

DANIELA GONÇALVES BITTAR

**Associação entre fluorescência vermelha emitida pela placa bacteriana e
atividade de cárie: estudo *in situ***

São Paulo
2012

DANIELA GONÇALVES BITTAR

**Associação entre fluorescência vermelha emitida pela placa bacteriana e
atividade de cárie: estudo *in situ***

Versão Original

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

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes

São Paulo

2012

Bittar DG. Associação entre fluorescência vermelha emitida pela placa bacteriana e atividade de cárie: estudo *in situ*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

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: _____

Aos meus pais, Ricardo e Silvia, meu irmão, Felipe, e meu marido, Pedro, que me apoiaram demais, obrigada por fazerem parte da minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela vida e por iluminar sempre meu caminho.

Ao meu anjo da guarda, meu fiel companheiro, que está sempre ao meu lado e me dá muita força.

Ao meu pai, que me ensinou a ter educação e principalmente garra e força para lutar pelos meus ideais. É o maior exemplo que eu pude ter na vida. Te amo!

Minha mãe, com você aprendi muito! Principalmente a ser paciente com as pessoas, e que, apesar de ser minha mãe, somos amigas! Obrigada pelo que sou hoje. Não vivo sem você!

Felix, não poderia escolher outro irmão para mim. Acho você TUDO! Quem me conhece sabe o quanto falo de você! Ele é educado, lindo, inteligente e tem o maior coração do mundo, sabe entender e consolar os amigos como ninguém! Te amo!

Zi, meu amor da minha vida inteira. Não sei nem o que dizer para a pessoa que mais me agüenta dia e noite, e ainda acorda cantando... Lindo, impressionante estarmos 9 anos juntos e nosso amor aumentar cada vez mais. Obrigada por ontem, hoje, amanhã e sempre!

Vozona (Mari), não esqueço quantas tardes passamos juntas estudando História do Brasil. Vó, você é a pessoa mais culta que eu conheci. Gostaria de saber metade do que você sabe, e cozinhar um terço já está bom! Você é demais! Te amo!

Não posso esquecer os meus avós que não estão mais presentes nesta vida, e que contribuíram muito para o meu desenvolvimento. Meu vô Ore, que também

estudou muito comigo português e geografia. Professor de economia e professor orientador de TCCs – pois é... não posso passar vergonha! Vô, tenho certeza de que você vai torcer por mim! Vó Mimi, não esqueço a nossa viagem para o Paraguai: quanto perrengue! Mas trouxemos bastante muamba! Foi muito divertido!

Vô Salim, se não fosse você, eu não estaria escrevendo os agradecimentos desta tese de frente para o mar. Obrigada por me proporcionar momentos de muitas alegrias e sempre com a família muito unida, como você sempre ensinou. Amo todos os meus avós. Eles foram essenciais para a pessoa que sou hoje!

Padrinhos, tia Mi, tio Jamil e tia Ana, e primos, agradeço pelo amor que sempre me deram – e me dão – e pela convivência maravilhosa que temos!

Ao meu tio Roberto, que me deu muita força e confiou em mim, obrigada por tudo mesmo!

Minhas melhores amigas especiais, Má, Gi, Cá e Paty, obrigada pela força e pelo incentivo de vocês! Amo vocês demais!

Agradeço muito às minhas novas famílias, Bruschini e Meirelles, pelo apoio que me dão mesmo sem saber!

Ao meu orientador, Fausto Medeiros Mendes, acho que, para quem estuda Cariologia, não preciso falar mais nada... Sim! Ele foi meu orientador! Desculpa aí! *[Risos.]* Fausto, quem é sua orientanda sabe que você é uma pessoa que tem o maior coração do mundo. Pois é, só tem cara de bravo. E, quando quer assustar...assusta! Mas depois mostra a pessoa que realmente é, verdadeiro, amigo e, acima de tudo, incapaz de fazer mal a uma formiga! É impressionante a sua capacidade de transformar as coisas mais complexas em coisas simples

e práticas. Realmente um gênio! Me sinto muito privilegiada por ser sua orientanda! Obrigada pela sua paciência, pela sua confiança, pela sua amizade e pelos seus ensinamentos!

Nesta tese, eu tive muitas co-orientadoras. Uma delas foi a Profa. Mariana. Mari, não sei nem o que lhe dizer... Obrigada por tudo mesmo! Você, para mim, é uma daquelas meninas superpoderosas! Quando quero alcançar um objetivo, sei que vou conseguir e consigo! Esse é o maior exemplo que tenho, que é você!

Profa. Cinthia, minha co-orientadora oficial, que considero como orientadora junto com o Prof. Fausto. Tudo que eu aprendi no laboratório e grande parte da metodologia, foi a senhora que me ensinou! Para a realização desta tese, tenho que agradecer imensamente à senhora por todos os seus ensinamentos! Obrigada por TUDO! Mas também não posso nunca esquecer a Ana (orientanda da Profa. Cinthia), pessoa maravilhosa que esteve sempre ao meu lado, atenciosa e prestativa com tudo, nunca a vi negar uma ajuda – e que paciência! Agradecer TUDO é pouco para você Ana!

Profa. Chris e Fer, agradeço por dedicarem tempos preciosos de vocês neste trabalho. À Profa. Chris, pelas considerações desde a qualificação para que este trabalho se tornasse melhor; e à Profa. Fer, pela preocupação para que tudo desse certo! Muito obrigada de coração!

À Profa. Patrícia, obrigada por tornar nossa batalha sua também! Ela faz mais que parte de toda esta conquista! Obrigada Paty! Sem você, esta história não teria este fim!

Ao Prof. Fernando, agradeço pelas suas considerações na qualificação. Foram muito importantes para o caminhar do trabalho!

Laurinha, minha irmãzinha e principalmente meu anjinho da guarda neste trabalho. Não preciso lhe dizer o quanto você foi importante e essencial neste trabalho. Não poderia ter pessoa melhor para me ajudar e principalmente me entender... Não acredito apenas na sorte. Deus colocou você no meu caminho! Você com certeza terá muito sucesso em tudo o que seguir! Nunca se subestime! Você não tem noção do que você é capaz! Pode sempre, mas SEMPRE, em tudo o que você precisar, contar comigo!

À Profa. Ana Lídia, obrigada por abrir as portas do Geape. Você não sabe o quanto eu aprendi com as crianças e os pais, aprendizado para a vida toda!

À Profa. Adriana, minha mãe científica, agradeço por todos os seus ensinamentos. Tive uma oportunidade que poucos têm: você como professora particular, toda quarta-feira de manhã, me ensinando tudo sobre a ortodontia preventiva! Dri, você foi essencial para o meu aprendizado, me apresentou o Pub Med., lembra? *[Risos]* Você me perguntou se tem alguém com o dom que você tem de ensinar e, principalmente, cativar e motivar as pessoas como ninguém! Você para mim é DEMAIS!

À Profa. Stella... Stelinha, com você pude aprender como tratar os pacientes. Nunca vi tanto amor e dedicação com uma criança! Não existe igual o carinho que você tem pelas pessoas!

À Profa. Dani Raggio, minha professora da faculdade (UNIP)... Dani, dentro do Departamento de Pediatria, pude descobrir o quão dedicada você é! Ao seu filho, seu marido e sua profissão! Faz tudo com tanta facilidade... Esse é meu objetivo! Obrigada! Como você mesma diz, você que é uma fofa!

Ao Prof. Imparato, Impa, agradeço imensamente as oportunidades que você me proporcionou e, principalmente, me confiou! Foi muito importante para eu descobrir o que realmente quero para mim! Muito obrigada por tudo!

À Profa. Claudinha, minha conselheira de plantão toda quinta à noite! Claudinha, não preciso lhe dizer o quanto você é amada pelos seus alunos! Um alto astral que eu nunca vi igual! Obrigada por todas as nossas conversas!

À Profa. Salete, posso dizer que tudo o que eu aprendi sobre um atendimento de bebês foi com a senhora, no inesquecível curso de bebês. Obrigada pelos seus ensinamentos!

À Profa. Márcia, obrigada pela convivência!

Aos Profs. e chefes Marcelo e Guedes, pelas inesquecíveis aulas que contribuíram para o meu aprendizado! E pelos conselhos sempre oportunos!

Agradeço imensamente a todos os alunos da pós da minha turma (incluindo, com certeza, a Tamara e o Juan), turma nova e passada, pela convivência e pelo aprendizado!

À minha amiga Nadia, de quem, logo no primeiro dia, eu já sabia que seria grande amiga. Agradeço a Deus por colocá-la no meu caminho e por você estar sempre ao meu lado, me dando força, me incentivando e me pondo sempre pra cima!

Tullllca! Você sabe o quanto somos parecidas em alguns aspectos... *[Risos.]*

Ainda bem que não nos conhecemos antes! Admiro muito você! Pode contar sempre comigo! Principalmente se for para uma festinha! *[Risos.]*

Alê! Você realmente é uma guerreira! E não tem tempo ruim para você!

Obrigada por me aguentar!!!

Chaia, outra guerreira também! Agradeço por aceitar que eu a fizesse de cobaia na estrada... Lembra? *[Risos.]* Obrigada por seu companheirismo e confiança!

Tati Novaes, Mãe de todas, assim a considero! Experiência é o que não falta! Maior coração... Ajuda é uma ordem! Dá para parar de ajudar um pouquinho! *[Risos.]* Você é realmente um espetáculo!

Thata, o que eu posso dizer de uma pessoa que é superdotada e, além disso, muito divertida... Que é chata, óbvio! *[Risos.]* Você tem tudo para ser uma professora e pesquisadora perfeita. Aliás, já é! A considero muito! Obrigada pelo seu apoio sempre!

Vanessinha, essa sim é uma mulher de fibra e corajosa! Só de pensar na sua trilha matutina, me dá forças para enfrentar tudo! Parabéns pela sua dedicação! Poucos têm tanta!

Dani Hesse e Camilinha, minhas amigas da especialização! Foi muito bom ter pessoas queridas ao meu lado durante essa nossa jornada! Agradeço por tudo o que me ajudaram!

Karlitcha! Sabe aquele dia que você não está a fim de fazer nada? Aí chega uma pessoa muito bem humorada e lhe dá aquele "BOM DIA AMIGUINHOS"? Com certeza esse "bom dia" trouxe alegria para todos! Obrigada por trazer alegria todos os dias!

Thati Lenzi ou Gi, com certeza você é a pessoa mais focada e disciplinada que eu já conheci!

Chris ou Mura, não esqueço nunca da nossa dupla no curso de bebê... Foi com você que pude aprender a anestésiar com APOIO! *[Risos.]* Como a Profa. Salete nos ensinou! Obrigada por tudo!

À Lucila, minha Profa. na faculdade (UNIP), e à Jana, agradeço a oportunidade de conhecê-las melhor e pela convivência!

Ao Cássio e à Rosângela, pelos ensinamentos do Moodle e pela convivência!

À Babou e à Gabi, pessoas maravilhosas que eu conheci e que tenho como exemplos! Agradeço demais pelas oportunidades e confiança! Com certeza nunca esquecerei o que vocês fizeram por mim!

Agradeço imensamente às pessoas que me apoiaram sinceramente e que foram muito importantes para que eu chegasse até aqui: Júlio, Fátima, Antônio, Anne e Marize!

Muito obrigada, Beth e Carlos (IPEN). Sem vocês, os bloquinhos não seriam esterilizados! Agradeço demais a gentileza e o acolhimento!

Às queridas secretárias do LELO, que foram primordiais para o andamento do trabalho! MUITÍSSIMO obrigada!!!

Meu muito obrigada aos alunos da graduação noturno 2010-2011, que me mostraram realmente o caminho que eu quero seguir!

Agradeço a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para que este trabalho fosse concluído! Sem esquecer as queridas voluntárias que não fazem parte da pós: Joyce, Ana e Jú (que agora faz parte!)

A autora da dissertação, bem como seu orientador, não apresentam conflito de interesses com nenhuma das empresas mencionadas no texto.

Gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte por meio da bolsa de mestrado (processo número 130334/2010-3) e pelo auxílio financeiro decorrente do Edital Jovens Pesquisadores coordenado pelo Prof. Fausto Medeiros Mendes (processo 565061/2008-9).

RESUMO

Bittar DG. Associação entre fluorescência vermelha emitida pela placa bacteriana e atividade de cárie: estudo *in situ* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

O objetivo desse estudo *in situ* cruzado de duas fases foi avaliar a influência da presença de placa dentária fluorescente no vermelho na indução de lesões cáries. Foram utilizados 272 blocos de esmalte bovino, que foram avaliados inicialmente em relação à microdureza superficial e quantificação da fluorescência verde com o QLF (*Quantitative light-induced fluorescence*). Dezesete voluntários utilizaram dispositivos palatais removíveis, com oito amostras cobertas com uma rede plástica para favorecer maior acúmulo de placa. No grupo experimental foi gotejada solução de sacarose a 20%, 8 X ao dia e no grupo controle, água destilada. Cada fase durou 14 dias com 7 dias de *wash-out*. Os blocos foram avaliados após 4, 7, 10 e 14 dias. Após cada período, a placa bacteriana presente sobre a superfície dos blocos foi analisada utilizando o QLF para a quantificação de fluorescência vermelha. Após cuidadosa limpeza da superfície, o bloco foi novamente avaliado para a perda de fluorescência verde (QLF) e perda de microdureza superficial. Foram realizadas análises de multinível para comparação entre os grupos, bem como análises de regressão linear de multinível entre as medidas de fluorescência vermelha e os desfechos relacionados à desmineralização. Em relação à microdureza de superfície, pode-se observar uma tendência de aumento da perda de dureza entre os diferentes períodos apenas no grupo experimental. Quanto à fluorescência vermelha da placa, houve aumento gradual de acordo com os diferentes períodos em ambos os grupos, sendo esse aumento mais pronunciado no grupo experimental. Houve associação significativa entre as medidas da fluorescência da placa e perda de dureza, independente dos grupos. Em conclusão, a fluorescência vermelha da placa bacteriana está relacionada à placa madura, independente da sua cariogenicidade.

Palavras-chave: Fluorescência. Placa dentária. Desmineralização do dente. Cárie dentária. Testes de dureza.

ABSTRACT

Bittar DG. Association between red fluorescence emitted by bacterial plaque and caries activity: *in situ* study [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

The aim of this two-phase crossover *in situ* study was to evaluate the influence of presence of red bacterial plaque on the induction of carious lesions. We used 272 bovine enamel blocks, which were initially evaluated in relation to surface microhardness and quantification of green fluorescence using the QLF (Quantitative light-induced fluorescence). Seventeen volunteers to use removable intra-oral appliances were selected, containing eight specimens covered by a plastic net to promote plaque accumulation. 20% sucrose solution, 8 times per day, was dripped in the experimental group, and distilled water was dripped in the control group. Each phase lasted 14 days, with seven days of wash-out. The specimens were assessed after 4, 7, 10 and 14 days. After each period, bacterial plaque present on the blocks surface was analyzed using the QLF to quantify the red fluorescence. After careful cleanness, the block was evaluated again with QLF to assess the loss of green fluorescence and surface microhardness loss. Multilevel analyses were carried out to compare the groups, as well as multilevel linear regression analyses among the red fluorescence and outcomes related to the demineralization. With regard to the surface microhardness, we could observe a trend of hardness loss among the different periods only at the experimental group. In relation to the red fluorescence of plaque, there was a gradual increase according to the different periods in both experimental and control groups, being this increase more relevant in the experimental group. There was significantly association between red fluorescence measurements and microhardness loss, independently of the groups. In conclusion, the red fluorescence of bacterial plaque is related to the mature plaque, independently of its cariogenicity.

Keywords: Fluorescence. Dental plaque. Tooth demineralization. Dental caries. Hardness tests.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
3 PROPOSIÇÃO	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
5 RESULTADOS.....	28
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICES	49
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje, a detecção das lesões de cárie nos estágios iniciais de desenvolvimento é essencial para que o processo de remineralização seja favorecido, e conseqüentemente, obtenha-se um melhor prognóstico no tratamento da doença (Nyvad; Fejerskov, 1997; Nyvad, 2004; Braga et al., 2010c). Os métodos diagnósticos tradicionalmente utilizados apresentam, no entanto, uma série de limitações.

A inspeção visual é um método eficaz para a avaliação da atividade das lesões de cárie (Ekstrand et al., 1998; Nyvad et al., 1999; Nyvad, 2004; Ekstrand et al., 2007; Braga et al., 2010a; Braga et al., 2010b; Braga et al., 2010c), mas é subjetivo (Pretty, 2006). Novas tecnologias tentam solucionar parcialmente os problemas ocorridos frente à utilização dos métodos de diagnóstico convencionais (Heinrich-Weltzien et al., 2005; Pretty, 2006). Métodos objetivos de diagnóstico baseados na fluorescência, têm esse objetivo. Um deles é o método de fluorescência a laser (DIAGNOdent pen, Kavo, Biberach, Alemanha), capaz de detectar a fluorescência proveniente da parte orgânica da lesão de cárie (Hibst et al., 2001; Mendes et al., 2004; Buchalla, 2005).

Outro método que tem chamado atenção é o aparelho de quantificação da fluorescência induzida por luz (*Quantitative light-induced fluorescence – QLF*, Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, Holanda). O QLF é uma câmera de fluorescência que juntamente com um software, possui duas ferramentas de análise: a medição da fluorescência na faixa do verde e na faixa espectral vermelha. A primeira serve para a avaliação da fluorescência intrínseca do tecido mineral dentário, e tem forte correlação com perda e ganho mineral de lesões cariosas de esmalte decorrentes do processo de desmineralização e remineralização (Tranaeus et al., 2001; Heinrich-Weltzien et al., 2003; Meller et al., 2006; Lippert et al., 2011). Os parâmetros analisados nesse espectro são o ΔF (%), que é a média da perda de fluorescência na lesão comparada com o esmalte hígido, a área da lesão medida em mm^2 e a integração dessas duas medidas, que é representada pelo ΔQ .

Já com relação à medição da fluorescência no vermelho, esse parâmetro é representado pelo ΔR (%), que é a porcentagem de diferença de fluorescência medida na faixa espectral do vermelho na lesão de cárie, comparada a do esmalte hígido. Provavelmente, essa fluorescência é emitida por metabólitos bacterianos, possivelmente provenientes de bactérias anaeróbias obrigatórias (Konig et al., 1998; Mendes et al., 2004; Buchalla, 2005; Lennon et al., 2006; Mendes et al., 2006; van der Veen et al., 2006).

Alguns estudos têm também demonstrado que a placa bacteriana exibe fluorescência na faixa espectral vermelha quando excitada por uma luz com comprimento de onda próximo a do QLF (405 nm). Os autores têm afirmado que essa autofluorescência do biofilme parece estar relacionada à placa madura (Coulthwaite et al., 2006; Pretty, 2006; van der Veen et al., 2006; Coulthwaite et al., 2009; Raggio et al., 2010), e possivelmente poderia ser mais cariogênica (Heinrich-Weltzien et al., 2003; Coulthwaite et al., 2006).

Portanto, a placa emissora de fluorescência no vermelho após a excitação com luz proveniente do QLF, se de fato for mais cariogênica, serviria como um parâmetro para prever o desenvolvimento e atividade de cárie dentária. Estudos prévios demonstraram que a placa dental madura está associada a lesões ativas de cárie; no entanto, a detecção foi feita com evidenciador de duas tonalidades, de forma qualitativa (Ekstrand et al., 1998; Braga et al., 2010b). Nenhum trabalho foi ainda desenvolvido com o QLF a fim de testar essa hipótese, o que motiva a execução da presente pesquisa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O diagnóstico precoce das lesões iniciais de cárie é de extrema importância para que a terapia mais conservadora seja eleita, facilitando o processo de remineralização e um melhor prognóstico no tratamento da doença (Nyvad; Fejerskov, 1997; Nyvad, 2004; Braga et al., 2010c).

A atividade de cárie pode ser conceituada como a velocidade de progressão da doença na cavidade bucal. Dessa forma, a simples constatação da doença presente não deve satisfazer os anseios do cirurgião dentista na decisão de tratamento. A avaliação da agressividade da doença é de fundamental importância para se obter um prognóstico adequado no tratamento da cárie dentária (Nyvad; Fejerskov, 1997). Isso é facilmente compreensível quando é levada em conta a natureza dinâmica do processo cariioso (Fejerskov, 1997).

O exame da atividade de cárie dentária é realizado através de várias avaliações. Inicialmente, a avaliação dos fatores etiológicos da doença deve nortear o cirurgião dentista na estimativa da atividade de cárie de cada paciente. Muitos fatores etiológicos de cunho biológico têm sido descritos como fundamentais no desenvolvimento da cárie dentária (Fejerskov, 1997). Alguns desses fatores são a presença de placa bacteriana, ausência de acesso a fluoretos, frequência alta de ingestão de alimentos ricos em sacarose, experiência passada de cárie, presença de lesões ativas em outros dentes, entre outros (Douglass, 1998; Kanellis, 2000; Burt, 2005). Todos esses fatores podem ser avaliados na prática clínica. Fatores de ordem socioeconômica também têm sido relacionados ao desenvolvimento da doença, sendo que indivíduos socialmente mais desfavorecidos apresentam maior predisposição à doença (Burt, 2005). No entanto, a avaliação individual dos fatores socioeconômicos não traz grandes informações ao cirurgião dentista, sendo essas variáveis melhor aplicadas num contexto populacional.

Além da avaliação dos fatores etiológicos, uma alternativa é o exame visual das lesões em uma única sessão, baseado em características clínicas que indiquem se as lesões estão ativas ou paralisadas. As lesões ativas apresentam aspecto opaco e rugoso, enquanto lesões inativas apresentam

aspecto brilhante e superfície lisa (Nyvad; Fejerskov, 1997; Braga et al., 2010c). Para facilitar essa avaliação, alguns autores propuseram índices baseados na inspeção visual para estimar a profundidade e a atividade dessas lesões (Ekstrand et al., 1998; Nyvad et al., 1999; Ekstrand et al., 2007).

Um dos índices utilizados para esse fim, que contempla tanto a severidade das lesões como a atividade é o critério de Nyvad (Nyvad et al., 1999). Outro índice para avaliar a severidade das lesões é *International Caries Detection and Assessment System* (ICDAS) (Ismail et al., 2007). Apesar do ICDAS não avaliar atividade de lesão, ele pode ser associado a critérios adicionais para avaliação da atividade das lesões (Ekstrand et al., 2007; Braga et al., 2010c).

Além disso, pode-se dizer que a avaliação longitudinal da evolução ou regressão dessas lesões poderia estimar sua atividade (Angmar-Mansson et al., 1998). No entanto, se fossem utilizados métodos convencionais de diagnóstico, como a inspeção visual tradicional ou o exame radiográfico, essas alterações só seriam detectáveis quando alterações significativas já tivessem ocorrido em tais lesões (Angmar-Mansson; ten Bosch, 2001), e isso é eticamente inaceitável.

Paralelamente, a utilização de métodos objetivos e quantitativos tem sido estudada para melhorar o desempenho no diagnóstico da cárie dentária, no que diz respeito a sua detecção e determinação de sua profundidade. Por esse motivo, métodos quantitativos que avaliem pequenas alterações minerais, sem que ocorram danos irreversíveis à estrutura do esmalte poderiam contornar essa dificuldade (Tranaeus et al., 2005). A quantificação de fluorescência induzida pela luz tem se mostrado promissora para essa finalidade e alguns métodos têm sido estudados.

Um aparelho desenvolvido para esse fim e que tem sido estudado utilizando a fluorescência a laser é o DIAGNOdent 2095 (KaVo, Biberach, Alemanha). Mais recentemente, foi lançada no mercado uma versão modificada desse aparelho (DIAGNOdent 2190 ou DIAGNOdent *pen*, KaVo, Biberach, Alemanha), que segundo o fabricante, apresenta maior facilidade de manuseio por se tratar de uma única peça.

O DIAGNOdent *pen*, assim como o modelo precursor, é um aparelho baseado na captação da fluorescência proveniente da parte orgânica da lesão

de cárie após a emissão de uma luz proveniente de um laser de diodo de 655nm de comprimento de onda. Essa fluorescência é maior no tecido cariado do que no tecido sadio. O próprio aparelho traduz essa fluorescência numa escala numérica que varia de 0 a 99. Quanto maior o valor registrado pelo aparelho, maior a profundidade da lesão (Hibst et al., 2001). O método tem demonstrado bom desempenho na detecção de lesões proximais e oclusais (Bader; Shugars, 2004; Novaes et al., 2009).

Os principais responsáveis pelo aumento da fluorescência após excitação com a luz nesse comprimento de onda parecem ser metabólitos bacterianos, provavelmente porfirinas (Hibst et al., 2001). Dessa forma, como lesões ativas de cárie são mais infectadas que lesões inativas (Nyvad; Fejerskov, 1997), o DIAGNOdent pen poderia ser um bom adjunto ao exame visual na avaliação da atividade das lesões de cárie. Lesões ativas com profundidade semelhante, ou com escores semelhantes obtidos na inspeção visual, poderiam demonstrar diferenças significativas nas medições com o DIAGNOdent pen comparando às lesões inativas. Recentemente, foi observado que o aparelho DIAGNOdent pode discriminar lesões ativas e inativas após secagem prolongada do dente. Assim, essa associação diminuiria a subjetividade inerente do exame visual, auxiliando o clínico na avaliação da atividade das lesões (Braga et al., 2010a).

Outro método baseado na quantificação de fluorescência induzida pela luz (QLF) tem sido estudado como instrumento para quantificação e monitoração das lesões de cárie (Heinrich-Weltzien et al., 2003). Esse aparelho registra a fluorescência emitida pelos tecidos dentários, além da fluorescência emitida por produtos bacterianos presentes na placa bacteriana. Esse sistema usa uma lâmpada de xenônio que emite luz violeta-azul com comprimento de onda de 405nm e as imagens são analisadas através de um software que mede o grau de perda de fluorescência entre o esmalte sadio e desmineralizado (van der Veen et al., 2006).

O QLF tem sido usado em estudos *in vitro*, *in situ* e clínicos (Pretty et al., 2002; Heinrich-Weltzien et al., 2003; Heinrich-Weltzien et al., 2005; Higham et al., 2005; Tranaeus et al., 2005; Meller et al., 2006; Pretty, 2006; Ferreira Zandona et al., 2010; Wu et al., 2010; Lippert et al., 2011). Dentre as indicações do uso do QLF estão: detecção precoce de lesões de cárie,

monitorar a progressão de lesões iniciais em pacientes com alto risco, avaliar a qualidade de selantes, restaurações e a eficácia na remoção de placa após a higienização (motivação do paciente) (Heinrich-Weltzien et al., 2003; Tranaeus et al., 2005; Pretty, 2006; de Josselin de Jong et al., 2009).

O método apresenta duas ferramentas, a medição da fluorescência na faixa do verde (ΔF), e a medição da fluorescência na faixa espectral vermelha (ΔR) (Heinrich-Weltzien et al., 2003; de Josselin de Jong et al., 2009). A fluorescência na faixa do verde tem sido descrita como a fluorescência intrínseca do tecido mineral dentário, e se propõe a avaliar principalmente alterações minerais decorrentes do processo de cárie. O método tem demonstrado uma forte correlação com a perda e ganho mineral de lesões cariosas de esmalte, decorrentes dos processos de desmineralização e remineralização (Ando et al., 1997; Ando et al., 2001; Angmar-Mansson; ten Bosch, 2001; Heinrich-Weltzien et al., 2003; de Josselin de Jong et al., 2009).

A outra ferramenta, que mede a fluorescência na faixa espectral do vermelho, é um pouco diferente da anterior, e seu estudo associado ao QLF ainda é escasso (de Josselin de Jong et al., 2009). A fluorescência vermelha é emitida provavelmente por produtos bacterianos, principalmente porfirinas e possivelmente polissacarídeos extrínsecos e intrínsecos (de Josselin de Jong et al., 2009). Muitas das bactérias que emitem essa fluorescência são relacionadas à placa bacteriana madura, no qual apresenta principalmente bactérias anaeróbias (Coulthwaite et al., 2006; Coulthwaite et al., 2009; de Josselin de Jong et al., 2009). A arquitetura da placa é provavelmente mais responsável pela fluorescência vermelha do que características específicas de bactérias isoladas (van der Veen et al., 2006; Thomas et al., 2008).

Por estar mais relacionada à placa madura, essa placa que fluoresce na faixa do vermelho poderia ser mais cariogênica (Heinrich-Weltzien et al., 2003; Coulthwaite et al., 2006), e portanto, a medição dessa fluorescência poderia ser um parâmetro útil para predizer o desenvolvimento de lesões de cárie.

A emissão de fluorescência pela placa bacteriana quando excitada pelo QLF já foi positivamente verificada (Heinrich-Weltzien et al., 2003; van der Veen et al., 2006; Thomas et al., 2008). Além disso, esse método mostrou-se eficiente na avaliação e quantificação da placa bacteriana (Pretty et al., 2005).

Considerando que a avaliação da atividade de cárie é de fundamental importância nos dias de hoje e a inspeção visual é o principal método disponível para diagnóstico da atividade das lesões de cárie (Braga et al., 2010c), é importante considerar que apesar do sistema de avaliação de atividade associado ao ICDAS estar validado (Ekstrand et al., 2007; Braga et al., 2010c), sua subjetividade não pode ser descartada. A combinação do critério de ICDAS com o QLF já foi avaliada e possui um bom potencial clínico que permite o diagnóstico precoce das lesões (Ferreira Zandona et al., 2010).

No entanto, a relação entre a presença de placa que fluoresce na faixa do vermelho com a utilização do QLF e a atividade de cárie ainda não foram avaliadas. Tal questão ainda em aberto suscita a necessidade de estudos que busquem aprimorar a avaliação da atividade de cárie, tanto pelo aperfeiçoamento no uso de métodos tradicionais já existentes, como de métodos adjuntos alternativos.

3 PROPOSIÇÃO

Diante do conhecimento prévio já exposto, foi levantada a hipótese de que a fluorescência vermelha da placa bacteriana poderia ser um indicador de sua cariogenicidade.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da presença de placa bacteriana fluorescente no vermelho na indução de lesões cárias utilizando um desenho experimental *in situ*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A). Um estudo *in situ* cruzado de duas fases foi delineado.

4.1 SELEÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA

Para este estudo, foram utilizados incisivos bovinos. Os dentes foram submetidos à profilaxia com pedra-pomes e água, e foram esterilizados com radiação gama (25 KGy). Os dentes foram então seccionados com disco diamantado em máquina de cortar dentes (Labcut 1010, Extec Corp., Enfield, EUA) sob refrigeração.

Primeiramente, os incisivos foram cortados separando a coroa da raiz com um único disco diamantado. Após, a coroa foi cortada na direção do seu longo eixo com dois discos diamantados e depois novamente com um único disco cortada transversalmente para a obtenção dos blocos de esmalte com medidas padronizadas 4 X 4 mm.

Os blocos tiveram a superfície polida com lixas de granulação decrescente (400, 600 e 1200) e com disco de feltro com pasta diamantada de 1 µm, acopladas a politriz automática (EcoMet, Buehler Ltda., Lake Bluff, EUA). Com isso os blocos obtiveram sua espessura padronizada e superfície polida para a leitura correta das durezas dos blocos. Tempos padronizados foram utilizados para cada lixa: na primeira (400), o tempo variou entre 3 à 5 minutos até alcançar a espessura desejada (2,2 à 2,5mm). Nas lixas de granulação 600, 1200 e feltro com a pasta diamantada, o tempo empregado foi de 1 minuto. Entre os polimentos de cada lixa, os blocos foram colocados no ultrassom com detergente enzimático por 2 minutos, e em seguida lavados com água destilada para remoção de resíduos. Ao final, os blocos tiveram as dimensões de 4 X 4 X 2 mm (Tenuta et al., 2003; Vale et al., 2007).

Foram inicialmente obtidos cerca de 500 blocos, que foram avaliados visualmente para a presença de trincas, manchas ou defeitos de superfície. Os que não apresentavam nenhum desses defeitos foram submetidos à avaliação da dureza inicial para seleção e obtenção dos valores de linha de base. A hidratação dos espécimes foi mantida em ambiente de 100% de umidade relativa durante todo o experimento, utilizando recipientes plásticos vedados com algodões umedecidos.

4.2 AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA

Cerca de 400 blocos foram submetidos à avaliação de dureza inicial. Para isso, foi utilizando um microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), composto por um indentador diamantado tipo Knoop, carga de 50 g por 25 s.

Cinco indentações foram realizadas para cada avaliação. A média dessas indentações deu o valor de dureza naquele bloco naquela fase de medição. Foram obtidos 288 blocos com média (desvio padrão) de 325,1 (30,4). Após, os blocos foram distribuídos aleatoriamente para cada voluntário, para cada período de exposição e nos diferentes grupos. Para a distribuição, números aleatórios foram gerados em computador e associados a cada bloco para serem distribuídos.

4.3 AVALIAÇÃO COM QLF

Após realização da microdureza, os blocos também foram avaliados utilizando o aparelho de quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF Pro; Inspektor Research Systems, Amsterdam, Holanda). As amostras foram avaliadas inicialmente, antes do posicionamento nos aparelhos, para avaliação das medidas de linha de base com relação à fluorescência verde e vermelha. Para manutenção de uma região livre de cárie durante todo o experimento,

uma área de cerca de 2 mm foi protegida com verniz ácido-resistente incolor (esmalte de unha). Essa região foi demarcada e não sofreu desmineralização durante o experimento. A integridade do verniz nessa região foi avaliada em todos os períodos de avaliação.

As medições foram realizadas com os blocos de esmalte sempre umedecidos. Quando os recipientes plásticos eram abertos, uma gaze umedecida era mantida sobre a amostra. Para a avaliação, o dispositivo para posicionar amostra do fabricante foi utilizado, e a ferramenta do software para padronização da obtenção das imagens foi ajustada num nível de 95% de captura. Pequenas correções entre as diferentes tomadas foram realizadas pelo operador com o próprio software.

4.4 SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Dezoito voluntários jovens e saudáveis com idades entre 20 e 40 anos foram selecionados para utilização de dispositivos intra-orais removíveis. Os voluntários foram devidamente esclarecidos sobre os objetivos e a metodologia a ser empregada (Apêndice A), e um termo de consentimento foi assinado concordando em participar do estudo (Apêndice B). Os voluntários eram todos cirurgiões-dentistas que aceitaram participar do estudo.

Para a seleção dos voluntários foi feita a anamnese, onde foram excluídos sujeitos que utilizassem medicamentos que poderiam alterar o fluxo salivar, tivessem alguma doença sistêmica ou não poderiam comparecer nos dias solicitados. Os voluntários incluídos no estudo tiveram seus arcos superiores moldados com alginato para obtenção dos modelos de gesso pedra e posterior confecção dos dispositivos intra-orais.

4.5 CONFECÇÃO DOS APARELHOS E ETAPA *IN SITU*

Aparelhos intra-orais palatais removíveis foram confeccionados em resina acrílica. Em cada dispositivo palatal foram criados nichos no acrílico para posicionar oito blocos de esmalte bovino. Os espécimes foram posicionados de modo a ficar 1 mm abaixo da superfície do acrílico (Tenuta et al., 2003; Aires et al., 2006; Ccahuana-Vasquez et al., 2007; Vale et al., 2007). Os espécimes foram então cobertos com uma rede plástica, com objetivo de favorecer o acúmulo de placa (Koulourides et al., 1974; Higham et al., 2005). Um estudo piloto foi previamente realizado com três voluntários.

Os indivíduos foram randomizados para seleção do grupo da primeira fase. Em uma fase, foi aplicada solução de sacarose a 20% que foi gotejada 8 vezes ao dia. Essa fase foi relacionada ao grupo experimental. Na outra fase, água destilada era gotejada em vez de sacarose, também oito vezes ao dias.

Cada fase teve duração de 14 dias, com 7 dias de *wash-out* entre elas (Higham et al., 2005). Dois blocos eram removidos do aparelho e avaliados após 4, 7, 10, 14 dias.

Nesses períodos experimentais, foram realizados os seguintes procedimentos. Primeiramente, a placa bacteriana presente sobre a superfície dos blocos foi analisado utilizando o QLF para a quantificação de fluorescência vermelha (ΔR). Para obtenção da região de referência, a placa bacteriana sobre a região protegida com verniz de unha foi removida cuidadosamente com uma lâmina de bisturi. Dessa forma, essa região livre de placa bacteriana serviu como referência para obtenção da medida de fluorescência vermelha.

Após essa avaliação, foi realizada a remoção total da placa bacteriana e cuidadosa limpeza com água destilada embebida em gaze. O bloco foi então novamente medido com o QLF, mas agora para a avaliação da fluorescência intrínseca do dente. A superfície protegida por verniz ácido-resistente foi utilizada como referência, e a medição da fluorescência verde (ΔF) foi realizada. Após avaliação com o QLF, que foi realizada no dia da coleta, os blocos foram armazenados em ambiente com umidade relativa de 100 % para posterior avaliação da microdureza. Os voluntários, após retirada dos blocos

referentes àquele período, voltavam a usar o aparelho com as demais amostras.

As avaliações de microdureza após o período experimental foram realizadas posteriormente, da mesma forma descrita anteriormente no item 4.2. A porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) foi calculada através da fórmula:

$$\%PDS = (\text{microdureza inicial} - \text{microdureza final}) / \text{microdureza inicial}$$

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Como cada voluntário usou dois blocos de dente para diferentes dias de exposição, em ambos os grupos, a média desses dois blocos foi considerada nas análises como unidade experimental. Inicialmente, os valores de todas as variáveis foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade e ao teste de Levene para avaliação da homocedasticidade. Como as variáveis mostraram distribuição normal e homogênea, os dados foram submetidos a análises paramétricas. Os valores de dureza inicial dos blocos foram submetidos à análise de variância de dois fatores (grupos e dias de exposição nos quais os blocos foram alocados) complementado pelo teste de contraste de Tukey, para avaliar se houve diferença estatisticamente significativa entre os blocos.

Num primeiro momento, como foi utilizado um desenho experimental de estudo cruzado, houve a preocupação de verificar se alguma variável apresentou um efeito de *carry-over* na segunda fase do experimento. Para avaliar esse efeito, os dados foram submetidos a uma análise linear de multinível considerando três fatores como variáveis independentes: grupo (controle ou exposto à sacarose), dias de exposição (4, 7, 10 ou 14 dias) e a fase (primeira ou segunda fase). A análise de multinível foi realizada para considerar os efeitos de agrupamento (*cluster*), pois os mesmos voluntários foram submetidos aos dois grupos e a todos os dias de exposição. Dessa

forma, quando a variável fase não apresentava diferença significativa, não havia evidência do efeito *carry-over* para aquela variável.

Como em nenhuma das variáveis analisadas houve efeito *carry-over*, trabalhou-se com todos os dados das duas fases. Para a comparação entre os grupos e os dias de exposição, também foi realizada a regressão linear de multinível, devido aos dois fatores vinculados (grupos e dias de exposição), para três diferentes desfechos: perda de dureza superficial (%), perda de fluorescência verde (diferença no ΔF , em %) e fluorescência vermelha da placa (ΔR , em %).

Num outro momento, para avaliar a associação da fluorescência vermelha da placa com a perda mineral do esmalte, foram realizadas análises de regressão linear de multinível para os dois desfechos relacionados à perda mineral: perda de dureza e perda de fluorescência verde. Nessas análises, a fluorescência da placa foi ajustada para o grupo experimental para avaliar se a associação, caso fosse significativa, era independente do grupo ou não. As análises de regressão entre a fluorescência da placa e os desfechos relacionados à desmineralização do dente foram feitas novamente de forma estratificada para cada grupo, empregando-se análises de regressão linear de multinível, bem como o teste de correlação de Pearson.

Para as análises de multinível, foi utilizado o software MLWIN 2.10 (Centre for Multilevel Modelling, University of Bristol, Bristol, Reino Unido). Para a análise de variância, teste de correlação de Pearson e confecção dos gráficos foi utilizado o programa Minitab 16 (Minitab Inc., State College, EUA). Para todas as análises, o valor de significância foi ajustado em 5%.

5 RESULTADOS

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de dureza inicial dos blocos de esmalte que foram alocados nos diferentes grupos para diferentes dias de exposição ($p = 0,991$). Dos 18 participantes inicialmente convidados a participar do estudo, um dos voluntários não pode participar da segunda fase, pois necessitou fazer uso de antibióticos e foi excluído do estudo. Portanto, a taxa de perda no estudo foi de 5,5%. Os valores da primeira fase do voluntário excluído não foram considerados na análise.

As análises para avaliação do efeito *carry-over* mostraram os seguintes valores de p para avaliar se houve diferenças entre a primeira e a segunda fase das diferentes variáveis: porcentagem de perda de dureza ($p = 0,131$); diferença no ΔF ($p = 0,632$); fluorescência vermelha da placa ($p = 0,571$). Todos esses valores de p estão ajustados para os grupos e dias de exposição, mostrando que não houve influência significativa da fase do estudo nas diferentes variáveis, independente dos grupos e dos dias de exposição.

Com relação às comparações realizadas nos diferentes grupos de acordo com os dias de exposição, houve um aumento na fluorescência vermelha da placa de acordo com os diferentes dias de exposição ($p < 0,001$). Além disso, esse aumento foi mais claro no grupo exposto à sacarose ($p < 0,001$). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a fluorescência vermelha da placa formada em 14 dias comparada à placa formada em 4 dias, em ambos os grupos. Os períodos intermediários (7 e 10 dias) apresentaram valores intermediários e sem diferenças significativas. Após 14 dias de formação, a fluorescência vermelha da placa foi estatisticamente maior no grupo exposto à sacarose (Figura 5.1).

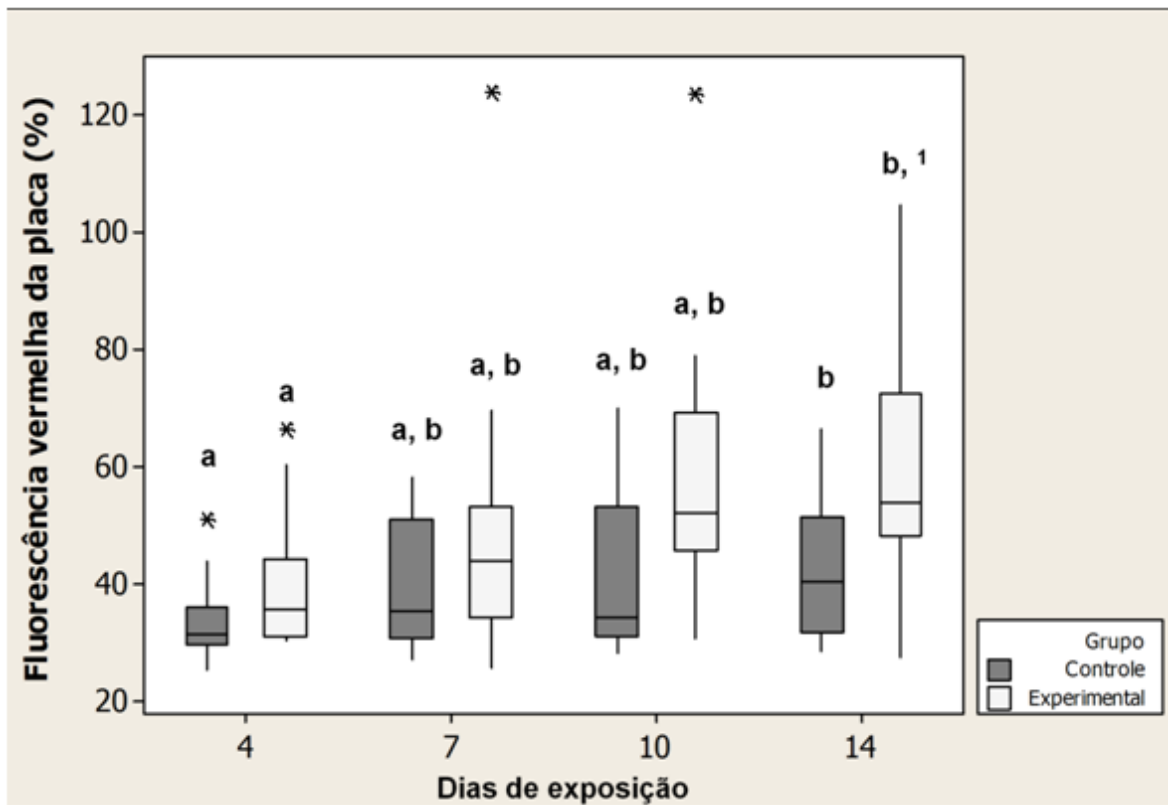


Figura 5.1 – Valores de fluorescência vermelha da placa formada em diferentes tempos de exposição nos diferentes grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os períodos de exposição considerando o mesmo grupo ($p < 0,05$). O número sobrescrito indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos naquele determinado período ($p < 0,05$)

Com relação aos valores de porcentagem de perda de dureza, houve uma tendência de aumento da perda de dureza entre os diferentes períodos apenas no grupo experimental ($P < 0,001$). No décimo dia de exposição, houve uma perda significativamente maior comparado ao quarto dia no grupo experimental. Nesse mesmo grupo, a perda foi significativamente maior após 14 dias de exposição, comparado a quatro e sete dias. Em todos os períodos de exposição, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o experimental (Figura 5.2).

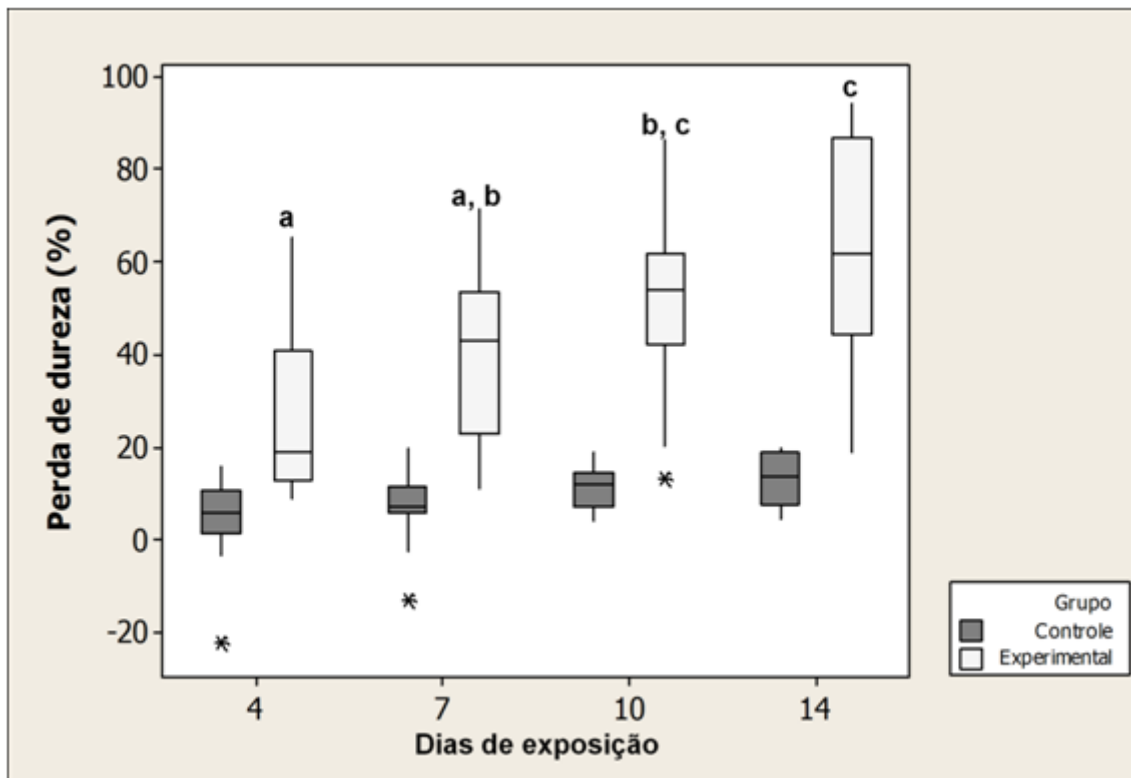


Figura 5.2 – Valores de perda de dureza após diferentes tempos de exposição nos diferentes grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os períodos de exposição considerando o mesmo grupo ($p < 0,05$). Não houve diferenças nos diferentes períodos nas amostras do grupo controle ($p > 0,05$). Em todos os períodos, houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

Já para a perda de fluorescência do esmalte (ΔF), apenas houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental sem levar em consideração os diferentes dias de exposição ($p < 0,001$). Entre os diferentes períodos, ou mesmo quando se levou em conta a interação grupo e dias de exposição, não houve diferenças estatisticamente significantes (Figura 5.3).

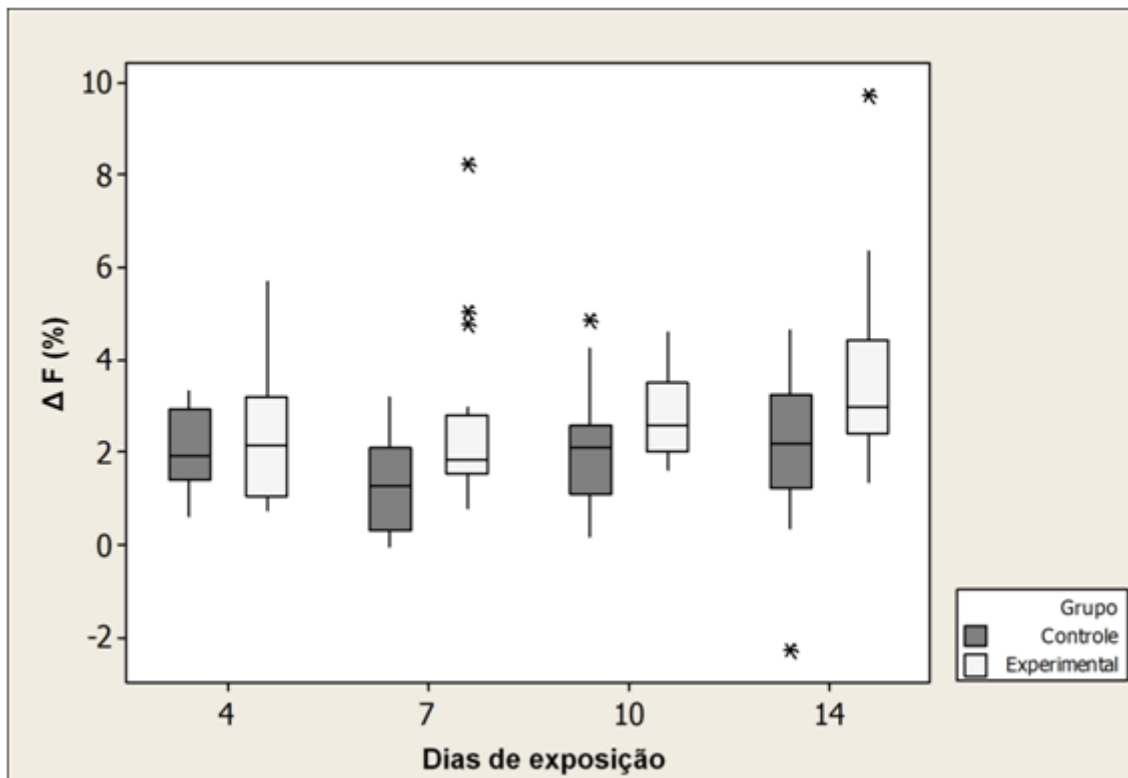


Figura 5.3 – Valores de perda de fluorescência verde do esmalte (ΔF) após diferentes tempos de exposição nos diferentes grupos. Não houve diferenças estatisticamente significantes na interação grupo e dias de exposição ($p > 0,05$)

Após as comparações, foram realizadas análises de regressão para avaliar a associação entre a fluorescência vermelha da placa e os desfechos relacionados à perda mineral. Num primeiro momento, as análises foram ajustadas pelo grupo. Pode-se observar que a fluorescência vermelha foi estatisticamente associada à perda de dureza do dente, independente da exposição à sacarose (grupo). Também nessa análise foi verificado que a maior parte da variância relacionada ao desfecho (porcentagem de perda de dureza) é explicada pela variação das amostras (primeiro nível), havendo apenas uma pequena porcentagem de variação entre os indivíduos (segundo nível). Todos os valores relacionados a essa análise estão descritos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Análise de regressão linear de multinível da associação entre a fluorescência vermelha da placa e a porcentagem de perda de dureza, ajustada pela exposição à sacarose ou não

Efeitos fixos	Modelo nulo		Modelo final		p *
	β	EP	β	EP	
Intercepto	27,74	3,75	-8,82	4,22	
<u>1º nível: Blocos</u>					
Fluorescência vermelha na placa			0,450	0,085	< 0,001
<u>2º nível: Voluntários</u>					
Grupo			32,34	3,80	< 0,001
Efeitos randômicos					
Variância do 1º nível (EP)	259,28 (36,31)		206,75 (28,95)		
Variância do 2º nível (EP)	412,87 (115,12)		63,60 (28,88)		
Deviance	1208,74		1135,31		
β = Coeficiente de regressão linear; EP = erro padrão					
* Valor de p calculado pelo teste da razão de máxima verossimilhança					

Para a associação da fluorescência vermelha da placa com a perda de fluorescência verde dos blocos de esmalte, também houve associação significativa ($p = 0,012$) entre a variável explanatória e o desfecho, independente do grupo de exposição ou não à sacarose. Da mesma forma, a maior parte da variância do modelo foi explicada pela variação entre os blocos de esmalte usados na pesquisa (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Análise de regressão linear de multinível da associação entre a fluorescência vermelha da placa e a redução na fluorescência verde do esmalte, ajustada pela exposição à sacarose ou não

Efeitos fixos	Modelo nulo		Modelo final		
	β	EP	β	EP	p *
Intercepto	2,376	0,150	1,150	0,346	
1º nível: Blocos					
Fluorescência vermelha na placa			0,019	0,008	0,012
2º nível: Voluntários					
Grupo			0,762	0,266	0,004
Efeitos randômicos					
Variância do 1º nível	2,164 (0,303)		2,061 (0,289)		
Variância do 2º nível	0,229 (0,201)		0,023 (0,149)		
Deviance	501,92		482,80		
β = Coeficiente de regressão linear; EP = erro padrão					
* Valor de p calculado pelo teste da razão de máxima verossimilhança					

Segundo a análise estratificada por grupo, para o grupo de amostras expostas à sacarose (grupo experimental), o coeficiente de correlação de Pearson entre a fluorescência vermelha da placa (ΔR) e a perda de dureza foi de 0,416 (Figura 5.4). A equação de regressão linear obtida foi:

$$\% \text{ Perda de dureza} = 20,114 (7,128) + 0,518 (0,124) \Delta R,$$

sendo que o erro padrão está representado nos valores entre parênteses.

Já para o grupo controle, o coeficiente de correlação foi menor (0,286), ou seja, a força de associação foi menor (Figura 5.4). A equação obtida foi:

$$\% \text{ Perda de dureza} = 2,145 (3,386) + 0,170 (0,083) \Delta R$$

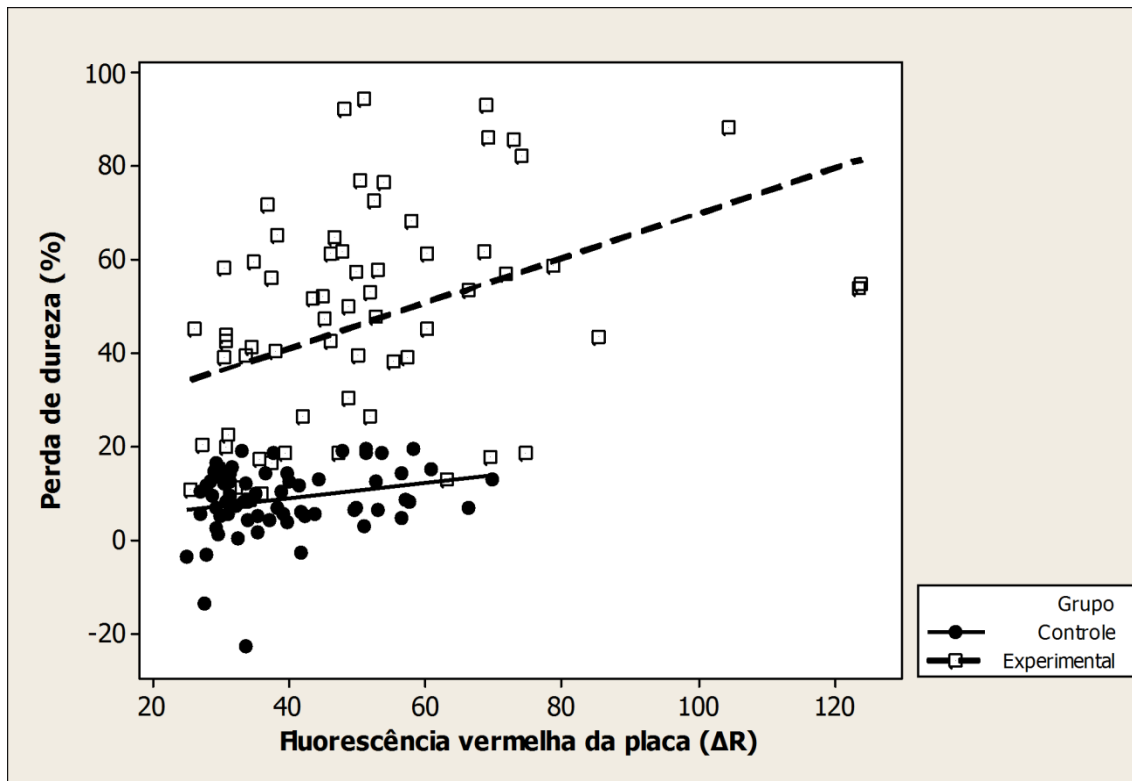


Figura 5.4 – Valores de fluorescência vermelha da placa associado à perda de dureza do esmalte considerando os diferentes grupos

Considerando a associação da fluorescência vermelha da placa (ΔR) com a diminuição de fluorescência dos blocos de esmalte (ΔF), pode-se observar que a associação é mais fraca para ambos os grupos, mas seguem a mesma tendência do grupo experimental apresentar maior força de associação do que o grupo controle. O coeficiente de correlação de Pearson para o grupo experimental foi 0,227, enquanto que para o grupo controle foi de 0,176 (Figura 5.5). A equação da regressão linear para o grupo experimental foi:

$$\Delta F = 1,924 (0,522) + 0,019 (0,009) \Delta R$$

Já para o grupo controle, a equação foi:

$$\Delta F = 1,075 (0,572) + 0,021 (0,014) \Delta R$$

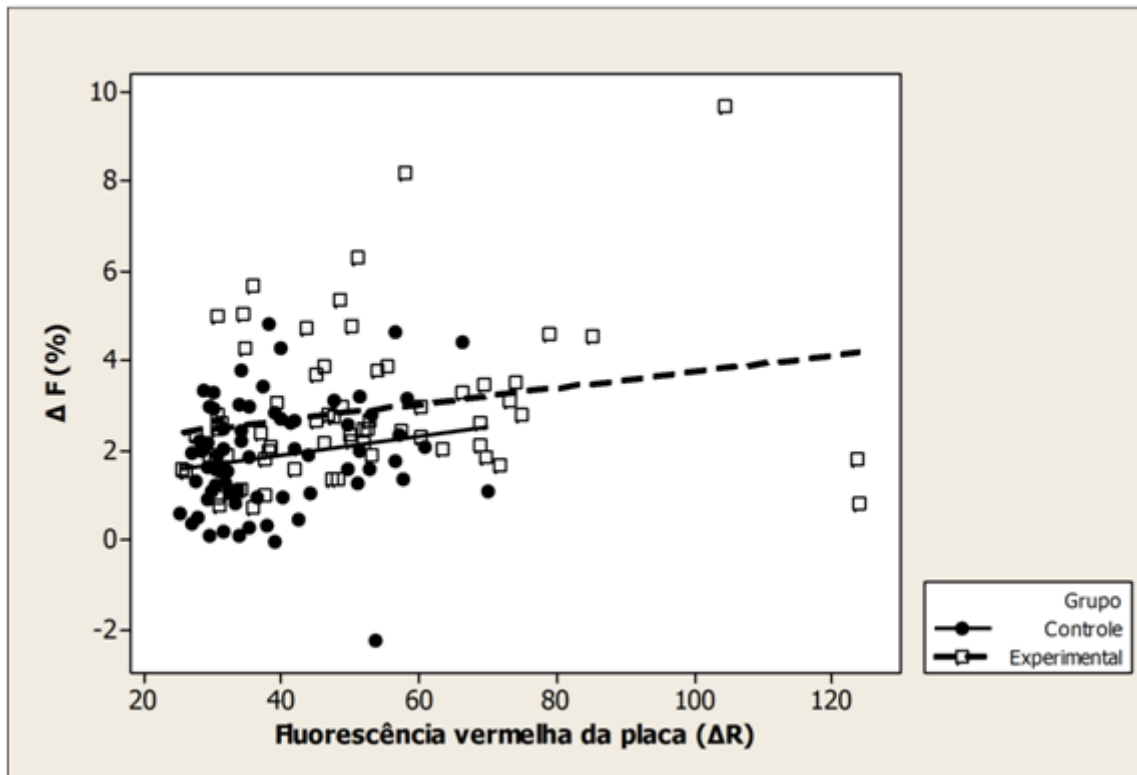


Figura 5.5 – Valores de fluorescência vermelha da placa associado à diminuição da fluorescência verde (ΔF) do esmalte considerando os diferentes grupos

6 DISCUSSÃO

Estudos anteriores têm demonstrado que a fluorescência vermelha da placa bacteriana indica a presença de bactérias anaeróbias obrigatórias, e que características intrínsecas da placa bacteriana madura são responsáveis pela autofluorescência vermelha (Coulthwaite et al., 2006; van der Veen et al., 2006; Raggio et al., 2010). Isso, portanto, poderia indicar uma maior cariogenicidade da placa e ser um fator de risco para a cárie dentária (Heinrich-Weltzien et al., 2003; Coulthwaite et al., 2006). A hipótese levantada no presente estudo foi que a placa fluorescente no vermelho teria maior potencial cariogênico. Para testar essa hipótese, foi delineado um experimento *in situ*, que é o primeiro estudo a avaliar diretamente a relação da placa bacteriana fluorescente no vermelho e sua cariogenicidade. No presente estudo, foi constatado que a fluorescência vermelha indica que a placa é realmente madura, mas isso não está necessariamente associada com a sua atividade cariogênica.

Para avaliar a perda mineral, dois métodos foram utilizados: a perda de dureza de superfície e a perda de fluorescência intrínseca do esmalte (verde) por meio do QLF. A placa bacteriana pode promover uma desmineralização da superfície dentária com consequente perda de dureza da superfície, e isso pode ser um indicador da perda mineral. Embora alguns autores critiquem seu uso (Magalhaes et al., 2009), é um método bastante utilizado e com certa validade para determinar perda mineral decorrente de lesão cáries em esmalte (Arends; ten Bosch, 1992; Aires et al., 2006; Ccahuana-Vasquez et al., 2007; Vale et al., 2007).

Ainda com relação à metodologia empregada, é importante ressaltar alguns aspectos da abordagem estatística utilizada. As análises de multinível podem ser utilizadas em experimentos com amostras repetidas com algumas vantagens sobre a análise de variância de medidas repetidas (Goldstein et al., 2002). Uma vantagem, por exemplo, é em relação à avaliação do efeito de *carry-over*, uma vez que os mesmos voluntários participaram dos dois grupos após um período de *wash-out*. Com a análise de multinível, inicialmente foi feita uma análise de três níveis (fase, períodos de coleta e grupo). Com isso, caso houvesse diferença estatisticamente significativa entre as fases com alguma

das variáveis, isso indicaria que houve efeito *carry-over*, e o delineamento cruzado estaria comprometido. Isso, no entanto, não ocorreu.

Outra vantagem é a possibilidade de incluir os participantes que por algum motivo desistiram ou tiveram que ser excluídos no meio do experimento. No presente estudo, um voluntário foi excluído da segunda fase. Com a análise de multinível, os dados da primeira fase desse voluntário poderiam ter sido incluídos, diferente do que ocorre com a análise de variância que obriga a exclusão desse indivíduo. No entanto, como a perda amostral foi pequena, optou-se por não incluir esses dados.

Outra vantagem das análises de regressão de multinível é relacionada à possibilidade de análise da variância de cada um dos níveis separadamente (Goldstein et al., 2002; Merlo et al., 2005). No presente estudo, foi observado que a maior parte da variância quando se incluía o grupo experimental no modelo era relacionada aos blocos de esmalte, e não aos indivíduos. Mais de 80% da variância do modelo era relacionado ao nível 1 (amostras). Isso é compreensível, uma vez que ambos os indivíduos participaram dos dois grupos, e atesta a vantagem do delineamento cruzado, bem como a qualidade do presente estudo em diminuir a variabilidade que inerente entre diferentes indivíduos.

Com relação à perda mineral, a avaliação da microdureza inicial e final dos blocos após exposição por sacarose foi avaliada. No presente estudo, com o passar dos dias de coleta foi observada maior perda mineral no grupo experimental. Isso demonstra que a técnica de microdureza de superfície refletiu o que seria esperado com o delineamento do experimento, ou seja, maior perda mineral no grupo experimental e tendência de aumento da perda mineral com maior tempo de acúmulo de placa.

Esses resultados foram previamente observados em outros estudos *in situ* (Tenuta et al., 2003; Aires et al., 2006; Ccahuana-Vasquez et al., 2007; Vale et al., 2007). Foi observada a desmineralização do esmalte em alguns estudos na presença (Ccahuana-Vasquez et al., 2007) e ausência de uso de dentifrício fluoretado (Ccahuana-Vasquez et al., 2007; Vale et al., 2007). No presente estudo, optou-se por não utilizar dentifrício fluoretado, pois se procurou testar apenas a cariogenicidade da placa bacteriana. Com o dentifrício fluoretado, o potencial cariogênico, e conseqüentemente, a perda

mineral, seria menor (Cury et al., 2003; Tenuta et al., 2009). Caso a fluorescência vermelha da placa fosse um indicador relevante de risco ou de cariogenicidade da placa, seria interessante repetir o estudo em voluntários sem a cessação do uso de dentifrícios fluoretados.

O outro método usado para a avaliação da perda mineral foi a detecção da fluorescência verde com o QLF após remoção da placa bacteriana. Muitos autores concordam que o QLF detecta muito precocemente a perda mineral (Ando et al., 1997; Angmar-Mansson et al., 1998; Ando et al., 2001; Angmar-Mansson; ten Bosch, 2001; Heinrich-Weltzien et al., 2003; Tranaeus et al., 2005; Pretty, 2006; Braga et al., 2010c). No entanto, a maioria dos trabalhos avaliou o método *in vitro* (Ando et al., 1997; Ando et al., 2001; Pretty et al., 2002; Wu et al., 2010; Lippert et al., 2011). Quando o método foi testado clinicamente, embora ele detectasse a desmineralização precocemente, o uso do aparelho na clínica foi limitado por diversos fatores de confusão (Heinrich-Weltzien et al., 2005). No presente estudo, o QLF demonstrou uma tendência de aumento da desmineralização com o tempo de acúmulo de placa no grupo experimental, semelhante ao que ocorreu com a microdureza de superfície. Entretanto, o poder discriminatório do QLF foi menor, visto que a diferença no teste estatístico foi significativa apenas entre os grupos, não nos diferentes tempos, nem nas interações. Portanto, os bons resultados obtidos previamente com a utilização do QLF em estudos *in vitro* necessitam ser testados *in situ* e *in vivo* para melhor comprovação da sua validade.

Outra ferramenta disponível no QLF é a avaliação da fluorescência vermelha (ΔR). Essa ferramenta ainda é recente, e poucos estudos avaliaram a sua utilidade (Pretty et al., 2005; Coulthwaite et al., 2006; Coulthwaite et al., 2009). Apesar de alguns autores afirmarem que a avaliação da fluorescência vermelha ser uma ferramenta promissora para detecção de lesões de cárie e para a educação do paciente, eles afirmam que as pesquisas nesse campo necessitam ser alavancadas (de Josselin de Jong et al., 2009).

Inicialmente esse fenômeno foi observado em avaliações com o QLF para detectar lesões de cárie na cavidade bucal em regiões de estagnação de placa que não haviam sido submetidas à profilaxia prévia. Isso foi inicialmente associado a um aumento do risco de cárie (Heinrich-Weltzien et al., 2003). De

fato, a fluorescência nessa faixa espectral emitida por alguns micro-organismos já havia sido relatada anteriormente (Konig et al., 1998).

Essa autofluorescência da placa bacteriana e de alguns micro-organismos está relacionado a metabólitos produzidos por algumas bactérias da cavidade oral, algumas associadas a cárie e doença periodontal. Foi observado que a excitação de alguns fluoróforos provenientes de metabólitos bacterianos com uma luz azul provoca uma fluorescência laranja ou vermelha (Konig et al., 1998). Esses metabólitos provavelmente são porfirinas bacterianas (Buchalla, 2005; Mendes et al., 2006; de Josselin de Jong et al., 2009). Outros autores também relatam que possivelmente a fluorescência pode ser proveniente de polissacarídeos extrínsecos e intrínsecos de algumas bactérias presentes no biofilme dentário (de Josselin de Jong et al., 2009).

Os primeiros trabalhos focaram a investigação da fluorescência emitida por algumas espécies de micro-organismos cultivadas em laboratório. Nesses estudos, os autores observaram que espécies anaeróbias, como algumas espécies de *Actinomyces* e micro-organismos associados à doença periodontal emitiam fluorescência no vermelho (Coulthwaite et al., 2006; Lennon et al., 2006). Com relação a micro-organismos relacionados à cárie dentária, diversas espécies de estreptococos não exibiram fluorescência no vermelho (Konig et al., 1998; Coulthwaite et al., 2006; Lennon et al., 2006). Em relação aos lactobacilos, entretanto, um estudo não detectou essa fluorescência (Konig et al., 1998), enquanto outro mais recente detectou que várias espécies de lactobacilos exibiram fluorescência vermelha (Lennon et al., 2006).

Esses achados iniciais parecem contradizer a relação da fluorescência vermelha emitida pela placa bacteriana e sua cariogenicidade, pelo menos com relação às lesões iniciais de cárie em esmalte (Lennon et al., 2006). No entanto, foi sugerido que a maturidade da placa poderia explicar uma maior atividade cariogênica da placa, uma vez que a maioria das bactérias fluorescentes em vermelho é encontrada em placa mais antiga e espessa (Coulthwaite et al., 2006).

Os estudos subsequentes foram realizados para avaliar a fluorescência da placa bacteriana, não só focando em espécies individuais. Uma pesquisa confirmou os achados que as espécies mais relacionadas ao início da lesão de cárie não exibiram fluorescência no vermelho, mas o *Lactobacillus acydophilus*

e outras espécies anaeróbias exibiram. No entanto, quando as bactérias eram semeadas em proximidade com outras, diferentes padrões de fluorescência foram observados (van der Veen et al., 2006). Um estudo *in situ* comprovou essa peculiaridade (Thomas et al., 2008). Dessa forma, parece que a fluorescência vermelha da placa bacteriana está mais relacionada a características intrínsecas do biofilme e sua arquitetura, do que a características de espécies isoladas presentes nesse biofilme (van der Veen et al., 2006; Thomas et al., 2008; de Josselin de Jong et al., 2009).

Portanto, a relação de maturidade e espessura da placa bacteriana (Coulthwaite et al., 2006; Lennon et al., 2006; van der Veen et al., 2006; Thomas et al., 2008; de Josselin de Jong et al., 2009; Raggio et al., 2010), associado ao fato da placa fluorescente no vermelho conter espécies associadas à formação da lesão da cárie (van der Veen et al., 2006; Thomas et al., 2008; de Josselin de Jong et al., 2009), poderia fazer com que essa propriedade estivesse relacionada com uma maior cariogenicidade da placa bacteriana e ser um fator de risco importante. Isso, entretanto, não havia sido testado diretamente em estudos anteriores. Apenas um estudo tentou mostrar essa relação na formação de lesões em esmalte e em dentina em amostras com restaurações ou não, usando um desenho experimental *in situ* (Thomas et al., 2008). No entanto, esse estudo não padronizou as condições de exposição à sacarose, e portanto, não havia um grupo experimental e um grupo controle definido (Thomas et al., 2008).

No presente estudo, procurou-se padronizar essas condições de exposição à sacarose, utilizando um delineamento de estudo cruzado, onde todos voluntários foram submetidos aos dois grupos. Para que a hipótese do estudo fosse comprovada, seria esperado que fluorescência vermelha da placa seguisse o mesmo padrão da perda mineral, ou seja, houvesse um aumento gradativo da fluorescência nos diferentes períodos do grupo experimental. De fato, houve esse aumento quando a placa era submetida à alta frequência de exposição à sacarose. Porém, houve um aumento também no grupo controle, embora menos pronunciado. Além disso, só houve diferença na fluorescência vermelha da placa entre os grupos experimental e controle após 14 dias de acúmulo de placa.

Esse achado corrobora os resultados previamente encontrados de que a placa bacteriana fluorescente no vermelho está relacionada à sua maturidade (Coulthwaite et al., 2006; Lennon et al., 2006; van der Veen et al., 2006; Thomas et al., 2008; de Josselin de Jong et al., 2009; Raggio et al., 2010). A diferença entre os grupos no último período é também compreensível, pois a placa se forma muito mais rapidamente na presença de sacarose (Ccahuana-Vasquez et al., 2007), e após algum tempo, era esperado que isso se diferenciasse.

Contudo, uma vez que não houve desmineralização significativa no grupo controle, a fluorescência vermelha da placa não está diretamente relacionada com a sua atividade cariogênica. As análises de regressão comprovam essa afirmação, uma vez que as medidas de fluorescência vermelha da placa foram significativamente associadas com as avaliações da perda mineral (perda de microdureza e de fluorescência intrínseca do dente), independentemente do grupo de exposição ou não à sacarose. Quando as análises de regressão foram feitas separadamente por grupo, a associação foi mais forte no grupo experimental, e as curvas foram totalmente diferentes, o que também é compreensível.

Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que, mesmo na ausência de sacarose, a placa que não sofre distúrbio de forças mecânicas se torna espessa e começa a abrigar espécies anaeróbias que emitem fluorescência vermelha, independente da relação com cárie dentária (Coulthwaite et al., 2006; Lennon et al., 2006). Dessa forma, os achados do presente estudo refutam a hipótese de que a fluorescência vermelha da placa bacteriana poderia ser um indicador da sua cariogenicidade.

Uma possibilidade que poderia ser avaliada num estudo clínico, todavia, é avaliar os valores de fluorescência vermelha da placa e frequência de ingestão de sacarose. Dessa forma, através de análises estatísticas apropriadas, seria possível definir se esses dois fatores avaliados em conjunto apresentariam maior validade preditiva do que quando considerados de forma separada. Outra possível utilidade da ferramenta de avaliação da fluorescência vermelha com o QLF poderia ser na avaliação da atividade de cárie das lesões. Nesse caso, a placa deveria ser removida, e a fluorescência vermelha da própria lesão seria medida. Estudos prévios mostram que outro aparelho de

medição de fluorescência, o DIAGNOdent, pode ser útil na avaliação da atividade de lesões de cárie (Pinelli et al., 2002; Braga et al., 2010a). Entretanto, essas duas utilidades devem ser investigadas futuramente.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a fluorescência vermelha avaliada pelo QLF é indicativa de uma placa bacteriana madura. No entanto, isso não está relacionado à atividade cariogênica do biofilme dentário.

REFERÊNCIAS¹

- Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res.* 2006;40(1):28-32.
- Ando M, Hall AF, Eckert GJ, Schemehorn BR, Analoui M, Stookey GK. Relative ability of laser fluorescence techniques to quantitate early mineral loss in vitro. *Caries Res.* 1997;31(2):125-31.
- Ando M, van der Veen MH, Schemehorn BR, Stookey GK. Comparative study to quantify demineralized enamel in deciduous and permanent teeth using laser- and light-induced fluorescence techniques. *Caries Res.* 2001;35(6):464-70.
- Angmar-Mansson B, ten Bosch JJ. Quantitative light-induced fluorescence (QLF): a method for assessment of incipient caries lesions. *Dentomaxillofac Radiol.* 2001;30(6):298-307.
- Angmar-Mansson BE, al-Khateeb S, Tranaeus S. Caries diagnosis. *J Dent Educ.* 1998;62(10):771-80.
- Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res.* 1992;71(Spec No):924-8.
- Bader JD, Shugars DA. A systematic review of the performance of a laser fluorescence device for detecting caries. *J Am Dent Assoc.* 2004;135(10):1413-26.
- Braga MM, de Benedetto MS, Imparato JC, Mendes FM. New methodology to assess activity status of occlusal caries in primary teeth using laser fluorescence device. *J Biomed Opt.* 2010a;15(4):047005.
- Braga MM, Martignon S, Ekstrand KR, Ricketts DN, Imparato JC, Mendes FM. Parameters associated with active caries lesions assessed by two different visual scoring systems on occlusal surfaces of primary molars - a multilevel approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010b;38(6):549-58.
- Braga MM, Mendes FM, Ekstrand KR. Detection activity assessment and diagnosis of dental caries lesions. *Dent Clin North Am.* 2010c;54(3):479-93.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

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

Burt BA. Concepts of risk in dental public health. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33(4):240-7.

Ccahuana-Vasquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res.* 2007;41(1):9-15.

Coulthwaite L, Pretty IA, Smith PW, Higham SM, Verran J. The microbiological origin of fluorescence observed in plaque on dentures during QLF analysis. *Caries Res.* 2006;40(2):112-6.

Coulthwaite L, Pretty IA, Smith PW, Higham SM, Verran J. QLF is not readily suitable for in vivo denture plaque assessment. *J Dent.* 2009;37(11):898-901.

Cury JA, Francisco SB, Simoes GS, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization in situ. *Caries Res.* 2003;37(3):194-9.

de Josselin de Jong ED, Higham SM, Smith PW, van Daelen CJ, van der Veen MH. Quantified light-induced fluorescence, review of a diagnostic tool in prevention of oral disease. *J Appl Phys.* 2009;105(10):102031.

Douglass CW. Risk assessment in dentistry. *J Dent Educ.* 1998;62(10):756-61.

Ekstrand KR, Bruun G, Bruun M. Plaque and gingival status as indicators for caries progression on approximal surfaces. *Caries Res.* 1998;32(1):41-5.

Ekstrand KR, Martignon S, Ricketts DJ, Qvist V. Detection and activity assessment of primary coronal caries lesions: a methodologic study. *Oper Dent.* 2007;32(3):225-35.

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

Ferreira Zandona A, Santiago E, Eckert G, Fontana M, Ando M, Zero DT. Use of ICDAS combined with quantitative light-induced fluorescence as a caries detection method. *Caries Res.* 2010;44(3):317-22.

Goldstein H, Browne W, Rasbash J. Multilevel modelling of medical data. *Stat Med.* 2002;21(21):3291-315.

Heinrich-Weltzien R, Kuhnisch J, Ifland S, Tranaeus S, Angmar-Mansson B, Stosser L. Detection of initial caries lesions on smooth surfaces by quantitative light-induced fluorescence and visual examination: an in vivo comparison. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(6):494-8.

Heinrich-Weltzien R, Kuhnisch J, van der Veen M, de Josselin de Jong E, Stosser L. Quantitative light-induced fluorescence (QLF)--a potential method for the dental practitioner. *Quintessence Int.* 2003;34(3):181-8.

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

Higham SM, Pretty IA, Edgar WM, Smith PW. The use of in situ models and QLF for the study of coronal caries. *J Dent.* 2005;33(3):235-41.

Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007;35(3):170-8.

Kanellis MJ. Caries risk assessment and prevention: strategies for Head Start, Early Head Start, and WIC. *J Public Health Dent.* 2000;60(3):210-7.

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

Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol.* 1974;3(4):185-96.

Lennon AM, Buchalla W, Brune L, Zimmermann O, Gross U, Attin T. The ability of selected oral microorganisms to emit red fluorescence. *Caries Res.* 2006;40(1):2-5.

Lippert F, Butler A, Lynch RJ. Enamel demineralization and remineralization under plaque fluid-like conditions: a quantitative light-induced fluorescence study. *Caries Res.* 2011;45(2):155-61.

Magalhaes AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res.* 2009;43(6):474-83.

Meller C, Heyduck C, Tranaeus S, Splieth C. A new in vivo method for measuring caries activity using quantitative light-induced fluorescence. *Caries Res.* 2006;40(2):90-6.

Mendes FM, de Oliveira E, Faria DLA, Nicolau J. Ability of laser fluorescence device associated with fluorescent dyes in detecting and quantifying early smooth surface caries lesions. *J Biomed Opt.* 2006;11(2):24007.

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

Merlo J, Chaix B, Yang M, Lynch J, Rastam L. A brief conceptual tutorial on multilevel analysis in social epidemiology: interpreting neighbourhood differences and the effect of neighbourhood characteristics on individual health. *J Epidemiol Community Health.* 2005;59(12):1022-8.

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.

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

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

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

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

Pretty IA. Caries detection and diagnosis: novel technologies. *J Dent.* 2006;34(10):727-39.

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

Pretty IA, Edgar WM, Smith PW, Higham SM. Quantification of dental plaque in the research environment. *J Dent.* 2005;33(3):193-207.

Raggio DP, Braga MM, Rodrigues JA, Freitas PM, Imparato JC, Mendes FM. Reliability and discriminatory power of methods for dental plaque quantification. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(2):186-93.

Tenuta LM, Lima JE, Cardoso CL, Tabchoury CP, Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in situ. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(4):326-31.

Tenuta LM, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. *Caries Res.* 2009;43(4):278-85.

Thomas RZ, van der Mei HC, van der Veen MH, de Soet JJ, Huysmans MC. Bacterial composition and red fluorescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite: an in situ study. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(1):7-13.

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

Tranaeus S, Shi XQ, Angmar-Mansson B. Caries risk assessment: methods available to clinicians for caries detection. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33(4):265-73.

Vale GC, Tabchoury CP, Arthur RA, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Cury JA. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. *Caries Res.* 2007;41(5):406-12.

van der Veen MH, Thomas RZ, Huysmans MC, de Soet JJ. Red autofluorescence of dental plaque bacteria. *Caries Res.* 2006;40(6):542-5.

Wu J, Donly ZR, Donly KJ, Hackmyer S. Demineralization Depth Using QLF and a Novel Image Processing Software. *Int J Dent.* 2010;2010:958264.

ORIENTAÇÕES AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

- 1) Todos os participantes deverão concordar em participar voluntariamente da pesquisa;
- 2) A pesquisa será realizada num total de 28 dias;
- 3) O participante receberá o dispositivo intraoral para uso diário, que somente será removido quando a solução de sacarose 20% ou água destilada deverá ser gotejada sobre os espécimes fixados no dispositivo (8 vezes ao dia);
- 4) Durante a escovação dental, o dispositivo deverá ser colocado na caixinha
- 5) O dispositivo intraoral será confeccionado em resina acrílica autopolimerizável e conterá 8 espécimes, devidamente esterilizados;
- 6) O voluntário deverá utilizar somente o dentifrício fornecido e não deverá higienizar o dispositivo intrabucal;
- 7) Não será solicitada nenhuma alteração adicional dos hábitos de higiene bucal ou hábitos alimentares;
- 8) O comparecimento às consultas é fundamental e essas serão agendadas com antecedência em horários convenientes aos participantes;
- 9) Qualquer dano ou problema com o dispositivo intraoral deverá ser comunicado imediatamente;
- 10) O material fornecido ao participante será constituído de solução com conta gotas, escova dental, dentifrício sem flúor, caixa plástica para armazenar o dispositivo.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Associação entre fluorescência vermelha emitida pelo biofilme dentário e atividade de cárie: estudo “*in situ*”**

Prezado Sr.(a),

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que estudará a capacidade de métodos de fluorescência em detectar e quantificar a perda mineral inicial no processo de formação de lesões de cárie, indicando sua progressão e atividade, tentando realizá-la da maneira mais próxima à realidade (*in situ*). Por este motivo, os voluntários utilizarão por período de 28 dias um aparelho de acrílico com pequenos blocos de dente bovino esterilizados.

O estudo será composto por 2 fases com intervalo de 1 semana entre as duas fases. Em uma das fases os voluntários terão que gotejar uma solução de sacarose 20%, 8 vezes ao dia e na outra água destilada 8 vezes ao dia, sobre os blocos, simulando o período de refeições. Neste período, os voluntários higienizarão a cavidade bucal com dentífrico fluoretado cedido pela pesquisadora, removendo, para isso, o aparelho.

Após 4, 7, 10 e 14 dias, os aparelhos serão entregues para a pesquisadora para que sejam realizadas as análises e na mesma sessão serão devolvidos. No 14 dia de análise o aparelho será entregue para que os voluntários tenham intervalo de uma semana para o início da próxima fase. Continuarão em seguida, por mais 14 dias com a utilização do aparelho e as análises nos dias específicos já ditos acima. Ao final deste período, os voluntários entregarão seus aparelhos para a pesquisadora.

Você foi selecionado de forma voluntária e sua participação não é obrigatória. Para participar deste estudo solicito a sua especial colaboração em utilizar corretamente o aparelho durante todo o período especificado (28 dias), pois a utilização inadequada poderá implicar na falha da pesquisa. Todos os materiais que serão utilizados (solução de sacarose 20%, água destilada, dentífrico sem flúor, aparelho e caixa para armazená-lo) não terão custo para o voluntário e

serão cedidos pela pesquisadora. Você não terá gasto com a sua participação no estudo e também não receberá pagamento pelo mesmo. Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, sem benefício direto para você, não representando qualquer risco de ordem física ou psicológica para você. Para confecção do aparelho será realizada moldagem da cavidade bucal superior dos voluntários, e o dispositivo intra-oral será utilizado por um período de dois dias para verificar sua adaptação.

Sua participação voluntária neste estudo é muito importante. Você tem o direito de não participar ou de sair deste estudo a qualquer momento. Você também pode ser desligado do estudo a qualquer momento, sem o seu consentimento, nas seguintes situações: (a) caso não use ou siga adequadamente as orientações do estudo; (b) caso sofra efeitos indesejáveis não esperados; (c) caso o estudo seja interrompido. Se optar por retirar-se do estudo, a pesquisadora responsável esclarecerá qualquer dúvida, bastando entrar em contato pelo seguinte endereço e/ou telefone e/ou e-mail:

Nome da Pesquisadora: Daniela Gonçalves Bittar

Endereço: Av. Prof Lineu Prestes , 2227

Telefone: 11 81392020 e-mail: dgbittar@usp.br

A sua identidade será mantida em sigilo. Os resultados serão sempre apresentados como o retrato de um grupo e não de uma pessoa. Dessa forma, você não será identificado quando o material de seu registro for utilizado, seja para propósitos de publicação científica ou educativa.

Consentimento

Após ler estas informações e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pela pesquisadora, concordo em participar de forma voluntária deste estudo.

Nome: _____

Assinatura: _____

R.G. _____

São Paulo, ____ de _____ de 20__

Dra. Daniela Gonçalves Bittar

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



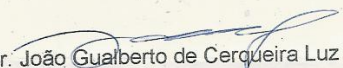
Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR - 226104
202/2008

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "**Associação entre fluorescência vermelha emitida pelo biofilme dentário e atividade de cárie: estudo in situ**", de responsabilidade do(a) Prof(a) Dra(a) Fausto Medeiros Mendes.

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

São Paulo, 11 de dezembro de 2008.


Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP