions. Experiments with the methods were also carried out to detect natural occlusal caries lesions. Mineral loss measurements of the artificial caries lesions were evaluated in terms of the calcium loss values, determined by atomic emission spectrometry, and lesions depth values, evaluated by polarized light microscope. In the early caries lesions, calcium loss was determined, and the validation of the occlusal caries lesions was performed by histopathological examination. Correlation between

DIAGNOdent readings associated or no with the dyes and the determinations performed to validate the caries lesions, as well as the parameters related to the performance of the methods to detect these lesions were calculated. The detection of the artificial caries lesions were better performed with the DIAGNOdent associated with the dyes (especially with TMPyP), compared to the method using the DIAGNOdent without dyes. With regard to the quantification of the caries lesions, the method with PPIX presented better results. Regarding the early caries lesions, the association between DIAGNOdent and TMPyP provided a very early detection and a suitable quantification of the demineralization, compared with the other methods. Concerning the occlusal caries lesions, there were no significant differences among the methods. In conclusion, the use of the DIAGNOdent associated with TMPyP provides better performance in detecting smooth surface artificial caries lesions and to detect early demineralization from dental caries, while the association of the device with PPIX improves the quantification of the smooth surface artificial caries lesions produced for longer periods, in primary teeth.

Key-words: Early diagnosis – Porphyrins – Lasers – Fluorescence – Dental caries – Deciduous tooth

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
3 PROPOSIÇÃO.....	70
4 MATERIAL E MÉTODOS	71
5 RESULTADOS	90
6 DISCUSSÃO.....	116
7 CONCLUSÕES.....	141
REFERÊNCIAS	142
ANEXO	155

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial progressiva, que acomete os tecidos mineralizados dos dentes, se inicia num nível subclínico e pode levar à destruição do dente (CLARKSON, 1999; FEJERSKOV, 1997; ZERO, 1999). A manifestação da doença se inicia no esmalte, que é a porção do dente mais exposta ao meio ambiente bucal.

O esmalte dentário é o tecido mais mineralizado do organismo, com 95 % em massa de conteúdo inorgânico. O restante é composto de água e proteínas não colágenas. O principal mineral que forma o esmalte é a hidroxiapatita rica em carbonato, denominada hidroxiapatita carbonatada (ARENDS; TEN CATE, 1981; LEGEROS, 1999).

Esse tecido permanece em constante troca iônica com o meio ambiente bucal circundante. Num pH próximo ao neutro, que é a situação mais comum entre as refeições, na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, as soluções do meio ambiente ao redor do dente (saliva, fluido da placa bacteriana e o líquido em volta dos cristais de hidroxiapatita) permanecem supersaturadas em relação à concentração de cálcio e fosfato presente no mineral do esmalte. Dessa forma, há uma tendência do dente adquirir esses íons do meio ao redor (ARENDS; TEN CATE, 1981; CLARKSON, 1999; FEJERSKOV, 1997; ZERO, 1999).

Quando ocorre a ingestão de alimentos ricos em açúcar, em especial sacarose, alguns microrganismos da placa bacteriana metabolizam esse substrato, produzindo ácidos orgânicos (principalmente ácido lático) favorecendo uma queda de pH no meio ambiente intra-oral. Quando o pH cai até um determinado valor (por

volta de 5,5), ocorre a inversão do equilíbrio entre o meio e a hidroxiapatita, e, dessa forma, o líquido ao redor do dente se torna subsaturado em relação ao mineral do dente. Assim, ocorre uma tendência de saída de cálcio e fosfato para o meio. Quando o meio é neutralizado, minerais retornam ao tecido parcialmente desmineralizado (ARENDS; TEN CATE, 1981; CLARKSON, 1999; FEJERSKOV, 1997; ZERO, 1999).

A ocorrência desses episódios de desmineralização e remineralização ocorre várias vezes ao dia, e isso não indica que o indivíduo está com cárie. A cárie dentária é resultado de um desequilíbrio decorrente desses processos de des/remineralização, com uma vantagem da perda mineral frente ao posterior ganho desses íons (ARENDS; TEN CATE, 1981; FEJERSKOV, 1997, 2004; ZERO, 1999). Essa perda mineral provoca alterações ópticas no esmalte, num primeiro momento num nível microscópico, e posteriormente, com o avanço da perda mineral, uma alteração clinicamente visível, denominada de mancha branca (ZERO, 1999).

A maioria dos métodos de detecção das lesões de cárie é baseada nessas alterações ópticas (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1996). O método visual é o método convencional mais indicado para detecção de lesões de cárie. Quando o método é utilizado adequadamente, num campo iluminado e com a secagem da superfície do dente para evidenciar essas alterações, consegue-se uma detecção das lesões de cárie antes que ocorra formação de cavidade, proporcionando a paralisação da lesão sem necessidade de tratamento operatório (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1996; ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1998; BADER; SHUGARS; BONITO, 2002; EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 1997; STOOKEY et al., 1999). No entanto, o método visual tem apresentado uma baixa reprodutibilidade, uma vez que é um método

subjetivo (BADER; SHUGARS; BONITO, 2002). Além disso, quanto mais precoce a detecção da desmineralização, melhor o prognóstico de reversão ou paralisação dessas lesões cariosas (KIDD, 1984).

Por esses motivos, a busca de novos métodos objetivos que apresentem um melhor desempenho na detecção de lesões de cárie, e que realizem uma detecção cada vez mais precoce do processo carioso, é um campo de pesquisa extremamente importante na Odontologia. Métodos baseados na fluorescência têm sido estudados sistematicamente desde o início da década de 80. Um método quantitativo não destrutivo utilizando um laser de argônio, com comprimento de onda de 488 nm foi proposto para detectar e quantificar pequenas alterações minerais (BJELKHAGEN et al., 1982). Estudos subsequentes provaram a efetividade do método e demonstraram que mede a fluorescência intrínseca do mineral do dente (TAM; MCCOMB, 2001). Outros autores testaram a associação do método com corantes fluorescentes na tentativa de melhorar a correlação com a perda mineral e proporcionar um diagnóstico ainda mais precoce do processo carioso (ANDO et al., 1997; EGGERTSSON et al., 1999; FERREIRA ZANDONA et al., 1998a, 1998b).

Apesar de bons resultados em lesões iniciais, o método não era adequado para detecção de lesões oclusais e não era de fácil utilização para a prática clínica. Dessa forma, um outro método baseado na captação da fluorescência emitida pelo tecido cariado, só que utilizando um laser diodo com comprimento de onda de 655 nm foi proposto (HIBST; GALL, 1998) com o nome de DIAGNOdent (KaVo, Biberach, Alemanha). O método tem apresentado bons resultados na detecção de lesões oclusais de cárie (BADER; SHUGARS, 2004). No entanto, não apresenta boa correlação com perda mineral em superfície lisa e não apresenta uma performance tão adequada na detecção de lesões iniciais (MENDES

et al., 2005b; SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a, 2001b). Apesar disso, o aparelho apresenta algumas vantagens, como o fato de ser portátil, a facilidade de utilização, além de ser quantitativo e não destrutivo. A associação de corantes fluorescentes poderia conseguir aliar as vantagens do DIAGNOdent a um melhor desempenho e uma detecção mais precoce de lesões incipientes, bem como proporcionar uma melhor correlação do método com a perda mineral decorrente da cárie dentária. Esses fatos encorajam o desenvolvimento da presente pesquisa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cárie dentária

Apesar da Cariologia ser uma área da Odontologia relativamente com pouco tempo de estudo, a cárie dentária existe há aproximadamente 20 milhões de anos. Nossos ancestrais primitivos, os hominídeos, tinham uma incidência estimada de 1 % de cárie dentária (CLARKSON, 1999). A incidência da cárie dentária nas populações modernas tem sofrido inúmeras variações com o passar dos anos. Nos períodos posteriores à Revolução Industrial no século XVIII até a metade do século XX, a população mundial apresentou índices crescentes de cárie dentária (ZERO, 1999), culminando em uma prevalência de 90 a 95 % da população dos países desenvolvidos por volta do ano de 1950 (CLARKSON, 1999; KONIG, 2004; MARTHALER, 2004). Nesse período, os cirurgiões dentistas estimavam a idade das crianças através do número de lesões de cárie presentes na cavidade bucal (CLARKSON, 1999).

Depois dessa época, a cárie dentária começou a sofrer uma queda marcante na incidência nos países desenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento (CLARKSON, 1999; KONIG, 2004; MARTHALER, 2004; ZERO, 1999). Esse declínio foi relacionado a um melhor entendimento dos fatores etiológicos causadores da cárie dentária e a uma melhor compreensão da atuação do flúor no tratamento da cárie dentária (CLARKSON, 1999; FEJERSKOV, 1997, 2004; MARTHALER, 2004; ZERO, 1999). Hoje em dia, na maioria dos países

desenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento, a cárie dentária apresenta um padrão polarizado de incidência, ou seja, cerca de 20 % da população portadora de aproximadamente 80 % das lesões de cárie (MARTHALER, 2004).

A cárie dentária é uma doença que acomete indivíduos em qualquer faixa etária. O entendimento da cárie dentária como doença é um fator importante no correto diagnóstico e planejamento do tratamento para os pacientes e para população de um modo geral (FEJERSKOV, 1997). Diferente do que se pensava, a idéia de “cáries dentárias”, da forma como eram abordadas, é um conceito equivocado, pois muitos só se preocupavam em detectar as cavidades e manchas brancas, e conseqüentemente, só se preocupavam em tratar essas lesões. Na verdade, essas são as manifestações clínicas da doença cárie dentária, e não a doença em si. Dessa forma, o diagnóstico e tratamento da doença devem ser realizados previamente à detecção e tratamento das lesões (FEJERSKOV, 1997; NYVAD, 2004).

A cárie dentária pode ser descrita como um processo dinâmico que ocorre nos depósitos bacterianos, resultando em alteração no equilíbrio entre a superfície dentária e o fluido da placa que, com o passar do tempo, levam à perda mineral. A etiologia é multifatorial, ou seja, uma série de fatores interagindo ao mesmo tempo para causar a doença (FEATHERSTONE, 2004; FEJERSKOV, 1997; ZERO, 1999). Inicialmente a etiologia da cárie dentária era descrita como uma interação entre um hospedeiro suscetível, microrganismos específicos capazes de produzir ácido e substrato adequado para esses microrganismos, agindo num mesmo intervalo de tempo. Esse modelo bastante conhecido foi difundido por muitos anos, e é conhecido como diagrama de Keyes (CLARKSON, 1999; FEJERSKOV, 1997; ZERO, 1999). No entanto, isso foi baseado em estudos com animais (FEJERSKOV,

1997). Atualmente, sabe-se que muitos outros fatores estão relacionados à cárie dentária em humanos, tanto biológicos, como ambientais (ZERO, 1999). Uma série de outras causas foi incluída no modelo de fatores etiológica da cárie dentária, tais como parâmetros salivares, acesso ao flúor, dieta, bem como aspectos sociais, econômicos e comportamentais (CLARKSON, 1999; FEJERSKOV, 1997). Muitos outros fatores, que ainda nem foram descobertos, devem desempenhar papel na etiologia da cárie dentária (CLARKSON, 1999).

A formação das lesões de cárie se inicia, na maioria das vezes, no esmalte dentário. O componente mineral principal do esmalte é a apatita. As apatitas encontradas nos organismos vivos geralmente são as hidroxiapatitas cálcicas, com fórmula representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ (LEGEROS, 1999). No esmalte do dente, há uma grande incorporação de elementos menores, principalmente o carbonato (LEGEROS, 1999). Deste modo, as apatitas biológicas são descritas como hidroxiapatita carbonatada.

Na faixa normal de pH que ocorre na cavidade bucal, a superfície do dente tem uma predominância de cargas negativas. Isso se deve à estrutura da hidroxiapatita, na qual os grupamentos fosfato permanecem próximos à superfície do cristal. A hidroxiapatita com essa carga atrai íons positivos, principalmente íons cálcio, que formam uma camada de hidratação ao redor dos cristais. Essa camada de hidratação só é removida com altas temperaturas. As cargas nessa camada são distribuídas irregularmente, mas há uma maior proporção de carga positiva, principalmente devido ao cálcio. Essa característica dos cristais de hidroxiapatita irá determinar a absorção de moléculas que irão formar a película adquirida (NAUNTOFTE; TENOVUO; LAGERLOF, 2005).

Apesar do esmalte dentário ser um tecido acelular, ele não é um material inerte na cavidade bucal, e sim um sistema químico ativo, em constante troca iônica entre seus constituintes e o meio ao redor (ARENDS; TEN CATE, 1981; FEATHERSTONE, 2004; KIDD; FEJERSKOV, 2004). Essa hidroxiapatita, que está no esmalte na forma de cristais firmemente unidos entre si, apresentam finos espaços intercristalinos, preenchidos por água e matéria orgânica. Esses espaços servem como as primeiras vias de difusão primária para a dissolução ácida inicial, que resulta na lesão de cárie (ARENDS; TEN CATE, 1981; ZERO, 1999).

Num pH próximo ao neutro, o ambiente ao redor do dente permanece supersaturado em relação à hidroxiapatita do esmalte dentário. Dessa forma, ocorre uma incorporação de íons cálcio e fosfato pelo esmalte. Com a queda de pH, que ocorre após a metabolização da sacarose e outros açúcares por microrganismos e conseqüente formação de ácido láctico, a direção de equilíbrio da reação se inverte, fazendo com que o meio adjacente se torne subsaturado em relação aos minerais do dente. Isso faz com que haja uma saída de íons do esmalte para o meio subjacente (ARENDS; TEN CATE, 1981; FEATHERSTONE, 2004; KIDD; FEJERSKOV, 2004; ZERO, 1999). Esse valor de pH em que ocorre a inversão da direção do transporte de íons é denominado de pH crítico. Esses valores dependem da concentração de cálcio, fosfato e flúor no meio bucal, e das propriedades de solubilidade do mineral nas diferentes regiões do dente, e estão em torno de 5,3 e 5,5 (DAWES, 2003; ZERO, 1999).

A formação da lesão de cárie se deve a um desequilíbrio entre os minerais do esmalte e o fluido que o circunda, onde a reprecipitação mineral é menor do que a perda. O processo de cárie pode ser descrito considerando D a quantidade de íons do esmalte perdido e R a quantidade de mineral depositado. Quando $D \cong R$,

temos um equilíbrio; nos casos em que $D > R$, ocorre uma desmineralização pronunciada, levando eventualmente a formação de lesão de cárie no esmalte. Em estágios mais avançados, segue-se a formação de cavidade. Quando temos $D < R$, os defeitos presentes no esmalte são remineralizados pelos íons presentes na saliva (ARENDS; TEN CATE, 1981).

Esse déficit favorecendo a perda mineral pode levar meses e até anos para se manifestar clinicamente. Inicialmente, a perda mineral só é observada ultraestruturalmente. Com a progressão da perda mineral, ocorre a manifestação clínica. Essa primeira manifestação recebe o nome de lesão de mancha branca ou lesão de cárie incipiente (EKSTRAND, 2004; KIDD; FEJERSKOV, 2004; ZERO, 1999). Essa aparência se deve às propriedades ópticas do esmalte dentário. O índice de refração da hidroxiapatita é de 1,62. Apesar da água contida nos espaços intercristalinos, que possui índice de refração mais baixo (1,33), essa quantidade é pequena e não interfere no aspecto óptico do esmalte sadio. No entanto, quando ocorre aumento desses espaços devido à progressão da lesão de cárie, aumenta a quantidade de água. Quando esse aumento é considerável, nas regiões onde há um aumento da porosidade do esmalte, este adquire uma aparência mais esbranquiçada, por causa da diferença do índice de refração entre água e hidroxiapatita. Quando secamos essa região, a água é substituída por ar, que possui índice de refração ainda menor (1,00), e o esmalte fica ainda mais esbranquiçado (EKSTRAND, 2004; KIDD; FEJERSKOV, 2004).

Portanto, a desmineralização que ocorre no esmalte decorrente da cárie dentária provoca alterações ópticas no tecido. Essas alterações são a base para a maioria dos métodos de detecção das lesões de cárie (ANGMAR-MANSSON; AL-

KHATEEB; TRANAEUS, 1996; BADER; SHUGARS; BONITO, 2002; EKSTRAND, 2004; EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 1997).

2.2 Diagnóstico de cárie dentária

Assim como a cárie dentária deve ser abordada como uma doença, o diagnóstico da cárie dentária deve ser realizado da mesma forma. Enquanto muitos só se preocupam em detectar as lesões, o processo de diagnóstico é muito mais amplo (NYVAD, 2004). A análise dos sintomas relatados pelo paciente e a avaliação dos fatores etiológicos da doença são importantes para uma correta decisão de tratamento. A avaliação de fatores biológicos envolvidos, como consumo de açúcar, acesso ao flúor, análise do fluxo e capacidade tampão da saliva, nível de higiene oral, quantidade de microrganismos cariogênicos na saliva e na placa, atividade de cárie atual e experiência passada de cárie fazem parte do diagnóstico da cárie (VERDONSCHOT et al., 1999). A análise de alguns fatores sócio-econômicos, tais como educação dos pais e renda familiar, podem atuar como fatores auxiliares na análise do risco ao desenvolvimento da cárie dentária (VERDONSCHOT et al., 1999).

A análise da atividade de cárie do paciente, ou seja, o grau de progressão da doença, também é um fator essencial nos dias de hoje, no processo de diagnóstico da doença cárie dentária (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1998). A avaliação da atividade de cárie dentária é importante para avaliar o risco de desenvolvimento e progressão de lesões, para estabelecer a

modalidade de tratamento apropriado e para aplicação de um programa preventivo, após a redução da atividade da doença (NYVAD; FEJERSKOV, 1997). Essa avaliação depende da análise dos fatores associados à patogênese da doença (relatados no parágrafo anterior) e do exame clínico das lesões de cárie (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1998).

A avaliação da atividade de lesões de cárie em um exame clínico é mais importante do que a avaliação da extensão das lesões. Alguns autores descreveram características clínicas de lesões de cárie em esmalte e dentina ativas e inativas (NYVAD; FEJERSKOV, 1997). Lesões ativas em esmalte apresentam-se opacas, rugosas e porosas, enquanto que lesões inativas possuem um aspecto liso, brilhante e polido. Outros fatores são importantes para diferenciação entre lesões ativas e inativas, como a distância da lesão à margem gengival livre. Lesões contínuas à margem gengival livre são ativas, lesões distantes são inativas ou estão em processo de inativação. Lesões em dentes em erupção apresentam maior chance de estarem ativas. A cor escura da lesão de cárie pode ser um fator indicativo de lesões inativas, mas nunca deve ser utilizada como único fator de avaliação (NYVAD; FEJERSKOV, 1997).

Um índice visual para avaliar a extensão e atividade de lesões foi proposto e utilizado em superfícies oclusais de terceiros molares agendados para serem extraídos. Após a exodontia do dente, estes foram seccionados e corados com vermelho de metila, um corante indicador de pH. O índice visual mostrou uma boa correlação com a extensão e atividade das lesões de cárie (EKSTRAND et al., 1998).

Um outro estudo propôs outro índice visual tátil (com explorador de ponta romba) para discriminação de lesões de cárie ativas e paralisadas em todas as

superfícies do dente (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999). Quando o índice foi utilizado por examinadores bem treinados, uma boa reprodutibilidade foi obtida, tanto intraexaminador (valores de Kappa entre 0,74 e 0,85), como interexaminador (0,78 a 0,80) (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999).

Devido à impossibilidade de se conseguir obter um padrão ouro no estudo anterior, foi realizada uma nova avaliação três anos após os primeiros exames para avaliar a validade preditiva e construtiva do índice proposto em indicar a atividade das lesões de cárie (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 2003). Caso o sistema de diagnóstico tenha a capacidade de prever o resultado do processo carioso, ele possui validade preditiva. Portanto, as lesões ativas sem cavidade teriam um risco relativo maior de evoluir para formação de cavidade do que as inativas (NYVAD, 2004; NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 2003). Se os índices propostos refletem o efeito teórico conhecido da escovação com dentifrícios fluoretados (MACHIULSKIENE et al., 2002), o método apresenta validade construtiva. Dessa forma, lesões ativas sem cavidade teriam maior chance de se tornarem sadias ou inativas no grupo exposto ao uso de dentifrício fluoretado do que no grupo controle, e lesões inativas e superfícies híginas teriam menor chance de evoluir para condições mais severas no grupo experimental (higiene supervisionada com dentifrício fluoretado) do que as lesões no grupo controle. Dessa forma, na reavaliação após 3 anos, o índice visual tátil previamente proposto (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999) mostrou que tem validade preditiva e construtiva (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 2003).

Outro aspecto importante do processo de diagnóstico de cárie é a detecção das lesões de cárie e avaliação da extensão dessas lesões. Os métodos de detecção de lesões de cárie devem possuir duas qualidades: confiabilidade e

validade (de critério). Confiabilidade, ou reprodutibilidade é o grau de estabilidade quando uma avaliação é repetida sob condições semelhantes (PRETTY; MAUPOME, 2004a), ou seja, o grau de igualdades entre dois exames da mesma amostra, realizada em épocas diferentes, ou por examinadores diferentes. O método mais comum de calcular esse parâmetro é através do teste de Kappa (OAKLEY; BRUNETTE, 2002; PRETTY; MAUPOME, 2004a). Uma reprodutibilidade perfeita seria de 1, enquanto que uma ausência total de concordância apresentaria um valor de Kappa de 0. Autores relatam um valor de concordância boa a excelente quando os valores de Kappa são maiores que 0,75 (OAKLEY; BRUNETTE, 2002; PRETTY; MAUPOME, 2004a).

A validade de critério do método reflete se um teste de diagnóstico realmente avalia o que ele se propõe a avaliar (DOUGLASS, 1993; OAKLEY; BRUNETTE, 2002; PRETTY; MAUPOME, 2004a). O resultado do teste de diagnóstico é confrontado com um padrão ouro, que é a avaliação da doença por um método mais preciso (geralmente mais invasivo). Dessa forma, quatro tipos de resultados podem ser obtidos: diagnóstico verdadeiro-positivo, quando o teste indica a presença da doença e o padrão ouro também; verdadeiro-negativo, quando o teste, bem como o padrão ouro, mostram ausência da doença; diagnóstico falso-positivo, quando o teste indica presença da doença, mas o padrão ouro indica ausência; e falso-negativo, quando o teste indica um resultado negativo, mas a doença está presente.

Diante desses resultados, a avaliação da validade do método pode ser realizada através de diversos parâmetros. Os parâmetros mais utilizados são a sensibilidade e especificidade. A sensibilidade é a capacidade do teste de diagnóstico detectar corretamente os indivíduos doentes. Já a especificidade

corresponde à capacidade de identificar os indivíduos sadios (DOUGLASS, 1993; OAKLEY; BRUNETTE, 2002; PRETTY; MAUPOME, 2004a). Esses valores são expressos em porcentagem (porcentagem de acertos nos indivíduos doentes para a sensibilidade e nos indivíduos sem a doença para a especificidade). Valores próximos de 1,0 indicam que o método é adequado.

O resultado ideal para testes de diagnósticos seria a obtenção de altos valores de sensibilidade e especificidade. No entanto, geralmente não é isso que ocorre. Quando o teste tem alta sensibilidade, geralmente ocorre uma queda de especificidade, e vice-versa (OAKLEY; BRUNETTE, 2002). Portanto, a preferência por testes com alta sensibilidade ou testes com alta especificidade é inerente ao tipo de doença pesquisada. Como exemplo, testes que avaliam a contaminação de sangue pelo vírus da imunodeficiência adquirida em bancos de sangue devem possuir uma alta sensibilidade, uma vez que resultados falso-negativos seriam desastrosos. Já em outros tipos de doença, uma maior especificidade é requerida, como por exemplo, doenças que levam o paciente a sofrer uma cirurgia complexa (PRETTY; MAUPOME, 2004a).

O índice total de acertos é representado pela acurácia (soma dos resultados verdadeiro-positivos e negativos dividido pelo número de indivíduos). Outra forma de avaliar a validade de testes diagnósticos é através de uma análise *Receiver operating characteristic* (análise ROC) (OAKLEY; BRUNETTE, 2002; PRETTY; MAUPOME, 2004b). Essa análise é adequada para testes de diagnóstico com valores contínuos, apesar de que pode ser utilizada com testes baseados em índices. Com a análise ROC, a avaliação da sensibilidade e especificidade é realizada com vários pontos de corte diferentes, ou seja, valores do método que discriminam entre indivíduos sadios e doentes. Um gráfico é construído com os

valores de sensibilidade no eixo y (proporção de resultados verdadeiro-positivos) e os valores de $1 - \text{especificidade}$ no eixo x (proporção de resultados falso-positivos). A partir desse gráfico, a área sob a curva pode ser calculada, dando um valor numérico para o teste realizado. Quando o valor da área sob a curva ROC for perto de 0,50, indica que o teste não é adequado. Por outro lado, quanto mais perto de 1 for o valor da área, melhor o desempenho do teste. Além disso, a análise ROC indica qual o melhor ponto de corte para o método em questão (OAKLEY; BRUNETTE, 2002; PRETTY; MAUPOME, 2004b).

Os métodos para realização do padrão ouro para lesões de cárie dentária são muito variados e conflitantes entre os pesquisadores (HUYSMANS; LONGBOTTOM, 2004). Geralmente, os métodos aceitos como padrão ouro são destrutivos. Dessa forma, esses métodos só podem ser utilizados em estudos *in vitro* ou *in situ*, ou ainda após a extração dos dentes.

Para avaliação de lesões de cárie em esmalte de superfícies lisas, métodos quantitativos são mais indicados. O principal parâmetro a ser avaliado por esses métodos é a perda mineral da lesão de cárie. O método mais indicado para esse tipo de avaliação é a microrradiografia transversa. Este método utiliza seções delgadas das lesões em esmalte com aproximadamente 100 μm de espessura. O sistema possui uma precisão razoável, e é capaz de determinar a perda mineral, bem como a profundidade das lesões. No entanto, o método é destrutivo, pois é necessário o corte do dente (ARENDS; TEN BOSCH, 1992; HUYSMANS; LONGBOTTOM, 2004; TEN BOSCH; ANGMAR-MANSSON, 1991).

A técnica de microdureza de seção transversal permite a medição indireta do conteúdo mineral na lesão (ARENDS; TEN BOSCH, 1992; TEN BOSCH; ANGMAR-MANSSON, 1991). No entanto, é um método muito sensível a erros de

preparação da amostra, tais como falhas de polimento, cortes não perpendiculares à lesão e pequenas fraturas da amostra. Também possui a desvantagem de ser destrutivo (ARENDS; TEN BOSCH, 1992).

Outros métodos utilizados são microrradiografia longitudinal, microrradiografia de comprimento de onda independente, microdureza de superfície, absorção de iodo, medição da luz dispersa, entre outros. Algumas dessas técnicas permitem o acompanhamento longitudinal da lesão, mas não são precisas na determinação do conteúdo mineral (ARENDS; TEN BOSCH, 1992; TEN BOSCH; ANGMAR-MANSSON, 1991).

Métodos químicos também podem ser utilizados realizando a medição de fósforo e cálcio. Esses métodos podem ser feitos por biópsia do esmalte através de um ácido ou desgaste mecânico, ou medindo os componentes da solução na qual as amostras foram colocadas. A quantidade de cálcio geralmente é avaliada por espectrometria de emissão atômica, enquanto que o fósforo pode ser avaliado por métodos colorimétricos ou também por espectrometria (ARENDS; TEN BOSCH, 1992; TEN BOSCH; ANGMAR-MANSSON, 1991). Na impossibilidade de utilizar a microrradiografia transversa, o método de medição do cálcio perdido num experimento de cárie artificial pode ser uma alternativa adequada para avaliação da perda mineral (ARENDS; TEN BOSCH, 1992; TEN BOSCH; ANGMAR-MANSSON, 1991).

O segundo parâmetro mais importante para ser avaliado em lesões de esmalte de superfície lisa é a profundidade das lesões. Além do método de microrradiografia transversa, a microscopia de luz polarizada é um método aceito para avaliar esse parâmetro. Com auxílio de programas de computador de análise de imagens, essa avaliação se tornou mais precisa e fácil de ser realizada

(ARENDS; TEN BOSCH, 1992; TEN BOSCH; ANGMAR-MANSSON, 1991). Para se obter um bom contraste entre o esmalte hígido e a região mais desmineralizada da lesão de cárie (corpo da lesão), o uso de água destilada como meio de embebição e o auxílio de uma placa de quartzo facilitam o processo.

Para as lesões de cárie oclusal, a utilização de métodos quantitativos se torna mais complicado, devido principalmente, a anatomia das fossas e fissuras e do padrão de avanço das lesões de cárie nessas regiões (HUYSMANS; LONGBOTTOM, 2004). Para estudos *in vitro*, a avaliação de seções da lesão em lupa estereoscópica e a classificação das lesões em graus de severidade (dentes hígidos, lesões iniciais em esmalte, até lesões avançadas em dentina) é o método mais usado (BADER; SHUGARS, 2004; BADER; SHUGARS; BONITO, 2002).

No entanto, muita variação é encontrada na validação histológica desses sítios oclusais. Os problemas podem resultar, por exemplo, de variações entre operadores. Diferenças entre metodologias também são comuns. Alguns estudos usam seções de espessura variada, outros usam o corte da lesão em duas metades. Alguns utilizam corantes para facilitar a detecção. Além disso, o procedimento de corte pode passar fora da lesão, alterando o resultado histológico mais correto para os sítios avaliados (HUYSMANS; LONGBOTTOM, 2004). Apesar disso, o método histológico é o método mais aceito para estudos de diagnóstico de lesões oclusais de cárie (BADER; SHUGARS; BONITO, 2002).

Para estudos *in vivo*, os dentes são submetidos a tratamento operatório para que a validação seja feita. Por motivos éticos, apenas dentes com suspeita de ter lesão em dentina podem ser invadidos. Assim, esse método não é adequado para lesões em esmalte, e através desse tipo de padrão ouro, resultados falso-negativos não podem ser avaliados (BADER; SHUGARS; BONITO, 2002;

EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 1997; REIS et al., 2005). Estudos que realizam os testes de diagnóstico na cavidade bucal em dentes agendados para extração (EKSTRAND et al., 1998; REIS et al., 2005) ou dentes que irão sofrer exfoliação num curto período de tempo (ROCHA et al., 2003) apresentam um grau de evidência científica muito forte, uma vez que associam a realização dos testes em condições clínicas e o melhor tipo de validação para esse tipo de estudo, o histológico.

Diante de tudo isso, como seria um teste de detecção ideal para lesões de cárie?

Numa situação de alta prevalência de cárie dentária (como acontecia em meados do século XX), a detecção das lesões de cárie era realizada sem problemas, uma vez que as lesões de cárie eram presentes na maioria das pessoas, e eram bem evidentes. A detecção precoce das lesões era muito difícil de ser realizada (KIDD, 1984), já que a velocidade de progressão das lesões era muito alta. Nesse contexto, era interessante que os testes diagnósticos tivessem alta sensibilidade, mesmo às custas de uma especificidade menor (MARTHALER, 2004).

Associada à marcante queda de incidência da cárie dentária na maioria dos países, veio uma maior dificuldade de diagnosticar corretamente as lesões de cárie. A velocidade de progressão das lesões tem apresentado uma diminuição significativa. Lesões em superfície oclusal não apresentam uma cavidade evidente. Algumas lesões apresentam uma pequena descontinuidade na superfície e uma maior extensão na dentina. São denominadas de lesões de cárie oculta (WEERHEIJM, 1997). Frente à realidade atual da cárie dentária na maioria dos países desenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento, a detecção precoce tem uma importância fundamental. A detecção do processo carioso antes de formar cavidade permite que a lesão seja paralisada de forma eficiente, sem que haja

necessidade de tratamento operatório, e conseqüentemente, perda de estrutura dentária (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1998; KIDD, 1984; NYVAD, 2004; STOOKEY et al., 1999). Em populações com baixa incidência de cárie dentária, o uso de testes de diagnóstico com maior especificidade (mesmo associado a uma baixa sensibilidade) é preferível (LUSSI et al., 1999). Dessa forma, há uma quantidade menor de diagnósticos falso-positivos, evitando o tratamento operatório desnecessário.

Como foi relatado anteriormente, a maioria dos métodos de detecção de lesões de cárie se baseiam em alterações físicas dos tecidos duros do dente, principalmente alterações ópticas, decorrentes do processo carioso. Os métodos de detecção de lesões de cárie mais comuns são a inspeção visual, o método tátil e o radiográfico (BADER; SHUGARS; BONITO, 2002).

O método tátil teve sua utilização indiscriminada por muito tempo, e ainda é um método bastante utilizado por cirurgiões dentistas nos Estados Unidos (CHAN, 1993). No entanto, o método não apresenta resultados melhores do que outros métodos convencionais (LUSSI, 1993). Além disso, alguns autores observaram que o uso de um explorador afiado pode provocar a formação de microcavidades em lesões incipientes de cárie (EKSTRAND; QVIST; THYLSTRUP, 1987). Dessa forma, o uso do exame tátil tem sido desencorajado, e quando é feito, deve-se utilizar um explorador com ponta romba (EKSTRAND, 2004; KIDD; FEJERSKOV, 2004; NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999).

Por outro lado, a inspeção visual tem sido um método bastante utilizado em países europeus (PITTS, 1993). Para realização de uma inspeção visual mais acurada, os dentes devem estar limpos, iluminados e o clínico deve secar os dentes antes da avaliação (EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 1997; EKSTRAND et al., 1998;

KIDD; FEJERSKOV, 2004; NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999). Em diversos estudos, a inspeção visual para detecção de lesões oclusais de cárie tem apresentado uma baixa sensibilidade (ATTRILL; ASHLEY, 2001; BADER; SHUGARS; BONITO, 2002; COSTA et al., 2002; KETLEY; HOLT, 1993; LUSSI, 1993; LUSSI; FRANCESCUT, 2003; LUSSI et al., 2001; MENDES et al., 2005a; PEREIRA; VERDONSCHOT; HUYSMANS, 2001). No entanto, apresenta uma maior especificidade. Dessa forma, são métodos adequados para populações com baixa incidência ou baixo risco de desenvolver cárie dentária.

Apesar da alta especificidade, o exame visual ainda está longe de ser um método ideal para detecção de lesões de cárie dentária. Além de resultar num número elevado de diagnósticos falso-negativos, o método é subjetivo e apresenta baixa reprodutibilidade (ATTRILL; ASHLEY, 2001; BADER; SHUGARS; BONITO, 2002; COSTA et al., 2002; KETLEY; HOLT, 1993; LUSSI, 1993; LUSSI et al., 2001; MENDES et al., 2005a). Isso faz com que o método não seja adequado para monitoramento de lesões de cárie em curtos espaços de tempo.

Quando a inspeção visual foi feita utilizando um sistema de escores baseados nas alterações ópticas das lesões de cárie, alguns autores obtiveram maiores valores de sensibilidade (EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 1997; REIS et al., 2005; ROCHA et al., 2003) ou uma melhor reprodutibilidade (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999; REIS et al., 2005).

Outra forma de melhorar a sensibilidade da inspeção visual na detecção de lesões em dentina é através do exame radiográfico interproximal. Alguns trabalhos mostram um aumento significativo de acertos para esse tipo de lesão (BADER; SHUGARS; BONITO, 2002; LUSSI, 1993; LUSSI; FRANCESCUT, 2003;

LUSSI et al., 2001; ROCHA et al., 2003). Contudo, não é um método eficaz para lesões restritas ao esmalte, além de expor os pacientes às radiações ionizantes.

Para a prática clínica diária, a inspeção visual associada à técnica radiográfica consegue um bom índice de acertos. Como a inspeção visual é um método com alta especificidade, e o método radiográfico consegue um bom índice de acertos em lesões relativamente extensas em dentina, esse tipo de associação consegue minimizar as falhas do processo de diagnóstico de cárie. No entanto, são métodos subjetivos e que conseguem detectar alterações minerais somente em longos períodos de tempo. Além disso, esses métodos, principalmente o radiográfico, não proporcionam uma detecção precoce do processo de cárie. Por esses motivos, metodologias modernas para a detecção de lesões de cárie têm sido constantemente estudadas.

Dentre elas, temos a medição da resistência elétrica, que se baseia na diferença de condutibilidade elétrica entre o dente hígido e o tecido cariado (BADER; SHUGARS; BONITO, 2002; BAMZAHIM; SHI; ANGMAR-MANSSON, 2002; CORTES; ELLWOOD; EKSTRAND, 2003; EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 1997; EKSTRAND et al., 1998; KORDIC; LUSSI; LUDER, 2003; LUSSI et al., 1999; PEREIRA; VERDONSCHOT; HUYSMANS, 2001), o método de transiluminação por fibra óptica, que avalia a diferença de transmissão da luz no dente sadio e no dente desmineralizado (CORTES; ELLWOOD; EKSTRAND, 2003), métodos baseados na magnificação por lupas (LUSSI, 1993; LUSSI; FRANCESCUT, 2003) ou microscópios clínicos (MENDES et al., 2005a; TONIOLI; BOUSCHLICHER; HILLIS, 2002), métodos que utilizam corantes (PEREIRA; VERDONSCHOT; HUYSMANS, 2001; TONIOLI; BOUSCHLICHER; HILLIS, 2002) e métodos baseados na captação da fluorescência emitida pelo dente (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB;

TRANAIEUS, 1998). Esses três últimos serão discutidos com maiores detalhes nos capítulos subsequentes.

2.3 Métodos de detecção de cárie baseados na fluorescência do dente

Outro tipo de alteração óptica decorrente do processo de cárie é a alteração na emissão de fluorescência dos tecidos cariados após a excitação com luz de comprimento de onda apropriado. Fluorescência é um fenômeno bastante conhecido em ciência e tecnologia. Um tipo de radiação eletromagnética interage com algumas moléculas, elevando-as para níveis de energia mais elevados. Essa radiação pode ser uma luz com comprimento de onda adequado para elevar níveis de energia de moléculas específicas. Esse processo é denominado de excitação, e as moléculas estariam em estado excitado. Quando as moléculas retornam para os níveis basais de energia, uma luz pode ser emitida com uma frequência mais baixa (correspondente à diferença de energia entre os estados envolvidos). Essa luz emitida no retorno das moléculas ao nível de energia inicial, que possui um comprimento de onda maior do que a luz de excitação, é denominada de fluorescência (FEATHERSTONE, 2000; SUNDSTROM et al., 1985).

Três tipos de fluorescência podem ser distinguidos nos tecidos dentários. Um tipo é a fluorescência azul quando o dente é excitado por uma luz na região ultravioleta. Outro tipo é a fluorescência amarela e laranja, quando o dente é excitado por luz na região do azul e verde. Por último, existe a fluorescência próxima

da região do infravermelho, excitada por luz na região do vermelho (ANGMAR-MANSSON; TEN BOSCH, 2001).

Apesar de existirem relatos, há muito tempo atrás, sobre a diferença na fluorescência emitida entre tecidos dentários hígidos e cariados após excitação com luz ultravioleta (ARMSTRONG, 1963), métodos baseados nessa diferença começaram a ser estudados sistematicamente somente a partir do início da década de 1980. Um método seguro, não destrutivo para detecção precoce de lesões de cárie em esmalte foi descrito (BJELKHAGEN et al., 1982). Os autores utilizaram dentes permanentes extraídos com lesões de cárie, ou superfícies hígidas desmineralizadas artificialmente. Um laser de argônio incidia uma luz visível com comprimento de onda de 488 nm, e a fluorescência era captada por máquina fotográfica acoplada a filtros apropriados. As regiões de lesões de mancha branca ou artificiais apresentavam uma fluorescência menos intensa que o esmalte sadio ao redor. A desmineralização foi validada por microrradiografia transversa. Os autores concluíram que o método foi capaz de detectar perdas minerais precoces no esmalte (BJELKHAGEN et al., 1982).

Outro estudo foi realizado para buscar as condições ideais de detecção de lesões de cárie por meio da fluorescência. Dentes permanentes extraídos com lesões de mancha branca foram excitados com luzes de quatro comprimentos de onda diferentes provenientes de três fontes: um laser de argônio trabalhando com comprimentos de onda de 488 e 515 nm; um laser de nitrogênio trabalhando a 337 nm e um laser de hélio-neônio a 633 nm; e a fluorescência foi detectada. No final, as lesões foram avaliadas por microrradiografia. Os autores observaram que com laser de 488 nm, a intensidade relativa da fluorescência do esmalte sadio foi bem maior do que no esmalteariado. Já com comprimento de 515 nm, as diferenças entre as

fluorescências captadas foram bem menores. Com o laser de nitrogênio, a diferença entre esmalte sadio e cariado foi pequena. No entanto, com esse comprimento de onda, a lesão foi detectada mais precocemente. Com a utilização do laser de baixa potência de hélio-neônio a 633 nm, os tecidos não emitiram fluorescência dentro da faixa visível e não houve contraste claro entre esmalte sadio e cariado. Dentre as alternativas pesquisadas, o laser de argônio com comprimento de onda de 488 nm foi a melhor (SUNDSTROM et al., 1985).

Emissão da fluorescência foi comparada entre esmalte humano e hidroxiapatita sintética em soluções, excitadas por uma luz com comprimento de onda de 375 nm. Os autores encontraram a fluorescência semelhante em picos de 460 e 560 nm, tanto no componente humano, como no sintético, o que levou os autores a concluir que, nesse comprimento de onda, esses picos são devido ao componente inorgânico do esmalte. Segundo os autores, este método pode ser usado para diagnóstico de lesões cariosas iniciais quando se utiliza excitação em 488 nm, um filtro de barreira até 540 nm, o que resulta em fluorescência dentro do espectro visível com comprimentos de onda maiores que 540 nm. Lesões de cárie mostram uma perda da fluorescência, pois emitem menos fluorescência acima dos 540 nm. Com isso, os autores concluíram que a perda de material inorgânico contribuiria para este decréscimo (ANGMAR-MANSSON; TEN BOSCH, 2001; HAFSTROM-BJORKMAN; SUNDSTROM; TEN BOSCH, 1991).

Dessa forma, métodos baseados na fluorescência poderiam proporcionar uma quantificação das lesões de cárie em esmalte e detecção relativamente precoce. O método usando um laser de argônio foi comparado ao método visual num estudo clínico de curta duração para testar cariogenicidade de alguns alimentos. Para isso, voluntários foram examinados e orientados a interromper a

higienização oral por 5 dias e a ingerir doces com sacarose ou palatinose 12 vezes ao dia. Ao final, um novo exame foi realizado com ambos os métodos. Os autores observaram que o método com laser apresentou maiores escores de cárie após o período do estudo, mas ambos os métodos foram capazes de detectar alterações. Não houve diferenças significantes entre os grupos (SUNDSTROM et al., 1989).

Um método quantitativo baseado nos estudos iniciais foi proposto para detecção de lesões de cárie em superfície lisa (DE JOSSELIN DE JONG et al., 1995). O método apresentava um laser de argônio que emitia uma luz com comprimento de onda de 488 nm. Uma câmera CCD captava a imagem e transmitia para um computador. Um filtro de 540 nm foi acoplado para barrar luz com comprimento de onda menor que 540 nm, e assim detectar apenas a fluorescência emitida pelo dente. Um programa de computador foi desenvolvido que possibilitava o armazenamento das imagens. Além disso, com o programa, a quantificação da perda mineral das lesões de cárie era realizada, usando a diferença entre a fluorescência do dente hígido (mais intensa) e da região desmineralizada. Com isso, três parâmetros eram fornecidos para as lesões: média da diferença da fluorescência, diferença máxima de fluorescência e área da lesão. O método foi denominado de quantificação da fluorescência induzida por laser, ou *quantitative laser fluorescence* (QLF) (DE JOSSELIN DE JONG et al., 1995). Para testar o método, lesões de cárie foram induzidas em dentes agendados para exodontia por motivos ortodônticos. Ao final da indução, o método pareceu apto a monitorar a perda mineral com o tempo, além de apresentar uma boa confiabilidade (DE JOSSELIN DE JONG et al., 1995).

Estudos subseqüentes foram realizados para testar o novo método em diversas situações. Estudos *in vitro* observaram que o método apresentava boa

correlação com perda mineral avaliada por microrradiografia transversa (coeficiente de correlação, $R=0,83$) e a profundidade das lesões avaliadas por microscopia de luz polarizada ($R=0,70$) (HALL et al., 1997). Segundo os autores, o método apresentou aumento da diferença de fluorescência entre tecido hígido e cariado em lesões com o aumento do tempo de desmineralização (2, 4, 8, 12, 16 e 24 h). Lesões muito precoces (menos de 8 h de formação) não foram avaliadas adequadamente pela microrradiografia transversa (HALL et al., 1997).

Estudos *in situ* também foram realizados (AL-KHATEEB et al., 1997a; HALL et al., 1997). Um estudo teve como objetivo, avaliar a possibilidade de utilizar o método QLF em amostras submetidas ao desafio cariogênico em aparelhos removíveis (HALL et al., 1997). O método foi capaz de avaliar remineralização *in vitro* de lesões formadas *in situ* (HALL et al., 1997).

Num outro estudo, lesões artificiais produzidas em dentes permanentes humanos foram colocadas em aparelhos intrabuciais de 12 voluntários para verificar a viabilidade da utilização do QLF para detectar remineralização *in situ*, além de verificar a influência no aumento da remineralização com a adição de suplementos de flúor ao uso regular de um dentífrico fluoretado. Os autores verificaram que as lesões expostas ao meio bucal por cinco semanas recuperaram de 80 a 100 % da fluorescência perdida pelo processo de desmineralização, indicando que ocorreu remineralização. Não houve diferenças entre o grupo que utilizou apenas o dentífrico e os grupos do dentífrico mais tablete e dentífrico acompanhado de chiclete com flúor. Houve correlação entre os resultados obtidos com QLF e microrradiografia transversa. Os autores concluíram que o método foi eficaz para medir remineralização *in situ* (AL-KHATEEB et al., 1997a).

O método QLF com laser foi utilizado também para avaliar remineralização de lesões de mancha branca de cárie em pacientes que usavam aparelhos ortodônticos. Após a retirada dos aparelhos, as lesões de mancha branca de sete voluntários foram examinadas com QLF e foi feito o registro do tamanho das lesões. Após orientação de higiene e uso de dentífrício, as lesões de mancha branca foram avaliadas periodicamente durante um ano. Os autores verificaram que a fluorescência aumentou após um ano do estudo, indicando um ganho mineral, e a área das lesões de quase todos dentes examinados diminuiu. O ganho de fluorescência foi parcial e mais pronunciado durante os primeiros meses, continuando posteriormente em menor grau. O método se mostrou adequado para avaliar remineralização de manchas brancas na cavidade bucal (AL-KHATEEB et al., 1998).

Apesar de resultados promissores, o método não apresentava bons resultados em lesões interproximais e oclusais e poderia sofrer com a interferência de pigmentações extrínsecas. Além disso, o aparelho demonstrava dificuldade de ser utilizado clinicamente e em laboratório (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1996; FEATHERSTONE, 2000; HALL et al., 1997). Diante dessa dificuldade de utilização, um sistema portátil foi desenvolvido para facilitar o uso do método em situações clínicas. Com esse método, o laser de argônio foi substituído por uma luz não coerente com comprimento de onda semelhante e um sistema de filtros (AL-KHATEEB et al., 1997b). Devido à absorção da luz no caminho, nesse método, o espectro da luz apresentava um pico de 404 nm (ANGMAR-MANSSON; TEN BOSCH, 2001).

O método, denominado de quantificação da fluorescência induzida por luz (*quantitative light-induced fluorescence – QLF*), foi testado em lesões artificialmente

formadas em dentes bovinos e humanos, e comparado com microrradiografia transversa e medições químicas. O novo QLF obteve bons coeficientes de correlação com a medição do cálcio perdido pelos dentes bovinos durante a indução de desmineralização (0,74) e com a microrradiografia (0,64) (AL-KHATEEB et al., 1997b). Em dentes humanos, o novo aparelho se correlacionou significativamente com o aparelho utilizando o laser como fonte emissora ($R=0,93$), e lesões de cárie com até 500 μm de profundidade foram detectadas com o novo aparelho (AL-KHATEEB et al., 1997b).

Outros autores observaram uma grande correlação entre medições realizadas com o QLF usando o laser de argônio e o QLF com luz coerente em lesões artificiais de cárie em dentes permanentes e decíduos. Os resultados indicaram coeficientes de correlação entre os dois métodos de 0,96 e 0,98 em dentes decíduos e permanentes, respectivamente. Houve maior correlação entre as avaliações com QLF (ambos os métodos) e perda mineral em dentes decíduos do que em dentes permanentes, indicando que o método seria adequado para avaliação de lesões em dentes decíduos (ANDO et al., 2001).

O novo QLF, por se correlacionar bem com a perda mineral, ser um método quantitativo não destrutivo e com maior facilidade de utilização na clínica, poderia ser um método adequado para aferir remineralização *in vivo* de lesões incipientes de cárie em superfícies lisas, e deste modo, avaliar a eficácia de métodos preventivos utilizados na clínica (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1996; ANGMAR-MANSSON; TEN BOSCH, 2001; TAM; MCCOMB, 2001).

Um estudo clínico controlado de curta duração (seis meses) foi realizado para avaliar a capacidade do QLF (com luz) em medir a remineralização de manchas brancas naturais, utilizando um grupo com verniz fluoretado e outro com profilaxia

profissional. Os autores verificaram que o método ofereceu vantagens de poder contar com um tempo experimental curto e um número de pacientes reduzido. Concluiu-se que a metodologia foi eficaz em medir pequenas alterações minerais, e que as aplicações de verniz de flúor tiveram um efeito mais favorável na remineralização das lesões. No entanto, com a utilização do método, não foi possível observar se a lesão tinha sido remineralizada na superfície ou no corpo da lesão (TRANAEUS et al., 2001).

Outros estudos observaram que as medições com QLF em lesões de cárie artificiais e naturais eram fortemente influenciadas pelo grau de hidratação dos dentes. Os autores observaram uma diminuição de fluorescência nas lesões com o aumento do tempo de desidratação dos dentes. As lesões artificiais não remineralizadas ou remineralizadas com solução sem flúor apresentavam uma queda da fluorescência mais rápida do que lesões remineralizadas com flúor ou lesões naturais. Esses resultados mostram que o método poderia ser capaz de diferenciar lesões ativas e paralisadas (AL-KHATEEB et al., 2002).

Autores posteriormente observaram que o QLF foi capaz de detectar e monitorar lesões de cárie adjacentes a restaurações (PRETTY et al., 2003b) e quantificar erosão (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2004). O desempenho do QLF em detectar lesões com tempos curtos de desmineralização em dentes decíduos foi avaliado. O método detectou lesões com 48 h de formação e demonstrou a capacidade de monitorar a perda mineral com o aumento do tempo do desafio cariogênico. Com isso, o método foi útil para detectar alterações minerais em dentes decíduos (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002).

Apesar da efetividade na maioria dos estudos, o método tem se apresentado inadequado para detecção e quantificação de lesões oclusais (TAM;

MCCOMB, 2001). O método perde acurácia em lesões mais profundas, próximas à dentina, e também não apresenta grande precisão na quantificação de perda mineral de tecido cariado em dentina (TAM; MCCOMB, 2001). Apesar do aparelho ser utilizado na prática clínica, é caro e necessita de um computador para armazenar as imagens, fazendo com o aparelho não seja portátil. Diante dessas limitações, novos métodos têm sido propostos.

2.4 Métodos de detecção de cárie com corantes

A utilização de corantes tem sido bastante difundida na medicina, biologia e odontologia. Caso haja dificuldade na diferenciação de alguns objetos devido à aparência semelhante entre eles, a utilização de um corante que se ligue a algum desses objetos facilita a diferenciação. A observação dessa coloração pode ser qualitativa ou quantitativa. No caso de observações qualitativas, basta que a coloração seja capaz de diferenciar o que se deseja identificar. Já para a quantificação, a quantidade de corante ou a intensidade de cor devem ser mensuradas. A quantidade de corante pode ser medida através da área corada, ou pelo número de determinados objetos corados comparado a objetos não corados (por exemplo, células). A intensidade de cor pode ser determinada por absorção ou fluorescência. A absorção é avaliada pela quantificação da diminuição da intensidade de luz num determinado comprimento de onda, enquanto que o aumento da intensidade de luz num comprimento de onda é avaliado com os corantes que

emitem fluorescência (AL-SEHAIBANY; WHITE; RAINEY, 1996; VAN DE RIJKE, 1991).

Uma das aplicações dos corantes na medicina é na terapia fotodinâmica, em células tumorais ou microrganismos. A protoporfirina IX (PPIX) é uma porfirina aniônica natural que faz parte da molécula da hemoglobina e é produzida por algumas bactérias. A PPIX não é uma molécula tão hidrofílica, e apresenta fluorescência no espectro de luz do vermelho (FUKUDA; CASAS; BATLLE, 2005; KONIG et al., 2000). O estímulo da produção de PPIX por células tumorais pode ser induzido após administração exógena de ácido aminolevulínico, um precursor da PPIX. Devido às propriedades de fluorescência e fotossensibilização da PPIX, esse acúmulo da substância pode ser utilizado para visualizar (diagnóstico fotodinâmico) e destruir (terapia fotodinâmica) as células malignas (FUKUDA; CASAS; BATLLE, 2005). A PPIX também é produzida por algumas bactérias da cavidade bucal, podendo ocorrer um aumento da quantidade de PPIX em lesões de cárie (BUCHALLA, 2005; KONIG; FLEMMING; HIBST, 1998; KONIG; SCHNECKENBURGER; HIBST, 1999; KONIG et al., 2000). Autores sugeriram que, por causa dessa produção de PPIX, a terapia fotodinâmica, usando luz na faixa do vermelho, poderia inativar esses microrganismos (KONIG et al., 2000).

Outra substância, a tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (TMPyP), é uma porfirina sintética catiônica e hidrofílica, que também apresenta fluorescência na região do vermelho (BORISSEVITCH; GANDINI, 1998; VERGELDT et al., 1995; ZUPAN et al., 2004). Em baixas concentrações, a molécula de TMPyP apresenta grande afinidade por superfícies (VERGELDT et al., 1995). A TMPyP se liga ao DNA de células e, por isso, tem grande utilização na terapia fotodinâmica contra células tumorais ou contra vírus (BORISSEVITCH; GANDINI, 1998; ZUPAN et al., 2004).

Na cariologia, o uso de corantes tem muitas finalidades. Uma das funções principais dos corantes na clínica odontológica é na evidenciação da placa bacteriana. Vários agentes têm sido utilizados para corar a placa bacteriana e auxiliar na orientação de higiene bucal ao paciente, tais como eritrosina, fucsina, verde de malaquita, fluoresceína, entre outros (HINO et al., 2005; VAN DE RIJKE, 1991). Os corantes também podem ser empregados como auxiliares na remoção de tecido cariado em dentina. A dentina cariada é evidenciada com fucsina básica a 0,5 % em propilenoglicol. Assim, o cirurgião dentista removeria a dentina até que não tenha presença do corante (VAN DE RIJKE, 1991). No entanto, o corante sempre evidencia uma certa extensão de dentina hígida, e não deve ser utilizado como auxiliar para remoção de cárie.

Outra utilidade dos corantes na Odontologia é relacionada à detecção de lesões de cárie. Um método proposto consiste na utilização de um corante visível, que possui maior penetração nas regiões desmineralizadas. Dessa forma, um examinador conseguiria distinguir mais facilmente as lesões de cárie. Num estudo, a utilização de um corante (vermelho ácido a 1 %) apresentou uma baixa sensibilidade (0,13) quando foi aplicado antes da abertura da fissura com broca. Após a abertura com broca, a aplicação do corante melhorou substancialmente a detecção de lesões de cárie, mas ainda assim, essa não foi perfeita (PEREIRA; VERDONSCHOT; HUYSMANS, 2001). Nesse estudo, a utilização do corante não apresentou vantagem, visto que seria preferível uma detecção antes da abertura, e o método de invasão exploratória proposta no artigo não deve ser utilizado por se tratar de um método destrutivo.

Um estudo realizou a comparação do método com explorador e outro com corante na detecção de lesões oclusais. Os autores afirmaram que o método com

corante detectou 100 % das lesões de cárie, enquanto que com o explorador, apenas 25 % das lesões foram detectadas (AL-SEHAIBANY; WHITE; RAINEY, 1996). No entanto, parece que os autores usaram apenas dentes com cárie. Dentes hígidos não foram avaliados. Dessa forma, valores de especificidade não foram apresentados, e provavelmente, o método apresentaria baixo valor nesse parâmetro. Portanto, o método não seria tão adequado como quis mostrar os autores.

Outros métodos visam quantificar a perda mineral através de propriedades fluorescentes do corante. Um estudo prévio propôs a utilização de um corante manufaturado (ZYGLO ZL-22) na detecção de desmineralização em dentes extraídos visualmente hígidos. Após aplicação do agente, os dentes foram examinados com luz ultravioleta. Dentes com lesão evidente foram utilizados como controle. Nessas lesões de cárie, houve penetração evidente do corante. Alguns dentes clinicamente sadios apresentaram incorporação de corante, geralmente em regiões mais suscetíveis ao desenvolvimento de lesões de cárie. Esses sítios apresentaram menor microdureza do que regiões em que não ocorreu penetração do corante (RAWLS; OWEN, 1978).

Outro método utilizando o Fluorol 7GA, um corante que é excitado pela luz com comprimento de onda de 468 nm e fluoresce a 525 nm, foi investigado para quantificação de lesões artificiais de cárie. Um sistema óptico composto por filtros apropriados e um fotodiodo foi utilizado para quantificar a fluorescência das lesões. A perda mineral das lesões foi avaliada por microrradiografia. O método apresentou um coeficiente de correlação com a perda mineral por volta de 0,88 (VAN DE RIJKE; TEN BOSCH, 1990). Para avaliar se o método poderia ser efetivo na detecção de lesões interproximais, um modelo *in vitro* foi simulado para avaliar se não havia perda de correlação com o conteúdo mineral nas medições feitas através de um

material que espalha a luz (como seria clinicamente, numa situação de lesão interproximal). Não houve diferença na correlação entre as medições com o método proposto e a perda mineral usando ou não o material para simular o contato interproximal. No entanto, os próprios autores foram cautelosos em extrapolar os resultados para a situação clínica (VAN DE RIJKE; POS; TEN BOSCH, 1990).

O método de transiluminação também foi utilizado em associação a um corante azul, para avaliar se havia um contraste de cor mais evidente entre tecido cariado e hígido, em lesões induzidas de cárie. As diferenças de cor foram mensuradas com um colorímetro de superfície. Houve um aumento de quatro vezes no contraste de cor com a utilização do corante (O'BRIEN; VAZQUEZ; JOHNSTON, 1989).

Outros autores propuseram a utilização do método QLF associado a alguns corantes fluorescentes. As alterações ópticas causadas pela desmineralização na dentina, como espalhamento ou autofluorescência, são menores e, portanto, mais difíceis de serem detectadas (VAN DER VEEN et al., 1996). Desta forma, o método apresenta um desempenho inadequado em lesões de dentina. Alguns estudos foram então realizados para observar se a associação do QLF com o corante melhorava a detecção de lesões em dentina.

Em um estudo prévio, foi verificado que a fluoresceína de sódio penetrava em lesões naturais de cárie radicular em dentes extraídos, e essa penetração foi 1,1 vezes maior do que a profundidade da lesão avaliada através de microrradiografia (VAN DER VEEN; TEN BOSCH, 1993). Num outro estudo, foi realizada a quantificação do mesmo corante em lesões radiculares artificiais de cárie. Os autores observaram uma correlação significativa entre a quantidade de corante e a

perda mineral avaliada por microrradiografia transversa ($R = 0,96$) (VAN DER VEEN et al., 1996).

A aplicabilidade clínica do efeito da incorporação de fluoresceína em lesões radiculares de cárie foi testada posteriormente *in vitro* com o QLF com luz halógena. Os autores avaliaram se o método QLF associado ao corante seria capaz de monitorar e quantificar a perda mineral e a remineralização de lesões radiculares artificiais. Para isso, as lesões foram examinadas usando o método QLF com fluoresceína de acordo com diferentes períodos de formação das lesões (de 12 a 120 h de desmineralização). Essas lesões foram seccionadas e a metade foi destinada a remineralização. Foi observado que as medidas feitas com o QLF associado ao corante aumentavam com o aumento do tempo de desmineralização. Dentes que foram avaliados sem o corante não apresentaram alteração na fluorescência. Após a remineralização das lesões, as medições de fluorescência diminuíram. A correlação com a perda mineral avaliada por microrradiografia transversa foi de 0,89 nas lesões desmineralizadas e de 0,84 nas lesões remineralizadas, indicando que o método pode ser adequado para utilização em lesões radiculares de cárie (PRETTY et al., 2003a).

A associação do método QLF com um corante foi proposta também para realização de diagnóstico precoce de lesões de cárie em esmalte. O método QLF e QLF associado a um corante (*Pyromethene 556*) foi testado em dentes submetidos a desmineralização por períodos de 2 a 24 h. A perda mineral das lesões foi avaliada através de microrradiografia transversa e microscópio confocal. A utilização do corante proporcionou uma detecção mais precoce, com 2 h de desmineralização, enquanto que o QLF possibilitou detecção com desmineralização com 8 h. O método com corante foi incapaz de diferenciar tempos de desmineralização. Já o QLF

apresentou melhor discriminação com relação aos diferentes períodos (ANDO et al., 1997).

Outros autores testaram a utilização do QLF e QLF com corante para detecção de lesões de cárie em superfícies oclusais simuladas (FERREIRA ZANDONÁ et al., 1998b) e naturais (FERREIRA ZANDONÁ et al., 1998a). No experimento com fissuras artificiais, fatias de dentes bovinos foram cortadas e posicionadas de modo a simular fissuras de três tipos: fissuras com paredes paralelas, com paredes convergentes e com paredes divergentes. Lesões artificiais na base da fissura foram criadas. O efeito da presença de placa também foi testado. Três examinadores avaliavam as imagens e classificavam os dentes em cariados, não cariados e indeterminado. Os autores observaram uma maior sensibilidade e especificidade com o método usando fluoresceína em fissuras sem placa. Já na presença de placa, a especificidade do método com corante diminuiu (FERREIRA ZANDONÁ et al., 1998b).

Os métodos QLF com laser de argônio e QLF associado à utilização de fluoresceína foram testados e comparados ao exame visual para detecção de lesões incipientes naturais de superfície oclusal em dentes permanentes extraídos. A validação das lesões de cárie foi realizada com exame histológico e microscópio confocal a laser. O método associado ao corante apresentou melhor reprodutibilidade interexaminador, seguido pelo QLF e o exame visual. A inspeção visual apresentou baixos valores de sensibilidade e altos valores de especificidade. Comparando os métodos baseados na fluorescência, o método QLF associado ao uso da fluoresceína apresentou valores maiores de sensibilidade e o método sem o corante, maior especificidade (FERREIRA ZANDONÁ et al., 1998a).

A utilização de corantes associado ao método de captação da fluorescência induzida por laser de argônio também foi testada para detecção de lesões interproximais. Lesões de cárie artificial foram induzidas nas superfícies proximais de dentes posteriores permanentes extraídos e estes foram posicionados de modo a simular o ponto de contato existente entre eles. Examinadores utilizaram os métodos sem e com fluoresceína. Também foi realizada a inspeção visual. Os valores de concordância intra e interexaminador foram maiores com os métodos com o corante e a inspeção visual, comparados ao QLF sem corante. Os valores de sensibilidade foram semelhantes com os três métodos, enquanto que os valores de especificidade foram um pouco maiores com a inspeção visual e o método com corante (EGGERTSSON et al., 1999).

2.5 Método da fluorescência induzida por laser diodo para detecção de lesões de cárie

Embora o método QLF tenha se mostrado viável em estudos *in vivo*, ele não é facilmente disponível e utilizado na prática clínica. Além disso, o método não se mostrou efetivo em lesões de cárie profundas e também em lesões oclusais (TAM; MCCOMB, 2001). Portanto, métodos quantitativos para detecção de lesões oclusais continuaram a ser estudados.

Baseado nos estudos de fluorescência, autores estenderam o comprimento de onda de excitação para região do vermelho, e verificaram que para excitação de 638 ou 655 nm, a intensidade da fluorescência integral (> 680 nm) de

lesões de cárie excedeu a do tecido sadio por mais de uma ordem de magnitude. Isto serviria para detectar lesões de cárie por aumento da intensidade da fluorescência, de forma mais eficiente do que analisando as diferenças espectrais. Fundamentado por esses estudos, um aparelho portátil para diagnóstico de lesões de cárie foi desenvolvido para utilização na clínica. Esse aparelho foi denominado de DIAGNOdent (HIBST; GALL, 1998).

O modo de funcionamento do aparelho se baseia na emissão de uma luz vermelha por um laser diodo (alumínio, gálio, índio e fósforo - AlGaInP), com comprimento de onda de 655 nm, que é transportada por uma ponta angulada dentro de uma fibra óptica central. Em volta desta fibra central, nove fibras arranjadas em disposição concêntrica, captam a fluorescência que é emitida pelos tecidos dentários. A luz refletida e a luz ambiente são eliminadas por um filtro com características específicas, que barra comprimentos de onda abaixo de 680 nm. Esse filtro absorve a excitação dispersada e outros comprimentos de onda mais curtos e transmite a radiação fluorescente de comprimento de onda mais longo (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004).

Um fotodiodo mede a quantidade de luz que passa através do filtro e um mostrador digital mostra um valor do local que está sendo medido, e um outro correspondente ao pico máximo de medição da lesão, até o aparelho ser zerado. Esses valores variam de 0 a 99, numa escala relativa. Um sinal sonoro opcional é produzido, e sua intensidade aumenta de acordo com aumentos nos valores de medição. Dois tipos de pontas de fibra óptica estão disponíveis, uma para superfície oclusal (ponta A) e outra para superfície lisa (ponta B) (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004).

Algumas vantagens do aparelho é ser portátil (600 g) e funcionar com cinco baterias (7,5 V) (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004). Além disso, é um aparelho fácil de ser utilizado (TAM; MCCOMB, 2001) e é um método quantitativo e não invasivo (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004; TAM; MCCOMB, 2001). Para utilização no diagnóstico de lesões de cárie, o aparelho deve ser inicialmente calibrado com um padrão de cerâmica que vem com o aparelho, e possui uma emissão de fluorescência de valor conhecido e estável (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001). Essa calibração deve ser feita com a ponta que será utilizada para o diagnóstico. O fabricante recomenda que o aparelho deve ser calibrado no dente que será diagnosticado, numa região livre de cárie. Esse valor é subtraído eletronicamente das medições subseqüentes. A ponta do aparelho deve ser colocada perpendicularmente no sítio suspeito, encostada no dente, e o operador deve realizar movimentos pendulares rotatórios, de modo que o laser incida em toda a lesão. O valor do pico máximo é anotado (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004).

O aparelho tem sido extensivamente estudado para detecção de lesões oclusais de cárie em dentes permanentes e decíduos. Um achado que é um consenso entre os autores, com relação à utilização do DIAGNOdent na detecção de lesões de cárie, é a reprodutibilidade do método. Vários estudos têm observado valores de reprodutibilidade intra e interexaminador bons a excelentes, variando de 0,42 a 0,99 (ALWAS-DANOWSKA et al., 2002; ANTTONEN; SEPPA; HAUSEN, 2003, 2004; ASTVALDSDOTTIR; HOLBROOK; TRANAEUS, 2004; ATTRILL; ASHLEY, 2001; BADER; SHUGARS, 2004; BAMZAHIM; SHI; ANGMAR-MANSSON, 2002; BASEREN; GOKALP, 2003; BENGTSON et al., 2005; COSTA et al., 2002; EL-HOUSSEINY; JAMJOUM, 2001; FRANCESCUT; LUSSI, 2003; FUNG et al., 2004;

HEINRICH-WELTZIEN et al., 2002; KORDIC; LUSSI; LUDER, 2003; KUHNISCH et al., 2004; LUSSI; FRANCESCUT, 2003; LUSSI et al., 1999, 2001; MENDES et al., 2005a; REIS et al., 2004, 2005; ROCHA et al., 2003; SHI; WELANDER; ANGMAR-MANSSON, 2000; TRANAEUS et al., 2004).

Com relação à validade do método na detecção de lesões oclusais de cárie, alguns estudos foram realizados em dentes permanentes extraídos. O desempenho do DIAGNOdent foi comparado a outros métodos. Quando o método com laser foi comparado ao exame visual na capacidade de detectar lesões em dentina, a maioria dos autores relatou uma maior sensibilidade. No entanto, a especificidade apresentou valores menores do que aqueles obtidos com a inspeção visual (ALWAS-DANOWSKA et al., 2002; CHONG et al., 2003; CORTES; ELLWOOD; EKSTRAND, 2003; COSTA et al., 2002; EL-HOUSSEINY; JAMJOUR, 2001; PEREIRA; VERDONSCHOT; HUYSMANS, 2001). Dois estudos encontraram resultados diferentes, ou seja, maior especificidade e menor sensibilidade do DIAGNOdent comparado ao exame visual (FUNG et al., 2004; REIS et al., 2004). No primeiro estudo, os autores utilizaram um ponto de corte alto (> 30) para diminuir a ocorrência de diagnósticos falso-positivos (FUNG et al., 2004). No outro estudo, a maior sensibilidade obtida pelo exame visual pode ser explicado pela utilização de um sistema de escores previamente descrito (EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 1997) e o treinamento dos examinadores para realização da inspeção visual (REIS et al., 2004). Outros autores observaram que o DIAGNOdent apresentou sensibilidade e especificidade maiores do que o exame visual. No entanto, o exame visual, nesse estudo, foi baseado exclusivamente na pigmentação dos sulcos, o que poderia explicar a baixa acurácia com esse exame (KORDIC; LUSSI; LUDER, 2003). Um estudo semelhante usando análise ROC para avaliação do desempenho dos

métodos (portanto, sem levar em conta pontos de corte fixos) observou uma área sob a curva ROC maior para o DIAGNOdent comparado ao exame visual (TONIOLI; BOUSCHLICHER; HILLIS, 2002).

Com relação a lesões em esmalte em dentes permanentes, os estudos *in vitro* não demonstram tão claramente essa diferença, de modo que a superioridade não fica evidente para nenhum dos dois métodos (CORTES; ELLWOOD; EKSTRAND, 2003; COSTA et al., 2002; EL-HOUSSEINY; JAMJOUR, 2001; KORDIC; LUSSI; LUDER, 2003; PEREIRA; VERDONSCHOT; HUYSMANS, 2001). Uma revisão sistemática sobre estudos que utilizaram DIAGNOdent confirmam essas tendências relatadas, tanto na detecção de lesões atingindo dentina, como em esmalte (BADER; SHUGARS, 2004).

A performance do DIAGNOdent foi também comparado a outros métodos, tais como, transluminação por fibra óptica (CORTES; ELLWOOD; EKSTRAND, 2003), medição de resistência elétrica (BAMZAHIM; SHI; ANGMAR-MANSSON, 2002; CORTES; ELLWOOD; EKSTRAND, 2003; KORDIC; LUSSI; LUDER, 2003; LUSSI et al., 1999; PEREIRA; VERDONSCHOT; HUYSMANS, 2001) e o método radiográfico (COSTA et al., 2002; REIS et al., 2004; SHI; WELANDER; ANGMAR-MANSSON, 2000; TONIOLI; BOUSCHLICHER; HILLIS, 2002). O método de transluminação por fibra óptica apresentou bons resultados na detecção de lesões cáries oclusais em esmalte e em dentina, comparados aos obtidos pelo DIAGNOdent (CORTES; ELLWOOD; EKSTRAND, 2003). Já o método de medição de resistência elétrica tem demonstrado uma maior especificidade e menor sensibilidade do que o DIAGNOdent (BAMZAHIM; SHI; ANGMAR-MANSSON, 2002; CORTES; ELLWOOD; EKSTRAND, 2003; KORDIC; LUSSI; LUDER, 2003; LUSSI et

al., 1999), exceto em um estudo em que foi observado um desempenho semelhante com ambos os métodos (PEREIRA; VERDONSCHOT; HUYSMANS, 2001).

Comparado ao método radiográfico convencional ou digital, o DIAGNOdent tem apresentado resultados mais favoráveis na detecção de lesões de cárie em dentes permanentes extraídos (COSTA et al., 2002; SHI; WELANDER; ANGMAR-MANSSON, 2000; TONIOLI; BOUSCHLICHER; HILLIS, 2002), exceto em um estudo em que os métodos foram semelhantes (REIS et al., 2004).

A detecção *in vitro* de lesões oclusais em dentes decíduos com o método utilizando laser diodo tem demonstrado resultados um pouco diferentes do que aqueles obtidos com dentes permanentes, como foi previamente observado numa revisão sistemática (BADER; SHUGARS, 2004). Alguns estudos demonstraram valores semelhantes de sensibilidade e especificidade (ATTRILL; ASHLEY, 2001; LUSSI; FRANCESCUT, 2003) ou valores de especificidade superiores aos de sensibilidade (BENGTSON et al., 2005; MENDES et al., 2005a), diferente do padrão observado em dentes permanentes. Quando o DIAGNOdent é comparado a outros métodos, tem apresentado valores superiores relacionados ao desempenho na detecção de lesões de cárie oclusal do que os métodos visual (ATTRILL; ASHLEY, 2001; BENGTSON et al., 2005; LUSSI; FRANCESCUT, 2003; MENDES et al., 2005a), visual com magnificação (LUSSI; FRANCESCUT, 2003; MENDES et al., 2005a), e radiográfico (ATTRILL; ASHLEY, 2001; LUSSI; FRANCESCUT, 2003; MENDES et al., 2005a).

O DIAGNOdent também tem sido avaliado para detecção de lesões de cárie em superfície oclusal em estudos clínicos. Quando o método foi utilizado por sete dentistas avaliando 332 superfícies oclusais, apresentou um desempenho melhor do que os exames visual e radiográfico. A validação dos sítios cariados

nesse estudo foi realizada com intervenção operatória, baseado nos resultados obtidos com o exame visual e radiográfico. Os valores de sensibilidade obtidos pelo DIAGNOdent foram de 0,96 e 0,92 para lesões em esmalte e em dentina, respectivamente. Além disso, os autores observaram uma maior detecção de lesões (117 % maior) com o DIAGNOdent utilizado como segunda opinião ao exame visual, fazendo com que o aparelho fosse indicado como auxiliar ao exame clínico (LUSSI et al., 2001).

Outro estudo realizado em superfícies oclusais de dentes permanentes, com validação por intervenção operatória, obteve maior sensibilidade do DIAGNOdent comparado aos métodos visual e radiográfico, embora com uma menor especificidade (HEINRICH-WELTZIEN et al., 2002). O DIAGNOdent apresentou correlação significativa (embora fraca) com a profundidade das lesões após abertura com broca, da mesma forma que os métodos visual e radiográfico (ASTVALDSDOTTIR; HOLBROOK; TRANAEUS, 2004).

O desempenho do DIAGNOdent no diagnóstico de lesões oclusais foi avaliado em condições de um estudo epidemiológico. As leituras do aparelho foram interpretadas usando duas tabelas de pontos de corte diferentes, propostas pelo fabricante e por um estudo anterior *in vitro* (LUSSI et al., 1999). Os resultados foram comparados aos resultados obtidos por meio da inspeção visual. A concordância entre os dois métodos foi melhor usando os pontos de corte recomendados pelo fabricante. Como a validação das lesões de cárie não pode ser realizada, os autores observaram que o DIAGNOdent resultou na detecção de um maior número de lesões de cárie do que o exame visual (SHEEHY et al., 2001). Outro estudo obteve um índice de acertos de 77 a 85 % usando pontos de corte ajustados para a amostra, em lesões de cárie de dentes permanentes, avaliados após abertura com

broca. Os autores não apresentaram valores de acerto para dentes hígidos, pois esses não foram validados por razões éticas. Além desses resultados, os autores observaram diferenças sistemáticas na leitura com dois aparelhos DIAGNOdent distintos (TRANAEUS et al., 2004). Esse último resultado discorda dos achados obtidos em outros estudos, que não obtiveram diferenças usando mais de um aparelho (ALWAS-DANOWSKA et al., 2002; KUHNISCH et al., 2004).

A preocupação com a utilização de diferentes pontos de corte também foi avaliada em outro estudo clínico, com validação após invasão com broca. Foram examinados 94 pacientes, com 248 primeiros e segundos molares permanentes sem restaurações. Desses, após abertura, 24 apresentavam lesões de cárie em esmalte, e 224 com lesões em dentina. Os melhores pontos de corte obtidos no estudo foram de 18 para lesões iniciais em dentina e 37 para lesões profundas em dentina. A área sob a curva ROC para lesões iniciais em dentina foi de 0,903, e para lesões profundas, de 0,830, indicando que os resultados com o DIAGNOdent não foram tão satisfatórios (HEINRICH-WELTZIEN et al., 2003).

A avaliação *in vivo* do desempenho do DIAGNOdent com posterior validação histológica das amostras foi realizada em dois estudos, um em dentes decíduos (ROCHA et al., 2003), outro em terceiros molares permanentes agendados para extração (REIS et al., 2005). No primeiro, o método apresentou resultados similares com os métodos visual e radiográfico na detecção de lesões em esmalte, exceto com relação à maior sensibilidade do método visual. Usando o limiar de detecção para lesões em dentina, o DIAGNOdent apresentou menor especificidade do que o método visual, mas maior do que o radiográfico. Os dentes foram seccionados e avaliados histologicamente após extração ou exfoliação do dente (ROCHA et al., 2003). Os resultados obtidos nesse estudo *in vivo* seguiram o

mesmo padrão de estudos realizados *in vitro* em dentes decíduos (ATTRILL; ASHLEY, 2001; BADER; SHUGARS, 2004; BENGTSON et al., 2005; LUSSI; FRANCESCUT, 2003; MENDES et al., 2005a).

No outro estudo, o diagnóstico foi realizado com o DIAGNOdent e exame visual na cavidade bucal, e *in vitro*, depois que os dentes foram extraídos. Nesse trabalho, o método visual foi melhor na detecção de lesões em dentina do que o DIAGNOdent. Isso pode ser explicado pelo uso do critério visual utilizado e pelo treinamento dos examinadores. O exame visual também não apresentou diferenças nos exames realizados na cavidade bucal, e depois, no dente extraído. Já o DIAGNOdent demonstrou pequenas diferenças entre os exames realizados nas diferentes condições (REIS et al., 2005). Apesar de alguns autores afirmarem que uma amostra constituída de terceiros molares pode não ser representativa (EKSTRAND et al., 1998), o DIAGNOdent foi utilizado com um bom desempenho numa amostra de terceiros molares (BASEREN; GOKALP, 2003).

O método de fluorescência induzida por laser diodo tem sido utilizado na detecção e quantificação de lesões cáries em superfícies lisas. Alguns estudos em mancha branca natural foram realizados com lesões interproximais em dentes permanentes extraídos. Verificou-se uma boa correlação entre as medições feitas com o DIAGNOdent e a profundidade da lesão avaliada com microrradiografia transversa, com coeficiente de correlação por volta de 0,84. Já a correlação com a perda mineral não foi tão boa ($R = 0,70$) (SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001b). Quando o método com o DIAGNOdent foi comparado ao QLF, utilizando como fonte emissora uma luz laser e uma luz não coerente, a sensibilidade e especificidade foram respectivamente de 0,75 e 0,96 para o DIAGNOdent, e de 0,94

e 1,00 para os dois métodos de QLF, mostrando um melhor desempenho do método QLF nesses tipos de lesão (SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a).

Um estudo realizado em superfícies proximais de dentes decíduos demonstrou uma boa performance na detecção de lesões de superfície lisa. O desempenho foi melhor em lesões em dentina do que lesões avançadas em esmalte e lesões iniciais em esmalte. Os valores do DIAGNOdent apresentaram correlação significativa com a profundidade das lesões ($R = 0,78$), e uma pior correlação, embora significativa, com os valores de perda mineral das lesões avaliados por microdureza de seção transversal ($R = - 0,57$) (MENDES et al., 2005b). Um outro estudo realizado *in vivo*, avaliou as medições de lesões de cárie em superfícies lisas de dentes permanentes, usando como método de validação, o QLF. A correlação das medidas do DIAGNOdent com os valores obtidos com o QLF foram apenas aceitáveis, variando de 0,57 a 0,73 (TRANAEUS et al., 2004).

Outros estudos foram realizados para observar se o DIAGNOdent era capaz de detectar lesões de cárie em volta de aparelhos ortodônticos. Para isso, bráquetes foram colados próximos a lesões naturais de cárie. Um estudo não observou grandes diferenças entre as medições sem os bráquetes e após a colagem, indicando que o método poderia ser utilizado para essa finalidade (STAUDT et al., 2004). Outro estudo observou uma correlação do método DIAGNOdent de 0,76 e de 0,64 com a profundidade e com a perda mineral das lesões, respectivamente. Com o método QLF, esses coeficientes foram maiores, indicando um desempenho mais adequado para essa finalidade (ALJEHANI et al., 2004).

Em virtude desses resultados em superfície lisa, associado a excelente reprodutibilidade do aparelho, alguns autores propõem que o DIAGNOdent seja

utilizado na monitoração da perda e ganho mineral de lesões de cárie. Um estudo utilizando o modelo de criação de lesões artificiais de cárie mostrou que, apesar de não haver uma excelente correlação com a profundidade das lesões, o DIAGNOdent apresentou um bom desempenho na diferenciação entre os dentes antes e após a indução da lesão artificial (MENDES; NICOLAU, 2004). Por outro lado, outros autores relataram que o método não foi adequado em detectar pequenas alterações minerais em lesões de cárie artificial (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001).

Um outro estudo avaliou a efetividade do DIAGNOdent em monitorar a remineralização *in vitro* de manchas brancas naturais. Lesões de mancha branca em dentes decíduos eram divididas ao meio, sendo que a metade de cada lesão foi submetida à remineralização numa solução remineralizadora, e a outra metade, mantida em água destilada. Avaliações periódicas com o DIAGNOdent foram realizadas. Ao final, apesar da profundidade das lesões ter diminuído no grupo experimental, indicando que ocorreu remineralização, as medidas com o aparelho não se alteraram em ambos os grupos (MENDES; NICOLAU; DUARTE, 2003).

Apesar desses resultados obtidos *in vitro*, dois estudos *in vivo* mostraram tendências diferentes. O DIAGNOdent se mostrou efetivo na diferenciação de lesões de mancha branca ativas e inativas (classificadas de acordo com exame visual) (PINELLI; CAMPOS SERRA; DE CASTRO MONTEIRO LOFFREDO, 2002). Um outro estudo piloto *in vivo* avaliou a capacidade do DIAGNOdent em monitorar alterações minerais de lesões de mancha branca formadas ao redor de aparelhos ortodônticos. Após a retirada dos aparelhos, as lesões foram avaliadas por exame visual e DIAGNOdent, sendo que reavaliações foram realizadas após 1, 3 e 6 meses. Os autores observaram que houve um decréscimo nas leituras do DIAGNOdent após 3 e 6 meses de retirada do aparelho, e os valores se

correlacionaram significativamente com o exame visual (ANDERSSON et al., 2004). Isso pode indicar que, apesar do aparelho não medir remineralização *in vitro* (MENDES; NICOLAU; DUARTE, 2003), poderia ser útil na avaliação clínica da inativação de lesões de cárie (ANDERSSON et al., 2004; PINELLI; CAMPOS SERRA; DE CASTRO MONTEIRO LOFFREDO, 2002).

Diante disso, alguns autores avaliaram a utilização do aparelho a laser diodo para diagnosticar atividade de lesões oclusais de cárie. Como já foi relatado anteriormente, esse aspecto de avaliação da atividade das lesões de cárie é extremamente importante no contexto atual da doença cárie dentária. Foi observado que o aparelho apresentou medições menores em lesões inativas do que em lesões ativas de superfície oclusal de crianças finlandesas (ANTTONEN; SEPPA; HAUSEN, 2003). Após um novo exame dessas crianças, aproximadamente um ano depois dos exames iniciais, foi observado que lesões que progrediram visualmente, apresentaram aumento da medição com o DIAGNOdent, e esses valores se correlacionaram com o aumento no escore obtido através de inspeção visual. Os autores concluíram que o DIAGNOdent poderia ser útil no monitoramento de lesões oclusais de cárie (ANTTONEN; SEPPA; HAUSEN, 2004).

A avaliação da correlação entre as medições do aparelho com a contagem bacteriana das lesões de cárie poderia auxiliar na verificação se o método é capaz de diferenciar lesões ativas e inativas. Um trabalho demonstrou um bom desempenho do DIAGNOdent na avaliação da infecção do tecido cariado, sendo que medições abaixo de 15,6 indicariam ausência de bactérias. Nesse estudo, as bactérias não foram quantificadas (IWAMI et al., 2004). Outros autores, no entanto, observaram uma fraca correlação entre os valores de leitura com o DIAGNOdent e a quantidade de bactérias (ASTVALDSDOTTIR; HOLBROOK; TRANAEUS, 2004).

Alguns aspectos da utilização do aparelho foram observados. Foi observado que a presença de pigmentações nos sítios avaliados pelo DIAGNOdent induz a uma maior medição desses sítios. Medições realizadas em sítios oclusais de dentes decíduos e permanentes com pigmentação foram maiores do que as leituras em sítios com opacidade ou sem pigmentação, independente da presença ou não de lesão de cárie, avaliada por exame histológico (FRANCESCU; LUSSI, 2003). Outros autores observaram que o DIAGNOdent apresentou um melhor desempenho na detecção de lesões oclusais de cárie numa amostra de dentes permanentes após a exclusão dos sítios pigmentados. As medições nos sulcos pigmentados apresentavam valores maiores. Conseqüentemente, havia um maior número de diagnósticos falso-positivos (CORTES; ELLWOOD; EKSTRAND, 2003). Como grande parte das lesões inativas em superfícies oclusais apresentam pigmentação (EKSTRAND, 2004; EKSTRAND et al., 1998; NYVAD; FEJERSKOV, 1997; NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999), parece controverso afirmar que o DIAGNOdent seria capaz de avaliar a paralisação de lesões de cárie em superfície oclusal. A tendência é de que o aparelho apresente medições maiores em lesões inativas do que em lesões ativas. Estudos futuros para avaliar se o DIAGNOdent é capaz de monitorar a paralisação de lesões em superfície oclusal são necessários.

A influência da presença de placa sobre as medidas e desempenho do DIAGNOdent também foi estudada. Apesar de alguns autores afirmarem que a não realização de profilaxia dos sítios sob exame poderia provocar aumento das leituras, e conseqüentemente, resultados falso-positivos (BAMZAHIM; SHI; ANGMAR-MANSSON, 2002; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004), foi observado em um estudo *in vitro* em dentes decíduos, que a presença de placa diminuiu significativamente os valores das leituras. Da mesma forma, o desempenho do método foi piorado nas

leituras realizadas com placa, comparado aos exames realizados sem placa (MENDES; HISSADOMI; IMPARATO, 2004). Apesar da controvérsia, a necessidade de limpeza dos sítios parece evidente. No entanto, algumas pastas profiláticas podem causar aumento da fluorescência nos sítios a serem examinados. Assim, causariam resultados falso-positivos (HOSOYA et al., 2004; LUSSE; REICH, 2005). Dessa forma, o clínico deve estar atento ao tipo de pasta profilática utilizada, e na lavagem do sítio após a realização da profilaxia.

Variação nas medições com o DIAGNOdent também podem ser atribuídas ao tempo de secagem dos sítios. Alguns autores não observaram diferenças nas medições realizadas nos dentes úmidos e levemente secos (LUSSE et al., 1999), ao passo que outros encontraram um aumento das leituras em dentes expostos ao ar por dois minutos (SHI; WELANDER; ANGMAR-MANSSON, 2000). Um outro estudo realizado em superfícies oclusais de dentes decíduos observou que, apesar das leituras se alterarem, o desempenho do método não é alterado significativamente pela secagem do sítio com seringa tríplice (MENDES; HISSADOMI; IMPARATO, 2004). Assim, como foi proposto para o método QLF (AL-KHATEEB et al., 2002), essa variação das leituras com diferentes tempos de secagem poderia ser utilizada na avaliação de lesões ativas e inativas de cárie.

A possibilidade de detecção de cárie com o DIAGNOdent em sítios com selante oclusal poderia representar uma grande utilidade para o método. No entanto, esse assunto é controverso. Um estudo *in vitro* em dentes permanentes verificou que o DIAGNOdent apresentou uma performance razoável na detecção de lesões de cárie sob selantes transparentes (TAKAMORI et al., 2001). Outros estudos, no entanto, afirmaram que a presença dos selantes provoca imprecisão na avaliação com o laser (ANTTONEN; SEPPA; HAUSEN, 2003; HOSOYA et al., 2004).

O efeito da experiência do examinador sobre as avaliações com o DIAGNOdent, comparado a outros métodos, foi investigado na detecção de lesões oclusais em dentes permanentes e decíduos. Independente do desempenho dos métodos, o DIAGNOdent foi o método que apresentou menor variação entre examinadores com diferentes graus de experiência. Isso se deve ao fato da grande reprodutibilidade do método. Um outro achado comum aos estudos foi que examinadores com menor experiência (dentistas recém formados ou estudantes de graduação) apresentaram maior sensibilidade com o exame visual no diagnóstico de lesões oclusais de cárie (BENGTSON et al., 2005; EL-HOUSSEINY; JAMJOUR, 2001; FUNG et al., 2004).

A necessidade de calibração na superfície sadia do dente, como recomendado pelo fabricante, foi avaliada em dentes permanentes. Segundo os autores, a realização da calibração fez com que os valores das medições dos sítios oclusais fossem cerca de 6 unidades menor do que quando a calibração não era realizada (BRAUN; KRAUSE; JEPSEN, 2005). No entanto, o efeito desse tipo de calibração no desempenho do DIAGNOdent na detecção de lesões de cárie ainda não foi avaliado.

A utilização do DIAGNOdent em estudos clínicos controlados ainda é bastante incipiente. Como o método é quantitativo e reprodutível, ele poderia ser utilizado como substituto do exame visual em estudos clínicos controlados avaliando a eficácia de diferentes produtos na prevenção da formação de lesões de cárie (LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004). Isso poderia possibilitar a realização de estudos mais curtos e com menor número de voluntários. Apesar dessa possível utilidade, a pigmentação de lesões inativas pode ser um obstáculo para que o método seja utilizado com essa finalidade.

Um estudo recente utilizou o método para avaliar a efetividade da utilização de um verniz de clorexidina em molares permanentes, num estudo *split-mouth*. No lado escolhido como controle, um verniz placebo foi utilizado. O estudo durou 42 semanas, com a avaliação pelo DIAGNOdent sendo realizada a cada 12 semanas. A média dos valores do DIAGNOdent no grupo experimental não se alterou durante o experimento, enquanto que, no grupo controle, houve aumento significativo nas avaliações após 24 semanas. Apesar disso, os valores não foram diferentes entre os grupos em nenhuma das avaliações. Os resultados sugeriram que o método pode ser utilizado como alternativa na monitoração do desenvolvimento de lesões de cárie (SKOLD-LARSSON et al., 2004).

Apesar do desempenho do DIAGNOdent ter sido extensivamente estudado, as moléculas responsáveis pelo aumento da fluorescência no tecido cariado ainda não estão totalmente elucidadas. Foi observado que, com o método QLF usando laser de argônio ou luz, há uma medição da fluorescência intrínseca do tecido mineral dentário. Assim, ocorre uma diminuição na intensidade da fluorescência com a desmineralização decorrente do processo de cárie. Já com o DIAGNOdent, nas regiões desmineralizadas, ocorre o aumento da fluorescência. Portanto, estudos com o método QLF não podem ser extrapolados para explicar o modo de funcionamento do DIAGNOdent (TAM; MCCOMB, 2001).

Estudos espectroscópicos de lesões de cárie observaram um aumento na intensidade da fluorescência na região espectral do vermelho. Esse aumento não foi tão evidente em regiões sadias dos dentes. O espectro de fluorescência foi característico de porfirinas fluorescentes, tais como a PPIX (KONIG; FLEMMING; HIBST, 1998). O tempo de decaimento de fluorescência após retirada da luz de excitação apresentou também propriedades características da PPIX (KONIG;

SCHNECKENBURGER; HIBST, 1999). Num outro estudo utilizando a avaliação da emissão de fluorescência do dente com excitação realizada com luzes de vários comprimentos de onda, foi observado um aumento na emissão de fluorescência do tecido cariado comparado ao tecido sadio do mesmo dente na região entre 600 e 700 nm. Essas bandas de emissão de fluorescência na região do vermelho parecem ser originadas de porfirinas presentes na região bacteriana (BUCHALLA, 2005). Essas porfirinas seriam produzidas por algumas bactérias presentes na cavidade bucal (BUCHALLA, 2005; KONIG; FLEMMING; HIBST, 1998; KONIG; SCHNECKENBURGER; HIBST, 1999; KONIG et al., 2000).

Outros estudos demonstraram que desmineralizações artificiais não causaram diferenças de fluorescência significantes e que hidroxiapatita sintética não produziu fluorescência quando excitada com luz de comprimento de onda de 655 nm. Por outro lado, bactérias coletadas de lesões de cárie e seus metabólitos emitiram forte fluorescência (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001). Após coleta de material de tecido cariado, esse foi dissolvido e analisado por cromatografia líquida de alta performance. Os autores encontraram a presença de PPIX, mesoporfirinas e coproporfirinas nas amostras (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004).

Outros resultados reforçam esses achados. O armazenamento dos dentes em formol aumentou as medições com o DIAGNOdent, provavelmente devido a alterações de componentes protéicos (SHI; WELANDER; ANGMAR-MANSSON, 2000). Outro experimento relativamente simples foi realizado para demonstrar que os componentes orgânicos são os principais responsáveis pelo aumento da fluorescência no tecido cariado. Dentes decíduos com lesões oclusais suspeitas de cárie foram mensurados com o DIAGNOdent. Após a avaliação inicial, metade das

amostras foi imersa em hipoclorito de sódio a 2 % por 24 h, e a outra metade foi imersa em soro pelo mesmo período. O hipoclorito de sódio é um agente que desnatura componentes orgânicos. Após a imersão, o grupo imerso em hipoclorito de sódio apresentou redução nas medições na ordem de 77 %, enquanto que a redução no grupo controle foi de apenas 20 % (MENDES; PINHEIRO; BENGTON, 2004).

Estudos em lesões de superfície lisa têm demonstrado que a correlação entre os valores do DIAGNOdent e a profundidade das lesões são maiores do que com a perda mineral (ALJEHANI et al., 2004; MENDES et al., 2005b; SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a, 2001b). Isso reforça o papel das substâncias extrínsecas no aumento da fluorescência. O fato do aparelho não ser adequado para monitorar remineralização *in vitro* (MENDES; NICOLAU; DUARTE, 2003), mas apresentar resultados satisfatórios na diferenciação entre lesões ativas e inativas (PINELLI; CAMPOS SERRA; DE CASTRO MONTEIRO LOFFREDO, 2002) e na monitoração da paralisação de lesões de superfície lisa após remoção dos aparelhos ortodônticos (ANDERSSON et al., 2004), também reforçam esse achado.

De fato, o aumento de fluorescência com a utilização do aparelho com laser diodo que ocorre com o processo de cárie provavelmente se deve mais às alterações orgânicas que ocorrem pela presença da bactéria e seus metabólitos, do que pela desintegração mineral (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004; MENDES; HISSADOMI; IMPARATO, 2004; MENDES; NICOLAU; DUARTE, 2003; MENDES; PINHEIRO; BENGTON, 2004; SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a, 2001b).

Isso explica alguns resultados obtidos nos estudos. Apesar de alguns autores relatam que o aparelho DIAGNOdent é útil para detecção precoce de lesões

de cárie (LUSSI et al., 1999), o aparelho tem apresentado melhor desempenho na detecção de lesões em dentina do que em esmalte (BENGTON et al., 2005; MENDES et al., 2005a; MENDES et al., 2005b; ROCHA et al., 2003). O aumento das leituras do DIAGNOdent com a secagem das amostras pode estar relacionado ao aumento de concentração dos metabólitos bacterianos nos sítios (MENDES; HISSADOMI; IMPARATO, 2004).

De fato, o DIAGNOdent tem apresentado bons resultados na detecção de lesões oclusais de cárie em dentina. Além dessa qualidade, é um aparelho fácil de ser utilizado, portátil, quantitativo e não destrutivo. No entanto, o aparelho não tem apresentado boa precisão na quantificação da perda mineral de lesões incipientes (MENDES et al., 2005b; SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a, 2001b). Além disso, o desempenho em lesões iniciais de cárie não tem se mostrado adequado, tanto em superfícies lisas (MENDES et al., 2005b), como em lesões oclusais (MENDES et al., 2005a). Talvez a associação de corantes, que emitam fluorescência no comprimento de onda captado pelo DIAGNOdent, possa melhorar o desempenho na quantificação e detecção precoce de lesões de cárie com o aparelho.

A busca de novas alternativas que visam associar as vantagens do DIAGNOdent a uma detecção precoce do processo carioso e uma melhora na quantificação do conteúdo mineral dessas lesões leva a realização do presente trabalho.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi propor a associação do aparelho DIAGNOdent com dois corantes fluorescentes e avaliar o desempenho dos métodos na detecção de lesões de cárie em superfícies lisas e oclusais, avaliar a capacidade de detecção precoce da desmineralização em superfícies lisas e testar a capacidade dos métodos em quantificar a perda mineral de lesões de superfície lisa em dentes decíduos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

Antes do início da pesquisa, o projeto foi submetido e aprovado em 22/03/2004 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, com o parecer de número 26/04 (Anexo A). Os dentes utilizados na pesquisa foram doados pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

4.2 Padronização para utilização dos corantes

4.2.1 escolha dos corantes e determinação da concentração ideal

A seleção inicial dos corantes utilizados na pesquisa foi feita baseada na literatura e nas propriedades químicas dessas substâncias. Um dos corantes selecionados foi a 5, 10, 15, 20–Tetrakis(1-metil-4-piridil)-21H, 23 H-porfina, tetra-p-tosilato ou tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (TMPyP). Outra porfirina selecionada foi o sal dissódico de 3, 7, 12, 17–tetrametil-8, 13-divinil-2, 18-porfina- ácido dipropiônico

ou Protoporfirina IX (PPIX). A partir da seleção desses dois corantes, estudos foram realizados para escolha da melhor concentração dessas substâncias.

Assim, soluções com várias concentrações dos corantes TMPyP (Aldrich, Milwaukee, EUA) e PPIX (Aldrich, Milwaukee, EUA) foram formuladas com água deionizada. Era realizada a tomada de 0,4 ml de solução com diferentes concentrações e colocadas em cubetas de quartzo de 1 ml, com caminho óptico de 1 cm. O aparelho DIAGNOdent com a ponta B foi utilizado. Inicialmente, o aparelho era calibrado no padrão de cerâmica, e a ponta era encostada perpendicularmente na parede da cubeta, sendo registrado o valor aferido pelo aparelho. Isso foi repetido até achar a faixa de concentração da TMPyP e da PPIX em que o aparelho era apto a fazer a leitura (ou seja de 0 a 99).

Soluções de diferentes concentrações com os dois corantes foram formuladas dentro da faixa em que o aparelho era capaz de medir. Dessa forma, três medições foram realizadas com o DIAGNOdent nas cubetas com diferentes concentrações (em duplicata), da forma descrita acima. Os valores do DIAGNOdent em cada concentração foram colocados num gráfico de dispersão e análise de regressão linear foi realizada para observar se havia uma correlação linear das medições do aparelho e aumento da concentração dos corantes. Foi escolhida a concentração dos corantes em que as medições com o DIAGNOdent eram altas, mas não extrapolavam o limite do aparelho. Depois, essa concentração foi testada num estudo piloto, em lesões de cárie artificial, lesões de cárie natural e dentes hígidos, para avaliar se naquela concentração previamente selecionada, havia um bom desempenho na diferenciação dessas lesões.

A faixa de concentração da TMPyP que o DIAGNOdent conseguiu medir foi de 0,01 a 0,2 mM, e houve uma relação linear entre os valores do DIAGNOdent e

as diferentes concentrações do corante (Figura 4.1). Inicialmente a concentração escolhida foi de 0,1 mM, mas após o estudo piloto, observou-se um melhor desempenho com uma concentração de 0,2 mM. Dessa forma, ficou definido que a melhor concentração da TMPyP utilizada em nosso estudo era de 0,2 mM.

Figura 4.1 – Gráfico de dispersão entre as medidas com o DIAGNOdent e soluções com diferentes concentrações de tetrakis (N-metilpiridil) porfirina dissolvidas em água deionizada

Para a PPIX, foi observado um menor rendimento do aparelho, ou seja, valores mais baixos em concentrações mais altas. Foi notado que as medidas não passavam de 50, mesmo em concentrações de 12 mM. Em virtude desses resultados obtidos no estudo piloto, e das características não tão hidrófilicas do corante, foram realizados alguns testes dissolvendo o produto em diferentes proporções de dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água. Dessa forma, foi observado um melhor rendimento do aparelho com a PPIX quando

o corante era dissolvido em DMSO e água, numa proporção de 1:1. Os estudos subsequentes foram realizados utilizando esse meio como solvente. Dessa forma, o aparelho conseguiu obter um melhor rendimento e a faixa de concentração do corante que o DIAGNOdent conseguiu medir foi de 1 a 6 mM. Os valores foram colocados em um gráfico de dispersão, e a análise de regressão linear mostrou uma correlação entre os valores e a concentração de PPIX (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Gráfico de dispersão entre as medidas com o DIAGNOdent (DD) e soluções com diferentes concentrações de Protoporfirina IX (PPIX) dissolvidas em dimetil sulfoxido e água deionizada

A concentração de 4 mM de PPIX dissolvida em DMSO e água foi testada em dentes com cárie artificial, natural e dentes hígidos, e demonstrou um bom desempenho na diferenciação dessas lesões. Assim a concentração de 4 mM para a PPIX ficou definida e foi utilizada em todo estudo.

Após verificação do melhor desempenho com a PPIX dissolvida em DMSO e água, alguns testes foram realizados com a TMPyP dissolvida em DMSO e água, na mesma proporção (1:1). Quando foram realizadas medições das soluções de 0,2 mM de TMPyP dissolvida em água e DMSO, essas foram mais baixas do que a mesma concentração do corante dissolvido apenas em água. Além disso, a incorporação do corante dissolvido em água nas lesões artificiais e naturais de cárie

foi muito mais efetiva do que quando a TMPyP era dissolvida em DMSO e água (valores menores do DIAGNOdent). Por esses motivos, mantivemos a concentração da TMPyP em 0,2 mM dissolvida apenas em água deionizada durante todo estudo.

4.2.2 modo de utilização dos corantes

Em todos os experimentos, as amostras foram mantidas em água antes da medição. Para a utilização dos corantes, as amostras foram retiradas da água, secas por 5 s com papel de filtro e imersas em 5 ml do corante durante 60 s. Após esse período, os dentes foram retirados e o excesso do corante foi removido através de dois mergulhos rápidos em água destilada. Após a retirada do excesso do corante, as amostras foram secas por 5 s com papel de filtro antes das medições com o DIAGNOdent, exceto nas superfícies oclusais, onde os dentes foram secos por 3 s com seringa tríplice.

4.3 Pesquisas aplicadas com o DIAGNOdent

4.3.1 seleção e preparo da amostra

Para todos os experimentos, foram utilizados dentes decíduos. Para avaliação dos dentes com superfícies hígidas, foram selecionados 20 caninos decíduos hígidos. Os dentes foram examinados com lupa (2 X) para verificação da ausência de trincas, defeitos de esmalte ou manchas. Foi realizada profilaxia com taça de borracha em motor de baixa rotação, utilizando uma mistura de pedra pomes e água. Os dentes foram lavados em água corrente por uma hora. Os caninos foram então separados no sentido vestibulo-lingual em duas metades com ponta diamantada e caneta de alta rotação. A metade esquerda de cada dente foi utilizada para os experimentos com o corante TMPyP, e a metade direita para a PPIX.

Para a avaliação dos métodos com o DIAGNOdent associado ou não aos corantes na detecção e quantificação de lesões de cárie artificial, foram selecionados 45 caninos decíduos, que foram previamente examinados com lupa da forma descrita acima. Os dentes foram submetidos aos mesmos procedimentos de profilaxia e lavagem, e também foram separados em duas metades, sendo a metade esquerda destinada à avaliação com a TMPyP e a metade direita com a PPIX.

Outros 40 caninos decíduos hígidos foram selecionados para o experimento para avaliação dos métodos na detecção precoce da perda mineral decorrente de cárie dentária. Esses dentes foram submetidos aos mesmos procedimentos de inspeção, profilaxia e separação dos dentes e utilizados para as finalidades acima descritas.

Para a avaliação dos métodos no desempenho da detecção de lesões de cárie oclusal, 81 molares decíduos com pelo menos um sítio oclusal suspeito de ter lesão cariosa foram selecionados. Os dentes foram separados aleatoriamente, sendo 40 dentes selecionados para a utilização com a TMPyP, e os outros 41 molares foram utilizados para a avaliação com o aparelho associado à PPIX.

Foi realizada profilaxia com escova Robinson e mistura de pedra pomes e água em baixa rotação e os dentes foram lavados com água corrente. As amostras foram numeradas e fotografadas com máquina digital. A escolha dos sítios foi feita por inspeção visual nos dentes, e os locais selecionados foram indicados na fotografia impressa para orientação das avaliações. Um ou dois sítios foram escolhidos em cada dente. Após essa seleção, foram considerados a avaliação de 57 sítios com o DIAGNOdent associado ou não à TMPyP e 57 sítios para a avaliação com a PPIX.

4.3.2 modo de utilização do DIAGNOdent

Para as aferições em todos os experimentos, foi utilizado um mesmo aparelho de fluorescência induzida por laser diodo, o DIAGNOdent. Para as avaliações em superfícies lisas (avaliação em superfícies híginas, detecção e quantificação de lesões de cárie artificial e avaliação do desempenho na detecção precoce), a ponta B foi utilizada. Para o experimento em lesões oclusais, foi empregada a ponta A do aparelho.

Em todas avaliações, o aparelho era previamente calibrado no padrão de cerâmica com valor de fluorescência estável e conhecida, como indicado pelo fabricante. Uma nova calibração no padrão de cerâmica era realizada a cada dez amostras examinadas. A medição era realizada com a ponta encostada na superfície do dente, sem que pressão fosse exercida. No caso das avaliações em lesões cariosas em superfícies lisas, a ponta era percorrida, em posição perpendicular à

superfície, em toda a lesão e na borda da lesão com a superfície hígida. Na superfície hígida, a ponta era levada por toda superfície vestibular. Na superfície oclusal, a ponta era posicionada perpendicularmente ao sítio, e movimentos pendulares eram realizados. O valor máximo era registrado em todas as medições. Sempre eram feitas três medições independentes, e a média dos valores máximos obtidos com o DIAGNOdent em cada local era calculada.

A calibração numa superfície hígida do dente previamente a avaliação do local da lesão, como é indicado pelo fabricante, foi realizada apenas na aferição das superfícies oclusais. Dessa forma, antes da avaliação do sítio suspeito, a ponta do aparelho era posicionada sobre a superfície vestibular, num local sem lesão de cárie, e o aparelho era zerado eletronicamente nessa superfície. Essa calibração na superfície hígida era feita de forma independente no aparelho associado ou não ao corante, ou seja, nas avaliações feitas com o corante, a calibração era feita após a retirada do dente do corante. Para a avaliação das lesões de cárie artificial essa calibração numa superfície hígida não foi realizada.

4.3.3 avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent sobre superfícies dentárias híginas

Esse experimento foi realizado para se obter parâmetros dos valores do DIAGNOdent sem e com os corantes em superfícies híginas. Esses valores foram utilizados como padrão de ausência de lesão de cárie para a avaliação do desempenho dos métodos na detecção de lesões artificiais e da perda mineral

precoce. Essas avaliações sobre superfícies hígidas não foram consideradas para o trabalho com lesões oclusais.

As metades esquerdas de 20 caninos decíduos foram utilizadas para avaliação do aparelho associado ou não à TMPyP, e as metades direitas com a PPIX. Inicialmente as amostras foram avaliadas com o DIAGNOdent sem a utilização dos corantes, em toda a superfície vestibular, registrando-se a média de três medições em cada amostra. Após as medições iniciais, os dentes foram avaliados após a imersão nas porfirinas (TMPyP e PPIX), como descrito previamente, sendo os valores novamente registrados. Esses valores serviam para as análises subseqüentes em lesões de cárie artificial.

4.3.4 avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent para detecção e quantificação de lesões de cárie artificial em esmalte

Após a seção e limpeza dos 45 caninos decíduos hígidos, estes foram isolados com verniz ácido resistente, exceto em uma janela retangular de 2 x 3 mm, posicionada no terço médio da superfície vestibular do dente. Nessas regiões, foram formadas lesões de cárie artificial. Os dentes foram divididos em três grupos, de acordo com o tempo de formação da lesão de cárie artificial.

Para a formação das lesões de cárie artificial, as amostras foram imersas em uma solução subsaturada com relação a hidroxiapatita durante 8, 12 e 16 dias (15 amostras de cada lado do dente para cada período de formação das lesões). A solução era composta de CaCl_2 2,2 mM; NaH_2PO_4 2,2 mM; ácido acético 0,05 M e o

pH ajustado para 4,8, por meio de solução de KOH 1M. Todos os reagentes eram pró-análise (Merck, Darmstadt, Alemanha) e as soluções preparadas com água deionizada. As amostras permaneceram imersas individualmente em 10 ml da solução. A cada 4 dias a solução era renovada. Uma alíquota de 3 ml era retirada da solução em que o dente permaneceu por 4 dias, misturada com 3 ml de ácido nítrico a 10 %, e armazenada em geladeira para posterior análise do conteúdo de cálcio perdido pelo dente. A cada troca, 5 frascos com 10 ml da solução era armazenada durante o mesmo período, sem a colocação de nenhuma amostra no interior. Ao final dos 4 dias, alíquotas dessas soluções foram tomadas da mesma forma com a finalidade de avaliar o conteúdo de cálcio da solução inicial.

Esses procedimentos foram repetidos até 16 dias, de forma que as últimas lesões fossem formadas. Ao final do ciclo de desmineralização, as janelas foram analisadas em lupa com luz refletida (10 X de aumento), e as imagens foram armazenadas em um computador. Dessa forma, foi realizada a medição da área do tamanho das janelas em mm^2 , com auxílio de um analisador de imagens (Leica Qwin, Leica microsystems, Heidelberg, Alemanha). Essa medição foi realizada para posterior cálculo da quantidade de cálcio perdida por área de esmalte exposto.

Para avaliação das lesões artificiais com o DIAGNOdent, o verniz ácido resistente foi removido. Inicialmente foram realizadas três medições com o aparelho (ponta B) sem a utilização de corante, varrendo a lesão e a borda entre lesão de cárie e superfície hígida. A mensuração foi realizada após secagem da superfície com papel de filtro por 5 s, após a retirada da amostra da solução de armazenamento. A média das três medições realizadas em cada amostra foi registrada.

Após a medição sem o corante, as metades esquerdas dos caninos foram imersas em 5 ml de solução a 0,2 mM de TMPyP por 60 s, retiradas e mergulhadas em água destilada, secas por 5 s com papel de filtro e avaliadas com a ponta B do DIAGNOdent, como descrito para a avaliação sem o corante. A média das três medições foi calculada.

Da mesma forma, as metades direitas foram colocadas em 5 ml de solução a 4 mM de PPIX e após a retirada do excesso e secagem com papel de filtro, avaliadas com o DIAGNOdent. Após todas as avaliações, as lesões foram seccionadas no centro com disco diamantado de 0,3 mm de espessura refrigerado com água, acoplado a máquina de cortar dentes (Labcut 1010, Extec Co., CT, EUA), para confecção das lâminas para avaliação da profundidade das lesões em microscopia de luz polarizada.

4.3.5 avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent para detecção precoce de lesões de cárie

Os 40 caninos decíduos selecionados, após limpeza e separação em duas metades, foram isolados com verniz ácido resistente, exceto em uma janela retangular de 2 X 3 mm no terço médio da superfície vestibular de cada dente. As amostras destinadas à avaliação com os dois corantes foram divididas em 4 grupos. O primeiro grupo foi submetido ao desafio cariogênico por 12 h, o segundo por 24 h, o terceiro por 48 h e o quarto por 96 h. Os dentes foram imersos individualmente em 5 ml de solução desmineralizadora (pH = 4,8). Após os períodos determinados, as

amostras foram retiradas das soluções e o líquido foi armazenado em geladeira com quantidade igual de ácido nítrico a 10 %. A solução desmineralizadora, sem a imersão de dentes, foi também armazenada.

Foi realizada a avaliação das janelas em lupa (10 X), e a área das lesões medida com auxílio de analisador de imagens. Após essa análise, o verniz foi removido, e foram realizadas medições com o DIAGNOdent nessas amostras sem os corantes, e depois com a utilização dos corantes, da mesmo modo como foi descrito anteriormente.

4.3.6 avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent para detecção de lesões naturais de cárie oclusal

Foram selecionados 57 sítios suspeitos em 40 molares decíduos que foram submetidos à detecção com o DIAGNOdent sem a utilização da TMPyP e depois com a utilização da porfirina. Outros 57 sítios em 41 molares decíduos foram avaliados com o DIAGNOdent sem e com a PPIX.

Para esse experimento, a ponta A do aparelho foi utilizada. Depois da calibração do aparelho no padrão fornecido pelo fabricante, foi realizada a calibração numa superfície hígida do dente. Nas avaliações com as porfirinas, a calibração era realizada após a imersão nos corantes.

Para correto posicionamento da ponta do aparelho em todas as medições, os sítios foram demarcados em fotos impressas dos dentes. A avaliação

inicialmente foi realizada com o DIAGNOdent após secagem com seringa tríplice por 3 s. A média de três medições em cada sítio foi registrada.

Após as medições sem o corante, os dentes foram imersos em solução a 0,2 mM de TMPyP (5 ml) e em 5 ml de uma solução a 4 mM de PPIX por 60 s, retirados e mergulhados em água destilada, e secos por 3 s com jato de ar proveniente de seringa tríplice. A média dos valores máximos em cada sítio foi calculada. Após as mensurações com o DIAGNOdent, os sítios foram cortados no sentido vestibulo-lingual em fatias de 300 μ m com disco diamantado de 0,3 mm de espessura refrigerado por água em máquina de cortar dentes, polidos em lixas d'água número 600 e 1200, para análise em lupa estereoscópica visando a determinação da profundidade das lesões.

4.4 Validação das lesões de cárie

4.4.1 análise da quantidade de cálcio perdido por amostra

Para o experimento de avaliação do desempenho e quantificação de lesões de cárie artificial com os métodos propostos, dois tipos de validação foram realizados. Durante a formação das lesões, as soluções eram trocadas a cada 4 dias. Dessa solução em que os dentes permaneceram imersos durante os 4 dias, uma alíquota de 3 ml era retirada, adicionado 3 ml de ácido nítrico a 10 % e armazenado em geladeira. Essa solução foi analisada com relação à concentração

de cálcio através de espectrometria de emissão atômica com fonte de excitação de argônio induzido, usando um espectrofotômetro seqüencial (Spectroflame, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Alemanha). A concentração de cálcio da solução sem a imersão dos dentes foi calculada usando o mesmo método. Para análise da quantidade de cálcio perdido de cada amostra, a concentração avaliada da alíquota da solução no qual permaneceu imerso cada dente durante 4 dias foi subtraída da média da concentração de cálcio da solução desmineralizadora. Esse valor foi somado às concentrações de cálcio obtidas nos outros períodos de desmineralização, obtendo-se assim a quantidade perdida de cálcio total (em ppm) de cada amostra. Esses valores foram divididos pela área da janela exposta à desmineralização, que foi avaliada em lupa com aumento de 10 X, com auxílio de um analisador de imagens (Leica Qwin). Dessa forma, a medida de cálcio perdido de cada amostra foi calculada em ppm/mm².

Esse tipo de análise foi realizado também para a quantidade de cálcio perdido por amostra no experimento de avaliação da detecção precoce. No entanto, foi adicionada uma quantidade de 5 ml de ácido nítrico a 10 % aos 5 ml de solução desmineralizadora em que permaneceram imersas as amostras.

4.4.2 avaliação da profundidade das lesões de cárie artificial

A avaliação da profundidade das lesões de cárie artificial de esmalte foi feita através de microscopia de luz polarizada. As lesões eram seccionadas com disco diamantado em máquina de cortar dentes, sob refrigeração por água, em fatias

de aproximadamente 300 μm de espessura. Essas seções eram manualmente polidas com lixas d'água número 400, 600, 1.200 e 4.000 e coladas em lâminas de vidro. As seções eram desgastadas com lixas d'água de granulação decrescente (400, 600, 1.200 e 4.000) até a espessura aproximada de 100 μm , mensurada com paquímetro digital.

Para o exame das lâminas, foi utilizado um microscópio óptico Zeiss (Alemanha), com uma câmera CCD acoplada. As imagens eram geradas diretamente no monitor do computador, em um programa de análise de imagens Leica Qwin. O exame foi feito com luz transmitida polarizada e com auxílio de placa de quartzo.

O meio de embebição para as análises foi água destilada. As lâminas foram examinadas com aumento de 50 X. A profundidade das lesões foi mensurada através do programa de análise de imagens. O contraste entre o corpo da lesão e o esmalte hígido era detectado, e o programa fazia a medição da profundidade das lesões em μm . Esse tipo de avaliação foi realizado apenas para avaliação da profundidade das lesões artificiais formadas por 8 a 16 dias, no experimento para avaliação do desempenho e quantificação das lesões artificiais em esmalte.

4.4.3 Avaliação da extensão das lesões de cárie oclusal

Para avaliação da extensão das lesões oclusais de cárie, seções de aproximadamente 300 μm de espessura foram realizadas no sentido vestibulo-lingual, passando pelos sítios avaliados com o DIAGNOdent. Estas seções foram

avaliadas de forma independente por dois examinadores treinados, em lupa estereoscópica com aumento de 16 a 32 X de magnificação. Os examinadores foram orientados a considerar o local de maior extensão em cada sítio examinado. Em caso de divergência entre os examinadores, as análises foram refeitas em conjunto até que os avaliadores chegassem a um consenso.

As lesões foram classificadas em uma escala de 5 escores: D0 = sem lesão de cárie; D1 = lesão de cárie limitada à metade externa do esmalte; D2 = lesão de cárie se estendendo na metade interna do esmalte, sem ultrapassar a junção amelodentinária; D3 = lesão de cárie limitada à metade externa da dentina; e D4 = lesão de cárie envolvendo a metade interna da dentina.

4.5 Análise estatística

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade (distribuição normal) das amostras.

Para o experimento de desempenho na detecção e quantificação de lesões de cárie artificial com os diferentes métodos, foi realizada análise de variância (ANOVA) para comparação entre os valores obtidos com o DIAGNOdent sem e com os corantes nas avaliações dos dentes hígidos e nas lesões de cárie artificial formadas em 8, 12 e 16 dias. Essa análise serviu para avaliar também a quantidade de cálcio perdido e a profundidade das lesões de cárie nas amostras nos diferentes períodos de formação de lesão. Em caso de diferença estatisticamente significativa,

foi utilizado o teste complementar de Tukey para analisar onde as diferenças estavam presentes.

A análise de correlação de Spearman foi realizada para avaliar a relação entre as medições do DIAGNOdent com e sem os corantes e o tempo de desmineralização (0, 8, 12 e 16 dias) das lesões artificiais de cárie. Foi feito também teste de correlação de Pearson entre os valores obtidos com o DIAGNOdent com e sem as porfirinas associadas e a quantidade de cálcio perdido e profundidade das lesões artificiais de cárie de cada amostra. Para esse experimento, também foi realizada uma análise ROC para os métodos utilizando o DIAGNOdent com e sem os corantes. Como a análise ROC necessita de uma amostra dicotomizada com relação à presença da doença, os valores obtidos nas mensurações em superfícies hígidas foram considerados como ausência de lesão de cárie, e os valores obtidos nas medições sobre as lesões de cárie artificial formadas durante 8, 12 e 16 dias foram considerados como presença de lesão de cárie. Na análise ROC, foi realizado o cálculo da área sob a curva ROC de cada método. A comparação entre as áreas sob as curvas ROC de cada método foi realizada usando um teste estatístico não paramétrico apropriado para amostras formadas por valores contínuos (HANLEY; MCNEIL, 1983). Foi realizada também a determinação do melhor ponto de corte entre dentes hígidos e presença de lesões de cárie para cada método através da análise ROC. Utilizando esses pontos de corte, a sensibilidade, especificidade e acurácia de cada método foram calculadas. A comparação entre esses valores dos diferentes métodos de detecção das lesões foi realizada com o teste de McNemar.

Para o experimento de detecção precoce, ANOVA complementada pelo teste de Tukey foi feita para comparação dos valores obtidos com o DIAGNOdent (com e sem corantes), bem como a quantidade de cálcio perdido nos diferentes

tempos de indução do desafio cariogênico (0, 12, 24, 48 e 96 h). Teste de correlação de Pearson foi realizado entre os valores obtidos com o DIAGNOdent e a quantidade de cálcio perdido. Foi realizada também análise ROC para determinar com quanto tempo de indução do desafio cariogênico, os métodos testados eram capazes de detectar as alterações minerais. Para essas duas últimas análises, num primeiro momento, as amostras foram separadas de acordo com o tempo de desmineralização, para poder discriminar melhor com quanto tempo de desmineralização os métodos apresentaram bom desempenho. Após essa análise, as amostras foram todas agrupadas e teste de correlação de Pearson e análise ROC foram realizadas para avaliar a performance dos métodos em toda a amostra.

A comparação entre as áreas sob a curva ROC, bem como escolha do melhor ponto de corte de cada método e cálculo e comparação dos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia foram feitos da mesma forma como foi descrita para o experimento anterior.

Para o estudo com lesões oclusais, análise ROC foi realizada para escolha dos melhores pontos de corte em dois limiares de detecção – lesão inicial em esmalte (D1) e lesão em dentina (D3). Dessa forma, para o limiar D1, as amostras foram divididas em dentes hígidos = D0; dentes com lesão de cárie = D1, D2, D3, D4, enquanto que para o limiar de detecção D3, foram considerados D0, D1, D2 = dentes hígidos; D3, D4 = dentes com lesão de cárie. Para esses dois limiares, foram calculadas as áreas sob a curva ROC e comparações entre os métodos foram realizadas. Valores de sensibilidade, especificidade e acurácia foram também calculados usando os valores de ponto de corte obtidos pela análise ROC, e a comparação desses parâmetros entre os métodos foi feita pelo teste de McNemar.

Para todos os testes estatísticos realizados, nível de significância de 5 % foi adotado.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent para detecção e quantificação de lesões de cárie artificial em esmalte

Os resultados da comparação entre os valores de cálcio perdido pelas amostras submetidas à desmineralização artificial, entre a profundidade das lesões formadas, e as medições com o DIAGNOdent sem o corante e associado à TMPyP em dentes hígidos e lesões artificiais formadas por 8, 12 e 16 dias estão expressos na tabela 5.1. Após os experimentos de cárie artificial, uma amostra com 12 dias de formação e três com 16 dias foram excluídas devido a dissolução da camada superficial. As medições com o DIAGNOdent foram realizadas sobre as demais amostras. Após a preparação das lâminas para avaliação em microscopia de luz polarizada, mais três lesões foram perdidas (duas com 8 dias e uma com 16 dias de desmineralização). Pode-se observar que houve diferença entre a quantidade de cálcio e a profundidade das lesões de cárie formadas em 8 dias e as formadas por mais tempo. Com relação às medições, os valores do DIAGNOdent não mostraram diferença significativa entre dentes hígidos e lesões artificiais, exceto com as lesões de 16 dias. Já com a TMPyP, os valores do DIAGNOdent foram significativamente maiores nas lesões artificiais comparadas aos dentes hígidos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Comparação entre os valores de profundidade das lesões, perda de cálcio (Ca), valores do aparelho DIAGNOdent (DD) sem o corante, e com a tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) entre lesões com diferentes tempos de indução de cárie artificial. Média $\pm$ DP (n)

Tempo de desmineralização	Profundidade (μm)	Perda de Ca (ppm/mm^2)	DD	DD TMPyP
Dentes hígidos	—	—	$3,3 \pm 0,9$ (20) a	$6,2 \pm 2,0$ (20) a
8 dias	$102,7 \pm 31,5$ (13) a	$6,24 \pm 1,91$ (15) a	$3,3 \pm 0,6$ (15) a	$21,4 \pm 6,5$ (15) b
12 dias	$155,6 \pm 58,9$ (14) b	$10,74 \pm 3,54$ (14) b	$3,4 \pm 0,7$ (14) a, b	$26,8 \pm 6,9$ (14) b
16 dias	$157,4 \pm 55,6$ (11) b	$13,70 \pm 4,71$ (12) b	$4,3 \pm 1,4$ (12) b	$27,4 \pm 8,2$ (12) b
Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores da mesma coluna				

O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado entre os valores obtidos com o DIAGNOdent e DIAGNOdent associado à TMPyP nas lesões com diferentes tempos de formação. Foi obtido um coeficiente de correlação de 0,294 ($p < 0,05$) (Figura 5.1) entre as medidas sem o corante, e um coeficiente maior com as leituras realizadas com o corante ($r_s = 0,786$, $p < 0,001$) (Figura 5.2).

O gráfico de dispersão entre os valores do DIAGNOdent sem o corante e os valores com o DIAGNOdent associado à TMPyP com os valores de cálcio perdido pelas amostras durante a indução de cárie estão representados na figura 5.3. O coeficiente de correlação de Pearson entre as medidas sem o corante e a concentração de cálcio foi de 0,044 ($p \geq 0,05$), enquanto que o coeficiente de correlação entre as medidas do aparelho com o TMPyP e a concentração de cálcio foi de 0,476 (significante ao nível de 1 %).

Figura 5.3 – Gráfico de dispersão entre os valores do DIAGNOdent sem o corante (DD) e os valores do DIAGNOdent com tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) e a concentração de cálcio perdido por cada amostra durante a formação das lesões artificiais de cárie

Na figura 5.4 está representado o gráfico entre os valores do DIAGNOdent sem e com a TMPyP e a profundidade das lesões artificiais de cárie. O coeficiente de correlação de Pearson entre as medições feitas com o aparelho sem a

utilização do corante foi de 0,190 ($p \geq 0,05$). Já as avaliações com o DIAGNOdent associado ao uso da TMPyP foi de 0,593 ($p < 0,001$).

Figura 5.4 - Gráfico de dispersão entre os valores do DIAGNOdent sem o corante (DD) e os valores o DIAGNOdent associado à tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) com a profundidade das lesões artificiais de cárie

A performance dos métodos com DIAGNOdent e DIAGNOdent associado à TMPyP na diferenciação de dentes com lesões de cárie artificial e dentes hígidos está representado na análise ROC, através das curvas ROC no gráfico (Figura 5.5).

Figura 5.5 – Curvas ROC representando o desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent associado à tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) na diferenciação entre dentes com lesões artificiais de cárie e dentes hígidos

Os pontos de corte de ambos os métodos para diferenciação entre dentes hígidos e dentes com lesões de cárie artificial, bem como valores de sensibilidade, especificidade, acurácia (com os pontos de corte determinados na tabela) e área sob a curva ROC (Az) estão apresentados na tabela 5.2. Os resultados indicaram que o desempenho do método com o DIAGNOdent associado à TMPyP utilizando um ponto de corte de 10,3, apresentou uma performance excelente na detecção de lesões de cárie artificial na nossa amostra (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Pontos de corte para diferenciação entre dentes com lesão de cárie artificial e dentes hígidos e desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent associado à tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) na detecção de lesões artificiais de cárie expressos em sensibilidade, especificidade, acurácia e área sob a curva ROC (Az)

Métodos	Pontos de corte	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	Az
DD	> 3,0	0,634 a	0,600 a	0,623 a	0,624 a
DD TMPyP	> 10,3	1,000 b	1,000 b	1,000 b	1,000 b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores na mesma coluna

Os resultados dos experimentos de detecção e quantificação de cárie artificial com o DIAGNOdent associado à outra porfirina, a PPIX estão apresentados a seguir. Na tabela 5.3 estão apresentados os valores de cálcio perdido pelas amostras durante a indução de cárie artificial e profundidade das lesões artificiais de cárie com diferentes tempos de desmineralização, bem como medidas do DIAGNOdent sem e com a PPIX em dentes hígidos e dentes com lesões artificiais de cárie formadas com 8, 12 e 16 dias. Nesse experimento, houve exclusão de três amostras pelos mesmos motivos descritos anteriormente (duas formadas em 12 dias e uma em 16 dias). Após o preparo das lâminas, mais uma lesão de 8 dias e duas de 16 dias foram perdidas. Podemos observar que houve um aumento estatisticamente significativo entre os valores de cálcio com o aumento do tempo de desmineralização, bem como da profundidade das lesões de cárie artificial, nas lesões formadas com 16 dias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medições com o DIAGNOdent sem o corante. Já com o aparelho associado

à PPIX, houve um aumento significativo nas medições das lesões de cárie de 8 e 12 dias comparadas às medições dos dentes hígidos, bem como um aumento na medição das lesões de 16 dias comparadas às demais avaliações.

Tabela 5.3 – Comparação entre os valores de profundidade das lesões, perda de cálcio (Ca), valores do aparelho DIAGNOdent (DD) sem o protoporfirina IX, e com a protoporfirina IX (DD PPIX) entre lesões com diferente tempo de indução de cárie artificial. Média $\pm$ DP (n)

Tempo de desmineralização	Profundidade (μm)	Perda de Ca (ppm/mm^2)	DD	DD PPIX
Dentes hígidos	—	—	$3,0 \pm 1,2$ (20) a	$6,6 \pm 2,0$ (20) a
8 dias	$95,4 \pm 32,6$ (14) a	$4,86 \pm 2,26$ (15) a	$3,4 \pm 0,6$ (15) a	$9,8 \pm 3,9$ (15) b
12 dias	$112,2 \pm 41,3$ (13) a	$10,99 \pm 5,12$ (13) b	$3,5 \pm 0,6$ (13) a	$11,9 \pm 2,8$ (13) b
16 dias	$157,2 \pm 37,9$ (12) b	$16,02 \pm 8,98$ (14) c	$3,7 \pm 0,9$ (14) a	$16,1 \pm 2,8$ (14) c
Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores da mesma coluna				

Foi observado um valor de coeficiente de correlação de Spearman baixo (embora significativo) entre as medidas realizadas com o DIAGNOdent sem o corante nas lesões formadas com diferentes tempos de desmineralização ($r_s = 0,330$, $p < 0,01$) (Figura 5.6). Já com o aparelho associado à PPIX, o coeficiente de correlação foi maior ($r_s = 0,801$, $p < 0,001$) (Figura 5.7).

Figura 5.6 – Relação entre as leituras realizadas com DIAGNOdent (DD) sem corante e as lesões formadas com diferentes tempos de desmineralização. R_s = coeficiente de correlação de Spearman

Figura 5.7 – Relação entre as leituras realizadas com DIAGNOdent associado à protoporfirina IX (DD PPIX) e as lesões formadas com diferentes tempos de desmineralização. R_s = coeficiente de correlação de Spearman

O gráfico de dispersão entre as medidas do DIAGNOdent sem o corante e com a PPIX e a quantidade de cálcio perdido nas amostras desmineralizadas artificialmente estão apresentados na figura 5.8. O coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de DIAGNOdent e a concentração de cálcio foi de 0,019 ($p \geq 0,05$), enquanto que o coeficiente de correlação entre as medidas do DIAGNOdent associado à PPIX foi de 0,643 ($p < 0,001$).

Figura 5.8 – Gráfico de dispersão entre os valores do DIAGNOdent sem o corante (DD) e os valores do DIAGNOdent com protoporfirina IX (DD PPIX) e a concentração de cálcio perdido por cada amostra durante a formação das lesões artificiais de cárie

O coeficiente de correlação de Pearson entre os valores do DIAGNOdent sem a porfirina e a profundidade das lesões artificiais de cárie avaliadas por microscopia de luz polarizada foi de 0,057, e não apresentou significância estatística. Já os valores do aparelho com a PPIX apresentaram um coeficiente de

correlação de Pearson com a profundidade das lesões de cárie de 0,697 ($p < 0,001$) (Figura 5.9).

Figura 5.9 - Gráfico de dispersão entre os valores do DIAGNOdent sem o corante (DD) e os valores do DIAGNOdent com protoporfirina IX (DD PPIX) e a profundidade das lesões artificiais de cárie

As curvas ROC que demonstram o desempenho dos métodos DIAGNOdent e DIAGNOdent associado à PPIX estão apresentados na figura 5.10. Através das curvas, podemos verificar uma melhor performance com o método associado à porfirina.

Figura 5.10 – Curvas ROC representando o desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent associado à protoporfirina IX (DD PPIX) na diferenciação entre dentes com lesões artificiais de cárie e dentes hígidos

Na tabela 5.4 estão representados os pontos de corte para diferenciação entre lesões de cárie artificial e dentes hígidos dos métodos com DIAGNOdent e DIAGNOdent com PPIX. Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia usando os pontos de corte indicados dos dois métodos, bem como os valores da área sob a curva ROC estão apresentados também na tabela. Os resultados obtidos com o corante foram significativamente superiores aos valores do DIAGNOdent sem a PPIX com relação à especificidade e área sob a curva ROC. O método com DIAGNOdent apresentou melhor sensibilidade do que com o corante (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Pontos de corte para diferenciação entre dentes com lesão de cárie artificial e dentes hígidos e desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent associado à protoporfirina IX (DD PPIX) na detecção de lesões artificiais de cárie expressos em sensibilidade, especificidade, acurácia e área sob a curva ROC (Az)

Métodos	Pontos de corte	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	Az
DD	> 2,7	0,976 a	0,350 a	0,774 a	0,707 a
DD PPIX	> 8,7	0,786 b	0,950 b	0,839 a	0,907 b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores na mesma coluna

5.2 Avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent para detecção precoce de lesões de cárie

Os valores de cálcio perdido em cada amostra durante a indução de cárie nos diferentes tempos de desmineralização (12, 24, 48 e 96 h), bem como os valores obtidos com o DIAGNOdent e com o DIAGNOdent associado à TMPyP nas lesões com esses tempos de formação e em dentes hígidos estão apresentados na tabela 5.5. Foi observado que houve um aumento estatisticamente significativo da concentração de cálcio nas amostras desmineralizadas por 48 h comparadas às amostras desmineralizadas por 12 h, e também um aumento da quantidade de cálcio das amostras com indução de cárie por um período de 96 h comparadas às demais lesões. Houve aumento significativo nas medições com DIAGNOdent das amostras de 48 h de desmineralização comparadas às amostras com outros tempos e com dentes hígidos, exceto em dentes com lesões de 96 h. Nas avaliações com

DIAGNOdent associado à TMPyP, houve aumento da medição nos dentes desmineralizados por 12, 24 e 48 h comparado aos dentes hígidos, e nas amostras de 96 h de desmineralização frente a todos os outros grupos (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Comparação entre os valores de perda de cálcio (Ca), valores do DIAGNOdent (DD) sem o corante, e com a tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) entre lesões com diferentes tempos de desmineralização. Média $\pm$ DP

Tempo de desmineralização	Número de amostras	Perda de Ca (ppm/mm ²)	DD	DD TMPyP
Dentes hígidos	20	—	3,3 $\pm$ 0,9 a	6,2 $\pm$ 2,0 a
12 h	10	0,49 $\pm$ 0,31 a	3,8 $\pm$ 1,1 a	13,0 $\pm$ 5,0 b
24 h	10	2,15 $\pm$ 1,03 a, b	4,1 $\pm$ 1,1 a	13,9 $\pm$ 2,3 b
48 h	10	3,66 $\pm$ 1,59 b	5,7 $\pm$ 1,8 b	13,5 $\pm$ 3,5 b
96 h	10	8,02 $\pm$ 2,33 c	4,8 $\pm$ 1,0 a, b	19,0 $\pm$ 5,5 c

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores da mesma coluna

Os coeficientes de correlação de Pearson entre as medições com o DIAGNOdent e com o DIAGNOdent associado à TMPyP e os valores de perda de cálcio das amostras desmineralizadas em diferentes tempos de desmineralização (calculadas separadamente para cada tempo) estão apresentados na tabela 5.6. Foi observado que houve correlação estatisticamente significativa entre as medições realizadas com DIAGNOdent associada à TMPyP e a perda de cálcio nas lesões formadas em 24, 48 e 96 h, sendo que com o aumento do tempo de desmineralização, o coeficiente de correlação aumentou. Já as medições apenas

com o DIAGNOdent não apresentaram correlação significativa em nenhum grupo (Tabela 5.6). Quando a análise foi realizada com todas as amostras, o coeficiente de correlação entre o DIAGNOdent e os valores de perda de cálcio foi de 0,310 ($p \geq 0,05$), enquanto que com o método associado à TMPyP, obteve-se coeficiente de correlação de 0,707 ($p < 0,001$).

Na mesma tabela, estão registrados os valores das áreas sob a curva ROC calculadas separadamente para lesões formadas em diferentes tempos, sempre utilizando as medidas sobre os dentes hígidos como referência para ausência de lesão (Tabela 5.6). Notamos um excelente desempenho do método associado ao corante na diferenciação de lesões precoces de cárie e dentes hígidos, com valores da área sob a curva ROC maiores que 0,90. No entanto, esses valores não foram estatisticamente maiores do que o método sem corante nas lesões desmineralizadas por 48 e 96 h (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Coeficientes de correlação de Pearson entre valores do DIAGNOdent (DD) sem o corante, e do DIAGNOdent com a tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) e quantidade de cálcio perdido e áreas sob a curva ROC (Az) nas medições realizadas em dentes com diferentes tempos de desmineralização e dentes hígidos

Tempo de desmineralização	Coeficientes de correlação		Área sob a curva ROC (Az)		Diferença entre Az
	DD	DD TMPyP	DD	DD TMPyP	
12 h	- 0,167 ns	0,237 ns	0,685	0,943	*
24 h	0,275 ns	0,735 *	0,728	0,990	*
48 h	0,173 ns	0,821 ***	0,883	0,985	ns
96 h	0,407 ns	0,896 ***	0,878	0,993	ns

ns = diferença estatisticamente não significativa ($p \geq 0,05$); * = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

A análise ROC dos métodos DIAGNOdent sem e com o corante TMPyP, considerando como dentes com lesão de cárie precoce, todas as amostras submetidas à desmineralização (indiferente do tempo de desmineralização), e como dentes sem lesões, as medições realizadas nos dentes hígidos estão representadas na figura 5.11. Observa-se na figura um desempenho excelente e muito superior do método do DIAGNOdent associado à TMPyP comparado ao método sem o corante.

Figura 5.11 – Curvas ROC representando o desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent associado à tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) na diferenciação entre dentes com lesões precoces de cárie e dentes hígidos

Valores de pontos de corte apropriados para diferenciação entre dentes com lesões precoce de cárie e dentes sadios, bem como valores relacionados ao desempenho dos métodos na detecção dessas lesões com os métodos DIAGNOdent e DIAGNOdent associado à TMPyP, expressos em sensibilidade, especificidade, acurácia e área sob a curva ROC, estão apresentados na Tabela 5.7. Para todos os parâmetros avaliados, exceto sensibilidade, o método associado ao corante apresentou melhores resultados (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 – Pontos de corte para diferenciação entre dentes com lesão precoce de cárie e dentes hígidos, e desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent associado à tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) na detecção de lesões artificiais de cárie expressos em sensibilidade, especificidade, acurácia e área sob a curva ROC (Az)

Métodos	Pontos de corte	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	Az
DD	> 3,0	0,875 a	0,600 a	0,783 a	0,793 a
DD TMPyP	> 9,3	0,950 a	0,850 b	0,917 b	0,978 b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores na mesma coluna

Com relação à utilização do método associado à PPIX, os resultados não foram adequados. Na tabela 5.8 estão expressos os valores de cálcio perdido pelas amostras nos diferentes tempos de desmineralização, os valores obtidos com as leituras com o DIAGNOdent sobre essas amostras e sobre dentes hígidos e os valores obtidos nas mesmas amostras com o DIAGNOdent associado à PPIX. Uma amostra com 48 h de formação foi excluída, porque os valores obtidos com DIAGNOdent foram extremamente altos (20,3). Observamos que houve uma maior saída de cálcio de amostras desmineralizadas durante 48 h comparadas às amostras desmineralizadas por 12 h, e nas amostras desmineralizadas por 96 h comparadas às demais. Com relação aos valores do DIAGNOdent, houve diferença nas medições realizadas nas amostras com desmineralização por 48 h comparadas às demais. Nas amostras submetidas à medição com o DIAGNOdent associado à PPIX, houve aumento da medição nas amostras com 96 h de desmineralização comparadas às leituras realizadas nos outros dentes, exceto os desmineralizados por 48 h (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 – Comparação entre os valores de perda de cálcio (Ca), valores do DIAGNOdent (DD) sem o corante, e com a protoporfirina IX (DD PPIX) entre lesões com diferentes tempos de desmineralização. Média $\pm$ DP

Tempo de desmineralização	Número de amostras	Perda de Ca (ppm/mm ²)	DD	DD PPIX
Dentes hígidos	20	—	3,1 $\pm$ 1,1 a	6,6 $\pm$ 2,1 a
12 h	10	0,74 $\pm$ 0,40 a	3,4 $\pm$ 0,8 a	6,1 $\pm$ 1,6 a
24 h	10	2,44 $\pm$ 1,37 a, b	3,5 $\pm$ 0,4 a	6,3 $\pm$ 2,5 a
48 h	09	4,03 $\pm$ 2,01 b	5,6 $\pm$ 0,8 b	6,8 $\pm$ 1,2 a, b
96 h	10	7,95 $\pm$ 4,01 c	3,9 $\pm$ 0,9 a	9,0 $\pm$ 2,9 b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores da mesma coluna

Na tabela 5.9 estão registrados os coeficientes de correlação de Pearson entre as leituras realizadas com o DIAGNOdent sem e com a PPIX e as concentrações de cálcio perdido pelas amostras, calculados separadamente para amostras com diferentes tempos de desmineralização. Não houve correlação estatisticamente significativa com nenhum dos métodos utilizados, em nenhum tempo de desmineralização. Quando as amostras foram analisadas em conjunto, o método com o DIAGNOdent sem o corante apresentou um coeficiente de correlação de Pearson entre os valores do aparelho e a perda de cálcio de 0,091 ($p \geq 0,05$). Já com a PPIX, apesar das análises separadas não apresentarem correlação significativa, quando as amostras foram analisadas em conjunto, houve correlação estatisticamente significativa ($R=0,597$, $p < 0,001$). Na mesma tabela estão apresentados os valores das áreas sob a curva ROC dos métodos utilizados para detecção precoce, calculados separadamente para cada grupo de amostras.

Medições em dentes hígidos foram utilizados para análise. O desempenho do método sem o corante foi melhor do que com a PPIX, mas só houve diferença significativa nas amostras de 48 h de desmineralização (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 – Coeficientes de correlação de Pearson entre valores do DIAGNOdent (DD) sem o corante, e do DIAGNOdent com a protoporfirina IX (DD PPIX) e quantidade de cálcio perdido, e áreas sob a curva ROC (Az) nas medições realizadas em dentes com diferentes tempos de desmineralização e dentes hígidos

Tempo de desmineralização	Coeficientes de correlação		Área sob a curva ROC (Az)		Diferença entre Az
	DD	DD PPIX	DD	DD PPIX	
12 h	0,258 ns	0,287 ns	0,673	0,570	ns
24 h	- 0,240 ns	0,316 ns	0,743	0,570	ns
48 h	0,223 ns	0,488 ns	0,953	0,503	***
96 h	- 0,493 ns	0,507 ns	0,790	0,750	ns
ns = diferença estatisticamente não significativa; * = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$					

A análise ROC dos métodos DIAGNOdent sem e com o corante PPIX, considerando como dentes com lesão de cárie precoce, todas as amostras submetidas à desmineralização, e as medições realizadas nos dentes hígidos estão representadas na figura 5.12. Observa-se na figura um desempenho melhor do método do DIAGNOdent comparado ao método com o aparelho associado à PPIX.

Figura 5.12 – Curvas ROC representando o desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent associado à protoporfirina IX (DD PPIX) na diferenciação entre dentes com lesões precoces de cárie e dentes hígidos

Os valores de ponto de corte utilizados na detecção de lesões precoce de cárie e sensibilidade, especificidade e acurácia calculadas com esses pontos de corte, bem como valores das áreas sob a curva ROC dos métodos DIAGNOdent e DIAGNOdent com PPIX estão apresentados na tabela 5.10. Os resultados demonstraram uma melhor efetividade do método usando o DIAGNOdent sem o corante, comparando ao método com corante em todos os parâmetros, exceto na especificidade (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 – Pontos de corte para diferenciação entre dentes com lesão precoce de cárie e dentes hígidos e desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent associado à protoporfirina IX (DD PPIX) na detecção de lesões artificiais de cárie expressos em sensibilidade, especificidade, acurácia e área sob a curva ROC (Az)

Métodos	Pontos de corte	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	Az
DD	> 3,0	0,769 a	0,750 a	0,763 a	0,785 a
DD PPIX	> 8,7	0,179 b	0,950 a	0,441 b	0,528 b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores na mesma coluna

5.3 Avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent para detecção de lesões naturais de cárie oclusal

Para a avaliação dos métodos na detecção de lesões oclusais, foram considerados dois limiares: lesões iniciais de cárie em esmalte (D1) e lesões em dentina (D3). As curvas ROC relativas ao desempenho dos métodos com DIAGNOdent associados ou não à TMPyP para detecção de lesões em esmalte e para detecção de lesões em dentina, estão apresentados respectivamente nas figuras 5.13 e 5.14. Observamos que não houve diferenças no desempenho de ambos os métodos, em ambos limiares de detecção.

Figura 5.13 – Curvas ROC do desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent com tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) na detecção de lesões oclusais de cárie iniciais em esmalte

Figura 5.14 – Curvas ROC do desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent com tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) na detecção de lesões oclusais de cárie em dentina

Os valores de ponto de corte obtidos com análise ROC para detecção de lesões de cárie nos limiares D1 e D3, assim como os valores associados ao desempenho dos métodos DIAGNOdent e DIAGNOdent com TMPyP, expressos em sensibilidade, especificidade, acurácia e área sob a curva ROC nesses dois limiares, estão descritos na tabela 5.11. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros avaliados entre os dois métodos, em ambos os limiares de detecção (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 – Pontos de corte e desempenho do DIAGNOdent (DD) e do DIAGNOdent associado à tetrakis (N-metilpiridil) porfirina (DD TMPyP) expressos em sensibilidade, especificidade, acurácia e área sob a curva ROC (Az) na detecção de lesões oclusais de cárie, iniciais em esmalte (D1) e em dentina (D3), em dentes decíduos

Métodos de Detecção	Pontos de Corte		Sensibilidade		Especificidade		Acurácia		Az	
	D1	D3	D1	D3	D1	D3	D1	D3	D1	D3
DD	> 7	> 13	0,500 a	0,727 a	0,864 a	0,911 a	0,643 a	0,875 a	0,680 a	0,909 a
DD TMPyP	> 13	> 17	0,588 a	0,909 a	0,727 a	0,867 a	0,643 a	0,875 a	0,678 a	0,901 a
Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre valores na mesma coluna										

O desempenho dos métodos com o aparelho DIAGNOdent e do DIAGNOdent associado à PPIX na detecção de lesões de cárie oclusais de cárie iniciais em esmalte e em lesões em dentina estão representados graficamente nas curvas ROC apresentadas respectivamente nas figuras 5.15 e 5.16. Não se observa

diferença significativa entre os dois métodos na detecção de cárie em esmalte ou em dentina.

Figura 5.15 – Curvas ROC do desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent com protoporfirina IX (DD PPIX) na detecção de lesões oclusais de cárie iniciais em esmalte

Figura 5.16 – Curvas ROC do desempenho dos métodos DIAGNOdent (DD) e DIAGNOdent com protoporfirina IX (DD PPIX) na detecção de lesões oclusais de cárie em dentina

6 DISCUSSÃO

Apesar de bastante utilizado em diversos países (PITTS, 1993), e de apresentar qualidades compatíveis com a situação atual de baixa prevalência de cárie, como por exemplo, uma alta especificidade, a inspeção visual apresenta alguns problemas, como baixa sensibilidade e reprodutibilidade (BADER; SHUGARS, 2004; BENGTSON et al., 2005; COSTA et al., 2002; LUSSI et al., 2001; MENDES et al., 2005a). Quando o método é realizado em superfícies limpas e iluminadas, e a secagem do sítio examinado é feita, é possível realizar uma detecção relativamente precoce do processo carioso (EKSTRAND, 2004; EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 1997; EKSTRAND et al., 1998; KIDD; FEJERSKOV, 2004; NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999). No entanto, o método visual é subjetivo. Dessa forma, alterações minerais entre dois exames realizados em épocas diferentes são detectadas somente após um grande avanço da lesão, e isso muitas vezes só ocorre depois de um tempo relativamente longo (ANGMAR-MANSSON; TEN BOSCH, 1993).

A busca por métodos quantitativos e reprodutíveis para detecção de cárie, que possibilitem detectar pequenas alterações minerais de forma mais precisa e em um curto espaço de tempo, é crescente na Odontologia (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1996; ANGMAR-MANSSON; TEN BOSCH, 1993; NYVAD, 2004; TAM; MCCOMB, 2001). Existem dois métodos quantitativos baseados na captação da fluorescência. Um trabalha com excitação do dente com luz de comprimento de onda por volta de 488 nm, e capta a fluorescência intrínseca do tecido mineral do esmalte e o outro é baseado na indução da fluorescência com

laser diodo, de comprimento de onda de 655 nm (DIAGNOdent). Foi observado que, ao contrário do QLF, o DIAGNOdent capta a fluorescência extrínseca do tecido cariado, proveniente de bactérias e metabólitos bacterianos presentes nas lesões de cárie (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; KONIG; FLEMMING; HIBST, 1998; KONIG; SCHNECKENBURGER; HIBST, 1999; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004). Portanto, o aumento da fluorescência com a utilização do aparelho com laser diodo, que ocorre com o processo de cárie, provavelmente se deve mais às alterações orgânicas do que pela desintegração mineral (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004; MENDES; NICOLAU; DUARTE, 2003; MENDES; PINHEIRO; BENGTSON, 2004; SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a, 2001b).

Diante dessas características do aparelho, o método com o DIAGNOdent tem apresentado resultados insatisfatórios na detecção de lesões incipientes e na quantificação de lesões de superfície lisa (ALJEHANI et al., 2004; MENDES et al., 2005b; SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a, 2001b). O presente estudo foi realizado para tentar aliar as vantagens do aparelho, como o fato de ser portátil, quantitativo, não destrutivo, ter uma facilidade de uso e um custo relativamente acessível, a uma melhora no desempenho de lesões iniciais de cárie.

Como, pelas características do aparelho, isso não seria possível, foi proposta a utilização de dois corantes fluorescentes para tentar atingir essa finalidade. Os corantes apresentam uma emissão de fluorescência na faixa em que trabalha o DIAGNOdent. Esses corantes penetrariam na porosidade causada pela desmineralização, e dessa forma, o DIAGNOdent poderia quantificar essa penetração. Conseqüentemente, quantificaria melhor as lesões incipientes.

Os corantes foram selecionados com base nas propriedades das substâncias. Como estudos prévios têm indicado que as moléculas responsáveis

pelo aumento da fluorescência no tecido cariado provavelmente são porfirinas produzidas pelas bactérias da cavidade bucal (BUCHALLA, 2005; HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; KONIG; FLEMMING; HIBST, 1998; KONIG; SCHNECKENBURGER; HIBST, 1999; KONIG et al., 2000; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004), foram selecionadas duas porfirinas para o estudo.

A PPIX é uma porfirina natural aniônica, com propriedades lipofílicas, precursora da molécula de hemoglobina. Além disso, a PPIX é produzida por algumas bactérias, sendo que algumas podem estar relacionadas às lesões de cárie (KONIG et al., 2000). Estudos para avaliar se o DIAGNOdent apresentava uma medição da PPIX, e em qual concentração isso ocorria, foram realizados, utilizando a ponta B do aparelho e cubetas de quartzo. Inicialmente, foi observado que as leituras eram relativamente baixas em soluções com concentrações altas de PPIX. Foi observado também que o corante não se dissolvia adequadamente em água. Assim, testamos a dissolução da PPIX em DMSO e água, em várias proporções. A melhor proporção dos dois solventes, obtidas no nosso estudo, foi de DMSO e água em quantidades iguais. Com isso, foi verificado que a melhor concentração para a PPIX ser utilizada foi de 4 mM. Um estudo prévio utilizando a PPIX, observou também uma relação de linearidade entre os valores do DIAGNOdent e a concentração de PPIX (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001). No entanto, nesse estudo, os autores demonstraram uma leitura com o aparelho em concentrações na faixa de 2 a 25 μ M, muito menores do que as concentrações utilizadas no presente estudo. Essas diferenças poderiam ser explicadas pelo tipo de sal utilizado, pelos solventes ou pelo método de medição com o DIAGNOdent. Nesse estudo, essas possíveis variáveis não são explicadas (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001), dificultando, portanto, a comparação com nossos resultados.

Outro corante utilizado no presente estudo foi a TMPyP. Essa é uma porfirina sintética catiônica, hidrofílica, que tem sido utilizada para terapia fotodinâmica contra células tumorais ou vírus, pois apresenta ligação ao DNA das células. Após a incorporação pelas células, essas seriam sensibilizadas e inativadas com luz de comprimento de onda na faixa do vermelho (BORISSEVITCH; GANDINI, 1998; VERGELDT et al., 1995; ZUPAN et al., 2004). A utilização da TMPyP em diferentes concentrações, avaliadas pelo DIAGNOdent em cubetas de quartzo, mostrou também uma relação de linearidade. As concentrações utilizadas foram menores, de 0,01 a 0,2 mM, sendo que após a avaliação em lesões de cárie, a concentração de 0,2 mM foi escolhida. Para minimizar possíveis variações entre os dois corantes, a TMPyP foi também testada com o DMSO como solvente, mas os resultados foram melhores quando o corante era dissolvido somente em água. A natureza hidrofílica da TMPyP pode explicar esses resultados.

A irregularidade na distribuição de cargas na superfície dos cristais de hidroxiapatita que formam o esmalte explica a escolha de duas porfirinas com propriedades químicas diferentes. Apesar da maior quantidade de cargas positivas, devido a maior predominância de íons cálcio na camada de hidratação que permanece ligada aos cristais de hidroxiapatita, há regiões que apresentam carga negativa, em virtude da presença de grupamentos fosfato e de outros ânions em menor quantidade, como por exemplo, o cloro (NAUNTOFTE; TENOVUO; LAGERLOF, 2005). Dessa forma, pareceu interessante testar porfirinas com cargas diferentes. Além disso, apesar da carga positiva que poderia dificultar a interação com o esmalte dentário, a TMPyP é bastante hidrofílica e possui grande afinidade por superfícies (VERGELDT et al., 1995), o que poderia ajudar nessa interação.

No presente estudo, optamos por trabalhar com os dois corantes em amostras separadas, para que não houvesse influência de um corante sobre o outro nos resultados obtidos. Dessa forma, mesmo as medições com o DIAGNOdent sem os corantes foram avaliados de forma separada. No experimento com lesões de cárie artificial, foram observados aumento da perda de cálcio e da profundidade das lesões de cárie com o aumento do tempo de formação das lesões de cárie artificial. As medições realizadas com o DIAGNOdent associadas aos dois corantes demonstraram também essa tendência, ao passo que as leituras realizadas com o aparelho sem os corantes não demonstraram isso. A utilização de vários períodos de formação de lesão permitiu a obtenção de lesões de tamanhos variados. Outros estudos utilizaram lesões artificiais com períodos diferentes de formação (AL-KHATEEB et al., 1997b; ANDO et al., 1997, 2001; HALL et al., 1997; PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002; PRETTY et al., 2003a, 2003b), sendo que em alguns deles, o método QLF conseguiu diferenciar as lesões formadas em diferentes tempos (ANDO et al., 1997, 2001; HALL et al., 1997; PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002). Já o método que associava o uso de um corante ao QLF obteve essa diferenciação em lesões radiculares de cárie (PRETTY et al., 2003a), mas não em lesões de esmalte (ANDO et al., 1997). Os resultados do presente estudo demonstraram que houve uma forte correlação dos valores do DIAGNOdent com o tempo de formação das lesões, quando o método foi associado aos corantes.

O DIAGNOdent tem apresentado um desempenho fraco na quantificação das lesões sem cavidade de cárie dentária em superfícies lisas. Isso se deve ao fato do aparelho medir principalmente alterações orgânicas nas lesões de cárie. Quando a lesão é inicial, essa alteração orgânica é pequena (LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004), e por isso, os resultados na quantificação dessas lesões são apenas

razoáveis, tanto em estudos *in vitro* (ALJEHANI et al., 2004; MENDES et al., 2005b; SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a, 2001b), como em estudos *in vivo* (TRANAEUS et al., 2004). Um dos intuitos do nosso estudo foi avaliar se o método com os corantes poderia melhorar essa quantificação. Os resultados mostraram que os métodos com os dois corantes possibilitaram uma quantificação das lesões evidentemente melhor, comparada à quantificação obtida com o uso do DIAGNOdent sem os corantes.

A correlação obtida com a perda mineral utilizando o método do DIAGNOdent associado à TMPyP não foi forte, embora tenha sido significativa. Já a correlação com a profundidade das lesões foi maior. Estudos anteriores utilizando o DIAGNOdent isoladamente também observaram melhor correlação com a profundidade das lesões do que com a perda mineral (ALJEHANI et al., 2004; MENDES et al., 2005b; SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a, 2001b). Isso provavelmente aconteceu porque o método mede alterações da fluorescência relacionadas a alterações extrínsecas, como por exemplo, a presença de metabólitos bacterianos. No caso da utilização do corante, essa também pode ser a explicação para o melhor resultado obtido com relação à profundidade do que com a perda mineral. Os resultados obtidos com a utilização da PPIX também seguiram esse padrão.

Outros trabalhos que avaliaram o desempenho do QLF na quantificação de lesões de superfície lisa obtiveram resultados variados. Enquanto alguns estudos em lesões artificiais de dentes permanentes e decíduos apresentaram maiores valores de correlação entre a perda da fluorescência avaliada com os métodos QLF usando luz ou laser com a perda mineral das lesões do que com a profundidade (ANDO et al., 1997, 2001; HALL et al., 1997), outros autores observaram em lesões

naturais de superfície lisa em dentes permanentes que os dois métodos QLF apresentaram melhor correlação com a profundidade das lesões do que com a perda mineral (SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a). Como o QLF avalia a fluorescência intrínseca do mineral do dente, parece compreensível o fato do aparelho apresentar melhor correlação com a perda mineral. Num estudo que utilizou corante associado ao QLF na detecção de lesões artificiais em esmalte, os autores não observaram correlação significativa com a perda mineral e a profundidade das lesões usando esse método (ANDO et al., 1997).

Os resultados obtidos na quantificação da perda mineral e profundidade das lesões artificiais usando o DIAGNOdent associado ao corante PPIX apresentaram maiores valores de correlação do que com a TMPyP, tanto com a perda mineral, como com a profundidade. Isso pode ser explicado pela natureza aniônica da PPIX (FUKUDA; CASAS; BATLLE, 2005; KONIG et al., 2000). Visto que o esmalte, em condições normais, apresenta predominância de carga positiva (NAUNTOFTE; TENOVUO; LAGERLOF, 2005), uma melhor interação da PPIX com o esmalte desmineralizado poderia ser esperada.

Com relação a outros estudos, os valores de correlação são compatíveis aos obtidos por outros métodos. Estudos que utilizaram corantes encontraram um coeficiente de correlação por volta de 0,85, usando o Fluorol 7GA em lesões artificiais em esmalte (VAN DE RIJKE; TEN BOSCH, 1990), ou a fluoresceína associada ao QLF em lesões artificiais em dentina radicular (PRETTY et al., 2003a). Pesquisas realizadas com o método QLF apresentaram resultados muito similares com os nossos, com valores de correlação em média entre 0,70 e 0,80 (ALJEHANI et al., 2004; AL-KHATEEB et al., 1997a; ANDO et al., 1997, 2001; HALL et al., 1997; SHI; TRANAEUS; ANGMAR-MANSSON, 2001a), mostrando que o método proposto

poderia ser utilizado para quantificação de lesões de cárie de superfície lisa. No entanto, estudos futuros realizando a comparação do método do DIAGNOdent com os corantes com o método QLF, realizado sob as mesmas condições e na mesma amostra, poderão avaliar de forma mais precisa a capacidade de quantificação das lesões de cárie por meio dos dois métodos.

Com relação ao desempenho dos métodos na detecção da presença de lesões de cárie, os resultados indicaram também uma superioridade significativa do DIAGNOdent associado aos corantes, comparados ao método utilizado sem os corantes. Nessa avaliação, o DIAGNOdent associado à TMPyP apresentou um desempenho excelente, com total discriminação entre lesões de cárie e dentes hígidos na nossa amostra. Com a PPIX, o desempenho também foi adequado e muito superior ao DIAGNOdent utilizado sem o corante. No entanto, os valores da performance com a PPIX foram numericamente inferiores aos obtidos com a TMPyP.

Esses resultados aparentemente contrariam os resultados obtidos na quantificação da lesão. Entretanto, isso é facilmente explicado. Como observamos nos resultados da regressão linear dos valores do DIAGNOdent em diferentes concentrações dos dois corantes (ver Material e métodos, seção 4.2.1), os valores obtidos com a TMPyP foram maiores do que os obtidos com a PPIX, mesmo em concentrações menores. Além disso, a TMPyP apresenta uma grande afinidade por superfícies e uma característica hidrofílica (VERGELDT et al., 1995), diferente da PPIX. O desempenho na detecção das lesões não está necessariamente ligado ao desempenho na quantificação. Enquanto para quantificação, seria necessária uma melhor penetração do corante na porosidade presente na região desmineralizada, para detecção da lesão, uma interação do corante com a superfície mais rugosa da lesão pode ser suficiente. Dessa forma, é compreensível que o DIAGNOdent

associado à TMPyP tenha resultado em melhor desempenho na detecção das lesões artificiais de cárie.

Com a utilização do DIAGNOdent associado à TMPyP, usando um ponto de corte de 10,3, obteve-se valores, de sensibilidade, especificidade e acurácia significativamente maiores do que com o DIAGNOdent utilizado isoladamente. Com relação à PPIX, o ponto de corte foi de 8,7, e o valor de especificidade foi significativamente maior, enquanto que o de sensibilidade usando o DIAGNOdent sozinho foi maior do que com o corante. O desempenho geral entre os dois métodos foi semelhante quando consideramos a acurácia, mas foi significativamente maior com a PPIX quando observamos o valor da área sob a curva ROC.

Outros estudos avaliaram a performance na detecção de lesões de cárie usando corantes. Quando o método QLF foi associado à fluoresceína, o desempenho avaliado através de curva ROC na detecção de lesões precoces artificiais foi de 0,999 (ANDO et al., 1997), semelhante ao obtido no nosso estudo, principalmente com a TMPyP. Nesse estudo, o método QLF sem o corante apresentou um desempenho menor (0,954). Já na detecção de lesões interproximais, o uso de corante associado ao QLF apresentou valores de sensibilidade e especificidade semelhantes ao exame visual, e um pouco superiores ao método sem o corante (EGGERTSSON et al., 1999).

O método de lesões artificiais de cárie é bastante utilizado em diversos estudos, e tem se mostrado adequado para simular as lesões de cárie em esmalte na maioria das pesquisas (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986). No entanto, algumas diferenças devem ser salientadas. Apesar de ocorrer a formação de uma camada superficial, com aparência óptica semelhante ao esmalte hígido, e uma lesão de cárie subsuperficial, o conteúdo mineral da superfície de lesões artificiais é

menor do que a de lesões naturais (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986). Isso é explicado principalmente pela velocidade de formação. Enquanto que as lesões artificiais são formadas muito rapidamente, as lesões naturais podem apresentar um período de formação bastante longo. As lesões artificiais simulariam melhor lesões ativas e com progressão rápida (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986).

Diante dessas características, a utilização de lesões artificiais poderia facilitar a penetração do corante. Além disso, o uso do DIAGNOdent não tem apresentado resultados adequados em lesões de cárie artificial (HIBST; PAULUS; LUSSI, 2001; MENDES; NICOLAU, 2004). No entanto, a utilização de lesões de cárie artificial possibilita um melhor controle dos experimentos e uma melhor quantificação da perda mineral das lesões, e por isso, o modelo pareceu mais adequado para testarmos o novo método proposto. De fato, muitos estudos anteriores que investigaram métodos de detecção utilizaram lesões de cárie artificial (AL-KHATEEB et al., 1997b; ANDO et al., 1997, 2001; BJELKHAGEN et al., 1982; EGGERTSSON et al., 1999; FERREIRA ZANDONÁ et al., 1998b; HALL et al., 1997; MENDES; NICOLAU, 2004; PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002; PRETTY et al., 2003a; RAWLS; OWEN, 1978; VAN DE RIJKE; POS; TEN BOSCH, 1990; VAN DE RIJKE; TEN BOSCH, 1990; VAN DER VEEN; TEN BOSCH, 1993; VAN DER VEEN et al., 1996). Isso, no entanto, não exclui a necessidade de estudos futuros para avaliar o desempenho do DIAGNOdent associado aos corantes na detecção e quantificação de lesões naturais de cárie.

Um estudo anterior utilizando o DIAGNOdent com lesões artificiais apresentou melhor desempenho na detecção e quantificação das lesões (MENDES; NICOLAU, 2004) do que os obtidos no presente estudo com o método sem os corantes. O método de formação das lesões artificiais de cárie pode explicar essas

diferenças, uma vez que no estudo anterior, um método de ciclagem de pH foi utilizado, ao passo que no presente estudo, apenas foi realizada desmineralização contínua. O método de ciclagem de pH simula melhor as condições de formação das lesões em esmalte (TEN CATE; DUIJSTERS, 1982). Outro fator importante é o tamanho das lesões. Enquanto que nesse estudo, a profundidade das lesões variou de 100 a 150 μm , no estudo anterior, a maioria das lesões de cárie não eram mais profundas do que 50 μm . Para reforçar esse achado, nossos resultados no experimento de detecção precoce, em que as lesões foram formadas com menos tempo, o desempenho do DIAGNOdent foi melhor do que com as lesões de cárie artificial formadas por mais tempo.

Outras possíveis explicações são que no estudo anterior com lesões artificiais (MENDES; NICOLAU, 2004), todas as lesões foram criadas da mesma forma, diferente do presente estudo em que as lesões foram formadas com tempos diferentes. Além disso, as comparações no estudo anterior foram realizadas entre medições nas mesmas amostras (antes e depois da formação das lesões). Já no presente estudo, foram utilizadas medidas realizadas em amostras diferentes.

Frente aos nossos resultados, podemos observar que o DIAGNOdent associado à PPIX apresentou melhores resultados na quantificação das lesões, tanto com relação à perda de cálcio, como com relação à profundidade das lesões. Já o método com a TMPyP obteve um melhor desempenho na detecção das amostras. Ambos os métodos foram melhores do que o DIAGNOdent utilizado isoladamente. Isso pode levar a indicação dos diferentes métodos para diferentes propósitos. Quando se deseja um melhor índice de detecção, a TMPyP pode ser mais apropriada, ao passo que quando o interesse for monitorar as alterações

minerais das lesões de cárie, a utilização do DIAGNOdent associado à PPIX pode ser mais indicada. Mais estudos são necessários para aperfeiçoar os métodos.

A despeito da boa performance na detecção de lesões de cárie dentária em superfície lisa, outra possível utilidade dos métodos propostos seria na detecção precoce da desmineralização provocada pela cárie dentária. Dos métodos atuais, o exame visual, quando realizado sob iluminação e em dentes limpos, e utilizando a secagem prolongada do dente, permite uma detecção da lesão antes dela formar cavidade ou atingir dentina, proporcionando a utilização de tratamentos que visam a paralisação da lesão sem a necessidade de intervenção operatória (EKSTRAND, 2004; EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 1997; EKSTRAND et al., 1998; KIDD; FEJERSKOV, 2004; NYVAD, 2004; NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999). No entanto, como já foi salientado, o método é subjetivo e só consegue detectar lesões com um certo grau de perda mineral. O método QLF tem proporcionado uma detecção relativamente precoce das lesões (ANDO et al., 1997; HALL et al., 1997; PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002), mas as dificuldades de utilização na prática clínica e o custo elevado limitam muito a sua utilização para esse propósito (TAM; MCCOMB, 2001). Portanto, novos métodos quantitativos devem ser estudados para realização da detecção precoce das lesões cariosas.

Para estudar o desempenho dos métodos na detecção precoce, a desmineralização foi induzida por períodos menores do que o usual. Estudos com lesões artificiais geralmente usam diferentes períodos, que podem variar de 4 dias a 4 semanas (AL-KHATEEB et al., 1997b, 2002; EGGERTSSON et al., 1999; MENDES; NICOLAU, 2004; TEN CATE; DUIJSTERS, 1982; VAN DE RIJKE; POS; TEN BOSCH, 1990; VAN DE RIJKE; TEN BOSCH, 1990). Estudos que visam uma utilização de lesões menores, objetivando detecção precoce têm utilizado tempos de

2 a 144 h de formação de lesão. No presente estudo, foram utilizados tempos de desmineralização de 12, 24, 48 e 96 h. As lesões obtidas com 12 e 24 h não apresentavam alterações clinicamente detectáveis. Já com 48 h, uma parte das amostras apresentava alterações visíveis, e quase todos os dentes desmineralizados por 96 h apresentavam alterações detectadas visualmente. No entanto, consideramos as lesões artificiais nesse experimento como incipientes. Além disso, as comparações entre os métodos são válidas, pois a padronização foi utilizada para todas as avaliações, sem e com os corantes. Um estudo anterior realizou avaliações com um corante fluorescente em dentes clinicamente hígidos, e posteriormente realizou microdureza, mostrando que dentes clinicamente hígidos que apresentaram maior incorporação do corante, apresentavam menor microdureza comparados àqueles que não incorporaram o corante (RAWLS; OWEN, 1978). Futuros estudos para avaliar os métodos com o DIAGNOdent associado aos corantes usando uma metodologia semelhante à descrita (RAWLS; OWEN, 1978) são desejáveis.

Nossos resultados mostraram uma detecção efetiva com o método DIAGNOdent associado à TMPyP, mesmo em lesões formadas com apenas 12 h de desmineralização. Com todos os tempos de desmineralização, os valores da área sob a curva ROC foram maiores de 0,90, indicando um excelente desempenho do método. Áreas sob a curva ROC próximas a 1,00 indicam que o método testado possui um excelente desempenho na detecção da doença (HANLEY; MCNEIL, 1983; OAKLEY; BRUNETTE, 2002; PRETTY; MAUPOME, 2004b). No entanto, apenas em lesões formadas por 12 e 24 h, houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de área sob a curva ROC obtidas com a TMPyP e sem o corante.

Os valores de correlação das medidas com o DIAGNOdent sem e com os corantes e a perda mineral foram também avaliados separadamente. O método utilizando TMPyP mostrou valores de correlação excelentes e significantes com a perda mineral das lesões formadas por 24, 48 e 96 h. Essa correlação não foi significativa nas lesões de 12 h. Utilizando o DIAGNOdent sem os corantes, em nenhum grupo de lesões houve correlação estatisticamente significativa entre os valores do aparelho e a perda de cálcio das lesões.

Tanto para as análises ROC, como para os coeficientes de correlação, os valores foram mais significantes conforme havia aumento do tempo de desmineralização. O desempenho do DIAGNOdent em lesões naturais tem sido melhor também em lesões mais avançadas (MENDES et al., 2005b), apesar de alguns autores relatarem que o aparelho é adequado para detecção precoce (LUSSI et al., 1999). De fato, como observado em estudos anteriores (BENGTSON et al., 2005; LUSI et al., 2001; MENDES et al., 2005a, 2005b; ROCHA et al., 2003) e no presente estudo, o DIAGNOdent não tem se apresentado como boa alternativa para detecção de lesões incipientes. A associação do DIAGNOdent com a TMPyP poderia melhorar o desempenho do aparelho nesse aspecto.

As análises foram realizadas separadamente com amostras em diferentes tempos de desmineralização para avaliar quão precocemente os métodos conseguiriam detectar a desmineralização. Quando as amostras foram analisadas em conjunto (independente do tempo de formação), o DIAGNOdent utilizado sem o corante não teve correlação significativa com a perda mineral, enquanto que o método associado à TMPyP apresentou correlação adequada e significativa (0,707). A área sob a curva ROC calculada com todas as amostras foi alta usando o DIAGNOdent associado à TMPyP na detecção de desmineralização (0,978), e foi

significativamente maior do que com o método sem o corante. O método com a TMPyP apresentou valores significativamente maiores de especificidade e acurácia que o método sem a porfirina catiônica.

Outros estudos propuseram métodos para detecção precoce de lesões em esmalte. O método QLF com laser de argônio mostrou correlação significativa com a profundidade e perda mineral de lesões artificiais formadas entre 2 e 24 h (HALL et al., 1997). Outro estudo investigou a capacidade de detecção precoce do método QLF associado ou não a um corante fluorescente. Apesar do método com o corante conseguir detectar lesões de cárie formadas em 2 h, não apresentou correlação significativa com a perda mineral das lesões. Já o método QLF, foi capaz de detectar lesões com 8 h, mas apresentou melhor correlação com a perda mineral. O desempenho do método com o corante na detecção foi mais efetivo (área sob a curva ROC de 0,999), apesar do QLF sem o corante apresentar boa performance (0,954) (ANDO et al., 1997). No presente estudo, o método com a TMPyP apresentou bom desempenho na detecção de lesões de cárie, bem como uma boa correlação com a perda mineral das lesões.

A comparação entre os estudos, no entanto é complicada. O método utilizado para formação das lesões apresenta diferenças significativas. Enquanto o estudo anterior utilizou dentes bovinos com a superfície polida, e as lesões foram formadas em uma solução de carbopol e ácido láctico com pH 5,0 a 37 °C (ANDO et al., 1997), no presente estudo foi utilizado dentes decíduos com a superfície hígida, em uma solução de cálcio, fosfato e ácido acético, com pH 4,8 a temperatura ambiente. A comparação pela perda mineral das amostras também não pode ser feita, já que os autores utilizaram microrradiografia transversa e microscópio

confocal (ANDO et al., 1997), e o nosso trabalho, análise química. Dessa forma, os parâmetros para indicar a perda mineral foram diferentes.

Uma outra pesquisa prévia, realizada em dentes decíduos, observou que o método QLF foi capaz de detectar 60 % da amostra desmineralizada por 24 h e 100 % dos dentes desmineralizados por 48 h. Por outro lado, desmineralização foi notada visualmente apenas em alguns dentes após 144 h de desafio cariogênico. Esse estudo, no entanto, não apresentou valores de desempenho ou correlação, uma vez que não realizou nenhum tipo de validação da amostra (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002). A comparação com o nosso estudo, nesse caso, pode ser realizada mais facilmente. Os autores utilizaram dentes decíduos e realizaram a desmineralização com uma solução semelhante a utilizada na nossa pesquisa, só que com um pH 4,5, sob agitação e a 37 °C (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002). O valor mais baixo de pH, a agitação e a temperatura maior faz com que a velocidade da desmineralização seja maior (DE GROOT; BORGGREVEN; DRIESSENS, 1986). Dessa forma, como conseguimos detectar lesões formadas em 12 h, usando o DIAGNOdent associado a TMPyP, pressupõe-se que o método proposto seja capaz de realizar detecção do processo carioso mais precocemente do que o QLF. Entretanto, estudos utilizando os dois métodos nas mesmas amostras são necessários para comprovar essa afirmação.

Nesse experimento, o método que associa o aparelho com laser diodo e a PPIX não apresentou resultados satisfatórios. Nas análises realizadas com amostras separadas por tempo de desmineralização, em nenhum grupo se observou correlação significativa. Da mesma forma, o desempenho de detecção das lesões não foi adequado, apresentando valores de área sob a curva próximos a 0,50. Quando as amostras foram analisadas em conjunto, o desempenho do método com

a PPIX foi pior do que com o DIAGNOdent sem o corante em todos os parâmetros, exceto especificidade, onde não houve diferença significativa. No entanto, quando as amostras foram agrupadas, o método com a PPIX apresentou correlação significativa, enquanto que o DIAGNOdent utilizado isoladamente não apresentou correlação.

Essas diferenças obtidas com os diferentes corantes nesse experimento podem ser explicadas novamente pelas características das duas substâncias. As lesões de cárie em esmalte iniciam a sua formação nos espaços intercristalinos. Assim, a dissolução ocorre inicialmente na periferia dos cristais, fazendo com que ocorra diminuição do tamanho dos cristais e aumento dos espaços intercristalinos, ocorrendo conseqüentemente, um aumento das vias de difusão dos ácidos formados pelos microrganismos. Isso tudo ocorre inicialmente na superfície. Com o avanço da perda mineral, parte do mineral que sai para o meio (quando o pH é menor do que o pH crítico), e parte do mineral que retorna ao dente (após subida desse pH), se depositam na superfície, formando a lesão subsuperficial de cárie. Portanto, a camada superficial relativamente bem mineralizada somente se forma após algum tempo de progressão da lesão (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986). Assim, lesões com pouco tempo de desmineralização, como as formadas nesse experimento, apresentam uma dissolução preferencial na superfície. A alta afinidade da TMPyP à superfícies (VERGELDT et al., 1995) pode explicar o melhor desempenho do método comparado à PPIX. Dessa forma, o método do DIAGNOdent associado à TMPyP parece proporcionar uma detecção precoce do processo carioso.

Alguns autores afirmam que métodos de detecção precoce não apresentam nenhuma vantagem frente ao exame clínico (NYVAD, 2004;

VERDONSCHOT et al., 1999). Isso porque o exame visual já proporciona uma detecção bastante precoce, de forma que é possível a paralisação da lesão de cárie sem a necessidade de intervenção operatória. Além disso, métodos que detectam mais precocemente a lesão apresentariam maior sensibilidade, mas menor especificidade, provocando um maior número de resultados falso-positivos e, portanto, não teriam uma relação custo benefício adequada (NYVAD, 2004; VERDONSCHOT et al., 1999).

No entanto, esse ponto de vista é bastante discutível. Tem sido observado que a remineralização das lesões é mais eficiente em lesões menores do que em lesões mais avançadas (KIDD, 1984). Alta especificidade é um requisito importante para testes de diagnóstico de cárie em populações com baixa incidência de cárie, mas isso é mais importante na detecção de lesões de cárie em dentina (BADER; SHUGARS; BONITO, 2002; VERDONSCHOT et al., 1999). Para o limiar de detecção de lesões em esmalte, num nível populacional, realmente o custo-benefício é afetado pelos diagnósticos falso-positivos de lesões em esmalte. Por outro lado, pensando no diagnóstico individual, de cada paciente, resultados falso-negativos (associado a métodos com baixa sensibilidade) poderiam causar uma avaliação equivocada da atividade de cárie. Caso ocorra um sobretratamento, este não será invasivo, e sim, serão utilizados métodos para paralisar a doença. Portanto, métodos de detecção precoce, realizados para orientar o plano de tratamento da doença cárie nos pacientes, podem ser úteis no diagnóstico de cárie. Outros autores concordam com a utilidade da detecção precoce do processo carioso, e defendem que estudos sejam realizados para criação de métodos que sejam efetivos para esse fim (PITTS, 1993; STOOKEY et al., 1999). No presente estudo, houve um aumento

significativo da sensibilidade associado a um alto valor de especificidade, e dessa forma, um baixo número de resultados falso-positivos foi encontrado.

Além de tudo isso, métodos quantitativos que detectem pequenas alterações minerais decorrentes do processo de cárie, poderiam ser utilizados para avaliar a atividade de cárie, através de medições realizadas em dias diferentes. Usando um método sensível a pequenas alterações, isso poderia ser feito em um intervalo pequeno, sem causar grandes danos ao tecido dentário (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002; STOOKEY et al., 1999). Com a inspeção visual, isso não é possível de ser realizado. A viabilidade da utilização do QLF na avaliação da cariogenicidade de alimentos e da atividade de cárie (SUNDSTROM et al., 1989), bem como na investigação da efetividade da remineralização de lesões de mancha branca *in vivo* (AL-KHATEEB et al., 1998; TRANAEUS et al., 2001) tem sido estudada. A utilização do método DIAGNOdent com a TMPyP na monitoração da perda mineral e da remineralização de lesões de cárie deve ser avaliada em estudos futuros.

Outro aspecto importante na Cariologia é a detecção de lesões oclusais. Segundo alguns autores, frente à diminuição da progressão das lesões de cárie, a detecção de lesões oclusais de cárie está ficando mais difícil de ser realizada, pois a lesão apresenta um esmalte com pequenas alterações, e a dentina subjacente extensamente destruída (ANGMAR-MANSSON; TEN BOSCH, 2001; BADER; SHUGARS, 2004; BADER; SHUGARS; BONITO, 2002; WEERHEIJM, 1997), provocando as chamadas lesões de cárie oculta (WEERHEIJM, 1997).

O DIAGNOdent tem sido extensivamente estudado para detecção de lesões de cárie oclusal. O método tem obtido bons resultados e alguns autores propõem que seja utilizado associado ao exame visual (LUSSI; FRANCESCUT, 2003; LUSSI; HIBST; PAULUS, 2004; LUSSI et al., 1999, 2001; REIS et al., 2005;

ROCHA et al., 2003). Como o exame visual falha em detectar algumas lesões (baixa sensibilidade), o DIAGNOdent poderia ser utilizado na detecção dessas lesões, substituindo o exame radiográfico.

Além da utilização do DIAGNOdent associado a corantes na detecção de lesões em dentina, avaliamos se o método também era viável para detecção de lesões iniciais em esmalte, uma vez que os experimentos anteriores observaram uma boa efetividade na detecção precoce da lesão de cárie. Com relação à utilização da TMPyP, o método sem o corante não apresentou diferença significativa comparado ao método com a porfirina, em ambos os limiares de detecção D1 e D3, em nenhum dos parâmetros analisados. Da mesma forma, não houve diferença em nenhum parâmetro relacionado ao desempenho do DIAGNOdent e do DIAGNOdent associado à PPIX para detecção de lesões iniciais de esmalte e lesões em dentina.

Vários motivos podem explicar os resultados. O DIAGNOdent tem apresentado resultados adequados na detecção de lesões em dentina. Dessa forma, nesse aspecto, o DIAGNOdent não apresenta falhas como apresenta na detecção precoce de lesões e na quantificação de lesões de superfície lisa. O estudo foi realizado para verificar se a associação com corantes poderia melhorar ainda mais o desempenho do DIAGNOdent, o que não ocorreu.

Outros autores que avaliaram o desempenho do DIAGNOdent na detecção de lesões em dentina em dentes decíduos obtiveram valores entre 0,73 e 0,82 de sensibilidade, e valores de especificidade entre 0,82 e 1,00 (ATTRILL; ASHLEY, 2001; LUSSI; FRANCESCUT, 2003; MENDES et al., 2005a; MENDES; HISSADOMI; IMPARATO, 2004; ROCHA et al., 2003). No presente estudo, com as amostras que foram submetidas ao estudo com a TMPyP, o DIAGNOdent utilizado sem o corante obteve resultados muito similares. Já na amostra utilizada no estudo

com a PPIX, encontramos com o DIAGNOdent sem o corante valores maiores de sensibilidade, e semelhantes de especificidade. Apenas um outro estudo obteve valor de sensibilidade muito mais baixo (0,33). Segundo os autores, isso pode estar relacionado à baixa prevalência de lesões em dentina na amostra estudada, e também pela exclusão de dentes com sulcos pigmentados (BENGTON et al., 2005). Essa tendência dos valores de especificidade serem maiores ou semelhantes aos de sensibilidade é diferente do que ocorre em dentes permanentes, onde geralmente os valores de sensibilidade são maiores (BADER; SHUGARS, 2004). No presente estudo, os métodos com corante obtiveram também resultados similares aos estudos prévios em dentes decíduos com o DIAGNOdent sem corante.

Com relação às lesões em esmalte, apenas um estudo realizou a análise da utilização do DIAGNOdent na detecção de lesões iniciais em esmalte (D1) (MENDES et al., 2005a). Nesse estudo, foi encontrado valor maior de especificidade do que de sensibilidade, reforçando o fato de que o DIAGNOdent não apresenta bom desempenho na detecção precoce de lesões de cárie. No presente estudo, foi observada uma tendência semelhante, mas apenas na amostra destinada ao experimento com a TMPyP.

Os resultados favoráveis com a utilização do DIAGNOdent associado à TMPyP para detecção precoce obtidos em lesões artificiais de superfície lisa, não foram repetidos nas lesões oclusais. A anatomia do sítio oclusal e o tamanho da lesão podem explicar a menor incorporação do corante e, portanto, os resultados similares do método com e sem os corantes. A utilização de lesões naturais também pode explicar uma certa dificuldade de incorporação do corante, uma vez que apresentam maior mineralização na superfície do que lesões induzidas (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986).

Como os resultados do experimento anterior parecem indicar para uma incorporação mais efetiva do corante em virtude da maior rugosidade da superfície, o método utilizando o corante (especialmente a TMPyP) poderia ser mais efetivo na detecção de lesões ativas, visto que esse tipo de lesão apresenta uma rugosidade maior do que lesões inativas (NYVAD; FEJERSKOV, 1997; NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999). Na escolha dos sítios para o estudo, o aspecto de lesões ativas ou inativas não foi levado em conta. Como lesões artificiais simulam lesões ativas, a efetividade dos novos métodos na detecção para diferenciação entre lesões naturais ativas e inativas seria bastante desejável. Estudos adicionais para avaliar essa função devem ser realizados.

Outros estudos utilizando corantes para auxiliarem o método visual foram realizados e obtiveram resultados desfavoráveis com o método para detecção de lesões em dentina (áreas sob curva ROC por volta de 0,70) (PEREIRA; VERDONSCHOT; HUYSMANS, 2001; TONIOLI; BOUSCHLICHER; HILLIS, 2002), diferente dos obtidos na presente pesquisa, que apresentou melhor desempenho com o uso dos corantes fluorescentes associados ao DIAGNOdent.

Estudos também foram realizados em superfícies oclusais simuladas e naturais com corantes fluorescentes associados ao QLF para detecção de lesões precoces de cárie (FERREIRA ZANDONÁ et al., 1998a, 1998b). Nas fissuras artificiais, o método QLF com o corante apresentou melhor desempenho (área sob a curva ROC entre 0,794 e 0,823) do que o QLF sem o corante (área entre 0,600 e 0,823) (FERREIRA ZANDONÁ et al., 1998b). Esses resultados discordam dos nossos, uma vez que os métodos de detecção de fluorescência associados ou não aos corantes não apresentaram diferenças significantes.

Com relação ao uso do corante fluorescente associado ao QLF na detecção de lesões naturais, o método apresentou maior sensibilidade do que o método QLF e o visual, e os valores de especificidade não se alteraram significativamente entre os métodos (FERREIRA ZANDONÁ et al., 1998a). Novamente, os resultados do presente estudo foram diferentes. Isso talvez possa ser explicado pela maior capacidade de penetração da fluoresceína, o corante utilizado nos estudos anteriores, nas lesões de cárie. A fluoresceína, no entanto, não pode ser utilizada com o DIAGNOdent, pois ela emite fluorescência quando é excitada por luz de comprimento de onda menor do que a emitida pelo laser diodo do aparelho.

É importante salientar que, no presente estudo, os métodos utilizando os corantes não apresentaram resultados desfavoráveis na detecção de lesões oclusais, mas sim resultados semelhantes ao uso do aparelho sem os corantes. Os valores relacionados ao desempenho foram bastante favoráveis com todos os métodos utilizados no estudo. Apesar disso, para simples detecção de lesões oclusais de cárie, o método com os corantes, da forma como foram utilizados no estudo, não é indicado, pois só com o DIAGNOdent obteve-se resultados favoráveis. No entanto, estudos com alterações na concentração dos corantes, no tempo de imersão, no modo de remoção do excesso do corante, no tempo de secagem e com a utilização de outros solventes podem fazer com que os métodos apresentem resultados mais favoráveis, quando utilizados em superfícies oclusais.

Esse foi o primeiro estudo associando a utilização de corantes ao DIAGNOdent, visando melhorar algumas propriedades do aparelho na detecção de pequenas alterações minerais. A utilização da PPIX não apresentou resultados muito satisfatórios para detecção precoce de desmineralização ou para detecção de

lesões oclusais, mas apresentou um bom desempenho na detecção e principalmente quantificação de lesões mais avançadas em superfície lisa. Já o método com a TMPyP nos pareceu bastante promissor, uma vez que apresentou resultados excelentes na diferenciação entre dentes com lesões de esmalte precoces ou mais avançadas, e dentes hígidos. Até onde sabemos, nenhum outro estudo utilizou a TMPyP, uma porfirina usada na terapia fotodinâmica contra células tumorais, no estudo da cárie dentária. Os resultados com a sua utilização se mostraram muito promissores para detecção precoce de desmineralização e possivelmente, na avaliação da atividade de lesões de cárie. A avaliação precisa da efetividade dos tratamentos utilizados para paralisação de lesões e diminuição da atividade da cárie dentária nos pacientes em períodos relativamente curtos é um anseio atual dos pesquisadores na área da Cariologia (ANGMAR-MANSSON; AL-KHATEEB; TRANAEUS, 1998; EKSTRAND, 2004; NYVAD, 2004; NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 2003; VERDONSCHOT et al., 1999).

De um modo geral, os métodos propostos na presente pesquisa, por se tratarem de estudos iniciais, apresentaram um desempenho altamente favorável, uma vez que a associação com os corantes apresentou melhor desempenho na quantificação e detecção de lesões artificiais de cárie em superfícies lisas, uma performance excelente para detectar lesões precoces de cárie e um desempenho favorável (embora semelhante ao DIAGNOdent sem os corantes) na detecção de lesões de cárie oclusal. Esse foi o estudo inicial de uma idéia de associar algumas vantagens do DIAGNOdent com uma melhora na performance do método em detectar e quantificar alterações minerais. Esses resultados obtidos estimulam a realização de estudos adicionais *in vitro* na busca da concentração ideal dos corantes, dos solventes mais indicados e no modo de aplicação dessas substâncias.

Outros corantes também devem ser investigados na tentativa de melhorar os resultados. Só após extensivos estudos *in vitro*, que busquem atingir a melhor forma de realização do método, estudos *in situ* e *in vivo* devem ser executados para realmente avaliar a aplicabilidade dos métodos que associam a utilização do DIAGNOdent e corantes fluorescentes.

7 CONCLUSÕES

Com base nas condições em que essa investigação foi desenvolvida, podemos concluir que a utilização do DIAGNOdent associado à TMPyP proporciona uma melhor performance na detecção de lesões artificiais de cárie de superfície lisa e na detecção precoce da desmineralização causada pela cárie dentária em dentes decíduos. Por outro lado, a associação do método com a PPIX proporciona uma melhor quantificação das lesões de cárie em superfície lisa quando comparada ao método DIAGNOdent. Já com relação à detecção de lesões oclusais em dentes decíduos, ambos os métodos possuem desempenho adequado.

REFERÊNCIAS¹

- Aljehani A, Tranaeus S, Forsberg CM, Angmar-Mansson B, Shi XQ. In vitro quantification of white spot enamel lesions adjacent to fixed orthodontic appliances using quantitative light-induced fluorescence and DIAGNOdent. *Acta Odontol Scand* 2004;62(6):313-8.
- Al-Khateeb S, Exterkate RA, De Josselin de Jong E, Angmar-Mansson B, Ten Cate JM. Light-induced fluorescence studies on dehydration of incipient enamel lesions. *Caries Res* 2002;36(1):25-30.
- Al-Khateeb S, Forsberg CM, De Josselin de Jong E, Angmar-Mansson B. A longitudinal laser fluorescence study of white spot lesions in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1998;113(6):595-602.
- Al-Khateeb S, Oliveby A, De Josselin de Jong E, Angmar-Mansson B. Laser fluorescence quantification of remineralisation in situ of incipient enamel lesions: influence of fluoride supplements. *Caries Res* 1997a;31(2):132-40.
- Al-Khateeb S, Ten Cate JM, Angmar-Mansson B, De Josselin de Jong E, Sundstrom G, Exterkate RA, et al. Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res* 1997b;11(4):502-6.
- Al-Sehaibany F, White G, Rainey JT. The use of caries detector dye in diagnosis of occlusal carious lesions. *J Clin Pediatr Dent* 1996;20(4):293-8.
- Alwas-Danowska HM, Plasschaert AJM, Suliborski S, Verdonchot EH. Reliability and validity issues of laser fluorescence measurements in occlusal caries diagnosis. *J Dent* 2002;30(4):129-34.
- Andersson A, Sköld-Larsson K, Hallgren A, Petersson LG, Twetman S. Measurement of enamel lesion regression with a laser fluorescence device (DIAGNOdent): a pilot study. *Orthod* 2004;1(3):201-5.

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

Ando M, Hall AF, Eckert GJ, Schemehorn BR, Analoui M, Stookey GK. Relative ability of laser fluorescence techniques to quantitate early mineral loss in vitro. *Caries Res* 1997;31(2):125-31.

Ando M, van Der Veen MH, Schemehorn BR, Stookey GK. Comparative study to quantify demineralized enamel in deciduous and permanent teeth using laser- and light-induced fluorescence techniques. *Caries Res* 2001;35(6):464-70.

Angmar-Mansson B, Al-Khateeb S, Tranaeus S. Monitoring the caries process. Optical methods for clinical diagnosis and quantification of enamel caries. *Eur J Oral Sci* 1996;104(4 Pt 2):480-5.

Angmar-Mansson B, Ten Bosch JJ. Advances in methods for diagnosing coronal caries - a review. *Adv Dent Res* 1993;7(2):70-9.

Angmar-Mansson B, Ten Bosch JJ. Quantitative light-induced fluorescence (QLF): a method for assessment of incipient caries lesions. *Dentomaxillofac Radiol* 2001;30(6):298-307.

Angmar-Mansson BE, Al-Khateeb S, Tranaeus S. Caries diagnosis. *J Dent Educ* 1998;62(10):771-80.

Anttonen V, Seppa L, Hausen H. Clinical study of the use of the laser fluorescence device DIAGNOdent for detection of occlusal caries in children. *Caries Res* 2003;37(1):17-23.

Anttonen V, Seppa L, Hausen H. A follow-up study of the use of DIAGNOdent for monitoring fissure caries in children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004;32(4):312-8.

Arends J, Christoffersen J. The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 1986;65(1):2-11.

Arends J, Ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992;71(Spec no.):924-8.

Arends J, Ten Cate JM. Tooth enamel remineralization. *J Crystal Growth* 1981;53(2):135-47.

Armstrong WG. Fluorescence characteristics of sound and carious human dentine preparations. *Arch Oral Biol* 1963;8(2):79-90.

Astvaldsdottir A, Holbrook WP, Tranaeus S. Consistency of DIAGNOdent instruments for clinical assessment of fissure caries. *Acta Odontol Scand* 2004;62(4):193-8.

Attrill DC, Ashley PF. Occlusal caries detection in primary teeth: a comparison of DIAGNOdent with conventional methods. *Br Dent J* 2001;190(8):440-3.

Bader JD, Shugars DA. A systematic review of the performance of a laser fluorescence device for detecting caries. *J Am Dent Assoc* 2004;135(10):1413-26.

Bader JD, Shugars DA, Bonito AJ. A systematic review of the performance of methods for identifying carious lesions. *J Public Health Dent* 2002;62(4):201-13.

Bamzahim M, Shi XQ, Angmar-Mansson B. Occlusal caries detection and quantification by DIAGNOdent and Electronic Caries Monitor: in vitro comparison. *Acta Odontol Scand* 2002;60(6):360-4.

Baseren NM, Gokalp S. Validity of a laser fluorescence system (DIAGNOdent) for detection of occlusal caries in third molars: an in vitro study. *J Oral Rehabil* 2003;30(12):1190-4.

Bengtson AL, Gomes AC, Mendes FM, Cichello LRD, Bengtson NG, Pinheiro SL. Influence of examiner's clinical experience in detecting occlusal caries lesions in primary teeth. *Pediatr Dent*. In press 2005.

Bjelkhagen H, Sundstrom F, Angmar-Mansson B, Ryden H. Early detection of enamel caries by the luminescence excited by visible laser light. *Swed Dent J* 1982;6(1):1-7.

Borissevitch IE, Gandini SC. Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin bound to DNA. *J Photochem Photobiol B* 1998;43(2):112-20.

Braun A, Krause F, Jepsen S. The influence of the calibration mode of a laser fluorescence device on caries detection. *Caries Res* 2005;39(2):144-9.

Buchalla W. Comparative fluorescence spectroscopy shows differences in noncavitated enamel lesions. *Caries Res* 2005;39(2):150-6.

Chan DC. Current methods and criteria for caries diagnosis in North America. *J Dent Educ* 1993;57(6):422-7.

Chong MJ, Seow WK, Purdie DM, Cheng E, Wan V. Visual-tactile examination compared with conventional radiography, digital radiography, and Diagnodent in the diagnosis of occlusal occult caries in extracted premolars. *Pediatr Dent* 2003;25(4):341-9.

Clarkson BH. Introduction to cariology. *Dent Clin North Am* 1999;43(4):569-78.

Cortes DF, Ellwood RP, Ekstrand KR. An in vitro comparison of a combined FOTI/visual examination of occlusal caries with other caries diagnostic methods and the effect of stain on their diagnostic performance. *Caries Res* 2003;37(1):8-16.

Costa AM, Yamaguti PM, De Paula LM, Bezerra ACB. In vitro study of laser diode 655 nm diagnosis of occlusal caries. *ASDC J Dent Child* 2002;69(3):249-53.

Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc* 2003;69(11):722-4.

De Groot JF, Borggreven JMPM, Driessens FCM. Some aspects of artificial caries lesion formation of human dental enamel in vitro. *J Biol Buccale* 1986;14(2):125-31.

De Josselin de Jong E, Sundstrom F, Westerling H, Tranaeus S, Ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res* 1995;29(1):2-7.

Douglass CW. Evaluating diagnostic tests. *Adv Dent Res* 1993;7(2):66-9.

Eggertsson H, Analoui M, van der Veen M, Gonzalez-Cabezas C, Eckert G, Stookey G. Detection of early interproximal caries in vitro using laser fluorescence, dye-enhanced laser fluorescence and direct visual examination. *Caries Res* 1999;33(3):227-33.

Ekstrand KR. Improving clinical visual detection--potential for caries clinical trials. *J Dent Res* 2004;83(Spec No C):C67-C71.

Ekstrand KR, Qvist V, Thylstrup A. Light microscope study of the effect of probing in occlusal surfaces. *Caries Res* 1987;21(4):368-74.

Ekstrand KR, Ricketts DNJ, Kidd EAM. Reproducibility and accuracy of three methods for assessment of demineralization depth of the occlusal surface: an in vitro examination. *Caries Res* 1997;31(3):224-31.

Ekstrand KR, Ricketts DNJ, Kidd EAM, Qvist V, Schou S. Detection, diagnosing, monitoring and logical treatment of occlusal caries in relation to lesion activity and severity: an in vivo examination with histological validation. *Caries Res* 1998;32(4):247-54.

El-Housseiny AA, Jamjoum H. Evaluation of visual, explorer, and a laser device for detection of early occlusal caries. *J Clin Pediatr Dent* 2001;26(1):41-8.

Featherstone JDB. Caries detection and prevention with laser energy. *Dent Clin North Am* 2000;44(4):955-69.

Featherstone JDB. The continuum of dental caries - Evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res* 2004;83(Spec No C):C39-C42.

Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. *Caries Res* 2004;38(3):182-91.

Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25(1):5-12.

Ferreira Zandoná AG, Analoui M, Beiswanger BB, Isaacs RL, Kafrawy AH, Eckert GJ, et al. An in vitro comparison between laser fluorescence and visual examination for detection of demineralization in occlusal pits and fissures. *Caries Res* 1998a;32(3):210-8.

Ferreira Zandoná AG, Analoui M, Schemehorn BR, Eckert GJ, Stookey GK. Laser fluorescence detection of demineralization in artificial occlusal fissures. *Caries Res* 1998b;32(1):31-40.

Francescut P, Lussi A. Correlation between fissure discoloration, Diagnodent measurements, and caries depth: an in vitro study. *Pediatr Dent* 2003;25(6):559-64.

Fukuda H, Casas A, Batlle A. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(2):272-6.

Fung L, Smales R, Ngo H, Moun G. Diagnostic comparison of three groups of examiners using visual and laser fluorescence methods to detect occlusal caries in vitro. *Aust Dent J* 2004;49(2):67-71.

Hafstrom-Bjorkman U, Sundstrom F, Ten Bosch JJ. Fluorescence in dissolved fractions of human enamel. *Acta Odontol Scand* 1991;49(3):133-8.

Hall AF, DeSchepper E, Ando M, Stookey GK. In vitro studies of laser fluorescence for detection and quantification of mineral loss from dental caries. *Adv Dent Res* 1997;11(4):507-14.

Hanley JA, McNeil BJA. Method of comparing the areas under Receiver Operating Characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983;148(3):839-43.

Heinrich-Weltzien R, Kuhnisch J, Oehme T, Ziehe A, Stosser L, Garcia-Godoy F. Comparison of different DIAGNOdent cut-off limits for in vivo detection of occlusal caries. *Oper Dent* 2003;28(6):672-80.

Heinrich-Weltzien R, Weerheijm KL, Kuhnisch J, Oehme T, Stosser L. Clinical evaluation of visual, radiographic, and laser fluorescence methods for detection of occlusal caries. *ASDC J Dent Child* 2002;69(2):127-32.

Hibst R, Gall R. Development of a diode laser-based fluorescence caries detector [abstract 80]. *Caries Res* 1998;32(4):294.

Hibst R, Paulus R, Lussi A. Detection of occlusal caries by laser fluorescence: Basic and Clinical investigations. *Med Laser Appl* 2001;16(3):205-13.

Hino DM, Mendes FM, de Figueiredo JLG, Gomide KLMN, Imparato JCP. Effects of plaque disclosing agents on esthetic restorative materials used in pediatric dentistry. *J Clin Pediatr Dent* 2005;29(2):143-6.

Hosoya Y, Matsuzaka K, Inoue T, Marshall GW, Jr. Influence of tooth-polishing pastes and sealants on DIAGNOdent values. *Quintessence Int* 2004;35(8):605-11.

Huysmans MCDNJM, Longbottom C. The challenges of validating diagnostic methods and selecting appropriate gold standards. *J Dent Res* 2004;83(Spec No C):C48-C52.

Iwami Y, Shimizu A, Narimatsu M, Hayashi M, Takeshige F, Ebisu S. Relationship between bacterial infection and evaluation using a laser fluorescence device, DIAGNOdent. *Eur J Oral Sci* 2004;112(5):419-23.

Ketley CE, Holt RD. Visual and radiographic diagnosis of occlusal caries in first permanent molars and in second primary molars. *Br Dent J* 1993;174(10):364-70.

Kidd EAM. The diagnosis and management of the 'early' carious lesion in permanent teeth. *Dent Update* 1984;11(2):69-78.

Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004;83(Spec No C):C35-C38.

Konig K, Flemming G, Hibst R. Laser-induced autofluorescence spectroscopy of dental caries. *Cell Mol Biol* 1998;44(8):1293-300.

Konig K, Schneckenburger H, Hibst R. Time-gated in vivo autofluorescence imaging of dental caries. *Cell Mol Biol* 1999;45(2):233-9.

Konig K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol* 2000;46(7):1297-303.

Konig KG. Clinical manifestations and treatment of caries from 1953 to global changes in the 20th Century. *Caries Res* 2004;38(3):168-72.

Kordic A, Lussi A, Luder HU. Performance of visual inspection, electrical conductance and laser fluorescence in detecting occlusal caries in vitro. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2003;113(8):852-9.

Kuhnisch J, Ziehe A, Brandstadt A, Heinrich-Weltzien R. An in vitro study of the reliability of DIAGNOdent measurements. *J Oral Rehabil* 2004;31(9):895-9.

LeGeros RZ. Calcium phosphates in demineralization/remineralization process. *J Clin Dent* 1999;10(2):65-73.

Lussi A. Comparison of different methods for the diagnosis of fissure caries without cavitation. *Caries Res* 1993;27(5):409-16.

Lussi A, Francescut P. Performance of conventional and new methods for the detection of occlusal caries in deciduous teeth. *Caries Res* 2003;37(1):2-7.

Lussi A, Reich E. The influence of toothpastes and prophylaxis pastes on fluorescence measurements for caries detection in vitro. *Eur J Oral Sci* 2005;113(2):141-4.

Lussi A, Hibst R, Paulus R. DIAGNOdent: an optical method for caries detection. *J Dent Res* 2004;83(Spec No C):C80-C83.

Lussi A, Imwinkelried S, Pitts NB, Longbottom C, Reich E. Performance and reproducibility of a laser fluorescence system for detection of occlusal caries in vitro. *Caries Res* 1999;33(4):261-6.

Lussi A, Megert B, Longbottom C, Reich E, Francescut P. Clinical performance of a laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions. *Eur J Oral Sci* 2001;109(1):14-9.

Machiulskiene V, Richards A, Nyvad B, Baelum V. Prospective study of the effect of post-brushing rinsing behaviour on dental caries. *Caries Res* 2002;36(5):301-7.

Marthaler TM. Changes in Dental Caries 1953-2003. *Caries Res* 2004;38(3):173-81.

Mendes FM, Nicolau J. Utilization of laser fluorescence to monitor caries lesions development in primary teeth. *J Dent Child* 2004;71(2):139-42.

Mendes FM, Hissadomi M, Imparato JCP. Effects of drying time and the presence of plaque on the in vitro performance of laser fluorescence in occlusal caries of primary teeth. *Caries Res* 2004;38(2):104-8.

Mendes FM, Nicolau J, Duarte DA. Evaluation of the Effectiveness of Laser Fluorescence in Monitoring in vitro Remineralization of Incipient Caries Lesions in Primary Teeth. *Caries Res* 2003;37(6):442-4.

Mendes FM, Pinheiro SL, Bengtson AL. Effect of alteration in organic material of the occlusal caries on DIAGNOdent readings. *Pesqui Odontol Bras* 2004;18(2):141-4.

Mendes FM, Ganzerla E, Nunes AF, Puig AVC, Imparato JCP. Use of high-powered magnification to detect occlusal caries in primary teeth. *Am J Dent*. In press 2005a.

Mendes FM, Siqueira WL, Mazzitelli JF, Pinheiro SL, Bengtson AL. Performance of DIAGNOdent for detection and quantification of smooth-surface caries in primary teeth. *J Dent* 2005b;33(1):79-84.

Nauntofte B, Tenovuo JO, Lagerlof F. Secreção e composição da saliva. In: Fejerskov O, Kidd EAM. *Cárie Dentária: A doença e seu tratamento clínico*. Trad. de Fábio Luiz Mialhe et al. São Paulo: Ed. Santos; 2005. cap. 2, p. 7-28.

Nyvad B. Diagnosis versus detection of caries. *Caries Res* 2004;38(3):192-8.

Nyvad B, Fejerskov O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25(1):69-75.

Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V. Construct and predictive validity of clinical caries diagnostic criteria assessing lesion activity. *J Dent Res* 2003;82(2):117-22.

Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries Res* 1999;33(4):252-60.

Oakley C, Brunette DM. The use of diagnostic data in clinical dental practice. *Dent Clin North Am* 2002;46(1):87-115.

O'Brien WJ, Vazquez L, Johnston WM. The detection of incipient caries with tracer dyes. *J Dent Res* 1989;68(2):157-8.

Pereira AC, Verdonchot EH, Huysmans MCDNJM. Caries detection methods: can they aid decision making for invasive sealant treatment? *Caries Res* 2001;35(2):83-9.

Pinelli C, Campos Serra M, de Castro Monteiro Loffredo L. Validity and reproducibility of a laser fluorescence system for detecting the activity of white-spot lesions on free smooth surfaces in vivo. *Caries Res* 2002;36(1):19-24.

Pitts NB. Current methods and criteria for caries diagnosis in Europe. *J Dent Educ* 1993;57(6):409-14.

Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. Detection of in vitro demineralization of primary teeth using quantitative light-induced fluorescence (QLF). *Int J Paediatr Dent* 2002;12(3):158-67.

Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The validation of quantitative light-induced fluorescence to quantify acid erosion of human enamel. *Arch Oral Biol* 2004;49(4):285-94.

Pretty IA, Ingram GS, Agalamanyi EA, Edgar WM, Higham SM. The use of fluorescein-enhanced quantitative light-induced fluorescence to monitor de- and re-mineralization of in vitro root caries. *J Oral Rehabil* 2003a;30(12):1151-6.

Pretty IA, Maupome G. A closer look at diagnosis in clinical dental practice: part 1. Reliability, validity, specificity and sensitivity of diagnostic procedures. *J Can Dent Assoc* 2004a;70(4):251-5.

Pretty IA, Maupome G. A closer look at diagnosis in clinical dental practice: part 2. Using predictive values and receiver operating characteristics in assessing diagnostic accuracy. *J Can Dent Assoc* 2004b;70(5):313-6.

Pretty IA, Smith PW, Edgar WM, Higham SM. Detection of in vitro demineralization adjacent to restorations using quantitative light induced fluorescence (QLF). *Dent Mater* 2003b;19(5):368-74.

Rawls HR, Owen WD. Demonstration of dye-uptake as a potential aid in early diagnosis of incipient caries. *Caries Res* 1978;12(2):69-75.

Reis A, Mendes FM, Angnes V, Angnes G, Grande RHM, Loguércio AD. Performance of methods of occlusal caries detection in permanent teeth under clinical and laboratory conditions. *J Dent*. In press 2005.

Reis A, Zach VL, Lima AC, Navarro MFL, Grande RHM. Occlusal caries detection: a comparison of DIAGNOdent and two conventional diagnostic methods. *J Clin Dent* 2004;15(3):76-82.

Rocha RO, Ardenghi TM, Oliveira LB, Rodrigues CRMD, Ciamponi AL. In vivo Effectiveness of Laser Fluorescence Compared to Visual Inspection and Radiography for the Detection of Occlusal Caries in Primary Teeth. *Caries Res* 2003;37(6):437-41.

Sheehy EC, Brailsford SR, Kidd EAM, Beighton D, Zoitopoulos L. Comparison between visual examination and a laser fluorescence system for in vivo diagnosis of occlusal caries. *Caries Res* 2001;35(6):421-6.

Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Mansson B. Comparison of QLF and DIAGNOdent for quantification of smooth surface caries. *Caries Res* 2001a;35(1):21-6.

Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Mansson B. Validation of DIAGNOdent for quantification of smooth-surface caries: an in vitro study. *Acta Odontol Scand* 2001b;59(2):74-8.

Shi XQ, Welander U, Angmar-Mansson B. Occlusal caries detection with KaVo DIAGNOdent and radiography: an in vitro comparison. *Caries Res* 2000;34(2):151-8.

Skold-Larsson K, Fornell AC, Lussi A, Twetman S. Effect of topical applications of a chlorhexidine/thymol-containing varnish on fissure caries assessed by laser fluorescence. *Acta Odontol Scand* 2004;62(6):339-42.

Staudt CB, Lussi A, Jacquet J, Kiliaridis S. White spot lesions around brackets: in vitro detection by laser fluorescence. *Eur J Oral Sci* 2004;112(3):237-43.

Stookey GK, Jackson RD, Ferreira Zandona AG, Analoui M. Dental caries diagnosis. *Dent Clin North Am* 1999;43(4):665-77.

Sundstrom F, Fredriksson K, Montan S, Hafstrom-Bjorkman U, Strom J. Laser-induced fluorescence from sound and carious tooth substance: spectroscopic studies. *Swed Dent J* 1985;9(2):71-80.

Sundstrom F, Hafstrom-Bjorkman U, Strom J, Angmar-Mansson B, Frostell G, Takazoe I. Evaluation of a model for short-term clinical testing of cariogenicity. *J Biol Buccale* 1989;17(2):115-20.

Takamori K, Hokari N, Okumura Y, Watanabe S. Detection of occlusal caries under sealants by use of a laser fluorescence system. *J Clin Laser Med Surg* 2001;19(5):267-71.

Tam LE, McComb D. Diagnosis of occlusal caries: Part II. Recent diagnostic technologies. *J Can Dent Assoc* 2001;67(8):459-63.

Ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. *J Dent Res* 1991;70(1):2-14.

Ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982;16(3):201-10.

Tonioli MB, Bouschlicher MR, Hillis SL. Laser fluorescence detection of occlusal caries. *Am J Dent* 2002;15(4):268-73.

Tranaeus S, Al-Khateeb S, Bjorkman S, Twetman S, Angmar-Mansson B. Application of quantitative light-induced fluorescence to monitor incipient lesions in caries-active children. A comparative study of remineralisation by fluoride varnish and professional cleaning. *Eur J Oral Sci* 2001;109(2):71-5.

Tranaeus S, Lindgren LE, Karlsson L, Angmar-Mansson B. In vivo validity and reliability of IR fluorescence measurements for caries detection and quantification. *Swed Dent J* 2004;28(4):173-82.

Van de Rijke JW. Use of dyes in cariology. *Int Dent J* 1991;41(2):111-6.

Van de Rijke JW, Ten Bosch JJ. Optical quantification of caries-like lesions in vitro by use of a fluorescent dye. *J Dent Res* 1990;69(5):1184-7.

Van de Rijke JW, Pos N, Ten Bosch JJ. A model study for quantification of approximal caries with a fluorescent dye. *Caries Res* 1990;24(6):436-40.

Van der Veen MH, Ten Bosch JJ. An in vitro evaluation of fluorescein penetration into natural root surface carious lesions. *Caries Res* 1993;27(4):258-61.

Van der Veen MH, Tsuda H, Arends J, Ten Bosch JJ. Evaluation of sodium fluorescein for quantitative diagnosis of root caries. *J Dent Res* 1996;75(1):588-93.

Verdonschot EH, Angmar-Mansson B, Ten Bosch JJ, Deery CH, Huysmans MCDNJM, Pitts NB, et al. Developments in caries diagnosis and their relationship to treatment decisions and quality of care. *Caries Res* 1999;33(1):32-40.

Vergeldt FJ, Koehorst RBM, Vanhoek A, Schaafsma TJ. Intramolecular Interactions in the Ground and Excited-State of Tetrakis(N-Methylpyridyl)Porphyrins. *J Phys Chem* 1995;99(13):4397-405.

Weerheijm KL. Occlusal 'hidden caries'. *Dent Update* 1997;24(5):182-4.

Zero DT. Dental caries process. *Dent Clin North Am* 1999;43(4):635-64.

Zupan K, Herenyi L, Toth K, Majer Z, Csik G. Binding of cationic porphyrin to isolated and encapsidated viral DNA analyzed by comprehensive spectroscopic methods. *Biochemistry* 2004;43(28):9151-9.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 26/04**

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *“Avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao uso do DIAGNOdent para detecção de perda mineral decorrente de cárie e erosão”*, de responsabilidade do Pesquisador Fausto Medeiros Mendes, sob orientação do Prof. Dr. José Nicolau.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 22 de março de 2004

Prof.ª Dr.ª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP