CYNTHIA SOARES DE AZEVEDO

**Proposta de padronização de método laboratorial para obtenção de
dentina afetada por cárie**

São Paulo

2012

CYNTHIA SOARES DE AZEVEDO

**Proposta de padronização de método laboratorial para obtenção de
dentina afetada por cárie**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Adriana Bona Matos

São Paulo

2012

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

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

Azevedo, Cynthia Soares de

Proposta de padronização de método laboratorial para obtenção de dentina afetada por cárie / Cynthia Soares de Azevedo; orientador Adriana Bona Matos. -- São Paulo, 2012.

80p. : fig., tab.; 30 cm.

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

Versão corrigida.

1. Carie dentária – Diagnóstico. 2. Dentina. 3. Hipomineralização dentinária. I. Matos, Adriana Bona. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Azevedo CS. Proposta de padronização de método laboratorial para obtenção de dentina afetada por cárie. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA ESPECIAL

A minha maior preocupação nos últimos anos aconteceu... Como me dói escrever essa homenagem “póstuma” a você, meu pai. Os mesmos olhos marejados de um pai orgulhoso falando da conquista da sua filha, em um de muitos dias em que estive com você no hospital, são os meus agora nesse momento...

Sorte das pessoas que puderam conhecer esse homem fantástico, inteligente, dedicado, trabalhador e íntegro! Por todos os lugares que passou meu pai deixou marcas e claro, que na minha vida e na da minha família não foi diferente. Pai, a casa sem você está muito quieta e tranquila, que saudade eu tenho de acordar aos domingos e te encontrar lendo o jornal e vendo o Boldrim, pedindo coisas sem parar pra mamãe. Como eu sinto falta de quando estávamos esperando você chegar para jantarmos todos juntos conversarmos sobre o dia que tivemos, da sua companhia logo cedo no café-da-manhã, das ligações de madrugada preocupado em saber que horas eu voltaria para casa.

Um vazio permanecerá para sempre nos nossos corações, eu a mamãe e a Tatí estamos sofrendo muito com a sua falta, mas pode deixar que vamos tocar a vida. Tivemos um exemplo maravilhoso seu em casa, um homem que tudo que conquistou foi com muito suor, de forma limpa e correta, da mesma forma que nos criou. Tenho muito orgulho de como você lutou pra viver, mas agora você desacansa, meu pai, e espero muito poder reencontrá-lo um dia.

Mas antes disso tenho muitas coisas para conquistar, e uma delas é esse Mestrado de que você tanto se orgulhava.

Antônio Moreira Soares de Azevedo, Cel. Azevedo, Prof. Azevedo, Toninho, Bola...Velhinho, Pai, dedico essa vitória integralmente a você, sua filha te ama demais.

À minha super mãe, Tânia, que sempre cuidou das suas filhas e de seu marido como prioridade em sua vida. Agradeço toda sua dedicação e amor, tenha certeza que estarei com você quando e onde precisar, você é uma mulher guerreira e estamos juntas! Te amo muito.

À minha querida irmã Tatiana. Como irmã mais velha sempre te tive como exemplo a ser seguido, você merece ter uma vida maravilhosa junto a sua família. Agradeço o sobrinho lindo que você e o Rafa me deram, formamos uma família linda! Amo vocês.

Ao meu namorado Sandro, que me acompanhou nessa jornada e no momento difícil que passamos me apoiou de forma incansável. Meu amor por você cresce a cada dia e espero ter muitas outras conquistas junto a você! Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Adriana Bona Matos, agradeço a confiança depositada em mim. Como aluna recém-formada sei que você se expôs para que eu fosse aceita como aluna de mestrado e espero não tê-la decepcionado. Sou muito grata a todos os ensinamentos passados no período em que estivemos juntas, desde as épocas de dentística operatória, restauradora, monitoria e iniciação científica. Aprendi e continuo aprendendo muito com você, não só na área acadêmica como também nas artimanhas da vida. Poucos têm uma orientadora tão presente e dedicada, sou muito grata pelos seus conselhos e carinho.

A todos os professores da Área de Dentística, Ana Cecília Aranha, Antônio Alberto de Cara, Carlos de Paula Eduardo, Eliza Maria Agueda Russo, Glaucio Fioranelli Vieira, Márcia Martins Marques, Maria Aparecida A. de C. Luz, Maria Angela Pita Sobral, Margareth Oda, Michel Nicolau Youssef, Miriam Lacalle Turbino, Narciso Garone Neto, Patrícia Moreira de Freitas e Rubens Corte Real de Carvalho, agradeço por terem, em diferentes fases, participado da minha formação.

À Prof^a Dr^a Maria Regina Lorenzetti Simionato, do Departamento de Microbiologia Oral do ICB/USP por me receber tão bem em seu laboratório em um ambiente acolhedor junto a seus alunos de pós-graduação e pelos conhecimentos passados que possibilitaram a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas, do Centro de Laser e Aplicações do IPEN/USP, que desde as épocas de iniciação científica me permitiu utilizar seu equipamento e com ótimas idéias e sugestões nos auxiliou na finalização deste trabalho.

À Elizabeth S. R. Somessari e Carlos Gaia da Silveira, do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN/USP, pela esterelização da amostra.

Ao Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes, do Departamento de Odontopediatria, pelo auxílio na parte estatística.

À minha colega de pós-graduação Luciana Cardoso Espejo Trung, que me introduziu no mundo das bactérias e sempre esteve disposta a me ensinar e ajudar, meu muito obrigada.

À Alessandra Pereira de Andrade, por ter permitido utilizar seu espaço para realização de parte do trabalho, agradeço sua prontidão e disponibilidade.

À Luciana Kfourí Siriani pela ajuda essencial no laboratório de microbiologia e momentos de descontração.

A todos os colegas de pós-graduação, sabemos as dificuldades que passamos e espero que todos alcancem seus objetivos.

À minha turma maravilhosa do curso de pós-graduação, Anely, Bruna, Carol, Ju, Livia, Mayra, Tati, Thayne, Thayanne e Thaysa. Com certeza essa jornada foi mais fácil junto a vocês, formamos um grupo ótimo e desejo muita sorte a todas!

Anely, Livia, Mayra, Tati, Thayanne e Thaysa, foi um prazer conhecê-las melhor nesses 2 anos de curso, vocês são pessoas especiais que eu quero levar para toda minha vida.

Meu agradecimento especial à minha amiga/irmã Bruna, que é minha companheira desde a graduação e fico muito feliz de estarmos juntas nesse momento tão importante das nossas vidas, te amo amiga.

Ao amigo Sérgio Brossi Botta, passamos ótimos momentos juntos e muito do que sei na área de pesquisa se deve a você, que é um exemplo a ser seguido e que nunca negou ajuda a mim e a Bruna, somos muito gratas!

À técnica do nosso laboratório Soninha, que sempre com sorriso no rosto me recebeu e me ajudou em tudo que precisei, muito obrigada.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, obrigado pela convivência nestes anos.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para a execução desse trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

A direção da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, na pessoa do Diretor Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha.

A Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia, na pessoa da Presidente, Prof^a Dr^a Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães.

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Dentística da FOUSP, na pessoa da Prof^a Dr^a Márcia Martins Marques.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de Mestrado e Auxílio Pesquisa.

“A sabedoria carece de dor para crescer”.

Tempo de Esperas - Pe. Fábio de Melo

RESUMO

Azevedo CS. Proposta de padronização de método laboratorial para obtenção de dentina afetada por cárie. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

Este estudo se propôs a validar um protocolo para obtenção de dentina afetada por cárie, através do processo *in vitro* de desmineralização de dentina humana induzida por biofilme de *Streptococcus mutans* (método microbiológico). A validação do protocolo foi realizada através de diferentes métodos diagnósticos: inspeção visual, radiografia digital, fluorescência a laser e sistema de tomografia por coerência óptica (OCT). Foram utilizados 48 molares humanos (24 erupcionados e 24 inclusos), que foram lixados na sua face oclusal para remoção do esmalte com exposição da dentina oclusal superficial, obtendo uma superfície plana. As raízes dos dentes foram removidas e os espécimes foram cortados no sentido vestibulo-lingual obtendo-se dois fragmentos que foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais. Os espécimes foram protegidos com verniz ácido resistente na metade da face oclusal (controle) e na outra metade foi produzida a lesão de cárie. Os grupos experimentais foram compostos a partir de 2 fatores de variação: tempo de desafio cariogênico (7, 14 e 21 dias) e tipo de dentina (proveniente de dentes inclusos ou erupcionados). Assim, formaram-se 6 grupos experimentais: com dentina proveniente de dentes erupcionados G1 (7 dias de desafio cariogênico), G2 (14 dias), G3 (21 dias); e com dentina proveniente de dentes inclusos G4 (7 dias), G5 (14 dias) e G6 (21 dias). Após os diferentes tempos de desafio cariogênico, os espécimes foram avaliados nas suas porções sadia e afetada por cárie utilizando diferentes métodos de diagnóstico e os resultados comparados. Através da inspeção visual comprovou-se a formação de dentina afetada por cárie uma vez que características do tecido como coloração amarelada, perda de brilho superficial e consistência borrachóide foram observadas. A radiografia digital foi capaz de detectar a presença de imagem sugestiva de lesão de cárie através de imagem radiolúcida. Três examinadores calibrados visualizaram todas as imagens obtidas através da inspeção visual e da radiografia digital e foram capazes de distinguir o tecido hígido do afetado por cárie. Foi aplicado o teste estatístico Exato de Fischer

com nível de significância de 5% que confirmou não haver diferença entre os grupos tanto na inspeção visual (G1 e G4 - $p=0,6$, G2 e G5 - $p=1$ e G3 e G6 - $p=1$) como para a radiografia digital (G1 e G4 - $p=1$, G2 e G5 - $p=1$ e G3 e G6 - $p=1$). Tanto os valores de fluorescência a laser quanto os de profundidade de desmineralização (OCT) foram submetidos ao teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) ($p<0,05$). Em relação aos valores obtidos via fluorescência a laser, pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa para o fator tipo de substrato ($p=0,001$), sendo que os espécimes provenientes de dentes erupcionados apresentaram maior valor de fluorescência em relação aos espécimes provenientes de dentes inclusos. Quanto ao OCT, pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa para o fator tipo de substrato ($p=0,163$), para o fator tempo de desafio cariogênico ($p=0,512$) e para a interação entre os fatores ($p=0,148$). Por fim, eletromicrografias foram obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura que confirmaram a presença do tecido afetado por cárie produzido artificialmente em todos os tempos de desmineralização testados, no entanto observou-se desmineralização superficial mais uniforme em dentina afetada por cárie proveniente de dentes inclusos. Assim, podemos concluir que 7 dias de desafio cariogênico é suficiente para obtenção de dentina afetada padronizada a ser utilizada em ensaios laboratoriais e que dentes inclusos forneceram um substrato dentinário mais adequado para utilização no protocolo proposto.

Palavras-chave: Cárie dentária. Diagnóstico. Dentina afetada por cárie. Hipomineralização dentinária.

ABSTRACT

Azevedo CS. Laboratorial method proposal to obtain caries-affected dentin. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

The aim of this in vitro study was to validate a protocol for obtaining standard caries affected-dentine by dentine demineralization process induced by *Streptococcus mutans* biofilm (microbiological approach). Validation methods performed were optical coherence tomography (OCT), visual inspection, laser fluorescence and digital radiography. As all methods were nondestructive, all analysis were performed in the same specimens. A total of 48 human molars (24 erupted and 24 unerupted) were grounded in the occlusal surface to remove enamel and obtain a flat dentin surface. The roots of the teeth were removed and the specimens were cut in the bucco-lingual direction yielding two fragments that were randomized into experimental groups. The dental fragments were protected with acid resistant varnish in half of the occlusal surface (control) and in the other half was produced carious lesions. The experimental groups were composed from two variation factors: period of cariogenic challenge (7, 14 and 21 days) and type of dentin (from erupted or unerupted teeth). Thus six experimental groups were formed: with dentin from erupted teeth - G1 (7 days of cariogenic challenge), G2 (14 days), G3 (21 days), and with dentin from unerupted teeth - G4 (7 days), G5 (14 days) and G6 (21 days). After different periods of cariogenic challenge, the specimens were evaluated on their healthy and caries-affected portions using different diagnostic methods and the results were compared. Visual inspection proved the formation of caries affected dentin as characteristics of the tissue as yellowing, loss of surface gloss and consistency elastic were observed. The digital radiography was able to detect the presence of radiolucent image, suggesting caries. Three calibrated examiners viewed all the images obtained by visual inspection and digital radiography, and were able to distinguish healthy from caries affected dentin. We used the Fisher exact statistical test with a significance level of 5% which confirmed no difference between groups in both visual inspection (G1 and G4 - $p=0.6$; G2 and G5 - $p=1$ and G3 and G6 - $p=1$) and digital radiography (G1 and G4 - $p=1$, G2 and G5 - $p=1$ and G3 and G6 - $p=1$).

Both laser fluorescence values and depth of demineralization (OCT) were subjected to statistical test Analysis of Variance (ANOVA) ($p < 0.05$). Regarding the values obtained by laser fluorescence, a statistically significant difference can be observed for the factor type of substrate ($p = 0.001$), with the erupted teeth specimens with higher fluorescence compared to specimens from unerupted teeth. For OCT, we can observe that there was no statistically significant difference for the factor type of substrate ($p = 0.163$), for the factor length of cariogenic challenge ($p = 0.512$) and interaction between factors ($p = 0.148$). Finally, photomicrographs were obtained by scanning electron microscopy which confirmed the presence of caries affected tissue produced artificially at all demineralization times tested, however a more uniform demineralization surface was observed in caries affected dentin of unerupted teeth. Thus, we conclude that 7 days of cariogenic challenge is sufficient to obtain standard caries affected dentin to be used in laboratory tests and unerupted teeth provided a more suitable substrate for use in this proposed protocol.

Keywords: Dental caries. Diagnosis. Caries-affected dentin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Atendimento às normas da bioética	26
4.2 Seleção dos dentes	26
4.3 Preparo da amostra	26
4.4 Preparo e Montagem dos Fragmentos Dentários para o Desafio Cariogênico	28
4.5 Esterilização da Amostra	29
4.6 Fase Microbiologia	29
4.6.1 Preparo e Armazenamento dos Meios de Cultura	29
4.6.2 Preparo do Caldo Inóculo	30
4.6.3 Determinação da quantidade de bactérias/ml	30
4.6.4 Desafio Cariogênico	31
4.7 Leitura dos resultados através do OCT	32
4.8 Exame com Fluorescência a Laser	33
4.9 Radiografia Digital	34
4.10 Inspeção Visual	34
4.11 Preparo da Amostra para MEV	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Análise Quantitativa	36
5.1.1 Comparação entre dentina hígida e afetada para a Fluorescência a laser e OCT	36
5.1. Fluorescência a Laser	37
5.1.3 OCT	39
5.2 Análise Quantitativa	41
5.2.1 Inspeção Visual	41
5.2.2 Radiografia Digital	42
5.2.3 Tomografia por Coerência Óptica	46
5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	53

6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

A cariologia é uma área da Odontologia que está em constante mudança quanto à filosofia no tratamento das lesões de cárie. Apesar da terapia preventiva ter crescido bastante nos últimos anos, a cárie dental continua a ser uma das doenças crônicas mais prevalente na população.

Quanto ao tratamento restaurador dos dentes afetados por cárie, sabe-se atualmente que não há mais a necessidade de remover totalmente o tecido cariado como preconizava-se antigamente. A dentina afetada por cárie, que é a dentina subjacente à dentina infectada, é um substrato que, quando em eficiente selamento marginal do material restaurador, consegue reverter o processo de desmineralização e reorganiza-se. Assim, este substrato pode ser mantido no assoalho cavitário, evitando uma remoção excessiva do tecido dentário e exposição pulpar.

Grande parte do conhecimento sobre a cárie dental e seu tratamento se deu pelo investimento na pesquisa laboratorial em que diversos assuntos relacionados à área puderam ser investigados. Para tal feito, modelos de formação de lesões de cárie artificial foram criados com o objetivo de entender melhor diversos aspectos, tais como, os efeitos preventivos do flúor, métodos de remoção de tecido cariado e a eficácia na adesão dos materiais restauradores.

No entanto, divergências metodológicas são encontradas em modelos *in vitro* para obtenção de cárie na literatura. Geralmente, os autores optam pela utilização de metodologias químicas, como a técnica do gel acidificado ou na ciclagem de pH, ou por metodologias microbiológicas, que utilizam cepas de microrganismos de cariogenicidade previamente conhecidas para o desenvolvimento de lesões de cárie. Ambas as metodologias são capazes de atingir o objetivo de produzir o tecido desmineralizado, no entanto, a não padronização nas metodologias gera uma dúvida quanto aos resultados obtidos. A literatura mostra que a utilização do método microbiológico resulta em um substrato com características mais próximas às encontradas *in vivo*, levando em consideração o padrão de degradação colágena e aspectos tátil-visuais, tais como, dureza e coloração.

Para tal feito diversos métodos diagnósticos devem validar e caracterizar esse substrato de forma não destrutiva ao espécime.

Existem alguns métodos consagrados para diagnosticar a cárie dental, entre eles inspeção visual, complementada pelo exame radiográfico. Atualmente, a radiografia evoluiu para o sistema digital, possibilitando manipulação das imagens e diminuição na exposição à radiação ionizante. Metodologias inovadoras, tais como, a fluorescência tecidual induzida por luz (DIAGNOdent) e a Tomografia por coerência óptica (OCT) foram criadas nos últimos anos e tem sido utilizadas possibilitando a mensuração e quantificação da profundidade de desmineralização das lesões de cárie.

Interessantemente, apesar da dentina afetada por cárie ser um substrato clinicamente relevante, a maioria dos ensaios laboratoriais na área de dentística é realizada sobre substrato dental hígido. Com o novo olhar que existe sobre o tratamento clínico das lesões de cárie, a adesão é mais freqüentemente realizada sobre dentina afetada por cárie, desmineralizada e passível de remineralização. Esta dentina possui características diferentes da dentina hígida e, conseqüentemente, a camada híbrida com ela formada será diferente da obtida com substrato hígido. Contudo, a obtenção deste substrato afetado por cárie de forma natural dá margem a uma grande variabilidade de resultados. Assim, um protocolo de padronização de obtenção desse substrato laboratorialmente para sua utilização em futuros testes *in vitro* seria de grande contribuição para a área da Dentística.

Sabemos que a situação ideal é a realização de pesquisas clínicas longitudinais de longa duração, mas estas demandam tempo até a sua conclusão e posterior aplicação prática dos resultados obtidos. Assim, estudos laboratoriais realizados sobre substratos cariados ou afetados por cárie produzidos artificialmente são uma importante alternativa para fornecer dados mais próximos e ágil dos alcançados na clínica diária.

Desta forma, este estudo *in vitro* se propôs a validar um protocolo de produção de dentina afetada por cárie padronizada com diferentes métodos de diagnóstico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A cárie dentária é uma doença microbiana que atinge o tecido calcificado da estrutura dentária através de um processo dinâmico, gerando a desmineralização da sua porção inorgânica e destruição da substância orgânica. Esta transformação resulta em perda estrutural dos dentes, havendo a necessidade de realizar técnica Operatória e Restauradora para a reparação desse dano e manutenção da sua função na cavidade bucal. O tratamento da cárie sofreu diversas modificações nos últimos anos, tal fato é justificado pela evolução do conhecimento em relação à doença, como a sua etiologia e progressão.

Com base em características estruturais, o tecido cariado pode ser subdividido em: zona de camada turva ou descolorida, zona translúcida e subtranslúcida. É na zona de descoloração que situa-se a dentina cariada externa, infectada, não remineralizável, morta e desvitalizada, ou seja, a dentina infectada, que apresenta características clínicas de descoloração amarelo-acastanhada de tecido amolecido devido à degradação colágena. A zona translúcida ocupa a maior parte do tecido e é nesta região que encontra-se a dentina cariada interna não infectada, remineralizável, viva e sensível, ou seja, a dentina afetada por cárie. Abaixo da zona translúcida está a zona subtranslúcida, próxima da dentina sadia, onde podem ser encontrados depósitos ácido-resistentes de minerais ocluindo os túbulos dentinários, o que caracteriza uma reação do órgão dentinopulpar frente à ação bacteriana (Fejerskov e Kidd, 2011).

A nova filosofia da mínima intervenção na odontologia restauradora propõe que o tecido cariado seja parcialmente removido, ou seja, somente a dentina infectada por cárie, que é danificada irreversivelmente, deve ser removida (Fejerskov e Kidd, 2011). A dentina afetada por cárie, se presente, deve ser mantida no assoalho da cavidade, que quando bem selada, permitirá que a dentina afetada se remineralize e endureça.

Um trabalho recente de Momoi et al., (2012) respondeu perguntas mais frequentes dos cirurgiões-dentistas quanto ao tratamento das lesões de cárie. Os autores confirmam a técnica da mínima intervenção em que a dentina infectada deve ser completamente removida e a afetada mantida, sendo os fatores dureza superficial e coloração fatores determinantes na detecção do tecido a ser removido,

uma vez que a contagem bacteriana presente em uma dentina cariada dura é muito menor do que em uma dentina amolecida.

Assim, por ser considerada um substrato de estudo com alta relevância clínica, estudos utilizando dentina afetada natural vêm sendo realizados (Pereira et al., 2006; Wang et al., 2006; Ergucu et al., 2009; Komori et al., 2009; Mobarak et al., 2010a; Mobarak et al., 2010b; Scholtanus et al., 2010; Mobarak e El-Badrawy, 2011). Porém, resultados controversos observados são atribuídos a ausência de padronização das lesões de cáries obtidas naturalmente, pois sabe-se das diferenças ultraestruturais nas diferentes zonas do tecido cariado (Pugach et al., 2009; Zanchi et al., 2010). Portanto, estudos nos quais a dentina afetada por cárie é obtida artificialmente, e de forma padronizada, podem contribuir significativamente na execução de estudos *in vitro*.

Marquezan et al., (2009) estudaram os principais métodos artificiais para obtenção de dentina cariada, como a técnica do gel acidificado, de ciclagem de pH e o método microbiológico e verificaram que, apesar da simplicidade das duas primeiras técnicas, o método microbiológico é o que apresenta uma maior semelhança no padrão de degradação colágena quando comparado com lesões naturais. Outros autores (Fontana et al., 1996) consideraram também como vantagens do sistema bacteriano a possibilidade de investigar a etiologia e a prevenção das lesões de cárie, o potencial cariogênico de diversas espécies bacterianas e a cariogenicidade das dietas.

Mesmo assim, diversos estudos que têm a finalidade de avaliar adesão em dentina afetada por cárie utilizam métodos químicos para a produção do substrato padronizado (Kuramoto et al., 2005; Sattabanasuk et al., 2005; Choi et al., 2006; Haj-Ali et al., 2006; Erhardt et al., 2008). No entanto, a técnica utilizada varia bastante na confecção das soluções desmineralizantes e no tempo de indução de cárie não apresentando um padrão e dificultando novamente a interpretação e correlação dos resultados obtidos.

O mesmo problema de padronização da técnica ocorre quando são avaliados os trabalhos que utilizam o método microbiológico para obtenção de dentina afetada padronizada. Enquanto Zanchi et al.,(2010) utilizaram um tempo de 28 dias para a indução de cárie, outros autores (Marquezan et al., 2009; Espejo et al., 2010; Sanabe et al., 2011) optaram por um período de 14 dias. No entanto, um estudo preliminar de Azevedo et al., (2011) mostrou que não há diferença na

profundidade de desmineralização nos diferentes tempos de indução de cárie (7, 14 e 21 dias) quando analisados em tomografia por coerência óptica. Assim, faz-se necessária a análise destas áreas desmineralizadas através de outros métodos de diagnóstico de cárie mais usuais, para permitir a reprodutibilidade dos resultados obtidos em outros laboratórios de pesquisa que não disponham desta tecnologia.

Estudos que realizam desafios cariogênicos, independente do método utilizado, não relatam detalhes acerca da seleção da amostra. Quais os molares que podem ser incluídos na amostra? Dentes inclusos e erupcionados sem distinção entre eles?

A literatura demonstra que próximo ao esmalte os túbulos dentinários apresentam um diâmetro interno de aproximadamente 0,8 μm , junto à polpa o diâmetro é de 3,0 μm . Isto faz com que os túbulos tenham características internas de um cone invertido. Esta diferença de diâmetro tubular parece estar relacionada com o tempo de deposição da dentina na parede interna dos túbulos, a qual ocorre de maneira lenta, porém contínua, podendo ser acelerada através de fatores extrínsecos, tais como, a atrição gerada pela mastigação e até mesmo processo de desenvolvimento de cárie (Fejerskov e Kidd, 2011).

Os dentes para pesquisa são obtidos muito frequentemente em bancos de dentes, onde é difícil detectar sua origem, condição na boca (incluso ou erupcionado), idade do paciente e presença de oclusão com dente antagonista.

A literatura demonstra que a dentina proveniente de dentes inclusos é bastante diferente da obtida de dentes erupcionados (Costa *et al.*, 2002). Em dentes erupcionados há a formação contínua de dentina secundária a partir do momento da erupção, podendo até mesmo haver estímulo para formação de dentina a partir dos esforços mastigatórios e atrição. Consequentemente, o diâmetro dos túbulos dentinários e a permeabilidade da dentina proveniente de dentes inclusos é maior quando comparado à dentina proveniente de dentes erupcionados (Costa *et al.*, 2002), que foram submetidos a maturação pós-eruptiva.

Mjor e Nordahl, (1996) afirmaram que o conhecimento detalhado da estrutura dentinária, e especialmente a respeito dos túbulos dentinários é de extrema importância para entender a permeabilidade dentinária e interpretar os resultados das investigações a respeito da adesão de materiais restauradores em dentina. Assim, os resultados divergentes a respeito da adesão em dentina devem

estar relacionados a diferenças no substrato dental e não nas diferenças dos produtos e técnicas investigados.

Pensando nesses detalhes referentes à dentina, decidimos investigar neste trabalho se dentes inclusos e erupcionados se comportam de maneira diferente frente ao desafio cariogênico.

O método ideal de detecção de lesões de cárie mede sua profundidade, que é importante no controle da progressão de lesões ativas e na tomada de decisões clínicas. O diagnóstico incorreto pode resultar em decisões erradas, especialmente no que diz respeito à intervenção operatória (Rindal *et al.*, 2010).

A maneira mais fácil e rápida de detectar lesões de cárie é a inspeção visual. Ela é geralmente feita a olho nu, sob iluminação e em campo seco, podendo-se utilizar fotografias auxiliares para tornar este registro permanente. Autores consideram que uma boa prática diagnóstica para a cárie dentinária envolve a seleção do método tátil-visual para obter informações básicas como: lesão cavitada ou não cavitada e lesão ativa ou inativa (Fejerskov e Kidd, 2011). Estes fatores determinam diretamente as opções de tratamento, que também variam quando analisados a atividade da lesão, dieta e condições do hospedeiro.

Através da inspeção visual características superficiais do substrato analisado podem ser descritos e identificados, no caso de uma dentina afetada por cárie observa-se uma dentina com coloração amarelada que apresenta certa resistência e consistência borrachóide à sondagem, diferentemente de uma dentina infectada que é extremamente amolecida e facilmente removida com a característica de um tecido fragmentado.

No entanto, somente com a inspeção visual é difícil de se obter um diagnóstico preciso, por se tratar de um método subjetivo e de não possibilitar a determinação do estágio e profundidade de desmineralização (de Paula *et al.*, 2011), podendo gerar um diagnóstico equivocado (Na *et al.*, 2009). Assim, a utilização de um exame complementar torna-se essencial.

Como exame complementar de diagnóstico da inspeção visual, a radiografia intra-oral é o sistema de diagnóstico por imagem mais popular na odontologia (Na *et al.*, 2009). Através dele as imagens sugestivas de cárie podem ser observadas como regiões radiolúcidas, podendo ajudar a estimar a profundidade da lesão, porém não é considerado totalmente preciso.

Atualmente, a técnica radiográfica evoluiu para o sistema digital, em que é possível a manipulação das imagens e melhor visualização da região a ser investigada. Outras vantagens do sistema radiográfico digital são as facilidades para melhora da densidade e contraste das imagens, menor dose de radiação, soluções de processamento não envolvidos e, por fim, técnica mais rápida (Araki *et al.*, 2010). Apesar da técnica radiográfica ser bastante popular na odontologia, sabe-se que as imagens sugestivas de lesão de cárie só são observadas a partir de certo estágio de desmineralização (Ricketts *et al.*, 2002; Na *et al.*, 2009), dificultando o diagnóstico precoce de lesões iniciais. Além disso, por se tratar de um método subjetivo e depender da experiência clínica do cirurgião-dentista, esse método tem apresentado baixa reprodutibilidade (Fung *et al.*, 2004), ou seja, apresenta baixo grau de estabilidade quando uma radiografia é repetida sob condições idênticas em comparação com a anterior. Por esse motivo, com a dificuldade na detecção precoce e determinação da profundidade das lesões de cárie, novos métodos vêm sendo desenvolvidos para auxiliar no processo diagnóstico (Fejerskov e Kidd, 2011), dentre eles, a fluorescência tecidual induzida por luz.

Este se baseia na captação da fluorescência emitida pelos componentes orgânicos pigmentados dos tecidos cariados quando iluminados por um laser diodo (alumínio, gálio, índio e fósforo –AlGaInP) de comprimento de onda de 655nm, situado no comprimento de onda vermelho do espectro visível (Markowitz *et al.*, 2012). O laser diodo chega a superfície do dente através de uma guia luminosa central contida em uma haste óptica flexível. A fluorescência emitida pelos componentes orgânicos do tecidoariado é captada por uma fibra e transformada em valores numéricos. A luz refletida e a luz ambiente são eliminadas por um filtro que bloqueia comprimentos de onda abaixo de 680nm. Esse filtro absorve a excitação dispersada de outros comprimentos de onda mais curtos e transmite a fluorescência com comprimento de onda mais longo (Rodrigues *et al.*, 2009a).

A fluorescência a laser é um método quantitativo e não-destrutivo, além de portátil e de fácil utilização. Além disso, o aparelho tem apresentado bons resultados na detecção e quantificação de lesões oclusais de cárie e em superfícies lisas (Lussi *et al.*, 2004; Bader e Shugars, 2006; Lussi e Hellwig, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009b; de Paula *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Markowitz *et al.*, 2012). Outro fator positivo deste método é a sua boa reprodutibilidade intraexaminador *in vitro* e *in vivo*, indicando consistência das medidas realizadas pelo equipamento,

reforçando a afirmação de que este pode ser utilizado para monitorar o processo carioso (Lussi e Hellwig, 2006).

Embora muitas evidências mostrem resultados promissores na utilização da fluorescência a laser, alguns fatores importantes dificultam a interpretação dos valores obtidos (Bader e Shugars, 2006), tais como, placa dental, cálculo, resquícios de dentifrício, dentes não-cariados hipomineralizados ou calibração incorreta do aparelho (Sheehy et al., 2001; Mendes et al., 2004; Lussi et al., 2005; Lussi e Reich, 2005), podendo causar resultados falso-positivos. As condições de hidratação dos dentes também são relevantes, uma vez que pode haver diferenças no resultado obtido através das medições longitudinais (Shi *et al.*, 2000).

Para aumentar a precisão diagnóstica, modalidades por imagem como ultra-som, tomografia computadorizada e ressonância magnética são exemplos de tecnologias que tiveram um impacto significativo na pesquisa médica e na prática clínica. A técnica de tomografia por coerência óptica (OCT) é uma técnica de imageamento óptico, que pode atingir uma resolução espacial até 10 vezes maior que o ultra-som (Fujimoto *et al.*, 1995). Ela é baseada em princípios de interferometria de baixa coerência, é em muitos aspectos semelhante à técnica de ultra-som, mas utiliza luz ao invés de ondas acústicas (Otis et al., 2000a; Otis et al., 2000b).

A importância de um método para avaliar quantitativamente a perda mineral de um dente, não terá utilidade se não houver um completo conhecimento das propriedades ópticas do esmalte e da dentina, como refletividade, espalhamento e interação luz-tecido (Featherstone, 1996; Chen et al., 2005). Devido a características estruturais diferentes, o esmalte e a dentina apresentam comportamento distinto frente a sua visualização no OCT. A profundidade de espalhamento da dentina é geralmente considerada menor do que o esmalte. As imagens de esmalte geralmente têm informações mais ricas e uma maior profundidade de análise, enquanto as imagens em dentina geralmente têm um perfil de menor profundidade. Esta característica tem sido atribuída pelo maior coeficiente de dispersão da dentina. No entanto, apesar de apresentarem essas diferenças em ambos os tecidos, o OCT tem capacidade de ser utilizado na pesquisa odontológica e no diagnóstico de cárie, uma vez que lesões de cárie apresentam informações

mais ricas de textura e de maior contraste quando comparado ao tecido hígido (Chen *et al.*, 2005).

A técnica de OCT para detecção de cárie é um método não-invasivo que pode acompanhar o processo de desmineralização dos tecidos dentais (Jones *et al.*, 2006b; Jones *et al.*, 2006a). Apresenta vantagens como, por exemplo, a utilização da luz no infra-vermelho próximo ao invés de radiação ionizante (raios-X), que é capaz de causar mutagênese (Na *et al.*, 2009). Através desta técnica pode-se obter uma resolução da imagem da estrutura estudada em torno de 10 µm com uma profundidade de penetração típica de 1,5 mm (Baumgartner *et al.*, 2000).

Diversos estudos utilizam a técnica do OCT para analisar lesões artificiais de cáries tanto em esmalte como em dentina, assim como, analisar a ação de agentes remineralizadores avaliando a profundidade de desmineralização (Freitas *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2006a; Freitas *et al.*, 2009; Manesh *et al.*, 2009b; Manesh *et al.*, 2009a; Azevedo *et al.*, 2011). Os bons resultados obtidos através dessa técnica mostram sua aplicação promissora e sua futura utilização *in vivo* no monitoramento de lesões de cárie.

Neste trabalho pretende-se desenvolver em laboratório, através do método microbiológico, um substrato padronizado – dentina afetada por cárie - que possa ser utilizado em futuros ensaios *in vitro*. Para tanto, métodos não invasivos de diagnóstico de cárie que sejam capazes de detectar a profundidade e extensão das lesões produzidas devem ser utilizados para não interferir nas características do tecido afetado obtido.

3 PROPOSIÇÃO

- I. Investigar a eficiência de diferentes métodos de diagnóstico de cárie - inspeção visual, radiografia digital, fluorescência a laser e tomografia por coerência óptica – na distinção entre dentina afetada por cárie e dentina hígida;
- II. Investigar a influência da procedência do substrato dentinário – dente incluso ou erupcionado – na desmineralização obtida com o desafio cariogênico através do método microbiológico;
- III. Investigar o efeito do tempo de desafio cariogênico através do método microbiológico – 7, 14 e 21 dias – na obtenção de dentina afetada padronizada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Atendimento às normas de bioética

O Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e mediante o parecer de aprovação Protocolo nº 11/2011 (ANEXO A) e adendo nº195/11 (ANEXO B).

4.2 Seleção dos dentes

48 molares humanos hígidos, sendo 24 erupcionados e 24 inclusos foram previamente examinados através de lupa para detectar defeitos de esmalte e/ou lesões de cárie, sendo que a presença destes determinaram a exclusão do elemento da amostra. Os dentes selecionados foram limpos com curetas periodontais e taça de borracha com pasta de pedra pomes-água e estocados em água destilada a temperatura de 4°C até o momento do uso.

4.3 Preparo da amostra

As faces oclusais íntegras dos dentes foram lidas por fluorescência a laser utilizando o aparelho DIAGNOdent Pen 2190 (Kavo, Biberach, Alemanha) para garantir a ausência de qualquer processo de desmineralização (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Leitura inicial da fluorescência a laser na face oclusal dos dentes íntegros

O aparelho foi calibrado antes do uso segundo instruções do fabricante. A sonda foi ajustada individualmente para cada dente, segurando a ponta da sonda contra uma superfície lisa e pressionando o botão até a emissão de um som determinando o final da calibração.

A superfície oclusal do dente foi seca com auxílio de uma seringa tríplice por 5 segundos e em seguida a ponta da sonda (indicada para fissuras e superfícies lisas) foi posicionada perpendicularmente sobre a região selecionada. Cada região foi lida 3 vezes como descrito anteriormente e a média dos valores obtidos determinou o valor definitivo atribuído a cada espécime, confirmando a ausência de desmineralização.

Em seguida, os molares foram lixados na face oclusal para remoção do esmalte com exposição da dentina oclusal, obtendo uma superfície plana. Posteriormente, a porção radicular dos 48 elementos dentais foi removida com auxílio de disco diamantado de aço em baixa rotação e sob refrigeração. Cada disco de dentina foi novamente seccionado no sentido vestibulo-lingual obtendo-se dois fragmentos.

Foi realizada nova leitura da amostra utilizando o aparelho de fluorescência a laser DIAGNOdent Pen 2190 (Kavo, Biberach, Alemanha) na superfície plana oclusal dos fragmentos dentais (Figura 4.2).

A superfície do espécime foi seca com auxílio de uma seringa tríplice por 5 segundos e em seguida a ponta da sonda (indicada para fissuras e superfícies lisas) foi posicionada perpendicularmente sobre a superfície plana de dentina. Cada região foi lida 3 vezes como descrito anteriormente e a média dos valores obtidos determinou o valor definitivo.

Figura 4.2 – Leitura fluorescência a laser na superfície plana oclusal dos fragmentos dentais

Dos noventa e seis fragmentos obtidos para compor a amostra, 12 foram excluídos por apresentarem exposição pulpar e/ou presença de dentina

reacional. Desta forma, os 84 fragmentos dentários (42 erupcionados e 42 inclusos), foram alocados aleatoriamente em 6 grupos experimentais ($n=14$), de acordo com os fatores de variação tipo de substrato (incluso ou erupcionado) e tempo de desafio cariogênico (7, 14 ou 21 dias).

4.4 Preparo e Montagem dos Fragmentos Dentários para o Desafio Cariogênico

Os espécimes foram totalmente protegidos com verniz ácido resistente, exceto na metade da face oclusal, região em que foi produzida a lesão de cárie. Todos os corpos de prova foram devidamente identificados com auxílio de etiquetas (Figura 4.3), fragmentos provenientes de dentes erupcionados foram protegidos com verniz ácido resistente vermelho enquanto que os provenientes de dentes inclusos foram protegidos com verniz rosa.

Os fragmentos foram presos com fios de aço e resina acrílica, montando-se estruturas denominadas “árvores”, que permitiram que todos os espécimes ficassem fixados à tampa dos recipientes de vidro e submersos no mesmo meio de cultura, numa altura similar, sem que ficassem em contato uns com os outros ou com a parede do recipiente (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Fragmentos dentais devidamente identificados protegidos com verniz ácido resistente e presos nas estruturas denominadas “árvores”

As “árvores” foram presas nos recipientes de vidro que foram utilizados durante o desafio cariogênico e ficaram imersas em 200 ml de água destilada para posterior esterilização.

Foram confeccionadas 3 “árvores” que continham dois grupos experimentais, ou seja, os espécimes de dentes erupcionados e inclusos ficaram dispostos na mesma árvore variando o tempo de desafio cariogênico (Quadro 4.1).

“ÁRVORES”	GRUPOS
1 (7 dias)	G1 e G4
2 (14 dias)	G2 e G5
3 (21 dias)	G3 e G6

Quadro 4.1 - Disposição dos grupos experimentais nas 3 “árvores”

4.5 Esterilização da Amostra

Por se tratar de um modelo experimental bacteriano para formação de dentina afetada por cárie *in vitro*, os espécimens deviam estar livre de contaminantes.

Os 3 recipientes contendo as “árvores” foram embalados em envelopes para autoclave e todo este conjunto foi submetido à radiação Gama (dose de 25 Kgy), capaz de esterilizar a amostra sem prejudicar os tecidos dentais e sem desidratá-los.

4.6 Fase Microbiológica

4.6.1 Preparo e Armazenamento dos Meios de Cultura

Durante a fase microbiológica com *S. mutans* foram utilizados dois tipos de meio de cultura: TSB e TSA.

O TSB, meio de cultura líquido, foi preparado segundo as instruções do fabricante e enriquecido com 5% de sacarose. A esterilização deste meio foi realizada em autoclave a 119° durante 20 minutos, nos próprios recipientes que receberam as árvores e estocados em temperatura ambiente até o momento do uso.

O TSA, um meio sólido, foi preparado segundo as instruções do fabricante e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. A seguir, dentro do fluxo laminar, foi transferido para placas de petri (cerca de 20ml por placa), que foram mantidas 24 horas em temperatura ambiente, a fim de verificar se não houve contaminação durante a manipulação. Após esse período, se não houve nenhum crescimento de microorganismos nas placas, estas foram estocadas em geladeira até o momento do uso.

4.6.2 Preparo do Caldo Inóculo

Com o auxílio de uma micropipeta, 100 µl de uma cepa de *S. mutans* UA159 com cariogenicidade previamente conhecida mantida congelada em glicerol foram transferidos para um tubo falcon contendo 15 ml de TSB enriquecido com 5% de sacarose. Posteriormente, este tubo foi incubado em estufa bacteriológica por 24h em temperatura de 37°C.

Após o período de 24 horas, o crescimento bacteriano foi verificado pela turvação do caldo no tubo. O caldo inóculo foi semeado em uma placa contendo TSA através da técnica de esgotamento com o auxílio de uma alça plástica estéril e descartável. A placa semeada foi então incubada por 48 horas em uma estufa de CO₂, criando uma atmosfera de microaerofilia, favorável ao desenvolvimento do *S. mutans*. Este procedimento confirmou que as colônias eram somente de *S. mutans* e que não haviam outros contaminantes (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Placa de TSA confirmou ausência de contaminação e crescimento bacteriano de *S. mutans*

4.6.3 Determinação da quantidade de bactéria/ml

O novo caldo inóculo preparado mostrou-se turvo após 24 horas e foi possível estimar a quantidade de bactérias presente em 1ml de caldo inóculo. Isto foi realizado através da medição da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm. O meio de cultura sem o inóculo foi considerado o parâmetro zero e o valor obtido no caldo inóculo foi de 0,829.

Para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) 0,5ml do caldo inóculo foi misturado a 4,5ml de água peptonada e depois de misturados, outros 0,5ml da diluição foram transferidos a outros 4,5ml de água peptonada e assim sucessivamente até gerar diluições 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000. Das três últimas diluições foi inoculado 25µl sobre placas contendo TSA em triplicata. As placas foram armazenadas em uma estufa de CO₂ e após 48 horas elas foram analisadas. A diluição que melhor apresentou condições para a contagem das UFC foi a de 1:10000. A média das UFC calculada foi igual a $3,3 \times 10^8$.

4.6.4 Desafio cariogênico

Cada recipiente de vidro contendo 200 ml de TSB enriquecido com 5% de sacarose recebeu 2 ml do caldo inóculo, assim todos os grupos experimentais receberam a alíquota proveniente do mesmo caldo inoculo. Cada árvore, previamente esterilizada foi transferida para os recipientes e vedada pela tampa

rosqueável em que elas estavam presas. As árvores, a cada 24 horas, foram transferidas para um novo meio de cultura e 2 ml do caldo crescido também foram transferidos. Todo este procedimento descrito anteriormente foi realizado em fluxo laminar.

Durante este período foram realizados testes para verificar a ausência de contaminação. O caldo foi semeado utilizando-se a técnica de esgotamento em uma placa contendo TSA, que permaneceu incubada a 37°C por 48 horas.

Finalizado o período do desafio cariogênico de 7 dias para os grupos G1 e G3, 14 dias para os grupos G2 e G4 e 21 dias para os grupos G3 e G6, os fragmentos dentários foram removidos dos fios de aço que os prendiam e a placa aderida à superfície foi removida cuidadosamente com gaze (Figura 4.5). Os espécimes foram lavados com água deionizada e armazenados individualmente segundo a identificação realizada previamente ao início da fase microbiológica, estes foram armazenados em água deionizada, em temperatura de 4°C até o início dos métodos diagnósticos.

Imediatamente antes do início das análises, o verniz ácido resistente presente na metade das superfícies oclusais dos espécimes foi removido.

Figura 4.5 – Presença de biofilme dental na superfície dos espécimes

4.7 Leitura dos resultados através do OCT

A avaliação do processo de desmineralização foi realizado pela técnica de tomografia por coerência óptica (OCT), que utiliza o interferômetro Michelson promovendo uma imagem de secção transversal do espalhamento da luz nos tecidos.

Utilizou-se um sistema de OCT (OCP930SR, Thorlabs) composto por um led superluminescente operando em 930 nm, com resolução, no ar, lateral e longitudinal de 6,0 μm , capaz de apresentar até 8 imagens por segundo. O sistema dispõe de uma ponta em fibra óptica capaz de alcançar as amostras facilmente, sem a necessidade de contato entre a ponta e as amostras (Figura 4.6). A luz conduzida pela fibra óptica foi dividida em dois feixes, um enviado para o espelho de referência e o outro levado até a amostra, possibilitando a formação de 4 imagens por segundo, assim promoveu imagens em tempo real (2000 X 512 pixels; equivalente a largura X altura de 6000 X 1581 μm^2).

As imagens foram adquiridas na região central da janela de exposição, gerando imagens da região exposta ao desafio cariogênico (lado direito da imagem), bem como a região de substrato hígido (lado esquerdo da imagem). As imagens obtidas em escala nos diferentes tempos de desafio cariogênico (7, 14 e 21 dias) pelo OCT foram analisadas comparativamente, quanto a profundidade da desmineralização e descritas qualitativamente.

O software utilizado para a mensuração da profundidade de desmineralização foi o Image J (National Institute of Mental Health- Bethesda, MD, EUA), que foi capaz de quantificar a profundidade de desmineralização fornecendo valores em μm . Em cada imagem 5 mensurações foram realizadas na região desmineralizada, cada uma distanciando 500 μm entre si. Os valores obtidos geraram um valor médio de profundidade de desmineralização para cada espécime, sendo este o valor final utilizado para posterior análise estatística.

Figura 4.6 – Espécime posicionado em lâmina de vidro para visualização no OCT

4.8 Exame com Fluorescência a Laser

O exame com fluorescência a laser foi realizado tanto na superfície controle (hígida), como na superfície em que houve a desmineralização pelo processo microbiológico, com o objetivo de obter valores individualizados para cada fragmento. A superfície do dente foi seca e a sonda ajustada para cada dente separadamente, segurando a ponta contra a dentina hígida e pressionando o botão até que houvesse a emissão de um som determinando o final da calibração. Em seguida, a ponta da sonda (indicada para fissuras e superfícies lisas) foi posicionada perpendicularmente sobre a região da dentina desmineralizada. Cada região foi lida 3 vezes como descrito anteriormente e a média dos valores obtidos determinou o valor definitivo para cada espécime.

4.9 Radiografia Digital

As imagens foram obtidas utilizando-se a técnica radiográfica interproximal digital pelo sistema IDA – Imagem Digital Avançada (Dabi Atlante – São Paulo, SP, Brasil), utilizando um aparelho de Raio X operando a 70 KVp e 1 mA. O sistema IDA é um sistema digital por escaneamento, tratamento e arquivamento de imagens radiográficas digitais. As imagens são capturadas através de um sensor, com tamanho similar a de um filme radiográfico convencional.

Os espécimes foram colocados em um posicionador, especialmente confeccionado pelo fabricante para promover uma posição padronizada. A distância foco-sensor foi de 21 cm e as imagens capturadas foram diretamente digitalizadas e apresentadas no software do sistema.

As imagens obtidas permitiram a visualização de imagem sugestiva de lesão de cárie, sendo assim descritas qualitativamente.

As imagens obtidas foram visualizadas em computador, com boa iluminação, por três examinadores calibrados e estes foram questionados quanto a sua habilidade de diferenciar a dentina hígida da afetada por cárie.

4.10 Inspeção Visual

A inspeção visual foi realizada a partir da utilização de boa iluminação artificial e secagem com a seringa tríplice por 5 segundos. As imagens da lesão de cárie artificial produzida, bem como da dentina adjacente hígida foram registradas através de fotografias padronizadas obtidas em câmera de vídeo acoplada juntamente ao aparelho de OCT, sendo que todas foram obtidas na mesma distância, e posteriormente descritas qualitativamente.

As imagens obtidas foram visualizadas em computador, com boa iluminação, por três examinadores calibrados e estes foram questionados quanto a sua habilidade de diferenciar a dentina hígida da afetada por cárie.

4.11 Preparo da Amostra para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após os métodos de análise não-invasivos, dois espécimes de cada grupo foram analisados em microscopia eletrônica de varredura a fim de obter imagens da dentina afetada por cárie obtida artificialmente, e da dentina hígida.

Os espécimes foram imersos individualmente em solução de Glutaraldeído 2,5% por 24h. Findo este tempo, eles foram lavados com solução tampão de fosfato de sódio (PBS) por 15 minutos, sendo realizada a troca desta solução por 3 vezes, totalizando um tempo total de 1h, após o qual, os espécimes foram lavados com água destilada por 1 minuto. Em seguida, todos os espécimes foram desidratados em série decrescente de etanol: Álcool 30% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 50% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 70% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 90% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 96% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool Absoluto por 20min (quatro imersões de 5min). Para secagem dos espécimes foi utilizado hexadimetil disilazona (HMDS – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 20min e secos com papel absorvente.

Após o preparo para microscopia, cada espécime foi colado com fita dupla face em stubs de alumínio e cobertos com fina película de ouro e então observados num microscópio eletrônico de varredura (JEOL 6460 – LV, Jeol Ltd. Tokio, Japão – FAPESP Proc.#00/08231-1) pertencente ao Laboratório de Filmes Finos do IFUSP, em aumento padronizado de 30, 50, 200 e 400 vezes.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Quantitativa

5.1.1 Comparação entre dentina hígida e afetada para a fluorescência a laser e OCT

Inicialmente, tivemos o interesse em verificar se os valores de fluorescência obtidos na dentina hígida e na dentina afetada através da fluorescência a laser foi diferente estatisticamente (Tabela 5.1), assim como no OCT em que foi avaliada a profundidade de desmineralização da dentina afetada em comparação com o padrão de espalhamento obtido na dentina hígida (Tabela 5.2). O teste utilizado foi o teste t-Student para amostras emparelhadas, considerando um nível de significância de 5%. Para as duas metodologias foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Tabela 5.1 - Estatística descritiva para a fluorescência a laser

Diagnodent	n	média	mediana	desvio padrão	mínimo	máximo
Dentina Hígida	84	0,83	0,67	0,82	0	3,00
Dentina Afetada	84	10,21	9,00	4,96	3	30,67

Tabela 5.2 - Estatística descritiva para o OCT

OCT	n	média	mediana	desvio padrão	mínimo	máximo
Profundidade de desmineralização Dentina Afetada	84	274,1	273,2	28,0	201,1	340,4
Padrão de espalhamento Dentina Hígida	84	205,1	197,2	34,7	148,6	333,4

Posteriormente, os dados numéricos, obtidos através da avaliação feita com o método de fluorescência a laser (DIAGNOdent) e através da mensuração da profundidade de desmineralização da dentina, em μm , com OCT foram avaliados

estatisticamente, utilizando Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores, adotando $p < 0,05$.

5.1.2 Fluorescência a laser

Em relação aos valores obtidos via fluorescência a laser, pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa para o fator tipo de substrato ($p=0,001$). Contudo, para o fator tempo de desafio cariogênico ($p=0,132$) e para a interação entre os fatores ($p=0,616$) não foi detectada diferença estatisticamente significativa. Os resultados evidenciam que, em média, os grupos que contém fragmentos provenientes de dentes erupcionados (G1, G2 e G3) apresentam valores maiores de medida de fluorescência a laser do que os grupos que contém fragmentos provenientes de dentes inclusos (G4, G5 e G6) (Tabela 5.3 e Figura 5.1).

Tabela 5.3 - Estatística descritiva para a fluorescência a laser

	Valores	Tempo		
	Diagnodent	7 dias	14 dias	21 dias
Erupcionado	N	14	14	14
	Média	11,4	10,6	14,0
	Mediana	11,5	10,0	12,3
	desvio padrão	6,3	3,3	7,7
	Mínimo	3,0	5,7	7,0
	Máximo	25,0	15,3	30,7
Incluso	N	14	14	14
	Média	7,7	8,3	9,3
	Mediana	7,7	8,2	9,2
	desvio padrão	2,1	2,7	2,7
	Mínimo	3,7	4,0	3,3
	Máximo	11,0	12,0	14,7

Figura 5.1 – Comparação ilustrativa das médias de fluorescência a laser, para a interação de dois fatores de variação (tipo de desafio cariogênico e tempo de desmineralização), pelo teste de ANOVA com nível de significância de 5%

5.1.3 OCT

Em relação aos valores obtidos via OCT, pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa para o fator tipo de substrato ($p=0,0,163$), para o fator tempo de desafio cariogênico ($p=0,512$) e para a interação entre os fatores ($p=0,148$) (Tabela 5.4 e Figura 5.2).

Tabela 5.4 – Estatística descritiva para o OCT

	Profundidade de desmineralização – OCT	Tempo		
		7 dias	14 dias	21 dias
Erupcionado	N	14	14	14
	Média	280,9	274,1	280,1
	Mediana	276,5	274,0	274,0
	desvio padrão	29,1	18,2	27,0
	Mínimo	231,9	235,4	221,0
	Máximo	335,4	306,2	322,0
Incluso	N	14	14	14
	Média	257,5	280,0	272,2
	Mediana	254,5	279,3	271,5
	desvio padrão	31,0	25,0	32,9
	Mínimo	219,8	236,8	201,1
	Máximo	340,4	333,0	329,4

Figura 5.2 – Comparação ilustrativa das médias de profundidade de desmineralização, para a interação de dois fatores de variação (tipo de substrato e tempo de desmineralização), pelo teste de ANOVA com nível de significância de 5%

5.2 Análise Qualitativa

5.2.1. Inspeção Visual

As imagens obtidas através de fotografia foram analisadas por três examinadores calibrados e estes foram questionados quanto a sua habilidade de diferenciar a dentina hígida da afetada por cárie.

As imagens mais representativas dos grupos experimentais provenientes de dentes inclusos e erupcionados estão apresentadas na figura 5.3. Em todos os grupos experimentais foi possível diferenciar a dentina hígida da dentina afetada por cárie. Características como mudança na coloração, no brilho de superfície e na rigidez do tecido foram detectadas, com a dentina afetada apresentando-se mais amarelada e opaca.

Os examinadores foram capazes de distinguir a dentina afetada por cárie da dentina hígida através do método de inspeção visual para todos os grupos experimentais com porcentagens que variaram entre 78,5 e 100% (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Porcentagem de capacidade de distinguir os tecidos dentinários nos grupos experimentais através da inspeção visual

Grupos experimentais	Porcentagem
G1	92,8%
G2	85,7%
G3	92,8%
G4	78,5%
G5	100%
G6	100%

Para detectar se havia diferença estatisticamente significativa entre grupos experimentais com diferentes porcentagens foi aplicado o teste estatístico Exato de Fischer com um nível de significância de 5%. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa quando os grupos foram comparados: G1 e G4 ($p=0,6$), G2 e G5 ($p=1$) e G3 e G6 ($p=1$).

5.2.2. Radiografia Digital

As imagens obtidas através da radiografia digital foram analisadas por três examinadores calibrados e estes foram questionados quanto a sua habilidade de diferenciar a dentina hígida da afetada por cárie.

As imagens mais representativas dos grupos experimentais provenientes de dentes inclusos e erupcionados estão apresentadas na figura 5.3. Em todos os espécimes dos grupos experimentais foi possível distinguir a dentina hígida da afetada por cárie. Nas imagens obtidas através do sistema de radiografia digital observou-se uma área radiolúcida característica de tecido desmineralizado, além de leve perda de estrutura.

Os examinadores foram capazes de distinguir a dentina afetada por cárie da dentina hígida através do método de radiografia digital para todos os grupos experimentais com porcentagens que variaram entre 92,8 e 100% (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Porcentagem de capacidade de distinguir os tecidos dentinários nos grupos experimentais através da radiografia digital

Grupos experimentais	Porcentagem
G1	100%
G2	100%
G3	92,8%
G4	100%
G5	100%
G6	100%

Para detectar se havia diferença estatisticamente significativa entre grupos experimentais com diferentes porcentagens foi aplicado o teste estatístico Exato de Fischer com um nível de significância de 5%. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa quando os grupos foram comparados: G1 e G4 ($p=1$), G2 e G5 ($p=1$) e G3 e G6 ($p=1$).

Figura 5.3 – Imagens representativas da inspeção visual e radiografia digital de cada grupo experimental. Imagens A, B, C, D, E, F – Imagem compatível com dentina hígida na região esquerda ao lado do asterisco (*), do lado direito observa-se imagem compatível com dentina afetada por cárie que, quando comparada com a dentina hígida, apresenta-se com menor brilho de superfície e mais amarelada. Imagens G, H, I, J K, L – Seta amarela indica limite entre dentina hígida e afetada. Em todos espécimes observa-se clara perda tecidual na região à esquerda da seta, que corresponde à região de dentina afetada por cárie. Nesta mesma região, detecta-se radiolucidez característica de desmineralização

Grupos	Inspeção Visual	Radiografia Digital
G1	A	G
G2	B	H
G3	C	I
G4	D	J
G5	E	K
G6	F

5.2.3. Tomografia por Coerência Óptica

O OCT pode gerar três tipos de imagens: tradicional (similar à gerada por um aparelho de ultrassom), invertida e colorida (branca, com a região desmineralizada em cinza ou preto). No presente estudo, as imagens do tipo tradicional, colorida e invertida foram obtidas nos 84 espécimes. Os três tipos de imagens de cada espécime para cada grupo foram selecionados para ilustrar as características do OCT nos fragmentos dentais submetidos ao desafio cariogênico (Figuras 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9). Todas as figuras apresentam uma barra vertical que divide a superfície de dentina em desmineralizada (lado direito) e hígida (lado esquerdo).

A profundidade de desmineralização pôde ser detectada pelo OCT, tanto nos dois tipos de substrato utilizados, quanto nos diferentes tempos de desmineralização, e é indicada através de setas nas imagens apresentadas. Além disso, a profundidade de desmineralização se deu de forma similar em todos os grupos experimentais, detectando-se também leve perda estrutural em todos os espécimes analisados.

Figura 5.4 – Imagens obtidas através do OCT no grupo 1. A barra vertical separa a dentina hígida da afetada por cárie obtida artificialmente. As setas apontam a região desmineralizada da dentina afetada por cárie

Figura 5.5 – Imagens obtidas através do OCT no grupo 2. A barra vertical separa a dentina hígida da afetada por cárie obtida artificialmente. As setas apontam a região desmineralizada da dentina afetada por cárie

Figura 5.6 – Imagens obtidas através do OCT no grupo 3. A barra vertical separa a dentina hígida da afetada por cárie obtida artificialmente. As setas apontam a região desmineralizada da dentina afetada por cárie

Figura 5.7 – Imagens obtidas através do OCT no grupo 4. A barra vertical separa a dentina hígida da afetada por cárie obtida artificialmente. As setas apontam a região desmineralizada da dentina afetada por cárie

Figura 5.8 – Imagens obtidas através do OCT no grupo 5. A barra vertical separa a dentina hígida da afetada por cárie obtida artificialmente. As setas apontam a região desmineralizada da dentina afetada por cárie

Figura 5.9 – Imagens obtidas através do OCT no grupo 6. A barra vertical separa a dentina hígida da afetada por cárie obtida artificialmente. As setas apontam a região desmineralizada da dentina afetada por cárie

5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias foram obtidas em 4 aumentos distintos: 30, 50, 200 e 400 vezes.

Em um aumento de 30 vezes, em todos os grupos experimentais, as imagens se distinguem claramente em duas metades com características bastante distintas:

- Lado direito: dentina hígida, observa-se a camada de esfregaço recobrimdo toda superfície de dentina, com ranhuras observadas características do desgaste produzido pelas lixas em superfície regular e lisa (Figuras 5.10 A, 5.11 A, 5.12 A, 5.13 A, 5.14 A e 5.15 A).
- Lado esquerdo: dentina afetada, houve desmineralização na superfície gerando irregularidades e microcavitações em alguns grupos (setas amarelas nas figuras 5.10 A, 5.13 A, 5.14 A). Na figura 5.10 A observa-se ainda no limite com a dentina hígida a presença de biofilme (seta vermelha).

Nos outros aumentos obtidos as fotomicrografias apresentam-se separadas quanto ao tipo de dentina, afetada ou hígida.

Em todos os grupos experimentais a dentina hígida apresentou as mesmas características morfológicas nos aumentos padronizados de 50, 200 e 400X. Superfícies planas, regulares e marcadas por ranhuras, provenientes de desgaste com lixas, foram observados nos aumentos de 50 e 200X, correspondendo às figuras 5.10 C, 5.10 E; 5.11 C, 5.11 E; 5.12 C, 5.12 E; 5.13 C, 5.13 E; 5.14 C, 5.14 E; 5.15 C e 5.15 E. Em aumento de 400X, a abertura de alguns túbulos dentinários pôde ser detectada (setas verdes nas figuras 5.10 G, 5.11 G, 5.12 G, 5.13 G, 5.14 G, 5.15 G) muito provavelmente pela utilização de solução aquosa com hipoclorito de sódio no preparo dos espécimes para microscopia.

Em um aumento de 50X na figura 5.10 B identificamos a presença de resíduos de biofilme (seta vermelha), além das microcavidades (seta amarela), o restante da superfície apresenta uma característica superficial heterogênea, causada pela desmineralização dos produtos ácidos bacterianos, característica também observada nas figuras 5.11 B, 5.12 B, 5.13 B, 5.14 B e 5.15 B.

Em um aumento de 400X as figuras 5.10 F, 5.11 F, 5. 13 F e 5. 14 F não apresentaram diferenças, todas mostraram clara desmineralização expondo a abertura dos túbulos dentinários em toda extensão da imagem e superfície irregular

Levanto em consideração o tipo de substrato, os grupos G1 e G4 (7 dias de desafio cariogênico em dentina proveniente de dentes erupcionados e incusos, respectivamente), nas figuras 5.10 D e 5.13 D observa-se que a superfície irregular do primeiro grupo não é uniforme como a do G4, o traçado laranja na figura 5.10 D separa regiões que apresentam maior irregularidade das com menor irregularidade, sendo descritos detalhadamente nas legendas.

Já os grupos G2 e G5 (14 dias de desafio cariogênico em dentina proveniente de dentes erupcionados e incusos, respectivamente) apresentam característica semelhante, sendo que em ambos (Figuras 5.11 D e 5.14 D) não observa-se uniformidade na superfície, sendo que em algumas regiões apresenta-se mais regular que em outras.

Quanto aos grupos G3 e G6 (21 dias de desafio cariogênico em dentina proveniente de dentes erupcionados e inclusos, respectivamente), uma característica comum foi observada nos aumentos de 200 e 400X, independentemente do tipo de substrato (Figuras 5.12 D, 5.12 F, 5.15 D e 5.15 F): observaram-se imagens em que os túbulos dentinários apresentavam-se abertos, no entanto, a superfície não apresentou mais as irregularidades vistas nos grupos anteriores, visualizando somente uma ondulação superficial em toda a extensão das imagens.

Assim, o grupo que apresentou uma maior uniformidade frente ao processo de desmineralização proposto e que não perdeu a característica superficial de dentina afetada por cárie foi o grupo G4.

Figura 5.10 – Fotomicrografia ilustrativa em MEV da superfície para o grupo G1 (Espécimes submetidos ao desafio cariogênico microbiológico por 7 dias, substrato proveniente de dente erupcionado)

A – Aumento de 30X, observa-se imagem panorâmica em que visualiza-se tanto a dentina afetada (lado esquerdo) quanto a dentina hígida (lado direito). Seta amarela indica região com microcavidades e seta vermelha resquícios de biofilme;

B – Aumento de 50X da dentina afetada, observa-se superfície irregular com característica superficial heterogênea. Setas amarelas indicam região com microcavidades e setas vermelhas resquícios de biofilme;

C – Aumento de 50X da dentina hígida – superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

D – Aumento de 200X da dentina afetada, observa-se túbulos dentinários abertos em toda superfície, na região à esquerda do traçado laranja há maior quantidade de dentina intertubular e menor quantidade de irregularidades; E – Aumento de 200X da dentina hígida, observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

F – Aumento de 400X da dentina afetada, observa-se clara desmineralização expondo a abertura dos túbulos dentinários em toda extensão da imagem e superfície irregular;

G – Aumento de 400X da dentina hígida – observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas e alguns túbulos dentinários abertos (setas verdes).

Figura 5.11 – Fotomicrografia ilustrativa em MEV da superfície para o grupo G2 (Espécimes submetidos ao desafio cariogênico microbiológico por 14 dias, substrato proveniente de dente erupcionado)

A – Aumento de 30X, observa-se imagem panorâmica em que visualiza-se tanto a dentina afetada (lado esquerdo) quanto a dentina hígida (lado direito);

B – Aumento de 50X da dentina afetada, observa-se superfície irregular com característica superficial heterogênea;

C – Aumento de 50X da dentina hígida – superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

D – Aumento de 200X da dentina afetada, observa-se túbulos dentinários abertos em toda superfície, na região abaixo do traçado laranja há maior quantidade de dentina intertubular e menor quantidade de irregularidades;

E – Aumento de 200X da dentina hígida, observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

F – Aumento de 400X da dentina afetada, observa-se clara desmineralização expondo a abertura dos túbulos dentinários e superfície irregular;

G – Aumento de 400X da dentina hígida – observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas e alguns túbulos dentinários abertos (setas verdes).

Figura 5.12 – Fotomicrografia ilustrativa em MEV da superfície para o grupo G3 (Espécimes submetidos ao desafio cariogênico microbiológico por 21 dias, substrato proveniente de dente erupcionado)

A – Aumento de 30X, observa-se imagem panorâmica em que visualiza-se tanto a dentina afetada (lado esquerdo) quanto a dentina hígida (lado direito);

B – Aumento de 50X da dentina afetada, observa-se superfície irregular com característica superficial heterogênea;

C – Aumento de 50X da dentina hígida – superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

D – Aumento de 200X da dentina afetada, observa-se túbulos dentinários abertos em toda extensão da imagem, a superfície como um todo apresenta-se mais regular, não sendo visualizada clara irregularidade como os grupos anteriores;

E – Aumento de 200X da dentina hígida, observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

F – Aumento de 400X da dentina afetada, observa-se clara desmineralização expondo abertura dos túbulos dentinários e a superfície como um todo apresenta padrão de desmineralização mais regular, não sendo visualizada clara irregularidade como os grupos anteriores;

G – Aumento de 400X da dentina hígida – observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas e alguns túbulos dentinários abertos (setas verdes).

Figura 5.13 – Fotomicrografia ilustrativa em MEV da superfície para o grupo G4 (Espécimes submetidos ao desafio cariogênico microbiológico por 7 dias, substrato proveniente de dente incluso)

A – Aumento de 30X, observa-se imagem panorâmica em que visualiza-se tanto a dentina afetada (lado esquerdo) quanto a dentina hígida (lado direito). Seta amarela indica região com microcavidades;

B – Aumento de 50X da dentina afetada, observa-se superfície irregular com característica superficial heterogênea. Seta amarela indica região com microcavidades;

C – Aumento de 50X da dentina hígida – superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

D – Aumento de 200X da dentina afetada, observa-se abertura dos túbulos dentinários em toda a extensão da superfície irregular, seta amarela indica microcavidade;

E – Aumento de 200X da dentina hígida, observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

F – Aumento de 400X da dentina afetada, em toda a extensão da dentina observa-se clara desmineralização expondo os túbulos dentinários e superfície irregular;

G – Aumento de 400X da dentina hígida – observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas e alguns túbulos dentinários abertos (setas verdes).

Figura 5.14 – Fotomicrografia ilustrativa em MEV da superfície para o grupo G5 (Espécimes submetidos ao desafio cariogênico microbiológico por 14 dias, substrato proveniente de dente incluso).

A – Aumento de 30X, observa-se imagem panorâmica em que visualiza-se tanto a dentina afetada (lado esquerdo) quanto a dentina hígida (lado direito). Seta amarela indica região com microcavidades.

B – Aumento de 50X da dentina afetada, observa-se superfície irregular com característica superficial heterogênea. Seta amarela indica região com microcavidades;

C – Aumento de 50X da dentina hígida – superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

D – Aumento de 200X da dentina afetada, observa-se abertura dos túbulos dentinários em toda extensão da imagem, superfície irregular menos evidente abaixo dos traçados laranjas;

E – Aumento de 200X da dentina hígida, observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

F – Aumento de 400X da dentina afetada, observa-se clara desmineralização expondo abertura dos túbulos dentinários em toda extensão da imagem e superfície irregular mais evidente na região central da imagem entre os traçados laranjas;

G – Aumento de 400X da dentina hígida – observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas e alguns túbulos dentinários abertos (setas verdes).

Figura 5.15 – Fotomicrografia ilustrativa em MEV da superfície para o grupo G6 (Espécimes submetidos ao desafio cariogênico microbiológico por 21 dias, substrato proveniente de dente incluso)

A – Aumento de 30X, observa-se imagem panorâmica em que visualiza-se tanto a dentina afetada (lado esquerdo) quanto a dentina hígida (lado direito). Seta azul indica fratura do espécime durante processamento ara microscopia;

B – Aumento de 50X da dentina afetada, observa-se superfície irregular com característica superficial heterogênea;

C – Aumento de 50X da dentina hígida – superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

D – Aumento de 200X da dentina afetada, observa-se abertura dos túbulos dentinários em toda a superfície, que como um todo, apresenta-se mais regular, não sendo visualizada clara irregularidade como os grupos anteriores;

E – Aumento de 200X da dentina hígida, observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas;

F – Aumento de 400X da dentina afetada, observa-se clara desmineralização expondo abertura dos túbulos dentinários em toda imagem e a superfície como um todo apresenta-se mais regular, não sendo visualizada clara irregularidade como os grupos anteriores;

G – Aumento de 400X da dentina hígida – observa-se superfície plana, regular, marcada por ranhuras provenientes do desgaste com lixas e alguns túbulos dentinários abertos (setas verdes).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo utilizamos 4 métodos diagnósticos: inspeção visual, radiografia digital, fluorescência a laser e tomografia por coerência óptica. Todos foram efetivos em diferenciar o substrato hígido do afetado por cárie produzido artificialmente, em todos os tempos de desmineralização testados (7, 14 e 21 dias).

A inspeção visual e a radiografia digital são métodos de diagnóstico estabelecidos na literatura. Nyttun et al., (1992) validaram estes dois métodos diagnósticos na detecção de lesões de cárie oclusais em um estudo *in vitro* e concluíram que a inspeção visual, quando acompanhada do método radiográfico, apresenta uma maior sensibilidade na detecção das lesões.

Com o passar dos anos a inspeção visual continuou a ser utilizada como método de diagnóstico na literatura tanto em estudos *in vitro* (Neuhaus et al., 2010; Jablonski-Momeni et al., 2012; Novaes et al., 2012) como em estudos *in vivo* (Novaes et al., 2009; Chen et al., 2012). Assim como em nosso trabalho, esta metodologia mostra bons resultados na detecção de lesões de cárie fornecendo informações ricas e detalhadas do substrato que nos propusemos a obter de forma artificial e padronizada, a dentina afetada por cárie.

De forma conjunta à inspeção visual optamos em utilizar a radiografia digital que, como dito anteriormente, é uma evolução do sistema convencional, e também nos permitiu obter informações da dentina afetada por cárie em comparação com a dentina hígida. Alguns autores questionam a sensibilidade do método radiográfico, realizando assim estudos com análise interexaminadores (Nyttun et al., 1992). Apesar dos resultados algumas vezes não serem positivos devido a limitação do sistema radiográfico em detectar precocemente imagens sugestivas de lesão de cárie, nossos resultados demonstram que no nível de desmineralização em que os espécimes foram submetidos, os três examinadores, devidamente calibrados, foram capazes de identificar a presença de radioluscentia dentinária na região de dentina afetada por cárie em todos os grupos experimentais.

A fluorescência a laser é uma técnica que está presente na literatura atual e apresenta bons resultados na detecção de lesões de cárie, tanto oclusais quanto interproximais. Sua utilização e eficácia já foi comprovada tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Rodrigues et al., 2008; Rodrigues et al., 2009a; Neuhaus et al., 2010;

Chen e Qi, 2011; de Paula et al., 2011; Chen et al., 2012). Desta forma, optamos em utilizá-lo não somente pelos seus bons resultados, mas também por ser um aparelho comercialmente disponível e acessível, podendo ser utilizado em outras instituições de ensino com a finalidade de verificar a presença ou não de tecido cariado. Além disso, acreditamos que a associação inspeção visual, radiografia digital e fluorescência a laser é eficaz na detecção de lesões de cárie.

Um fato interessante a ser pontuado nos resultados obtidos através da fluorescência a laser foi a diferença estatística presente nos valores numéricos obtidos entre os dois tipos de substrato: os provenientes de dentes inclusos ou de dentes erupcionados. Os fragmentos dentais provenientes de dentes erupcionados apresentaram maior valor de fluorescência da dentina afetada por cárie quando comparados à dentina proveniente de dentes inclusos. Muito provavelmente essa diferença ocorreu, pois a dentina de dentes erupcionados apresentava visualmente uma coloração mais pigmentada que a dentina de dentes inclusos, sendo esta observação suportada por Rodrigues et al. (2008).

Não só a coloração final da dentina afetada proveniente de dentes inclusos é diferente da dentina proveniente de dentes erupcionados. Dentes erupcionados passam por diversos processos tanto intrínsecos, como a produção de dentina secundária a partir da sua erupção na cavidade bucal, como processos extrínsecos, tais como, a atrição causada pela mastigação e processos cariosos que provocaram a produção de uma dentina reparativa (Fejerskov e Kidd, 2011). Assim, morfológicamente pode-se observar diferenças no diâmetro tubular com aumento de dentina peritubular que é proveniente do processo de maturação (Costa *et al.*, 2002). Consequentemente ocorre a diminuição na permeabilidade dentinária em algumas regiões, pois este processo não ocorre concomitantemente em toda a extensão de dentina. Portanto, uma superfície de dentina proveniente de dentes erupcionados deve apresentar maior heterogeneidade se comparado com uma superfície dentinária proveniente de dentes inclusos, em que só houve formação de dentina primária.

Assim, se refletirmos sobre os substratos dentinários utilizados em testes de resistência de união, as características deste substrato proveniente de dentes inclusos serão diferentes das de dentes erupcionados, podendo interferir diretamente nos resultados obtidos. Tal fato foi pontuado por Mjor e Nordahl, (1996)

evidenciando o cuidado que os pesquisadores devem ter quando da seleção de elementos dentais para compor a amostra.

Através das fotomicrografias obtidas em MEV, ao compararmos o substrato dentinário proveniente de dentes inclusos e erupcionados, verificamos desmineralização superficial mais uniforme em toda extensão de dentina afetada por cárie proveniente de dentes inclusos. Desta forma, acreditamos que esta dentina é o substrato mais adequado para a utilização na produção de dentina afetada por cárie produzida artificialmente.

O último método de diagnóstico utilizado por nós para validar a produção do substrato afetado por cárie foi o OCT, que é uma tecnologia nova que vem apresentando resultados promissores na detecção de lesões de cárie (Can et al., 2008; Lee et al., 2009; Azevedo et al., 2011). O fator determinante para a escolha desta nova tecnologia foi a sua capacidade de detectar e quantificar de forma não destrutiva ao espécime (Gimbel, 2008) a profundidade de desmineralização gerada, no nosso caso, pelo método microbiológico.

As imagens mostram claramente que o processo de desmineralização ocorreu nos espécimes nos diferentes períodos de exposição ao desafio bacteriano. Associando os resultados qualitativos e quantitativos, pudemos observar que a profundidade de desmineralização foi estatisticamente igual comparando os 3 tempos de desafio cariogênico.

Freitas et al. (2009) avaliaram o processo de desmineralização através de cepa bacteriana em até 11 dias, e observou um aumento exponencial na profundidade de desmineralização somente até cerca de 9 dias. Estes autores relacionam o fato ao esgotamento de nutrientes disponíveis na cultura, acúmulo de metabólitos inibitórios e produtos finais, ou falta de espaço biológico. Este resultado pode ser relacionado com o presente estudo, uma vez que não houve aumento na profundidade de desmineralização nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Acreditamos que a hipótese de esgotamento de nutrientes não se aplica às nossas condições, uma vez que os nutrientes foram fornecidos a cada 24 horas, através da troca do meio. No entanto, o acúmulo de metabólitos e produtos finais, bem como a falta de espaço biológico poderiam ser as causas para a não progressão na profundidade de desmineralização posterior a 7 dias.

Tais achados podem ser explicados: *In vivo*, o biofilme que naturalmente se acumula sobre a superfície dos dentes é uma comunidade complexa composta por mais de 500 espécies bacterianas (Paster et al., 2001; Kolenbrander et al., 2002). Os primeiros colonizadores são predominantemente estreptococos. Para dar início a interações bacterianas heterogêneas, sinais podem desempenhar papel importante, e os processos de co-adesão e co-agregação de microrganismos distintos contribuem para a maturação do biofilme. Na presença de sacarose, a enzima glicosiltransferase produz glucanos de polissacarídeos insolúveis em água que podem contribuir para a colonização de *S. mutans* (Banas e Vickerman, 2003). É provável que as bactérias colonizadoras iniciais criem um ambiente favorável para novos invasores favorecendo a sobrevivência de outras espécies mais capazes de se adaptar ao novo habitat e substituam as espécies iniciais. Neste estudo, o biofilme continha apenas colônias de *S. mutans* e conseqüentemente, não havia nenhuma substância competitiva ou inibitória produzida por outras espécies. Além disso, a deposição bacteriana que ocorreu durante os dias de desafio cariogênico produziu um espesso biofilme. Embora nenhuma medida de biomassa tenha sido feita neste estudo, os resultados mostram uma manutenção na profundidade de desmineralização no período de 7 a 21 dias, o que pode ser explicado, pois uma camada muito espessa de depósito bacteriano foi formada no processo de indução de cárie.

Assim, o correto desenvolvimento da cárie dental nos permite entender os resultados obtidos no presente estudo. O *S. mutans* tem um sistema de reconhecimento que permite que a superfície bacteriana ligue-se à película adquirida dental especialmente na presença de sacarose (fonte de nutrientes utilizados neste estudo), que possibilita que outras células bacterianas possam se co-agregar no biofilme (Banas e Vickerman, 2003). Em um ambiente natural, na fase de acumulação, com a multiplicação dos colonizadores iniciais e aumento de volume do biofilme, ocorre a adesão de diferentes colonizadores dando sequência ao processo de desenvolvimento da cárie dental através da sucessão microbiana (Kolenbrander et al., 2002). Em nosso estudo as fases de acumulação e de sucessão microbiana não foram viáveis, pois utilizamos uma monocultura de um colonizador inicial, o *S. Mutans*.

O fato de não ter havido diferença na profundidade de desmineralização, nos valores obtidos de fluorescência a laser e na detecção do tecido afetado por cárie, através da inspeção visual e da radiografia digital pelos diferentes examinadores, nos permite afirmar que 7 dias é tempo suficiente para obtenção de dentina afetada padronizada a ser utilizada em ensaios laboratoriais. Tal achado é relevante por 2 motivos principais: 1- sabe-se que a metodologia que envolve o método microbiológico para obtenção de lesões de cárie é bastante sensível e requer treinamento do pesquisador, assim, com um tempo consideravelmente rápido as chances de sucesso na obtenção desse tipo de substrato *in vitro* sem problemas de contaminação é maior; 2- os estudos de resistência de união realizados sobre dentina afetada natural apresentam resultados divergentes, como por exemplo, alguns trabalhos mostraram que os valores de adesão em dentina afetada por cárie são menores comparativamente à dentina hígida (Pereira et al., 2006; Wang et al., 2006; Komori et al., 2009; Scholtanus et al., 2010), enquanto que outros não verificaram diferença estatisticamente significativa entre os dois substratos avaliados (Ergucu et al., 2009; Mobarak et al., 2010b; Mobarak e El-Badrawy, 2011). Assim, um protocolo de padronização para obter dentina afetada por cárie em laboratório, possibilitará a realização de estudos *in vitro* em que o substrato não terá influência sobre os fatores de variação investigados.

Por fim, através dos resultados obtidos em nosso estudo, podemos afirmar que a proposta de protocolo para obtenção de dentina afetada por cárie produzida artificialmente através do método microbiológico atingiu seu objetivo e nos permite planejar utilizar este substrato padronizado em futuros testes de resistência de união.

7 CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais sob as quais foi realizado este estudo *in vitro* podemos concluir que:

- I. Todos os métodos diagnósticos testados – inspeção visual, radiografia digital, fluorescência a laser e tomografia por coerência óptica – foram efetivos em diferenciar o substrato hígido do afetado por cárie produzido artificialmente, em todos os tempos de desmineralização testados (7, 14 e 21 dias);
- II. O substrato dentinário, proveniente de dente incluso ou erupcionado, interfere qualitativamente nas características superficiais da dentina afetada por cárie, observando-se desmineralização superficial mais uniforme em dentina proveniente de dentes inclusos;
- III. Quanto aos tempos de desmineralização estudados, consideramos 7 dias tempo suficiente para obtenção de dentina afetada padronizada a ser utilizada em ensaios laboratoriais.

Assim, este protocolo sugere que dentina afetada por cárie pode ser obtida artificialmente com o método microbiológico de desafio cariogênico, realizado por 7 dias em dentes inclusos.

REFERÊNCIAS¹

- Araki K, Matsuda Y, Seki K, Okano T. Effect of computer assistance on observer performance of approximal caries diagnosis using intraoral digital radiography. *Clin Oral Investig*. 2010 Jun;14(3):319-25.
- Azevedo CS, Trung LC, Simionato MR, Freitas AZ, Matos AB. Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. *Braz Oral Res*. 2011 Oct;25(5):407-13.
- Bader JD, Shugars DA. The evidence supporting alternative management strategies for early occlusal caries and suspected occlusal dentinal caries. *J Evid Based Dent Pract*. 2006 Mar;6(1):91-100.
- Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol M*. 2003 Mar;14(2):89-99.
- Baumgartner A, Dichtl S, Hitzenberger CK, Sattmann H, Robl B, Moritz A, et al. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. *Caries Res*. 2000 Jan-Feb;34(1):59-69.
- Can AM, Darling CL, Ho C, Fried D. Non-destructive assessment of inhibition of demineralization in dental enamel irradiated by a $\lambda=9.3\text{-}\mu\text{m}$ CO₂ laser at ablative irradiation intensities with PS-OCT. *Lasers Surg Med*. 2008 Jul;40(5):342-9.
- Chen J, Qi M. [A study of a laser fluorescence device for assessing caries removal in primary teeth in vitro]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2011 Oct;29(5):457-60.
- Chen J, Qin M, Ma W, Ge L. A clinical study of a laser fluorescence device for the detection of approximal caries in primary molars. *Int J Paediatr Dent*. 2012 Mar;22(2):132-8.
- Chen Y, Otis L, Piao D, Zhu Q. Characterization of dentin, enamel, and carious lesions by a polarization-sensitive optical coherence tomography system. *Appl Opt*. 2005 Apr 10;44(11):2041-8.
- Choi K, Oshida Y, Platt JA, Cochran MA, Matis BA, Yi K. Microtensile bond strength of glass ionomer cements to artificially created carious dentin. *Oper Dent*. 2006 Sep-Oct;31(5):590-7.
- Costa LR, Watanabe IS, Kronka MC, Silva MC. Structure and microstructure of coronary dentin in non-erupted human deciduous incisor teeth. *Braz Dent J*. 2002;13(3):170-4.
- de Paula AB, Campos JA, Diniz MB, Hebling J, Rodrigues JA. In situ and in vitro comparison of laser fluorescence with visual inspection in detecting occlusal caries lesions. *Lasers Med Sci*. 2011 Jan;26(1):1-5.

¹ De acordo com estilo Vancouver

Ergucu Z, Celik EU, Unlu N, Turkun M, Ozer F. Effect of Er,Cr:YSGG laser on the microtensile bond strength of two different adhesives to the sound and caries-affected dentin. *Oper Dent*. 2009 Jul-Aug;34(4):460-6.

Erhardt MC, Rodrigues JA, Valentino TA, Ritter AV, Pimenta LA. In vitro microTBS of one-bottle adhesive systems: sound versus artificially-created caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Jul;86(1):181-7.

Espejo LC, Simionato MR, Barroso LP, Netto NG, Luz MA. Evaluation of three different adhesive systems using a bacterial method to develop secondary caries in vitro. *Am J Dent*. 2010 Apr;23(2):93-7.

Featherstone JD. Modeling the caries-inhibitory effects of dental materials. *Dent Mater*. 1996 May;12(3):194-7.

Fejerskov O, Kidd EA. Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Editora Santos; 2011.

Fontana M, Dunipace AJ, Gregory RL, Noblitt TW, Li Y, Park KK, et al. An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. *Caries Res*. 1996;30(2):112-8.

Freitas AZ, Zezell DA, Mayer MPA, Ribeiro AC, Gomes ASL, Vieira ND. Carious growth monitoring with optical coherence tomography - art. no. 613704. *P Soc Photo-Opt Ins*. 2006;6137:13704-.

Freitas AZ, Zezell DM, Mayer MPA, Ribeiro AC, Gomes ASL, Vieira ND. Determination of dental decay rates with optical coherence tomography. *Laser Phys Lett*. 2009 Dec;6(12):896-900.

Fujimoto JG, Brezinski ME, Tearney GJ, Boppart SA, Bouma B, Hee MR, et al. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nat Med*. 1995 Sep;1(9):970-2.

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 Jun;49(2):67-71; quiz 101.

Gimbel C. Optical coherence tomography diagnostic imaging. *Gen Dent*. 2008 Nov-Dec;56(7):750-7; quiz 8-9, 68.

Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodont*. 2006 Mar-Apr;15(2):82-8.

Jablonski-Momeni A, Liebegall F, Stoll R, Heinzl-Gutenbrunner M, Pieper K. Performance of a new fluorescence camera for detection of occlusal caries in vitro. *Lasers Med Sci*. 2012 Mar 21 [Epub ahead of print].

Jones RS, Darling CL, Featherstone JD, Fried D. Imaging artificial caries on the occlusal surfaces with polarization-sensitive optical coherence tomography. *Caries Res*. 2006a;40(2):81-9.

Jones RS, Darling CL, Featherstone JD, Fried D. Remineralization of in vitro dental caries assessed with polarization-sensitive optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2006b Jan-Feb;11(1):014016.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol R.* 2002 Sep;66(3):486-+.

Komori PC, Pashley DH, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF, et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2009 Mar-Apr;34(2):157-65.

Kuramoto A, Imazato S, Walls AW, Ebisu S. Inhibition of root caries progression by an antibacterial adhesive. *J Dent Res.* 2005 Jan;84(1):89-93.

Lee C, Darling CL, Fried D. Polarization-sensitive optical coherence tomographic imaging of artificial demineralization on exposed surfaces of tooth roots. *Dent Mater.* 2009 Jun;25(6):721-8.

Lussi A, Hellwig E. Performance of a new laser fluorescence device for the detection of occlusal caries in vitro. *J Dent.* 2006 Aug;34(7):467-71.

Lussi A, Hibst R, Paulus R. DIAGNOdent: an optical method for caries detection. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C80-3.

Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F. Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. *Caries Res.* 2005 Jul-Aug;39(4):284-6.

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

Manesh SK, Darling CL, Fried D. Nondestructive assessment of dentin demineralization using polarization-sensitive optical coherence tomography after exposure to fluoride and laser irradiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009a Aug;90(2):802-12.

Manesh SK, Darling CL, Fried D. Polarization-sensitive optical coherence tomography for the nondestructive assessment of the remineralization of dentin. *J Biomed Opt.* 2009b Jul-Aug;14(4):044002.

Markowitz K, Stenvall R, Graye M. The effect of distance and tooth structure on laser fluorescence caries detection. *Oper Dent.* 2012 Mar-Apr;37(2):150-60.

Marquezan M, Correa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol.* 2009 Dec;54(12):1111-7.

Mendes FM, Hissadomi M, Imparato JC. 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 Mar-Apr;38(2):104-8.

Mjor IA, Nordahl I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Arch Oral Biol*. 1996 May;41(5):401-12.

Mobarak EH, El-Badrawy W, Pashley DH, Jamjoom H. Effect of pretest storage conditions of extracted teeth on their dentin bond strengths. *J Prosthet Dent*. 2010a Aug;104(2):92-7.

Mobarak EH, El-Badrawy WH. Microshear Bond Strength of Self-etching Adhesives to Caries-affected Dentin Identified Using the Dye Permeability Test. *J Adhes Dent*. 2011 Nov 24.

Mobarak EH, El-Korashy DI, Pashley DH. Effect of chlorhexidine concentrations on micro-shear bond strength of self-etch adhesive to normal and caries-affected dentin. *Am J Dent*. 2010b Aug;23(4):217-22.

Momoi Y, Hayashi M, Fujitani M, Fukushima M, Imazato S, Kubo S, et al. Clinical guidelines for treating caries in adults following a minimal intervention policy--evidence and consensus based report. *J Dent*. 2012 Feb;40(2):95-105.

Na J, Baek JH, Ryu SY, Lee C, Lee BH. Tomographic imaging of incipient dental-caries using optical coherence tomography and comparison with various modalities. *Opt Rev*. 2009 Jul;16(4):426-31.

Neuhaus KW, Rodrigues JA, Hug I, Stich H, Lussi A. Performance of laser fluorescence devices, visual and radiographic examination for the detection of occlusal caries in primary molars. *Clin Oral Investig*. 2010 May 27.

Novaes TF, Matos R, Braga MM, Imparato JC, Raggio DP, Mendes FM. Performance of a pen-type laser fluorescence device and conventional methods in detecting approximal caries lesions in primary teeth--in vivo study. *Caries Res*. 2009;43(1):36-42 [Epub ahead of print].

Novaes TF, Matos R, Gimenez T, Braga MM, MS DEB, Mendes FM. Performance of fluorescence-based and conventional methods of occlusal caries detection in primary molars - an in vitro study. *Int J Paediatr Dent*. 2012 Jan 25.

Nytun RB, Raadal M, Espelid I. Diagnosis of dentin involvement in occlusal caries based on visual and radiographic examination of the teeth. *Scand J Dent Res*. 1992 Jun;100(3):144-8.

Otis LL, Colston BW, Jr., Everett MJ, Nathel H. Dental optical coherence tomography: a comparison of two in vitro systems. *Dentomaxillofac Radiol*. 2000a Mar;29(2):85-9.

Otis LL, Everett MJ, Sathyam US, Colston BW, Jr. Optical coherence tomography: a new imaging technology for dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2000b Apr;131(4):511-4.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001 Jun;183(12):3770-83.

Pereira PN, Nunes MF, Miguez PA, Swift EJ, Jr. Bond strengths of a 1-step self-etching system to caries-affected and normal dentin. *Oper Dent*. 2006 Nov-Dec;31(6):677-81.

Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ, et al. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. *J Dent Res*. 2009 Jan;88(1):71-6.

Ricketts DN, Ekstrand KR, Kidd EA, Larsen T. Relating visual and radiographic ranked scoring systems for occlusal caries detection to histological and microbiological evidence. *Oper Dent*. 2002 May-Jun;27(3):231-7.

Rindal DB, Gordan VV, Litaker MS, Bader JD, Fellows JL, Qvist V, et al. Methods dentists use to diagnose primary caries lesions prior to restorative treatment: findings from The Dental PBRN. *J Dent*. 2010 Dec;38(12):1027-32.

Rodrigues JA, Diniz MB, Josgrilberg EB, Cordeiro RC. In vitro comparison of laser fluorescence performance with visual examination for detection of occlusal caries in permanent and primary molars. *Lasers Med Sci*. 2009a Jul;24(4):501-6.

Rodrigues JA, Hug I, Diniz MB, Lussi A. Performance of fluorescence methods, radiographic examination and ICDAS II on occlusal surfaces in vitro. *Caries Res*. 2008;42(4):297-304.

Rodrigues JA, Hug I, Lussi A. The influence of zero value subtraction on the performance of a new laser fluorescence device for approximal caries detection. *Lasers Med Sci*. 2009b May;24(3):301-6.

Rodrigues JA, Hug I, Neuhaus KW, Lussi A. Light-emitting diode and laser fluorescence-based devices in detecting occlusal caries. *J Biomed Opt*. 2011 Oct;16(10):107003.

Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Exposed collagen in aged resin-dentin bonds produced on sound and caries-affected dentin in the presence of chlorhexidine. *J Adhes Dent*. 2011 Apr;13(2):117-24.

Sattabanasuk V, Shimada Y, Tagami J. Bonding of resin to artificially carious dentin. *J Adhes Dent*. 2005 Autumn;7(3):183-92.

Scholtanus JD, Purwanta K, Dogan N, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Microtensile bond strength of three simplified adhesive systems to caries-affected dentin. *J Adhes Dent*. 2010 Aug;12(4):273-8.

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

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

Wang S, Huang C, Zheng TL, Zhang ZX, Wang YN, Cheng XR. [Microtensile bond strength and morphological evaluations of total-etch and self-etch adhesives to caries-affected dentin]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2006 Jun;41(6):323-6.

Zanchi CH, Lund RG, Perrone LR, Ribeiro GA, del Pino FA, Pinto MB, et al. Microtensile bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems on sound and artificial caries-affected dentin. *Am J Dent*. 2010 Jun;23(3):152-6.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 11/11
CAAE 0012.0.017.000-11

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa “**Proposta de padronização de método laboratorial para obtenção de dentina afetada por cárie**”, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Cynthia Soares de Azevedo sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Adriana Bona Matos.

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 a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2011.

Prof. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B – Adendo do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CEP/FOUSP/OF.195/11

DECLARAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a necessidade de ampliação da amostra de 18 para 48 dentes, para maior confiabilidade dos dados, no projeto: "**Proposta de padronização de método laboratorial para obtenção de dentina afetada por cárie**", de responsabilidade da Pesquisadora Cynthia Soares de Azevedo sob orientação da Profa. Dra. Adriana Bona Matos, protocolo 11/2011, CAAE 012.0.017.000-11, aprovado em 16 de fevereiro de 2011.

São Paulo, 06 outubro de 2011.

Prof. Dra. **Marcia Tuolla Wanderley**
Coordenadora do CEP-FOUSP

Ilma Sra.
Prof. Dra. Adriana Bona Matos
ODD