

MATHEUS DE CASTRO COSTA

Avaliação da dureza dos tecidos dentários hígido e cariado

São Paulo

2022

MATHEUS DE CASTRO COSTA

Avaliação da dureza dos tecidos dentários hígido e cariado

Versão Original

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

Área de concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Adriana Bona Matos

São Paulo

2022

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

Costa, Matheus de Castro.

Avaliação da dureza dos tecidos dentários hígido e cariado / Matheus de Castro Costa; orientadora Adriana Bona Matos. -- São Paulo, 2022.

100 p. : 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 original.

1. Dureza. 2. Esmalte dentário. 3. Dentina. 4. Cárie dentária. I. Matos, Adriana Bona. II. Título.

Fábio Jastwebski – Bibliotecário - CRB8/5280

Costa MC. **Avaliação da dureza dos tecidos dentários hígido e cariado** [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Original.

Aprovado em: 13/02/2023

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a) Saulo Geraldelli

Instituição: East Carolina University

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a) Yvette Alania Salazar

Instituição: University of Maryland

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a) Fausto Medeiros Mendes

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por toda força dada para concluir mais um projeto de vida, tendo em vista todas as dificuldades e superações ao longo da minha jornada, seja ela profissional ou mesmo pessoal.

Agradeço à minha família por todo apoio e incentivo para que eu siga buscando pelos meus sonhos. Em especial aos meus pais, Valéria e Paulo César, os quais sempre lutaram para me oferecer as melhores coisas da vida. Aos meus irmãos, Kenya, Paulo César Júnior, Adany e Kevin, por sempre me incentivarem e acreditarem em meu potencial.

Agradeço ao Victor Hugo, por sempre estar ao meu lado, ser um grande apoio e me ajudar em muitas decisões da vida. Aproveito também para agradecer em especial à minha amiga Ruth, por estar junto de mim em várias etapas desse trabalho e ser uma grande amiga. Também, agradeço à minha amiga Brenda por ser um grande suporte em São Paulo, apoiadora e conselheira.

Agradeço à minha orientadora, Adriana, por ter me acolhido como seu orientado, por ter compartilhado o seu conhecimento, ter me ajudado no desenvolvimento profissional e ter oportunizado vários momentos importantes. Agradeço aos alunos de iniciação científica, Naor e Maithê, por terem percorrido toda essa trajetória comigo e compartilhado vários momentos de risadas. Um agradecimento especial à Érika, por ter me ajudado bastante nesse trabalho e me ensinado muito sobre as etapas laboratoriais.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (processo número: 88887.616403/2021-00), agradeço pelo apoio financeiro e por acreditar que com a pesquisa chegaremos cada vez mais longe. Também, agradeço a FUNDECTO por ceder o espaço, muitas vezes, para realizar parte das etapas da pesquisa.

Outro agradecimento especial vai para os funcionários do departamento de dentística, Aldo, Selma e Silvana, vocês são essenciais em nossa trajetória.

No mais, agradeço a todos os outros aqui não mencionados, mas que de alguma forma me ajudaram a conquistar tudo isso, seja professores e amigos. Obrigado à banca por terem aceitado o meu convite e ajudar a enriquecer esse estudo.

RESUMO

Costa MC. **Avaliação da dureza dos tecidos dentários hígido e cariado** [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Original.

A dureza é uma das propriedades mecânicas da estrutura dental que pode ser afetada pelo processo carioso. O objetivo deste estudo foi avaliar a dureza de diferentes tecidos de dentes humanos permanentes, utilizando dois diferentes instrumentos de mensuração. A amostra foi composta por 36 espécimes classificados em escores ICDAS 3 (n = 14) e 4 (n = 22). Os dentes cariados foram seccionados no sentido méso-distal e polidos até a obtenção de uma superfície lisa e plana, expondo esmalte e dentina hígidos e cariados. Foram comparados esmalte hígido e cariado na mesma profundidade. Já para a dentina, diferentes camadas da dentina cariada foram comparadas à dentina hígida também na mesma profundidade. Os testes de dureza foram realizados utilizando os indentadores Knoop e Berkovich. Os dados foram submetidos à ANOVA de medidas repetidas seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). Após comparação entre o tecido cariado e hígido em profundidades equivalentes de esmalte e dentina de ambos escores, verificou-se maior dureza para o tecido sadio, independentemente do método utilizado. Por outro lado, a dentina esclerótica exibiu valores de dureza superiores à dentina hígida ($p = 0,001$). Houve correlação entre os indentadores utilizados para obtenção da dureza do esmalte (ICC: 0,98; IC 95%: 0,98 a 0,99) e da dentina (ICC: 0,96; IC 95%: 0,95 a 0,97). O teste de Bland-Altman e o teste t demonstraram concordâncias entre as medidas, enquanto a regressão linear simples não detectou variação entre as medidas de dureza realizadas. A regressão de multinível exibiu uma tendência similar entre os valores de dureza do esmalte e da dentina mensurados por ambos indentadores utilizados indicando que esmalte ($p < 0,001$) e dentina ($p < 0,001$) cariados possuem menor dureza dos que os hígidos. Com base nos achados foi concluído que ambos os equipamentos foram eficientes em detectar diferenças de dureza entre os tecidos dentais, hígidos e cariados. O esmalte hígido possui maior dureza do que o cariado em lesões ICDAS 3 e 4. A dureza da dentina em lesões ICDAS 3 foi maior para a dentina hígida do que para as dentinas

afetadas testadas. Já para a lesão ICDAS 4, a dureza da dentina esclerótica foi maior do que a dureza das dentinas hígida, infectada, afetada e terciária.

Palavras-chave: Dureza. Esmalte dentário. Dentina. Cárie dental.

ABSTRACT

Costa MC. Hardness assessment healthy and carious dental tissues [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Original.

Hardness is one of the mechanical properties of the tooth structure that can be affected by the carious process. This study aimed to evaluate the hardness of different tissues of permanent human teeth using two different measuring instruments. The sample consisted of 36 specimens classified in ICDAS scores 3 (n = 14) and 4 (n = 22). The decayed teeth were sectioned in the mesiodistal direction and polished until obtaining a smooth and flat surface, exposing healthy and decayed enamel and dentin. The hardness of sound and decayed enamel were compared. Different layers of carious dentin (infected, affected, sclerotic, and tertiary) were compared to sound dentin. The hardness tests were performed using the Knoop and Berkovich indenters. Data were statistically analyzed with repeated measures ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). After comparing carious and healthy tissue in equivalent depths of enamel and dentin of both ICDAS scores, greater hardness was observed for healthy tissue, regardless of the hardness equipment used. On the other hand, sclerotic dentin exhibited higher hardness values than all other tested dentin ($p = 0.001$). There was a correlation between the indenters used to obtain enamel hardness (ICC: 0.98; 95% CI: 0.98 to 0.99) and dentin (ICC: 0.96; 95% CI: 0.95 to 0.97). The Bland-Altman test and the t-test showed agreement between the measurements, while the simple linear regression did not detect any variation between the hardness measurements. The multilevel regression showed a similar trend between enamel and dentin hardness values measured by both indenters, indicating that decayed enamel ($p < 0.001$) and dentin ($p < 0.001$) have a lower hardness than sound ones. Based on the findings, one could conclude that both equipment efficiently detected hardness differences between sound and decayed dental tissues. Sound enamel has a greater hardness than carious enamel in ICDAS 3 and 4 lesions. Dentin hardness in ICDAS 3 lesions was greater for sound dentin than for the affected dentin tested. As for the ICDAS 4 lesion, the hardness of sclerotic dentin was greater than that of sound, infected, affected, and tertiary dentin.

Keywords: Hardness. Dental enamel. Dentin. Dental caries.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Desenho esquemático das zonas histológicas da cárie dental em esmalte. (S) camada superficial; (C) corpo da lesão; (E) zona escura; e (T) zona translúcida.....30
- Figura 2.2 - Esquema mostrando a produção de dentina terciária (células brancas = odontoblastos; células azuis = células indiferenciadas)43
- Figura 2.3 - Esquema ilustrativo dos diferentes indentadores comumente utilizados em testes de dureza.....48
- Figura 4.1 - Ilustração esquemática do preparo dos espécimes: (A) Seleção de dentes posteriores permanentes cariados; (B) Cortadeira Labcut 1010; (C) Corte transversal (separação coroa e raiz); (D) Seleção da área de interesse; (E) Cortadeira automática Isomet 1000; (F) Corte longitudinal (sentido méso-distal); (G) Espécime com exposição de tecido cariado; (H) Politriz; (I) Discos de lixa de granulação crescente; (J) Espécime planificado e polido; e (K) Teste e análise da dureza tecidual56
- Figura 4.2 - Hemi-coroas com lesões classificadas em ICDAS 3 e 4, utilizadas para avaliação de dureza de distintas regiões do tecido cariado57
- Figura 4.3 - Imagem representativa de um molar cariado: (ES) esmalte sadio; (EC) esmalte cariado; (DS) dentina sadia; (DI) dentina infectada; (DA) dentina afetada; (DE) dentina esclerótica; (DT) dentina terciária; e (CP) câmara pulpar59
- Figura 4.4 - Imagem de um molar cariado mostrando os pontos esquemáticos das mensurações de dureza Knoop e Berkovich em esmalte cariado, com distância entre as indentações de 100 µm.....60
- Figura 4.5 - Imagem de um molar cariado (ICDAS 3) mostrando os pontos esquemáticos das mensurações de dureza Knoop e Berkovich. Os pontos em branco representam as indentações no tecido dentinário afetado a 200 e 400 µm da junção amelodentinária (JAD) e os pontos azuis em dentina hígida seguindo as mesmas distâncias mencionadas. E: Esmalte/ D: Dentina61

Figura 4.6 - Imagem de um molar cariado (ICDAS 4) mostrando os pontos esquemáticos das mensurações de dureza Knoop e Berkovich em diferentes dentinas modificadas. De forma pareada, os pontos em branco representam as indentações no tecido dentinário cariado e os pontos azuis em dentina hígida, nas mesmas profundidades. As regiões analisadas foram: I: dentina superficial (cariada e hígida); II: dentina afetada média e hígida; III: dentina esclerótica e hígida profunda; e IV: dentina terciária 62

Figura 4.7 - Confeção de discos de resina acrílica para leitura de dureza Berkovich. (A) Placa de vidro com fita adesiva de dupla face; (B) Molde de silicone industrial; (C) Espécimes inseridos em cada orifício do molde; (D) Inserção de resina acrílica nos orifícios; e (E) Obtenção dos discos para leitura..... 63

Figura 5.1 - Gráficos de Bland-Altman dos indentadores Knoop e Berkovich para obtenção da dureza tecidual em (a) esmalte e (b) dentina, de dentes permanentes com lesões cariosas classificadas em ICDAS 3 e 4 71

Figura 5.2 - Linha de regressão linear para avaliar o potencial viés de proporção entre as diferenças das durezas Knoop e Berkovich (eixo Y) e médias de ambas as durezas (eixo X) de dados do (a) esmalte e (b) dentina..... 73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1 - Valores atribuídos ao teste de dureza Berkovich, utilizando o ultramicrodurômetro64
- Tabela 5.1- Média (desvio padrão) dos valores de dureza de lesões cariosas em esmalte classificados em ICDAS 3 e 4, utilizando as durezas Knoop e Berkovich65
- Tabela 5.2- Média (desvio padrão) dos valores de dureza de lesões em dentina de ICDAS 3, utilizando as durezas Knoop e Berkovich.....66
- Tabela 5.3- Média (desvio padrão) dos valores de dureza de lesões em dentina de ICDAS 4, utilizando as durezas Knoop e Berkovich.....69
- Tabela 5.4- Análise de regressão linear de multinível para valores de durezas Knoop e Berkovich obtidos em esmalte75
- Tabela 5.5- Análise de regressão linear de multinível para valores de durezas Knoop e Berkovich obtidos em dentina75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VHN	dureza vickers
KHN	dureza knoop
EDS	espectroscopia de raios-X por dispersão de energia
EDX	espectroscopia de raios-X por dispersão de energia
GPa	gigapascal
HAP	hidroxiapatita
ICDAS	sistema internacional para a detecção e avaliação de cárie
JAD	junção amelodentinária
MEV	microscópio eletrônico de varredura

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca	cálcio
CO ₃ ²⁻	carbonato
Cl ⁻	cloreto
PO ₄ ³⁻	fosfato
F ⁻	flúor
OH	hidroxila
Mg ²⁺	magnésio
mg	miligrama
Na ⁺	sódio
K ⁺	potássio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3	PROPOSIÇÃO	53
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
5	RESULTADOS	65
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

O tecido duro dental é formado por esmalte e dentina que apresentam composições e estruturas distintas, apesar de serem predominantemente constituídos de cristais de hidroxiapatita (HAP) (de Dios Teruel et al., 2015). O esmalte contém uma pequena quantidade de material orgânico e grande porção de conteúdo inorgânico (90-96%). Milhões de cristais com formato hexagonal, quando unidos, formam bastonetes com diâmetro de aproximadamente 4 µm, próximo à junção amelodentinária (JAD), até 8 µm, próximo a superfície externa do dente (Heymann et al., 2014; de Dios Teruel et al., 2015). Na dentina, apenas 70% do peso é de conteúdo mineral (Goldberg et al., 2011; de Dios Teruel et al., 2015). Os cristalitos dentinários apresentam-se em formatos de placas achatadas com comprimento de aproximadamente 60-70 nm, largura de 20-30 nm e espessura de 3-4 nm (de Dios Teruel et al., 2015).

Tais estruturas calcificadas podem ser modificadas frente a processos cariosos, resultando na alteração das propriedades mecânicas, como a dureza tecidual (Gutiérrez-Salazar; Reyes-Gasga, 2003). A redução da dureza é um indicativo do processo de desmineralização, visto que a ação de ácidos bacterianos provenientes da fermentação de carboidratos por bactérias cariogênicas causa perda mineral e desnaturação do colágeno (Feagin et al., 1969; Wang et al., 2007). Com o auxílio do Sistema Internacional para a Detecção e Avaliação de Cárie (ICDAS II), as características clínicas da cárie podem ser classificadas em seis pontuações. Os ICDAS de 1 a 3 apresentam alterações em esmalte dental (Ismail et al., 2007) caracterizadas pela presença de manchas brancas, sendo decorrentes da perda de minerais como Ca e PO_4^{3-} (Ismail et al., 2007; Gurunathan et al., 2012). Quando os processos físico-químicos não são eficientes em remineralizar o dente, a cárie resulta na deterioração da superfície do esmalte e progride para a dentina (Güçlü et al. 2016). Dessa forma, os ICDAS 4 a 6 são caracterizados por lesões gradativamente mais extensas, sem cavitação (4) ou com grau de cavitação na dependência do seu estágio (5 ou 6) (Ismail et al., 2007).

Em lesões de extenso acometimento do tecido dentinário, dúvidas ainda são recorrentes em relação a quantidade de tecido a ser removido (Joves et al., 2014). O tecido cariado pode assumir diferentes profundidades e durezas (Joves et al., 2014).

Alguns aspectos que podem influenciar nessa decisão estão associados à atividade da lesão cariada (aguda ou crônica), idade do paciente e as diferentes zonas da cárie (Joves et al., 2014). Alguns parâmetros de remoção desse tecido foram relatados, dentre os quais pode-se destacar os métodos de coloração, umidade e sensação tátil (Schwendicke et al., 2015). A inspeção tátil é o critério mais comumente usado durante o procedimento de escavação, porém é altamente subjetivo (Banerjee, Watson, Kidd, 2000; Banerjee et al., 2010; Joves et al., 2014). Não há um método efetivo para identificar clinicamente as fases de transição presentes na dentina cariada (Banerjee et al., 2010; Banerjee et al., 2017). No entanto, testes *in vitro* de dureza ajudam a fornecer valores translacionais para auxiliar clínicos no delineamento das margens do tecido que deve ser removido (Banerjee et al., 2010).

Os testes de dureza são amplamente utilizados para avaliar o processo de desmineralização e remineralização (Angker et al., 2003). São técnicas rápidas e simples, sendo utilizadas para avaliar diferentes tipos de dureza de materiais (Vander Voort; Lucas, 1998; Gutiérrez-Salazar; Reyes-Gasga, 2003). Esses métodos são ideais para substratos não homogêneos e de microestrutura delgada (Moharam et al., 2020). Diferentes indentadores são descritos na literatura, alguns exemplos incluem: Knoop, Vickers, Brinell e Rockwell (Vander Voort; Lucas, 1998). As pontas Knoop e Vickers são mais utilizadas em ensaios de dureza sobre os mais diferentes substratos (Vander Voort; Lucas, 1998). Ultimamente, alguns estudos têm usado a nanoindentação para fornecer informações sobre a dureza dental (Angker; Swain 2006; Senawongse et al., 2006). Os principais nanoindentadores encontrados são: Berkovich, ponta cúbica, cono-esférica e plana, sendo a primeira mais comumente utilizada nestes testes (Subramani et al., 2018). A diferença básica entre as pontas mais empregadas nos testes se dá em relação à mensuração das indentações. As marcações produzidas por Knoop e Vickers são tomadas a partir da área de indentação, enquanto que na Berkovich, a profundidade também é avaliada, promovendo maior precisão nas mensurações (Oliver; Pharr, 1992; Vander Voort; Lucas, 1998; Mahoney et al., 2000).

Diversos estudos têm descrito a dureza em diferentes regiões da cárie dental (Craig et al., 1959; Fusayama et al., 1966; Grajower et al., 1977; Banerjee et al., 2010; Almahdy et al. 2012), no entanto, não há uma padronização no tipo de lesão estudada. No presente trabalho, buscamos investigar a dureza de esmalte e dentina utilizando os indentadores Knoop e Berkovich em lesões cariosas, classificadas de acordo com

ICDAS em escores 3 e 4, comparando-as com o tecido hígido em mesma profundidade. Ademais, buscou-se verificar a concordância entre os indentadores na obtenção dos valores de dureza, a partir de parâmetros pré-estabelecidos na literatura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DO DENTE

A fase inorgânica do esmalte é formada por um ou mais tipos de minerais, sendo predominantemente encontrado a HAP, formada basicamente por cálcio (Ca) e fosfato (PO_4^{3-}) (de Dios Teruel et al., 2015). No entanto, pode ser observada uma diferença na razão cálcio-fosfato dessa estrutura cristalina em sua forma pura, devido a incorporação de impurezas (Abou Neel et al., 2016), tais como, carbonato (CO_3^{2-}), cloreto (Cl^-), flúor (F^-), magnésio (Mg^{2+}), potássio (K^+) e sódio (Na^+) (de Dios Teruel et al., 2015; Alkattan et al., 2018). Desse modo, substituições iônicas podem ser observadas na apatita dentária (de Dios Teruel et al., 2015). Muitos cátions e ânions são agregados à estrutura catiônica (Ca^{2+}) e aniônica (OH , PO_4^{3-}) da HAP (de Dios Teruel et al., 2015). Como exemplo, observa-se a substituição de Na^+ , K^+ e Mg^{2+} pelo cálcio. Ademais, F^- e Cl^- podem substituir a posição da hidroxila (OH) e o CO_3^{2-} na posição da hidroxila e do fosfato (de Dios Teruel et al., 2015).

Tais substituições de íons na estrutura da apatita podem causar mudanças em suas propriedades (Abou Neel et al., 2016). Dentre elas, um aumento da solubilidade mineral pode ser observado quando ocorre a substituição dos grupamentos hidroxila ou do fosfato por íons de carbonato (Nanci, 2017). Além disso, quando os íons de magnésio substituem os de cálcio pode ocorrer a inibição do crescimento dos cristais de apatita, visto que bloqueiam os locais de crescimento ativo (Jang et al., 2015; Nanci, 2017). Ao passo que, os íons fluoreto podem substituir as hidroxilas e diminuir a solubilidade mineral (Nanci, 2017). Após análise química por Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia (EDS), detectou-se uma mínima presença de Na^+ e Mg^{2+} na superfície externa do esmalte e verificou o aumento de ambos componentes à medida que se aproxima da JAD (Gutiérrez-Salazar; Reyes-Gasga, 2003). Enquanto que Ca e PO_4^{3-} permanecem quase constantes em toda a extensão desse tecido (Gutiérrez-Salazar; Reyes-Gasga, 2003).

Na porção orgânica do esmalte não são encontrados picos de hidroxiprolina e hidroxilisina que são características de fibras colágenas, o que difere da dentina (Eastoe, 1960). A matriz protéica do esmalte muda drasticamente durante a fase de desenvolvimento para o esmalte maduro, ocorrendo a diminuição do teor de proteína

(Eastoe, 1960). O esmalte em desenvolvimento, devido a sua maior quantidade de proteína, é menos duro (Eastoe, 1960). Durante o processo de maturação, há uma mudança na morfologia dos ameloblastos que refletem na alteração de sua função secretora (Gil-Bona A, Bidlack FB, 2020). Por sua vez, passam a absorver proteínas da matriz do esmalte com intuito de permitir o crescimento dos cristais minerais. Sendo assim, há uma diminuição drástica de proteínas e predomínio do conteúdo mineral no esmalte dental (Gil-Bona A, Bidlack FB, 2020).

A estrutura dentinária é composta por túbulos, dentina intertubular e peritubular (Angker; Swain 2006). Os túbulos abrigam os prolongamentos odontoblásticos, os quais se estendem da pré-dentina, próximo à polpa, podendo se estender até a JAD. Os túbulos possuem diâmetros entre 1-3 μm e aumentam à medida que se aproximam da câmara pulpar (Angker; Swain 2006; Mjör, 2009). Os túbulos são revestidos por dentina peritubular e podem ser obliterados por deposição mineral decorrente de processo carioso, ou ainda com o passar do tempo (Mjör, 2009). As dentinas intertubular e peritubular mineralizam ao mesmo tempo durante o processo de dentinogênese (Mjör, 2009). A dentina, em sua maior porção, possui um grau de mineralização uniforme, mas a dentina peritubular é mais mineralizada do que a intertubular (Mjör, 2009).

A formação das dentinas peritubular e intertubular se dá de forma diferente (Goldberg et al., 2011). A dentina peritubular é secretada pelos processos odontoblásticos ou mediante depósito de moléculas derivadas do fluido dentinário nas paredes dos túbulos dentinários (Goldberg et al., 2011). Algumas proteínas, proteoglicanos e lipídios da matriz extracelular estão diretamente envolvidas nesse processo, contribuindo para a formação dessa dentina hipermineralizada (Goldberg et al., 2011). Por sua vez, a dentina intertubular se dá a partir da transformação da pré-dentina em dentina, que resulta na formação da dentina intertubular, a qual é controlada pela matriz extracelular, sendo o colágeno tipo I o protagonista desse processo, atuando, no mínimo, como carreador de proteínas não-colágenas (Goldberg et al., 2011).

No geral, a dentina possui cerca de 40-45% em volume de mineral, sendo predominantemente formada por HAP, além de outros cristais como o β -tricálcio fosfato, conhecido por *whitlockite* (WH) (Goldberg et al., 2011; Jang et al., 2015). Mais especificamente, encontra-se 34-39% de cálcio e 16-18% de fosfato em peso na estrutura dentinária (de Dios Teruel et al., 2015). De acordo com um estudo in vitro

realizado em dentes humanos, a relação Ca/P da dentina foi menor que no esmalte (Gutiérrez-Salazar; Reyes-Gasga, 2003). Essa relação na dentina foi em torno de 1,5, enquanto no esmalte foi de 1,63, comparado com 1,67 em HAP pura (Gutiérrez-Salazar; Reyes-Gasga, 2003). No estudo de De Dios Teruel et al. (2015) a relação Ca/P da dentina foi de 1,53, a do esmalte 1,61 e da hidroxiapatita 1,64. Ademais, foi observado o aumento de Mg^{2+} da JAD para a superfície interna da dentina, enquanto Na^+ diminuiu (Gutiérrez-Salazar; Reyes-Gasga, 2003). O Mg^{2+} é responsável por melhorar o ambiente antimicrobiano e também aumenta a absorção do cálcio nos dentes, o que fortalece os dentes. Quando comparada ao esmalte, a dentina possui maior porcentagem de carbono, oxigênio e nitrogênio, o que é evidente devido seu maior conteúdo orgânico (Gutiérrez-Salazar; Reyes-Gasga, 2003; de Dios Teruel et al., 2015). Além disso, podem ser observados ainda em dentina, a presença de ácido cítrico e outros componentes orgânicos menores como glicosaminoglicanos, lipídios e diversas outras proteínas (Mjör, 2009).

Portanto, a dentina destaca-se por sua maior quantidade de material orgânico (30% em volume) quando comparada ao esmalte dental (Goldberg et al., 2011; Abou Neel et al., 2016). Em sua maior porção, a dentina é composta por 85% de colágeno tipo I, sendo o restante dividido entre colágenos tipos III e V (Abou Neel et al., 2016). A porção não colagenosa da matriz orgânica é formada por fosfoproteína de dentina (envolvidas em eventos de ligação mineral-matriz), que estão presentes em 50% de sua constituição, bem como outras proteínas, a exemplo, os proteoglicanos, que possuem relevância estrutural e mecânica (Abou Neel et al., 2016; Bertassoni et al., 2012).

Na dentina intertubular há um predomínio de fibrilas colágenas tipo I (90% em peso) associada com proteínas não colagênicas e proteoglicanos, enquanto que na dentina peritubular não são observadas fibrilas colágenas, apenas proteínas não-colágenas e fosfolípidos (Goldberg et al., 2011; Bertassoni et al., 2012).

É importante salientar que as propriedades físicas e químicas dos diferentes tecidos dentários variam bastante mediante a proporção de conteúdo orgânico/inorgânico, o que reflete diretamente em suas características (Abou Neel et al., 2016). O esmalte, por exemplo, possui alto conteúdo inorgânico, sendo o tecido mais resistente do corpo humano. Já a dentina, por sua grande quantidade de material orgânico, possui grande resiliência, o que é benéfico para o esmalte e o cimento (Abou Neel et al., 2016). Ademais, influenciam no comportamento desses tecidos

frente aos desafios de desmineralização e remineralização que ocorrem no meio bucal.

2.2 PROCESSO CARIOSO, ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS EM ESMALTE

Desde a erupção dos dentes na cavidade oral, as superfícies dentais são colonizadas por comunidades microbianas simbióticas, em especial bactérias saprófitas gram-positivas que no geral são inofensivas ao dente (Farges et al., 2015). Diversos gêneros de bactérias presentes na cavidade oral estão associadas à saúde, sendo elas normalmente: *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Streptococcus* e *Veillonella* (Sanz et al., 2017). Entretanto, quando há a passagem do estado de saúde para a cárie dental há uma modificação na microbiota oral (Sanz et al., 2017). A diversidade bacteriana geral é menor na doença do que na saúde (Sanz et al., 2017). Isso ocorre em ambientes com grandes quantidades de açúcares, visto que são substratos que favorecem a proliferação de bactérias cariogênicas, produzindo ácidos que levam à desmineralização do esmalte (Loesche, 1996; Fejerskov et al., 2015).

As características que propiciam a proliferação de bactérias cariogênicas são: acidogenicidade, acidúricas e produção de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose da dieta. As principais bactérias envolvidas neste processo são os *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus* (Nishikawara et al., 2007). No entanto, outros microorganismos podem estar associados à cárie, como *Bifidobacterium dentium*, *Scardovia wiggsiae* (encontrado em lesões de cárie precoce da infância) e *Chlebolella* ou *Pseudoramibacter* (Sanz et al., 2017).

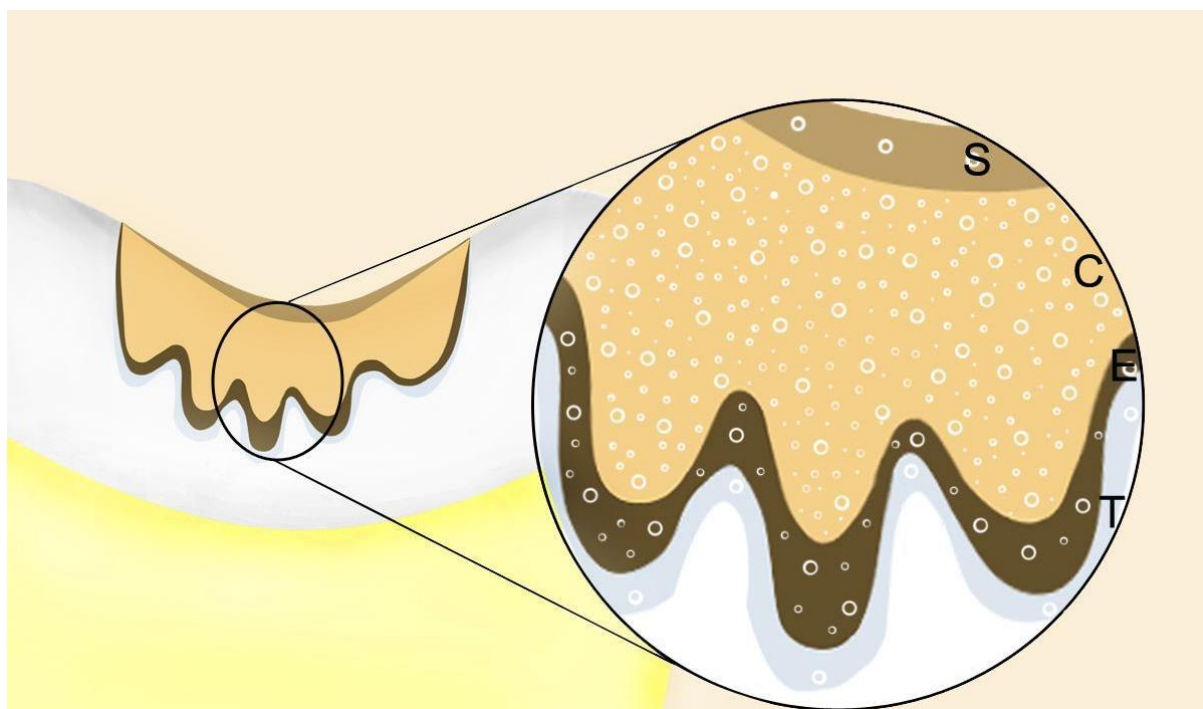
Os *S. mutans* foram isolados, a partir de dentes humanos cariados, pela primeira vez por Clarke em 1924 (Clarke, 1924). Loesche et al. (1984) em seu estudo longitudinal observou que dentes prestes a apresentar lesões cariosas apresentavam um acréscimo significativo do número de *S. mutans* entre 6 a 24 meses antes do diagnóstico. Os *S. mutans* podem fermentar diversos açúcares, principalmente a sacarose, em razão da grande quantidade produzida de ácido láctico (Balakrishnan et al., 2000) por essa bactéria. Esse ácido promove a desmineralização do cálcio

presente nos cristais de hidroxiapatita na superfície dental causando sua dissolução (Balakrishnan et al., 2000).

Margolis et al. (1999) buscou avaliar a cinética de desmineralização do esmalte, utilizando soluções ácidas que se assemelham às condições do processo cariioso. Observaram que a taxa de desmineralização é inversamente proporcional ao pH da solução. Em soluções com pH relativamente altos, não foram observadas lesões subsuperficiais de esmalte, enquanto que em soluções com pH mais baixo (<5,5) a formação de lesão subsuperficial foi detectada. Portanto, devido à diminuição do pH, em um nível crítico, a taxa de dissolução da hidroxiapatita aumenta (West; Joiner, 2014).

Dessa forma, após repetidas quedas de pH e ataques ácidos, os sinais do processo de desmineralização acometem o esmalte, inicialmente, em um nível subclínico, não sendo detectado por meio dos métodos clínicos e radiográficos tradicionais (Selwitz et al., 2007). Ressalta-se que a remineralização proveniente da saliva torna este processo dinâmico. Portanto, os ciclos de desmineralização causam uma maior porosidade no esmalte superficial e os ácidos permeiam o esmalte iniciando a formação da lesão de cárie em camadas mais profundas do esmalte. Darling (1956) detectou, a partir de microscopias de luz polarizada, quatro regiões distintas em manchas brancas de esmalte, que apresentavam propriedades ópticas diferentes. Essas zonas parecem representar um estágio discreto de degradação do esmalte (Hallsworth et al., 1972). Assim, as manchas brancas em esmalte estão constituídas por quatro zonas: zona de superfície, corpo da lesão ou camada subsuperficial, zona escura e zona translúcida (Darling, 1956; Moreno; Zahradnik, 1974; Robinson et al., 2000) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Desenho esquemático das zonas histológicas da cárie dental em esmalte. (S) camada superficial; (C) corpo da lesão; (E) zona escura; e (T) zona translúcida



Fonte: O autor.

2.2.1 Zona translúcida

Devido ao aumento da porosidade do esmalte frente ao processo de formação da cárie, os ácidos penetram nestas porosidades e iniciam sua ação desmineralizante em profundidade. Assim, a primeira mudança é o aparecimento da zona translúcida, que possui conteúdo mineral em torno de 1-1,2% menor do que o do esmalte sadio (Hallsworth et al., 1972; Robinson et al., 2000). Esta zona está localizada na porção mais profunda do esmalte desmineralizado. Uma perda maior de carbonato e magnésio é observada na zona translúcida nas primeiras alterações histológicas ocorridas neste processo carioso (Hallsworth et al., 1972). O magnésio, na zona translúcida primária, apresenta cerca de 12% de peso a menos quando comparado ao esmalte hígido (Hallsworth et al., 1972). Isso é esperado, visto que esses minerais são mais solúveis (Robinson et al., 2000). Essa zona, depois que a cárie atinge o seu estágio avançando, localiza-se entre a zona escura e o esmalte hígido em sua porção mais interna (Hallsworth et al., 1972).

2.2.2 Zona escura

A próxima camada a se formar é a zona escura que possui uma birrefringência positiva que contrasta com a birrefringência negativa do esmalte sadio (Robinson et al., 2000). Essa zona quando observada por microscopia de luz transmitida possui uma coloração amarronzada quando embebida em quinolina, vista acima da zona translúcida (De Medeiros et al., 2012). De acordo com Hallsworth et al. (1972), a zona escura mostrou uma perda de mineral total entre 5,6-7,6% e mais especificamente de Mg^{2+} entre 9,1-11,6% em comparação ao esmalte hígido. Na zona escura é possível observar o aumento da porosidade em aproximadamente 5-10%, com a contínua perda seletiva de carbonato e magnésio (Robinson et al., 2000).

2.2.3 Corpo da lesão

Com a progressão da desmineralização, tem-se a formação do corpo da lesão que exibe um volume de poros entre 25-50% em sua porção central. Estes poros se alargam continuamente até que ocorra a destruição tecidual, ou seja, a formação de cavitação (Robinson et al., 2000). O corpo da lesão possui 18-33% de perda mineral (Hallsworth et al., 1972), com redução entre 14-22,9% do conteúdo de Mg^{2+} , em comparação ao esmalte hígido (Hallsworth et al., 1972). Por fim, essa zona localiza-se entre a camada superficial e a zona escura, sendo a zona de maior perda mineral, considerada o estágio final da destruição do esmalte (Robinson et al., 2000). Em espectroscopia Raman foi observado diminuição acentuada no pico de PO_4^{3-} e intensa depleção da cristalinidade no corpo da lesão (Al-Obaidi et al., 2018). A cristalinidade é de grande importância, visto que cristais pequenos e imperfeitos, devido a substituição por outros componentes (p. ex. íon carbonato), se tornam mais susceptíveis à dissolução ácida e ocorre a progressão da lesão cariiosa (Al-Obaidi et al., 2018). É de se esperar que em lesões cariosas haja um aumento da relação CO_3^{2-}/PO_4^{3-} em comparação ao esmalte hígido (Al-Obaidi et al., 2018).

2.2.4 Zona superficial

Após o ataque cariogênico inicial com a formação da zona translúcida, desenvolve-se a zona superficial, que inicialmente encontra-se “inalterada” e é a zona mais superficial da lesão de mancha branca (Moreno; Zahradnik, 1974). De acordo com Robinson et al., (2020) essa zona permanece intacta até um determinado momento, devido aos mecanismos de desmineralização/remineralização durante o processo de cárie. Quando ocorre a diminuição do pH, ocorre a desmineralização de cristais mais solúveis, enquanto que quando o pH retorna ao neutro, há a precipitação de cristais menos solúveis, o que torna essa camada mais resistente aos novos desafios ácidos (Daculsi et al., 1987; Maltz et al., 2016). No entanto, outra teoria para explicar a manutenção dessa camada superficial é a da existência de proteínas da saliva ricas em prolina, que seriam capazes de inibir a desmineralização. Por serem macromoléculas, não conseguem adentrar por entre as porosidades do esmalte, tendo apenas ação na superfície (Maltz et al., 2016).

No trabalho realizado por Hallsworth et al. (1972), uma perda mineral entre 8,3-11,5% quando comparada com o dente hígido foi observada nesta zona. A zona superficial permanece íntegra até que ocorra o aumento do corpo da lesão, quando a zona superficial fica sem suporte e colapsa, aparecendo clinicamente a cavitação (Robinson et al., 2000). Quando analisado o conteúdo de Mg^{2+} , observou-se que não havia diferença com relação à região superficial do esmalte hígido, ambos apresentaram 40% menos Mg^{2+} do que a porção interior hígida de esmalte (Hallsworth et al., 1972). A zona superficial encontra-se remineralizada, a qual possui picos de fosfato e dureza aumentados (Sa et al., 2017).

Apesar da zona superficial ser intacta, a sondagem dessa superfície deve ser evitada, visto que por apresentar porosidades e uma subsuperfície com grande alteração da dureza, pode ser cavitada a depender da pressão exercida (Maltz et al., 2016).

2.2.5 ICDAS

Para distinguir clinicamente as lesões cariosas, um sistema vem ganhando destaque no diagnóstico de cárie, o ICDAS II, que é baseado no exame visual e é classificado em sete pontuações (0-6) (Quadro 2.1).

Quadro 2.1 - Diagnóstico de cárie proposto pela Classificação Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie II (ICDAS II)

ICDAS	Característica visual	Tecido
0	Saudável	Esmalte/ Dentina
1	Lesão inicial de mancha branca/marrom em esmalte seco	Esmalte
2	Lesão inicial de mancha branca/marrom em esmalte úmido	
3	Lesão moderada com microcavitação em esmalte seco	
4	Lesão moderada com sombra da dentina em esmalte úmido com ou sem cavitação	Dentina
5	Lesão extensa com cavitação de aproximadamente metade da dentina	
6	Lesão extensa com cavitação de mais da metade da dentina	

Fonte: Ismaïl et al., 2007

2.2.6 Aspectos clínicos de lesões cariosas em esmalte

De acordo com o ICDAS II, neste tópico trataremos apenas dos escores 0 a 3, quando apenas o esmalte dental está envolvido no processo. O escore 0 é considerado dente hígido, mas pode necessitar de alguma intervenção preventiva, como a aplicação tópica de flúor e o uso de selantes de fósulas e fissuras.

O ICDAS 1 representa o primeiro sinal clínico de cárie em esmalte (Ismaïl et al., 2007), apesar de sabermos que histologicamente a formação da lesão ocorre em profundidade, como já descrito acima. Nesse estágio, a ação dos ácidos aumenta a

permeabilidade da porção mais externa do esmalte e este tecido mais poroso possui propriedades ópticas alteradas que se expressam no aparecimento de manchas brancas (Ismaïl et al., 2007). Ocorre, primariamente, a dissolução de carbonato e magnésio, seguido de cálcio e fosfato (Coolidge; Jacobs 1957; Hallsworth et al., 1973). Nessa classificação, a lesão cariada não é vista quando o dente está úmido, portanto, é necessário secar o dente por pelo menos cinco segundos para uma efetiva desidratação do esmalte dental (Ismaïl et al., 2007).

O ICDAS 2 apresenta o mesmo tipo de alteração observada nas lesões de mancha branca classificadas como ICDAS 1, porém em maior magnitude (Ismaïl et al., 2007). As mudanças são mais acentuadas e as manchas brancas são visualizadas mesmo com a presença de saliva (Zero et al., 2011). Com o aumento da permeabilidade do esmalte, os ácidos que o permeiam estimulam uma resposta do complexo dentina-polpa, aumentando a atividade dos odontoblastos (Zero et al., 2011). Na sequência, estes odontoblastos iniciam a produção de matriz de dentina terciária (Zero et al., 2011). Ou seja, no ICDAS 2 já se inicia alguma modificação em dentina sem nenhum sinal clínico.

Em um estágio mais avançado de cárie em esmalte ICDAS 3, pode-se observar uma ruptura restrita ao esmalte e localizada, sem sinal clínico do acometimento da dentina (Ismaïl et al., 2007; Zero et al., 2011). Nessa fase, o dente apresenta uma lesão de mancha branca vista mesmo em presença de umidade (Ismaïl et al., 2007). Em caso de dúvida, uma sonda de extremidade esférica pode ser usada de forma suave para confirmar a presença de cavitação confinada ao esmalte dental (Ismaïl et al., 2007).

Para além de uma classificação em escores, as lesões de esmalte também devem ser analisadas quanto a sua atividade. As lesões de esmalte em superfície lisa podem ser inativas ou ativas. As inativas possuem uma superfície esbranquiçada, brilhante e lisa, indicando que clinicamente já passaram por um processo de remineralização eficiente, porém permanecerão na superfície do esmalte como uma cicatriz (Kidd, 2000). As lesões ativas são caracterizadas por manchas brancas opacas e de aparência rugosa (Kidd, 2000).

O ICDAS II, também pode ser utilizado para caracterizar a atividade de lesões em face oclusal (Ismaïl et al., 2007). Portanto, quando se trata de uma lesão inativa, o ICDAS 1 é normalmente representado por uma fina mancha amarronzada nos sulcos e fissuras vista somente quando o esmalte está seco. Para o ICDAS 2, esta

mesma coloração marrom nos sulcos e fissuras pode ser vista em esmalte úmido. Em lesões classificadas como ICDAS 3 uma coloração amarronzada está associada a alguma cavitação do esmalte (Ismail et al., 2007). As pigmentações na camada superficial são decorrentes dos pigmentos alimentares que agora podem ser incorporados à lesão devido a sua inatividade (Paris; Meyer-Lueckel 2016).

Durante a inatividade das lesões, nota-se uma camada superficial menos porosa devido ao aumento dos cristais em comparação às lesões ativas (Paris; Meyer-Lueckel 2016). Observa-se também, a diminuição da extensão do corpo da lesão, com consequente aumento da zona escura na direção da camada superficial (Holmen et al., 1987). Isso se deve à reposição mineral que ocorre na cavidade oral, como pela ingestão de flúor através da água fluoretada (Featherstone, 1999). Sabe-se que o flúor atua promovendo: I) inibição da desmineralização do mineral presente na estrutura dental; II) aumento da remineralização da superfície, visto que é muito resistente a ação de ácidos; III) inibição de enzimas provenientes de bactérias (Featherstone, 1999).

2.3 MANIFESTAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E CLÍNICAS DE LESÕES CARIOSAS EM DENTINA

Quando há o rompimento do esmalte, a dentina é colonizada por *S. mutans*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* (Love; Jenkinson, 2002). O conteúdo mineral da dentina é muito importante, visto que limita a penetração do ácido produzido pelas bactérias (Chu; Lo 2008). Os minerais, em um nível macromolecular, ocupam duas regiões distintas da estrutura de colágeno: intrafibrilar (nas lacunas entre as fibrilas colágenas) e extra-fibrilar (nos espaços intersticiais das fibrilas) (Chu; Lo, 2008). No entanto, quando os produtos metabólicos bacterianos se difundem pelos túbulos dentinários, em direção à polpa, causam danos (Farges et al., 2015). Além disso, são capazes de ativar metaloproteinases (MMPs) da dentina, que por sua vez, promovem a degradação da rede de colágeno, propiciando uma rápida progressão da lesão (Tjäderhane et al., 1998). Com a desmineralização da dentina intertubular, uma densa rede de fibrilas colágenas é exposta, as quais são revestidas por proteínas não colágenas (Goldberg et al., 2011).

O ICDAS II é uma ferramenta útil para facilitar e organizar as características clínicas da estrutura dental acometida por cárie, cujos escores de 4-6 representam o acometimento da dentina (Ismaïl et al., 2007). O ICDAS 4 representa uma sombra dentinária, que pode ser vista a partir do esmalte intacto ou com sinais de ruptura localizada sem a exposição da dentina (Ismaïl et al., 2007). Geralmente, a sombra da dentina é vista melhor quando o dente está sob umidade. Esse tecido pode apresentar-se na cor cinza, azul ou marrom (Ismaïl et al., 2007).

Quando há cavitação em esmalte opaco ou descolorido expondo o tecido dentinário subjacente, a dentina pode apresentar-se escurecida sendo visível através do esmalte (Ismaïl et al., 2007), a lesão será classificada como ICDAS 5. Após secagem da superfície, há evidente perda de estrutura dental na entrada ou dentro da fóssula ou fissura com a presença de cavitação, podendo esta ser confirmada por meio de sonda esférica (Ismaïl et al., 2007). É importante salientar, que a dentina pulpar profunda não deve ser sondada (Ismaïl et al., 2007).

Por fim, as lesões podem ser classificadas em ICDAS 6 quando observa-se uma perda nítida de estrutura dental (Ismaïl et al., 2007). Nesse estágio, a cavidade é extensa e atinge o dente em profundidade e largura (Ismaïl et al., 2007).

As lesões em dentina podem ainda ser classificadas de acordo com a sua atividade em lesões de cárie ativa e inativa (Conceição; Masotti, 2007). Quando a lesão de cárie é ativa, normalmente encontram-se cobertas por biofilme, e são caracterizadas por uma coloração clara, fundo amolecido (Conceição; Masotti, 2007; Leal et al., 2020). Se inativa, a dentina possui uma coloração escurecida, lisa, endurecida à sondagem e brilhantes (Conceição; Masotti, 2007; Leal et al., 2020). Algumas das lesões de cárie podem estar pigmentadas, porém a cor não serve como parâmetro para definir a atividade da cárie (Leal et al., 2020).

Quando o processo carioso atinge o tecido dentinário, clinicamente são observadas duas camadas distintas: (1) dentina infectada e (2) dentina afetada. Essas zonas podem ser diferenciadas claramente em lesões inativas, enquanto é menos distinguida em lesões ativas devido a sua maior atividade (Heymann et al., 2014). Além disso, em lesões ativas podem ser observadas a formação de tratos mortos, os quais são causados devido aos estímulos agressores da cárie se darem de forma rápida e intensa, levando a morte dos odontoblastos, deixando os túbulos dentinários vazios e mais impermeáveis (Magalhães et al., 2021). Isso propicia uma passagem mais facilitada dos produtos bacterianos à polpa (Magalhães et al., 2021). Quando o

processo de cárie se desenvolve mais lentamente, são observados a formação de dentina esclerótica e/ou terciária, as quais variam em quantidade de acordo com a intensidade do estímulo (Magalhães et al. 2021).

2.3.1 Dentina infectada

Esta zona é a mais externa do processo cariioso (Heymann et al., 2014). Trata-se da região de invasão bacteriana, caracterizada pela baixa quantidade de mineral e a rede de fibrilas de colágeno desnaturada, não passível de remineralização (Heymann et al., 2014), amolecida e altamente desorganizada (Conrads, 2018).

Histologicamente, pode ser dividida em zona necrótica e zona contaminada. A zona necrótica tem a presença de biofilme aderido e abaixo está a zona contaminada. Nestas zonas, há uma grande quantidade de microrganismos, com um gradiente de cerca de 10^1 a 10^8 células bacterianas viáveis por miligramas (mg) de dentina, mensurados da porção interna para a externa, com o predomínio de microrganismos proteolíticos (Conrads, 2018). Por sua ampla destruição e desorganização, esta camada não é passível de remineralização, devendo ser removida (Conrads, 2018).

De acordo com Almahdy et al. (2012) essa zona apresenta 25% de conteúdo mineral e 20% de proteína. Mais especificamente, após análise em Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia (EDX) da dentina cariada, a porcentagem encontrada de cálcio e fosfato foi de 16,79% e 8,5%, respectivamente (Hamama et al., 2013). Além disso, as concentrações de aminoácidos encontram-se alterados nesse tecido infectado, verificando-se uma redução de arginina, glicina, hidroxiprolina e prolina, o que indica a ocorrência de degradação da rede de fibrilas colágenas (Armstrong, 1961; Nakornchai et al., 2004). Observa-se o desaparecimento da estrutura tubular e perda da dentina peritubular em sua porção mais profunda (Mazzoni et al., 2015). Portanto, essa zona encontra-se necrótica, podendo ser facilmente identificada clinicamente, pois tem uma aparência úmida e consistência amolecida após inspeção visual tátil (Heymann et al., 2014).

2.3.2 Dentina afetada

Esta zona é representada pela desmineralização da dentina intertubular (Heymann et al., 2014) e pode ter diferentes zonas dependendo da atividade da lesão. A dentina afetada pode ser dividida em diferentes zonas histológicas, sendo elas: i) zona descolorida ou turva; ii) zona transparente; e iii) zona subtransparente (Banerjee, Watson, Kidd, 2000; Marshall et al., 1997). O trabalho de Wang et al. (2007), além de descrever a zona transparente e subtransparente, também descreveu zonas aparentemente normais de dentina abaixo da camada transparente.

A dentina afetada, em sua porção mais superficial correspondente à zona perturbada ou turva, encontra-se parcialmente desmineralizada (Marshall et al., 1997; Mazzoni et al., 2015). Observa-se uma perda da dentina peritubular e desmineralização da dentina intertubular (Marshall et al., 1997). Essa zona apresenta quase o dobro do conteúdo mineral da dentina infectada (aprox. 47%) e 28% de proteína (Almahdy et al., 2012). De acordo com Wang et al. (2007) o conteúdo mineral, como fosfato e cálcio, diminui na dentina afetada. O pico de carbonato diminui acentuadamente na faixa 1070 cm^{-1} , o que significa que tal mineral é dissolvido de forma rápida em processo de cárie (Wang et al., 2007).

Clinicamente, apresenta uma consistência mais amolecida quando comparada com a dentina sadia (Heymann et al., 2014). Pode apresentar-se com aspecto de couro durante a sondagem (Conrads, 2018). Nesta camada, nota-se a presença de poucos microrganismos por miligrama em função do menor aporte nutricional, visto que são consumidos pelos microrganismos presentes na camada mais superficial (Conrads, 2018). Apesar dessa dentina constituir um ambiente anaeróbio, o que favorece a desmineralização por produção de ácidos, o baixo nível de microrganismos fermentadores e a baixa quantidade de nutrientes impede a multiplicação bacteriana (Conrads, 2018). A rede de colágeno da dentina afetada, apesar do recorrente ataque ácido proveniente dos metabólitos bacterianos, atua como um molde para a remineralização da dentina intertubular (Heymann et al., 2014). O colágeno da dentina encontra-se alterado, sendo observadas mudanças leves nos picos de amida I e III (Wang et al., 2007). Por esse fato, é uma dentina passível de remineralização, podendo atingir valores de dureza semelhantes à dentina hígida (Fusayama, 1979).

Em direção à polpa, há aumento da largura da dentina peritubular e do grau de mineralização da dentina intertubular e intratubular (Mazzoni et al., 2015). Esta porção

da dentina afetada é conhecida pela zona transparente e pode ser chamada de esclerótica (Mazzoni et al., 2015). É caracterizada por uma dentina firme, porém desmineralizada, devido a chegada dos ácidos provenientes das bactérias, podendo atingir grandes profundidades (Conrads, 2018). Nesta camada, há a dissolução dos cristais de apatita, que se recristalizam em uma forma romboidal, conhecida por *whitlockite* (Conrads, 2018). No entanto, o grau de mineralização desta zona é menor quando comparada com a dentina sadia, mesmo com a deposição de cristais mineralizados (*whitlockite*) no lúmen dos túbulos dentinários (Mazzoni et al., 2015). A camada transparente apresenta-se menos dura em relação à dentina hígida, apesar do interior dos túbulos serem amplamente preenchidos por minerais (Ogawa et al., 1983).

No trabalho realizado por Jang et al. (2015), buscaram entender o mecanismo cinético da precipitação de *whitlockite*, no qual observaram que a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ pode se transformar em *whitlockite*, em ambientes ácidos. Após investigação in vitro, verificou-se que a HAP se transforma em fosfato dicálcico dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), visto que essa transformação é favorecida em ambiente ácido. Na presença de íons Mg^{2+} transforma-se em *whitlockite*, conforme ocorre a queda do pH. *Whitlockite* é o mineral mais estável em pH abaixo de 4.2, ao contrário da HAP que é mais estável em pH neutro. A cinética entre cálcio e magnésio para se transformar em sua forma mais estável depende do pH do meio.

A camada mais profunda da dentina afetada é conhecida por camada subtransparente e geralmente é estreita (Mazzoni et al., 2015). É representada por pouca ou nenhuma desmineralização da dentina intertubular, dentina peritubular normal e aumento do conteúdo mineral intratubular (Mazzoni et al., 2015). Essa deposição de minerais no interior dos túbulos dentinários deve-se aos mecanismos de defesa do complexo dentina-polpa frente a agressão por cárie (Almahdy et al. 2012). A camada subtransparente possui cristais minerais e dureza superiores à dentina normal, sendo esta a real camada esclerótica (Mazzoni et al., 2015).

Logo abaixo da camada mais profunda da dentina afetada, há uma zona de dentina sadia. Nesta zona não há a presença de bactérias nos túbulos dentinários (Heymann et al., 2014). Os processos odontoblásticos não apresentam alterações e não tem a presença de cristais em seus lúmens (Heymann et al., 2014). A dentina intertubular apresenta bandas de colágeno cruzado normais e cristais de apatita hígidos e densos (Heymann et al., 2014). Observa-se uma quantidade de 61% de

mineral e 33% de proteína nesta zona (Almahdy et al., 2012). Quando estimulada clinicamente provoca dor aguda (Heymann et al., 2014).

2.4 MECANISMOS DE PROTEÇÃO CONTRA A PROGRESSÃO DA LESÃO CARIOSA

A resposta pulpar frente à agressão da lesão cariosa é um fator importante para compreender o desenvolvimento da lesão e de suas consequências para o tecido dental (Conrads, 2018). Inicialmente, a proteção do complexo dentina-polpa é conferida pelo esmalte que atua como uma barreira física mineralizada dificultando a penetração de bactérias na dentina e na polpa (Conrads, 2018). Por sua vez, o complexo dentina-polpa, por atuar como uma unidade funcional, é capaz de impedir que a agressão bacteriana chegue até a polpa, com a formação de dentina esclerótica, calcificando o lúmen dos túbulos dentinários e/ou formando dentina terciária através de duas populações celulares distintas (Smith et al., 1995; Lee et al., 2006; Farooq et al., 2021). Esses mecanismos afetam a permeabilidade dentinária, dificultando a passagem de agentes nocivos e conseqüentemente, com essa variação há um efeito nas reações pulpares (Mjör, 2009).

2.4.1 Esclerose dentinária

A dentina esclerótica é formada a partir da deposição mineral no interior dos túbulos dentinários, que pode ser parcial ou completa, frente a estímulos agressores, como cárie dentária, bem como pelo processo de envelhecimento (Farooq et al., 2021). Essa dentina não representa uma nova dentina formada, e sim uma condição mais hipermineralizada da dentina pré-existente que serve de barreira física para a progressão bacteriana (Magalhães et al., 2021). O seu mecanismo ainda permanece desconhecido (Xu et al., 2009). Sabe-se que os túbulos da dentina se tornam altamente mineralizados e conseqüentemente, diminui a permeabilidade dentinária

(Farooq et al., 2021). Os depósitos minerais no interior dos túbulos dentinários contribuem para a dureza da dentina (Marshall et al., 2001).

Segundo Weber (1974), as regiões escleróticas aparecem mais brilhantes do que a dentina circundante quando vistas por luz transmitida, e isso se deve à redução da quantidade de luz espalhada. Essa dentina é mais aparente e mais comumente encontrada em lesões de cárie crônica do que em aguda (Fusayama et al., 1966). No entanto, a formação da dentina esclerótica é observada desde lesões iniciais em esmalte, ainda que este não esteja cavitado (Magalhães et al., 2021).

A composição e estrutura de conteúdo inorgânico e orgânico da dentina esclerótica é diferente da dentina normal (Xu et al., 2009). Essa dentina encontra-se modificada, apresentando maior grau de mineralização com aproximadamente duas vezes mais fosfato e menor teor de carbonato que a dentina normal (Xu et al., 2009). Por sua vez, a matriz orgânica possui uma intensidade média de CH₂ significativamente menor na dentina esclerótica, na qual também se observa uma redução na reticulação das fibras colágenas (Xu et al., 2009). A razão mineral/matriz é de duas a três vezes mais do que na dentina normal, devido à diminuição do conteúdo orgânico e aumento do conteúdo inorgânico (Xu et al., 2009).

2.4.2 Dentina terciária

A dentina terciária também é formada em resposta a agentes agressores externos como atrito, abrasão, trauma, cárie dental ou durante o procedimento restaurador (Goldberg et al., 2011; Farooq et al., 2021). É provável que a formação da dentina terciária tenha maior ocorrência em resposta às lesões cariosas (Smith et al., 1995). A formação da dentina terciária começa desde o início da cárie em esmalte devido ao aumento de sua permeabilidade, nos quais os ácidos permeiam por entre as porosidades, causando danos à dentina (Zero et al., 2011; Maltz et al., 2016). Uma das primeiras manifestações observadas na polpa é a inflamação, com consequente diminuição da pré-dentina e aumento de proteínas como colágeno tipo I, fosforina e sialoproteína, que são responsáveis pelo processo de mineralização (Maltz et al., 2016). O estímulo produzido ao complexo dentina-polpa é responsável pela formação

da dentina terciária (Zero et al., 2011). Essa dentina é dividida em dois subtipos, sendo elas a reacional e a reparativa (Lee et al., 2006; Farooq et al., 2021) (Figura 2.2).

A formação da dentina terciária reacional se dá a partir de irritações leves induzindo os odontoblastos sobreviventes a secretar matriz dentinária em resposta ao agente agressor a fim de proteger o complexo dentina-polpa (Smith et al., 1995; Goldberg et al., 2011; Farooq et al., 2021) (Figura 2.2). Acredita-se que os ácidos bacterianos promovem a solubilização de componentes da matriz dentinária como os fatores de crescimento, os quais permeiam a dentina e iniciam o efeito estimulatório nos odontoblastos para o início da deposição da dentina reacional (Smith et al., 1995). Um estudo *in vitro* realizado por Begue-kirn et al. (2004) demonstrou que o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β) pode atuar como componente modulador do início da atividade das células odontoblásticas.

A dentina reacional se difere da dentina fisiológica por apresentar menor quantidade de túbulos dentinários, além de serem mais irregulares, com diâmetros reduzidos e distribuídos de forma aleatória (Charadam et al., 2012). Essa dentina modificada é capaz de impedir a migração de bactérias, protegendo a polpa de injúrias (Charadam et al., 2012)

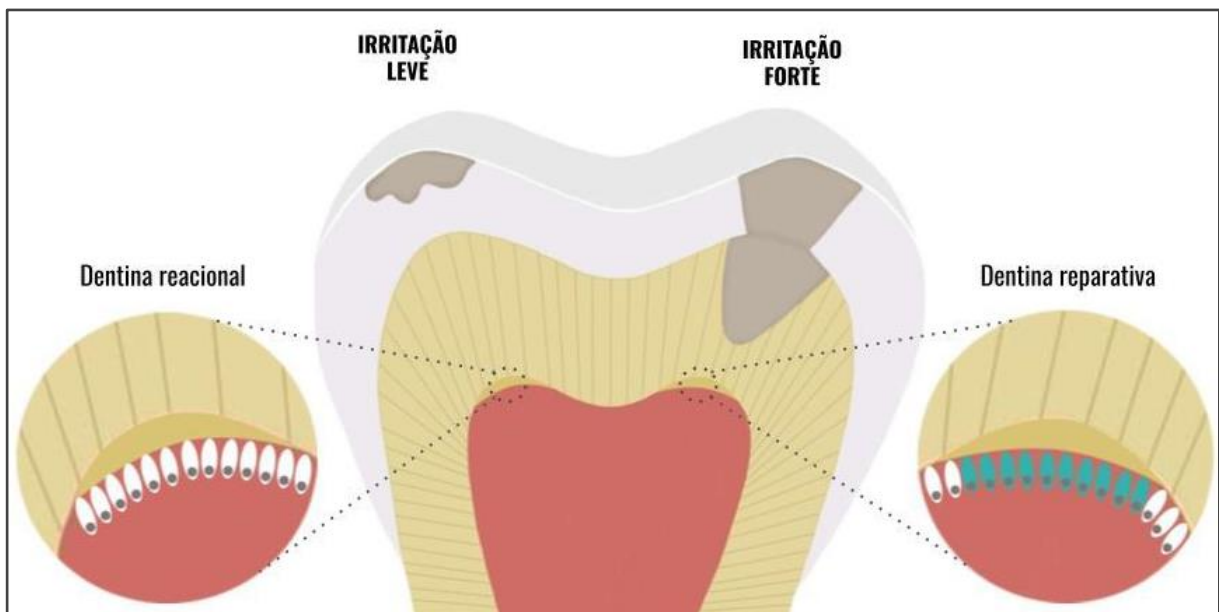
Por sua vez, a dentina reparativa é formada em casos em que a agressão externa é mais forte, causando a morte das células odontoblásticas (Maltz et al., 2016; Farooq et al., 2021). Dessa forma, células indiferenciadas (células-tronco/progenitoras) presentes no tecido pulpar se diferenciam em novas células semelhantes aos odontoblastos originais, secretando tecido reparador no teto da câmara pulpar (Smith et al., 1995; Farooq et al., 2021). Essa dentina apresenta traços de células similares ao tecido ósseo e é atubular (Carvalho, Lussi, 2017).

Segundo Cajazeira Aguiar e Arana-Chavez (2007) é possível observar a presença de uma proteína não-colagenosa, chamada de osteopontina (OPN), na matriz ao redor das células aprisionadas na dentina reparativa, o que se difere das dentinas fisiológica e reacional. Essa matriz calcificada modificada compartilha características estruturais similares ao osso primário, majoritariamente em relação à presença de OPN (Cajazeira Aguiar; Arana-Chavez, 2007).

Em uma análise histológica, Reeves e Stanley (1966) observaram que a quantidade de dentina reparativa formada frente a uma agressão de cárie é proporcional à injúria por esse agente perturbador. Após análise de 40 dentes humanos cariados, observaram que onde a invasão de bactérias foi de 1,11 mm e

2,42 mm de distância do tecido pulpar, o distúrbio gerado foi quase insignificante aos tecidos pulpare. Dez dos espécimes não revelaram formação de dentina reparativa e tiveram um valor médio de invasão bacteriana de 1,61 mm de distância à polpa. Enquanto que, as respostas pulpares tornaram-se mais evidentes e expressivas quando a distância foi de 0,5 mm. O comprometimento pulpar ocorre quando as bactérias conseguem invadir a dentina reparativa.

Figura 2.2 - Esquema mostrando a produção de dentina terciária (células brancas = odontoblastos; células azuis = células indiferenciadas)



Fonte: O autor.

2.5 CRITÉRIOS PARA REMOÇÃO DE TECIDO CARIADO

Durante a remoção clínica do tecido cariado, não há como definir com exatidão em qual zona histológica se está trabalhando. Sabe-se que o sucesso na remoção de bactérias durante o preparo cavitário pode aumentar a longevidade das restaurações (Conrads, 2018). No entanto, é importante salientar que a eliminação de todas as bactérias de um dente acometido por cárie é um trabalho difícil, quase impossível e já não é mais necessário (Conrads, 2018). As cavidades de G.V Black foram substituídas e restritas apenas a remoção de tecido cariado seguindo uma filosofia de odontologia

minimamente invasiva (Conrads, 2018). A remoção de todo o tecido cariado em lesões extensas pode afetar a vitalidade pulpar e enfraquecer o dente (Conrads).

Dessa forma, a fim de evitar a exposição pulpar em decorrência da completa escavação do tecido cariado, procedimentos minimamente invasivos de remoção seletiva são altamente indicados para o tratamento de cárie em dentes decíduos e/ou permanentes, sejam elas superficiais ou profundas (Kher; Rao, 2020). Na remoção seletiva do tecido cariado as paredes laterais devem ser completamente removidas, até que se tenha esmalte e dentina sadios (Kher; Rao, 2020). Essas paredes serão responsáveis por uma restauração bem selada, contribuindo para o estímulo à produção de dentina reacional que serve para proteger a polpa dentária (Kher; Rao, 2020).

De acordo com a International Caries Consensus Collaboration (ICCC) é recomendada a divisão da lesão cariada em zonas a partir da sensação tátil utilizando-se instrumentos manuais (Kher; Rao, 2020). Essas zonas são: dentina mole, firme e dura (Kher; Rao, 2020). Em dentina firme, a remoção do tecido cariado é recomendada para dentes com lesões cariosas superficiais a moderadamente profundas, sem que haja sinais de pulpíte irreversível (Kher; Rao, 2020). A remoção do tecido necrótico deve ser realizada para providenciar estabilidade da restauração (Kher; Rao, 2020). Nas cáries moderadamente profundas, a primeira zona é a dentina mole, mais estreita, seguida de uma dentina mais firme, a qual é o limite de remoção de tecido (Kher; Rao, 2020).

Em lesões de cárie profunda, a maior parte do tecido cariado é constituído de dentina amolecida (Kher; Rao, 2020). A remoção desse tecido necrótico deve ser bem criteriosa pelo clínico a fim de conseguir uma profundidade adequada para a restauração sem causar a exposição pulpar (Kher; Rao, 2020). Além disso, o sucesso é também dependente de um bom selamento promovido pela restauração nas paredes circundantes da cavidade (Kher; Rao, 2020). Quando a cavidade está bem selada, o tecido cariado remanescente é inativado devido à falta de aporte nutricional (Kher; Rao, 2020).

Ainda não há métodos quantitativos para determinar as propriedades físicas da estrutura dental in vivo, porém tentativas laboratoriais são feitas para tentar simular essa situação e entender mais sobre o seu comportamento mecânico quando submetidos a determinadas cargas (Meredith et al., 1996; Angker et al., 2003). O conhecimento das propriedades mecânicas dos tecidos dentais é extremamente importante para o clínico durante sua prática odontológica, visto que o sucesso das restaurações é fortemente dependente do bom selamento entre o material restaurador e as paredes do preparo realizado no dente (Angker et al., 2003). Quando as propriedades mecânicas (dureza e elasticidade) dos materiais são bem próximas do tecido dental, a deflexão que ocorre devido aos esforços mastigatórios na interface dente-restauração, pode ser reduzida (Angker et al., 2003). Quando há diferenças no módulo de elasticidade entre esmalte e resina composta, ocorre deflexão frente às cargas mastigatórias e pontos de tensão localizados na interface adesiva, resultando em falhas mecânicas ou microinfiltração, propiciando lesões de cárie secundária (Angker; Swain 2006). Portanto, uma restauração com propriedades mecânicas adequadas e próximas às da estrutura dental resultarão em uma vida útil longa do material (Angker; Swain 2006).

Desse modo, diversos testes têm sido utilizados para quantificar a dureza dos tecidos dentários, visto que são largamente usados para avaliar o grau de mineralização dos dentes (Angker et al., 2003). Dentre eles pode-se citar o teste de dureza por microindentação, conhecido por microdureza. Contudo, este é um termo equivocado pois dá a ideia de a dureza ser muito baixa, o que não condiz com a realidade (Vander Voort; Lucas, 1998). Dentre os microindentadores, os mais comumente utilizados nos estudos de dureza do esmalte e da dentina são o Knoop (KHN) e o Vickers (VHN) (Vander Voort; Lucas, 1998; Angker; Swain 2006), sendo o Knoop ainda mais popular (Meredith et al., 1996). Esses dispositivos utilizam um pequeno indentador simétrico, responsável por penetrar na superfície do esmalte ou dentina, com uma determinada carga e tempo pré-estabelecidos (Mahoney et al., 2000). O valor resultante da dureza é calculado dividindo a carga aplicada pela área onde o indentador penetrou (Angker; Swain 2006).

Apesar de ser um teste de carga e tempo dependente, ainda não existe uma padronização relatada na literatura, ficando a critério do pesquisador essa decisão

(Chuenarrom et al., 2009). Uma maior carga pode ser escolhida durante o teste de microdureza para facilitar a medição da diagonal da indentação, visto que essas impressões ficam nítidas para avaliação (Chuenarrom et al., 2009). No entanto, em tecidos amolecidos a medição fica comprometida, pois podem ultrapassar a área de avaliação da impressão obtida (Chuenarrom et al., 2009). Um estudo laboratorial, após teste de dureza KHN e VHN de 20 espécimes de esmalte e 20 de dentina humana, utilizando tempo e carga diferentes, observou que o tempo não influenciou nos valores de dureza obtidos. Entretanto, os valores de KHN de esmalte e os valores de VHN de dentina tiveram diferenças em relação à carga aplicada (Chuenarrom et al., 2009).

Ressalta-se que o teste de microdureza deve ser realizado sobre superfícies planas e polidas, com cuidadoso alinhamento entre o indentador, a base do equipamento e o espécime (Vander Voort; Lucas, 1998). Quando há inclinações do espécime, resulta em indentações assimétricas, além de poder gerar movimento lateral entre a amostra e o indentador (Vander Voort; Lucas, 1998). Portanto, os espécimes devem estar perpendicularmente em relação ao indentador e paralelos à base do equipamento (Vander Voort; Lucas, 1998). Suportes são utilizados para que esse alinhamento seja estabelecido de forma correta (Vander Voort; Lucas, 1998).

É ainda válido observar a relação entre o tipo de indentador e a espessura da amostra (Vander Voort; Lucas, 1998). Ao utilizar uma ponta Vickers, a espessura do espécime deve ser de pelo menos 2,5 vezes a sua diagonal (Vander Voort; Lucas, 1998). Já na ponta Knoop, por produzir uma indentação mais rasa em relação a Vickers com uma mesma carga, espécimes mais finos podem ser utilizados (Vander Voort; Lucas, 1998). Ressalta-se ainda a necessidade de treinamento intenso do operador para executar o teste, pois a delimitação do final da diagonal impressa no espécime é feita pelo operador, dependendo da sua análise visual (Doerner; Nix, 1986; Mahoney et al., 2000). Além disso, a cuidadosa inspeção do indentador procurando identificar rachaduras ou lascas no diamante é recomendada (Vander Voort; Lucas, 1998).

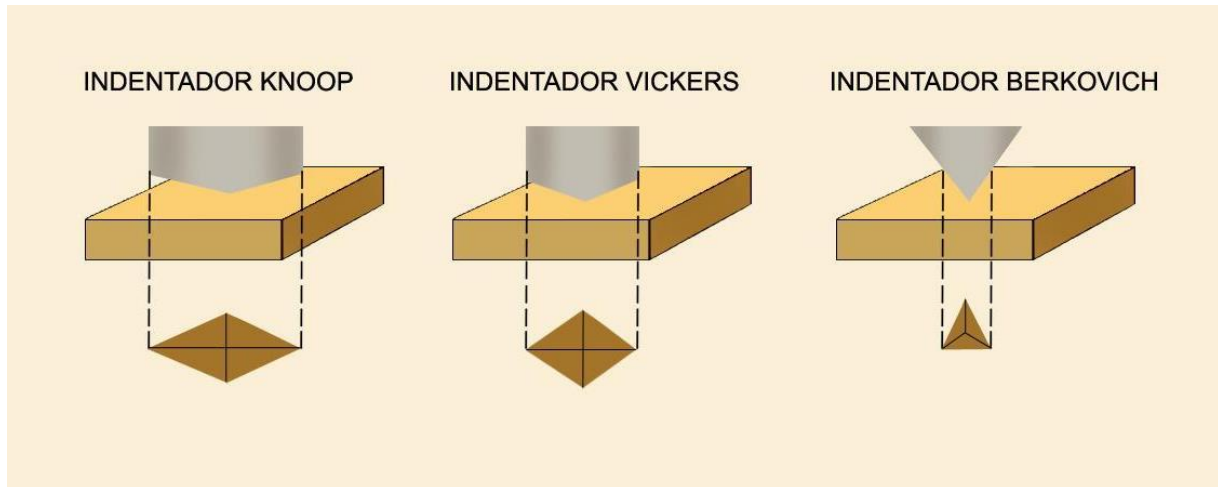
Outro dispositivo relatado na literatura para avaliar a dureza é o ultramicrodurômetro, o qual é baseado no princípio da nanoindentação (Mahoney et al., 2000; Sakoolnamarka et al., 2005). Nesta técnica são produzidas indentações muito pequenas utilizando cargas de alguns mili-Newtons (Sakoolnamarka et al., 2005). Ao invés de registrar somente a área de indentação, registra-se a sua profundidade, promovendo maior precisão nas mensurações (Oliver; Pharr, 1992; Mahoney et al., 2000; Sakoolnamarka et al., 2005). Esse registro dinâmico detecta mudanças na profundidade de uma indentação durante os ciclos de carga e descarga, o qual é representado por meio de um gráfico. Portanto, os valores de dureza e módulo de elasticidade são calculados automaticamente a partir da curva de carga-descarga produzida durante o teste (Mahoney et al., 2000; Sakoolnamarka et al., 2005). A equação que representa o valor de dureza determinada em função da profundidade de penetração é:

$$H = \frac{P}{k_1 h_p^2} ,$$

onde P é a força, K_1 é a constante do parâmetro geométrico do indentador, e h_p é o componente de penetração plástica (Angker; Swain 2006).

Após o teste, o formato e a posição da indentação produzida na superfície de interesse deve ser analisada microscopicamente a fim de avaliar a qualidade da indentação (Sakoolnamarka et al., 2005). O penetrador de diamante mais comumente empregado na técnica de nanoindentação é a ponta Berkovich, a qual possui uma base em forma de triângulo equilátero (Angker; Swain 2006). Tal penetrador difere dos Knoop e Vickers, no quais possuem formato romboédrico e quadrado, respectivamente, sendo em Knoop a dureza medida nas extremidades apenas da diagonal maior, enquanto na Vickers é mensurada a partir das duas diagonais que possuem tamanhos similares (Vander Voort; Lucas, 1998) (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Esquema ilustrativo dos diferentes indentadores comumente utilizados em testes de dureza



Fonte: O autor.

A dimensão dos espécimes é uma preocupação em testes de nanoindentação. Quando são pequenos, há a necessidade de serem incorporados em resina para facilitar o manuseio durante o experimento, bem como servir de suporte durante o processo de indentação (Subramani et al., 2018). O embutimento deve ser cauteloso, visto que os resultados podem ser alterados caso haja resina sobre o espécime (Subramani et al., 2018). A rugosidade da superfície analisada também é um fator que pode influenciar na dureza (Bobji; Biswas, 1998). Assim, os espécimes devem apresentar boa lisura superficial, a qual pode ser obtida com o polimento mecânico associado a cortes precisos realizados com micrótomo (Subramani et al., 2018). As superfícies que são seccionadas com micrótomo parecem ter menor rugosidade do que quando submetidas ao polimento manual, visto que são aparadas com lâminas de diamante (Subramani et al., 2018). Outra observação é que os espécimes devem ser armazenados hidratados para não ocorrer alteração das propriedades mecânicas (Subramani et al., 2018). No entanto, quando submetidos ao teste devem estar secos, pois a umidade pode influenciar nos valores de dureza (Subramani et al., 2018).

Dentre as vantagens de utilizar o ultra-microdurômetro em relação aos métodos convencionais temos que por ser um dispositivo de detecção de profundidade, não requer medição visual de forma manual, possui alta resolução e possibilidade a obtenção de propriedades plásticas e elásticas (Doerner; Nix, 1986; Oliver; Pharr, 1992). Além disso, possibilita que as indentações sejam produzidas em distâncias bem próximas, o que permite a realização de mais testes em um único espécime,

devido à vantagem de poder utilizar cargas muito pequenas (Mahoney et al., 2000). Do contrário, nos testes de microindentação, deve haver um cuidado maior em relação às distâncias entre as indentações, visto que produz uma deformação plástica além de acometer também as porções teciduais adjacentes à indentação (Vander Voort; Lucas, 1998). Se a distância entre as indentações não forem respeitadas, a nova indentação pode ser afetada (Vander Voort; Lucas, 1998). Recomenda-se que um espaço de 2,5 vezes a diagonal Vickers e 2,5 vezes a diagonal curta do indentador Knoop (Vander Voort; Lucas, 1998).

Geralmente, os valores de dureza obtidos são representados apenas pelo número, visto que se subentende que tais unidades sejam kgf/mm^2 (Martuci, 2006). No entanto, de acordo com a nomenclatura introduzida pela Organização internacional de padronização (ISO), esses valores passaram a ser representados por gigapascals (GPa), o qual corresponde a um bilhão de newtons sobre um metro quadrado (Martuci, 2006). Para realizar a conversão de tais representações, basta seguir a seguinte equação: caso a dureza seja fornecida em kgf/mm^2 , deve-se multiplicar por 0,009807 para obter o valor em GPa. Do contrário, se for GPa basta multiplicar por 101,967982 e terá o valor em kgf/mm^2 (Martuci, 2006).

Com base na análise de valores de dureza das estruturas híidas encontradas na literatura, o esmalte apresenta valores entre 272 a 440 de dureza Knoop (KHN) (Craig; Peyton, 1958). Outros valores, do esmalte híido, foram reportados na literatura como 271 KHN (Wei; Koulourides, 1972) e 316,2 KHN (Shimizu et al., 2015). No trabalho realizado por Collys et al. (1992), os autores observaram uma relação entre a carga e o valor de dureza, na qual foi constatado decréscimo no valor de dureza obtido à medida que houve o acréscimo da força aplicada durante o teste. Os valores obtidos foram de 431,2 VHN (força de 50g) e 354,9 VHN (força de 200g) (Collys et al., 1992). Essa variação de dureza pode ser explicada pela incapacidade do equipamento em ler o micron final da indentação. Isso se torna mais proeminente quando os valores de dureza são calculados em indentações curtas (Collys et al., 1992).

O trabalho realizado por Ryge et al. (1961) demonstrou que a dureza é carga dependente. O valor de dureza aumenta até atingir um máximo, geralmente com carga de 50g (345 KHN/303 VHN) ou 100g (355 KHN/348 VHN). Quando as cargas são de 500g (303 KHN/ 339 VHN), 1000g (289 KHN/335 VHN) e 10.000g (254 VHN), os

valores de dureza tendem a diminuir, embora os valores permaneçam bem próximos do máximo (Ryge et al., 1961).

De acordo com Feagin et al. (1969) existe uma relação direta entre a dureza superficial do esmalte e o conteúdo mineral (Ca e PO_4^{3-}). Portanto, se há perda de Ca e PO_4^{3-} , a dureza do esmalte diminui (Feagin et al., 1969). Um estudo in vitro, após classificação de lesões de manchas brancas de acordo com o ICDAS, verificou que os valores de dureza relacionadas a seus ICDAS foram de: 219,9 KHN (ICDAS 1), 162,4 KHN (ICDAS 2) e 31,7 (ICDAS 3) (Shimizu et al., 2015).

Estudos de desmineralização artificial também são comumente empregados nos estudos odontológicos, principalmente para avaliar a efetividade dos produtos remineralizantes (Mohd Said et al., 2017; Alkattan et al., 2018). Após ciclos de desmineralização em esmalte humano de dentes permanentes, valores encontrados de desmineralização foram de 71,53-72,75 KHN (Mohd Said et al., 2017). Outro estudo obteve valores de dureza, após ciclos de desmineralização em esmalte bovino, de 74,5 KHN, em 24 horas, e 61,3 KHN, em 96 horas e depois de remineralizar os valores passaram a ser 205,6 KHN e 151,3 KHN, respectivamente (Alkattan et al., 2018).

A dentina, devido a sua estrutura, possui propriedades mais complexas quando comparadas ao esmalte dentário (Angker et al., 2003). Portanto, seus valores de dureza se diferem do esmalte, sendo reportados dados de KHN 65 a 83 para a dentina hígida (Craig et al., 1959). Braden (1976) sintetizou em seu trabalho diversos estudos, nos quais os valores da dureza da dentina hígida variam entre 50 a 70. Os resultados de dureza variam de acordo com a profundidade do tecido, no qual foram encontrados valores de 52-56 KHN próximos à JAD e 65-83 KHN no centro da dentina (Craig et al., 1959). Banerjee et al. (1999) observou valor de KHN entre 48,88 e 53,91 para a região da dentina mais próxima à JAD.

Outros estudos observaram uma maior dureza da dentina superficial e diminuição à medida que se aproxima da câmara pulpar (Ogawa et al., 1983; Hosoya et al., 2000; Fuentes et al., 2003). Dados fornecidos, a partir de diferentes cargas, de dureza KHN da dentina superficial foram de 73,75 e 72,53 e 64,75 e 65,05 para a dentina mais profunda, nas cargas de 50g e 100g, respectivamente (Fuentes et al., 2003). De igual forma, os dados de dureza Vickers foram 61,93 e 62,48 para a dentina superficial e 63,01 e 61,86 VHN, em cargas de 300g e 500g, respectivamente (Fuentes et al., 2003). A dureza da dentina não foi influenciada por diferentes cargas aplicadas

para ambos métodos analisados neste estudo (Fuentes et al., 2003). Além disso, Hamama et al. (2013) encontrou valores de dureza Vickers da dentina sadia entre 81,79 a 83,88, em profundidades variando de 25-150 μm . No entanto, com relação a dureza da porção média da dentina, apesar de parecer ser menor que a superficial, não apresenta diferença significativa (Hosoya et al., 2000).

De acordo com Han et al. (2012) a dentina possui dureza variável de acordo com o ângulo de orientação dos túbulos dentinários. Quanto maior o ângulo de orientação dos túbulos dentinários, menor a dureza. Ângulos entre 10° e 80° possuem dureza entre 0,588-0,521 GPa. A orientação dos túbulos dentinários exerce efeito sobre o comportamento mecânico, resistência à flexão e fratura.

A literatura demonstra (Banerjee et al., 1999) uma diminuição da dureza do tecido cariado em dentina, que pode variar entre 13,64 a 37,93 KHN. A porção mais externa do tecido cariado, pigmentada de marrom escuro, apresenta uma dureza menor e aumenta à medida que se aproxima da câmara pulpar (Banerjee et al., 1999). Em relação ao tipo de cárie, no geral, observa-se menores valores de dureza em lesões agudas quando comparados com a forma crônica (Fusayama et al., 1966). De acordo com Banerjee et al. (2010) a dentina infectada por cárie possui valor inferior a 25, sendo observado aumento da autofluorescência. Nos estudos de Almahdy et al. (2012) o conteúdo mineral diminuiu significativamente na dentina infectada ($24,8 \pm 5,7\%$), sendo os valores referidos de dureza entre 16,1 e 20,6 KHN.

Logo abaixo da dentina infectada há a dentina afetada por cárie. Essa dentina, por sua vez, possui menor rigidez e maior conteúdo de água em relação à dentina hígida (ITO et al., 2005). Banerjee et al., (2010) encontrou valores de dureza entre 25-40 para a dentina afetada. De acordo com Almahdy et al. (2012) a dentina afetada possui um conteúdo mineral de $47,5 \pm 5,7\%$ e dureza KHN entre 30,7 a 33,9. Quando comparada ao tecido hígido não foi observado diferença significativa entre as dentinas (Almahdy et al., 2012). Outro estudo, após realizar nanoindentação, verificou que os valores dos dentes afetados por cárie são mais baixos que a estrutura sadia em diferentes profundidades avaliadas (Joves et al., 2014).

Após realizar a análise da dureza, utilizando ponta Knoop com carga de 2 a 25 gramas, em áreas periféricas ao tecido cariado, Craig et al. (1959), observou que a dureza da área periférica da dentina cariada é de 81 e 85 KHN. Tais autores chamam essa dentina de transparente e relatam possuir maior dureza visto que são completamente calcificadas. Após análise da dentina esclerótica de porção radicular,

dureza de 71,2-71,8 foram encontrados na dentina transparente próximos à região mais opaca (Grajower et al., 1977). Nos estudos de Ogawa et al. (1983), na qual realizou a análise da camada subtransparente (hipermineralizada) encontrou valores de KHN superior às demais regiões de dentina analisadas. Isso também foi observado, no trabalho de Banerjee et al., (1999), na qual a zona subtransparente mostrou-se mais dura que a camada transparente.

Além disso, um estudo comparativo, realizando a mensuração da dureza Vickers com carga de 50g em tempo de permanência de 45 segundos, mostrou que a dentina esclerótica em dentes humanos com exposição da dentina é $45,26 \pm 2,92$, a qual é significativamente maior que a da dentina esclerótica bovina ($29,93 \pm 3,83$). Os dados de dureza da dentina esclerótica, em GPa, de dentes livres de cárie, foram também encontrados por Castanho et al. (2011). Nas lesões com esclerose grave foi observado dureza de 0,51 Gpa, enquanto que na dentina hígida a dureza foi de 0,67 Gpa.

Investigação da dentina próxima à câmara pulpar encontrou valores de dureza baixos, os quais foram entre 37 a 43 KHN (Craig et al., 1959). Senawongse et al. (2006), através da nanodureza, observou que a dentina terciária possui valor de dureza de $53,6 \pm 24,7$. Essa dentina, em dentes envelhecidos, exibiu menor módulo de elasticidade e dureza do que outras dentinas circumpulpare e a camada transparente (Senawongse et al., 2006). Além disso, detectaram mudança na direção dos túbulos dentinários, ora apresentando-se tubular e ora atubular (Senawongse et al., 2006).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi comparar os valores de dureza Knoop e Berkovich das diferentes camadas de lesões de cárie em esmalte e dentina, classificadas de acordo com o ICDAS em escores 3 e 4, com as porções híidas em profundidades equivalentes

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo 1), sob o número de parecer de aprovação 4.749.509.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este trabalho possui análises múltiplas em esmalte e dentina, sem comparar os tecidos entre si, por considerar que possuem características distintas.

A dureza do esmalte foi avaliada em relação aos fatores de variação:

- ICDAS: em dois níveis (3 e 4).
- Tipo de esmalte: em dois níveis (hígido e cariado).

Em dentina, as lesões classificadas como ICDAS 3 não foram comparadas às de ICDAS 4, pois possuem características muito distintas entre si. Assim, os fatores de variação testados para analisar as lesões em dentina ICDAS 3 foram:

- Tipo de dentina: em dois níveis (hígido e cariado).
- Profundidade de dentina afetada (200 e 400 micrômetros).

Para as lesões classificadas como ICDAS 4, os fatores de variação foram:

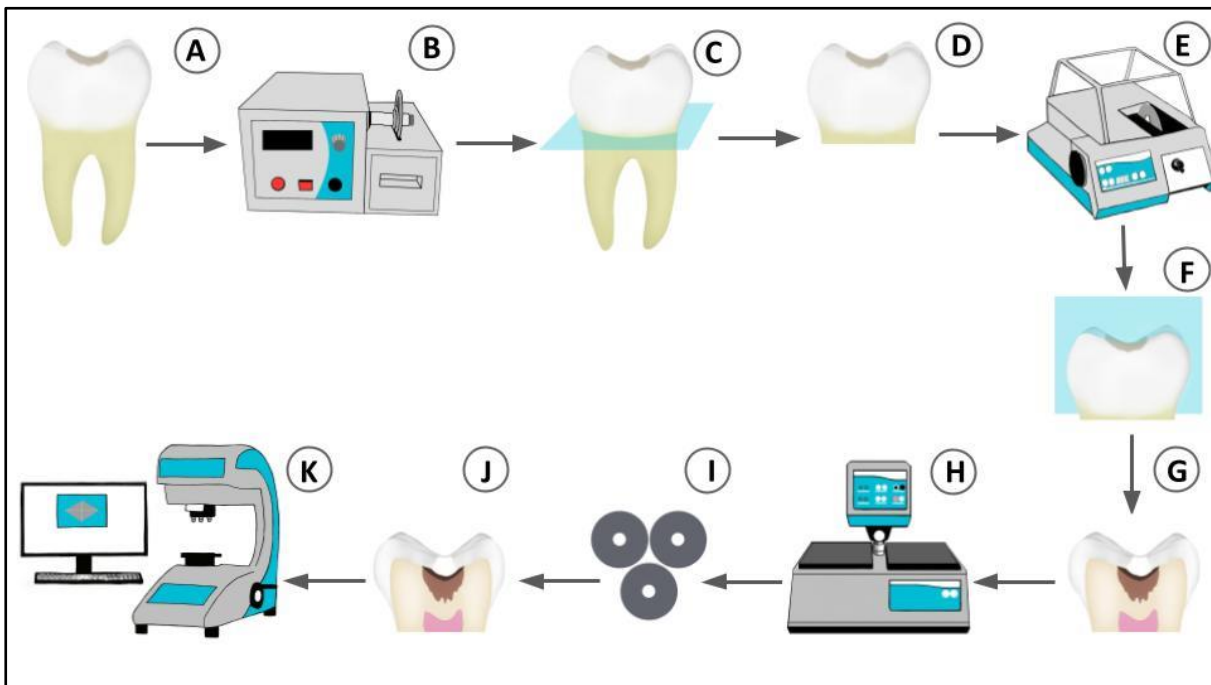
- Tipo de dentina: em quatro níveis (infectada, afetada, esclerótica e terciária).
- Profundidade da dentina hígida (superficial, média, profunda 1 e profunda 2).

Todas estas análises foram realizadas com dois equipamentos distintos de mensuração da dureza: dureza Knoop e dureza Berkovich.

4.2 SELEÇÃO, LIMPEZA E ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

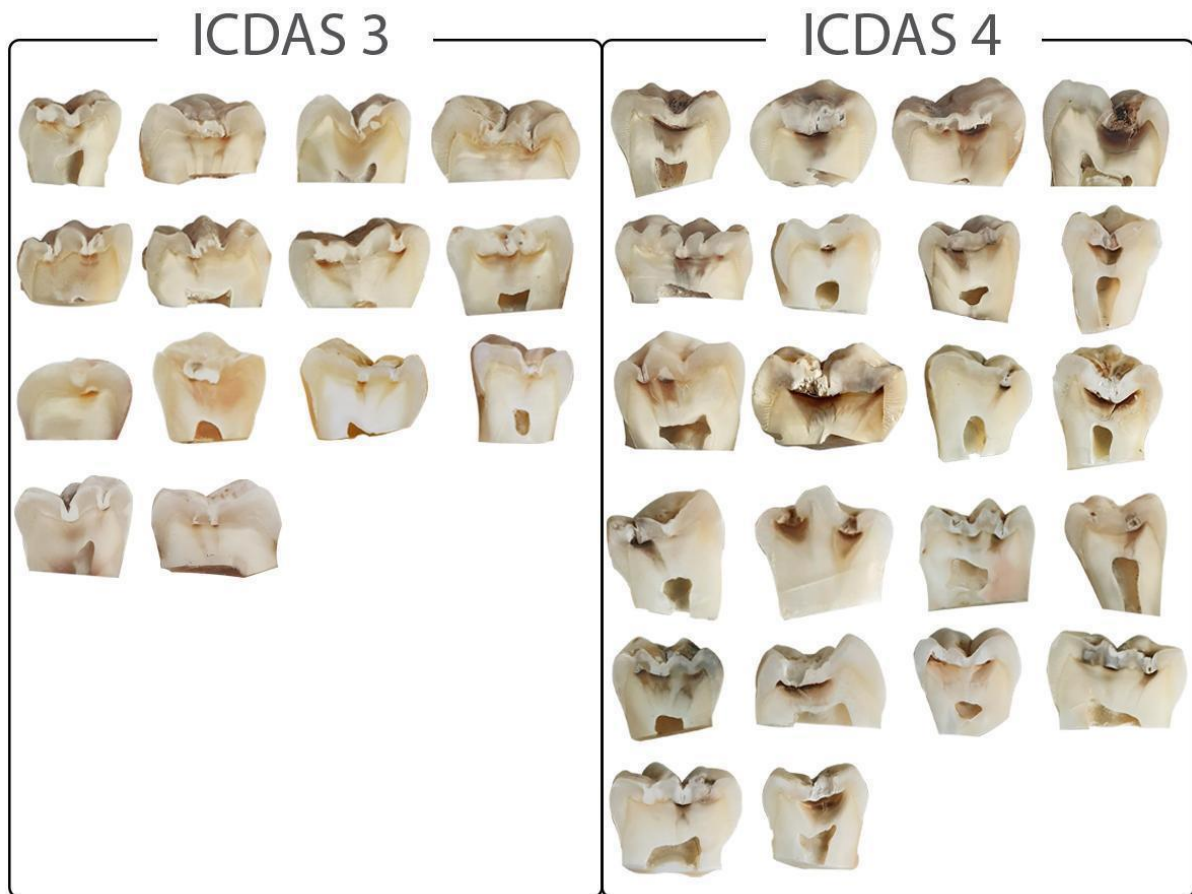
Foram selecionados 36 dentes posteriores permanentes, recém extraídos, com lesão de cárie na face oclusal (Figura 4.1-A), sendo classificados de acordo com o ICDAS em escores 3 (n = 14) e 4 (n = 22) (Figura 4.2). Os dentes selecionados foram submetidos à limpeza utilizando curetas e ultrassom e, posteriormente, armazenados em refrigerador a 4°C até o momento de uso.

Figura 4.1 - Ilustração esquemática do preparo dos espécimes: (A) Seleção de dentes posteriores permanentes cariados; (B) Cortadeira Labcut 1010; (C) Corte transversal (separação coroa e raiz); (D) Seleção da área de interesse; (E) Cortadeira automática Isomet 1000; (F) Corte longitudinal (sentido méso-distal); (G) Espécime com exposição de tecido cariado; (H) Politriz; (I) Discos de lixa de granulação crescente; (J) Espécime planificado e polido; e (K) Teste e análise da dureza tecidual



Fonte: O autor.

Figura 4.2 - Hemi-coroas com lesões classificadas em ICDAS 3 e 4, utilizadas para avaliação de dureza de distintas regiões do tecido cariado



Fonte: O autor.

4.2 PREPARO DOS ESPÉCIMES

Os dentes foram seccionados transversalmente em seu longo eixo com auxílio de um disco diamantado acoplado na Labcut 1010 (Extec, USA) com o intuito de separar a coroa da raiz dos dentes (Figura 4.1 B-C). A porção coronária, área de interesse (Figura 4.1-D), foi fixada com auxílio de cera utilidade, em suportes para corte, com a face oclusal voltada para cima. Posteriormente, utilizando-se a cortadeira automática Isomet 1000 (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) a 475 rpm, foi realizado um corte longitudinal com disco diamantado (IsoMet Diamond Wafering Blade, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA), no sentido méso-distal, gerando duas hemi-seções com exposição longitudinal de tecido cariado (Figura 4.1 E-G).

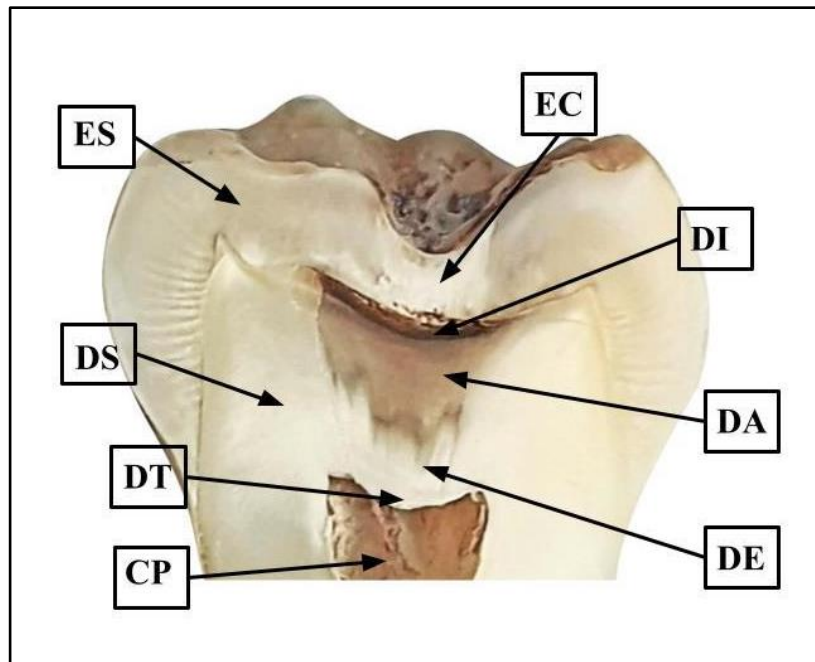
Os espécimes foram levados à Politriz EcoMet/Automet 2000 (Buehler, Lake Buff, IL, USA) a 140 rpm sob refrigeração, de modo a planificar as faces opostas ao tecido cariado utilizando lixa de granulação 400 (Figura 4.1 G-H). Após obter uma superfície plana para medições precisas de dureza Knoop, as superfícies do corte foram polidas manualmente utilizando uma sequência de lixas de granulação crescente, sequencialmente (P800 por 10s; P1200 por 10 s; P2400 por 10 s e 4000 por 4 minutos), umedificadas com água destilada (Figura 4.1-I). A cada diferente granulação de lixa utilizada, os espécimes eram levados à lavadora ultrassônica (Schuster, L100, Shenzhen, China) por 180 segundos, imersos em água destilada, para remoção das sujidades.

4.3 MENSURAÇÃO DA DUREZA TECIDUAL

4.3.1 Dureza Knoop (Microdurômetro)

Os espécimes foram destinados à mensuração da dureza em aparelho de dureza Knoop (Shimadzu HVM-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) (Figura 4.1 J-K) e fixados em lâmina de vidro. O teste de dureza por microindentação foi realizado em regiões distintas, sendo elas: esmalte hígido e cariado; dentina hígida, dentina modificada pelo processo de cárie (infectada, afetada por cárie, esclerótica) e dentina terciária (Figura 4.3). Para análise da dureza em esmalte foi utilizado uma carga de 25g por 10 segundos e para a dentina uma carga de 10g por 15 segundos (Craig et al., 1959; Alturki et al. 2021). Em cada região foram realizadas entre três a dez indentações de acordo com o tamanho do tecido cariado.

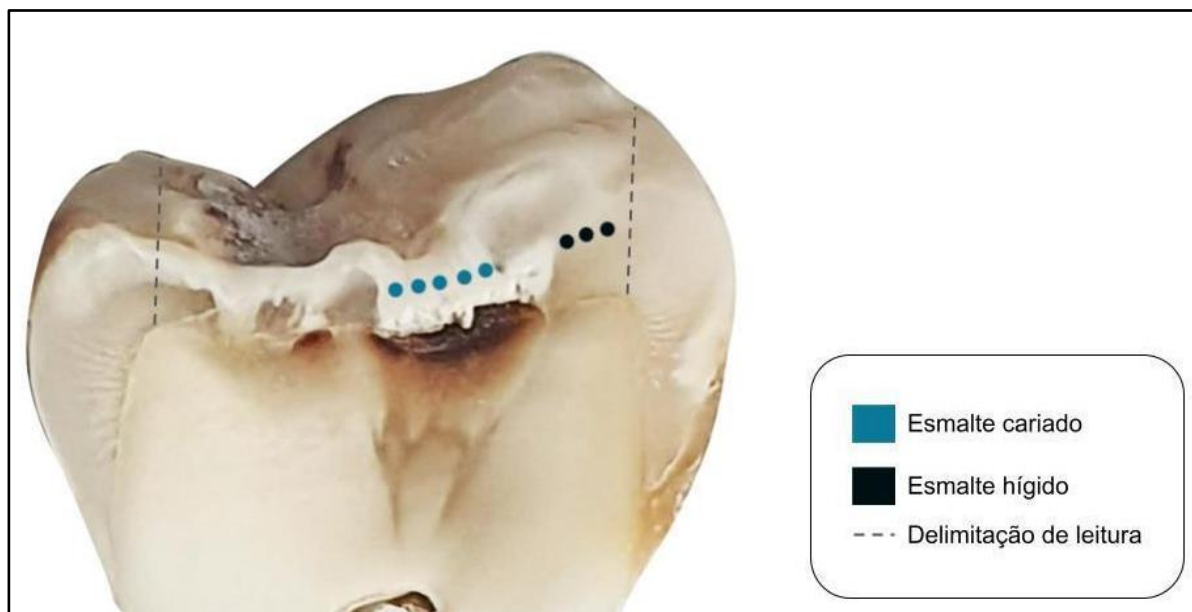
Figura 4.3 - Imagem representativa de um molar cariado: (ES) esmalte sadio; (EC) esmalte cariado; (DS) dentina sadia; (DI) dentina infectada; (DA) dentina afetada; (DE) dentina esclerótica; (DT) dentina terciária; e (CP) câmara pulpar.



Fonte: O autor.

As primeiras indentações foram feitas em esmalte hígido e cariado em dentes com lesões classificadas em ICDAS 3 e 4 (Figura 4.4). Devido a distribuição radiada dos prismas de esmalte foram traçadas duas linhas verticais de referência, paralelas ao longo eixo do dente, delimitando uma área para leitura das medidas de dureza de esmalte hígido e cariado (Figura 4.4). A primeira mensuração iniciou-se a 100 μm de distância da linha vertical direita, na porção média do esmalte dentário. As demais indentações tinham 100 μm de distância entre elas. No esmalte cariado, as indentações foram realizadas ao longo de toda a extensão do corpo da lesão, seguindo o trajeto anatômico da estrutura dental, com 100 μm de distância entre cada uma delas.

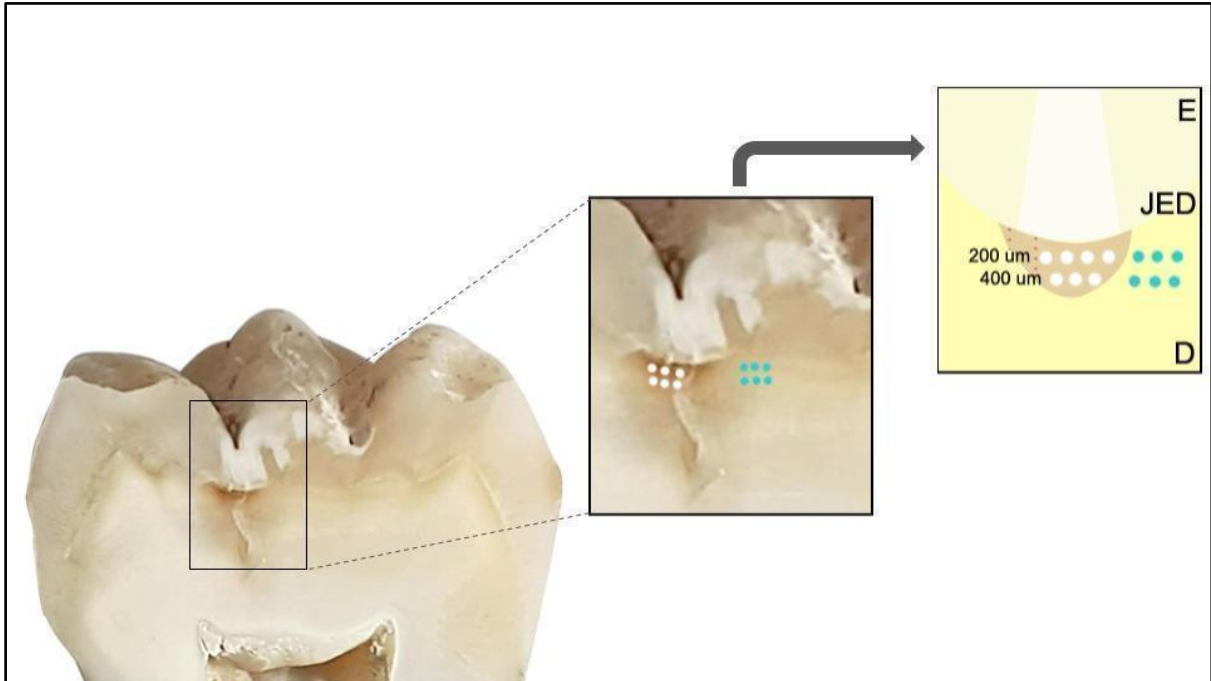
Figura 4.4 - Imagem de um molar cariado mostrando os pontos esquemáticos das mensurações de dureza Knoop e Berkovich em esmalte cariado, com distância entre as indentações de 100 μm



Fonte: O autor.

Na dentina, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15, todo o tecido cariado foi circundado para delimitar as áreas de leitura. Para os dentes com lesões classificadas em ICDAS 3, não foi identificada dentina amolecida semelhante à infectada após secção coronária. Assim, a leitura da dentina afetada foi realizada a 200 e 400 μm abaixo da junção amelodentinária (Figura 4.5), com o objetivo de distinguir se haveria efeito da profundidade da dentina sobre os dados de dureza em lesões ICDAS 3. Da mesma forma, considerando o efeito da profundidade, as leituras de dureza da dentina hígida foram realizadas em uma mesma linha horizontal em relação às dentinas modificadas avaliadas.

Figura 4.5 - Imagem de um molar cariado (ICDAS 3) mostrando os pontos esquemáticos das mensurações de dureza Knoop e Berkovich. Os pontos em branco representam as indentações no tecido dentinário afetado a 200 e 400 μm da junção amelodentinária (JAD) e os pontos azuis em dentina hígida seguindo as mesmas distâncias mencionadas. E: Esmalte/ D: Dentina

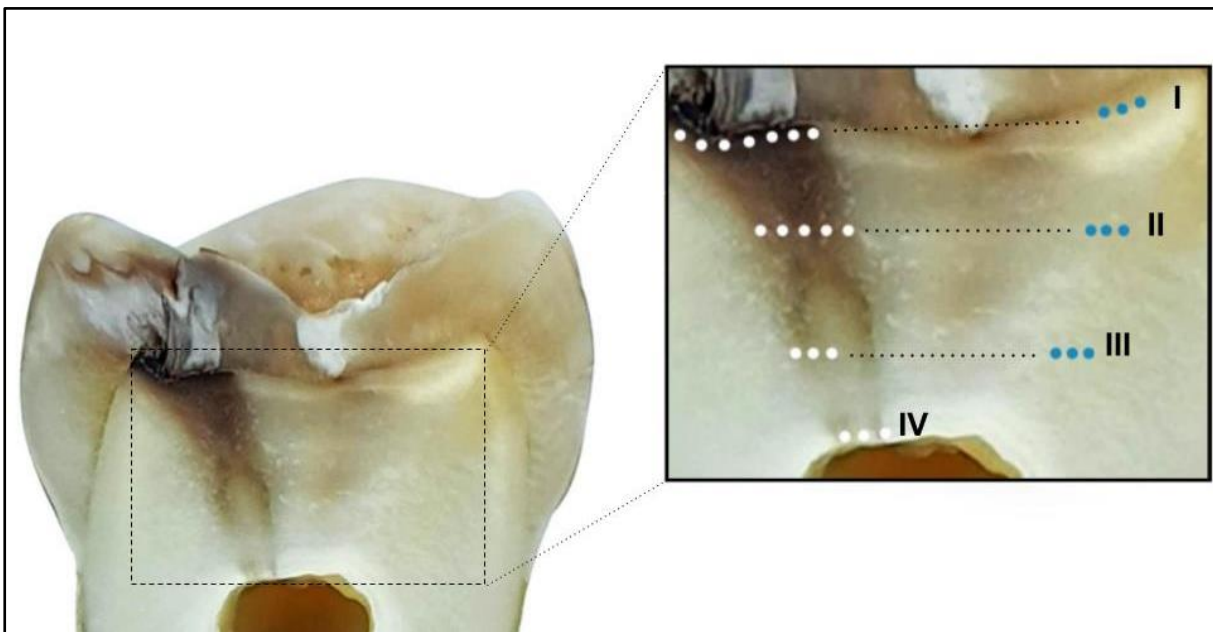


Fonte: O autor.

O teste de dureza para lesões classificadas em ICDAS 4 iniciou-se na dentina infectada, a qual corresponde a porção mais superficial desse tecido (Figura 4.6). A localização das indentações concentraram-se a 200 μm abaixo da junção amelodentinária e percorreram o longo eixo da junção por todo o tecido cariado. Na sequência, a análise de dureza foi realizada na dentina superficial hígida, seguindo a mesma altura das indentações realizadas previamente. A zona seguinte foi a dentina afetada, a qual restringiu-se a porção média do tecido cariado. Foram realizadas indentações de uma extremidade a outra, respeitando-se o limite da linha confeccionada previamente com o bisturi. No mesmo segmento de reta, foram confeccionadas indentações na dentina de profundidade média. Posteriormente, o teste de dureza Knoop foi feito na dentina esclerosada, a qual encontra-se na porção mais inferior da lesão. A partir da delimitação inferior realizada com o bisturi, as leituras da dentina esclerótica foram realizadas a 200 μm acima da linha inferior e dentro dos limites dessa zona. Logo, foram realizadas indentações na mesma altura, da dentina hígida mais profunda. Por fim, foram realizadas indentações na dentina terciária.

Todas as indentações realizadas tiveram uma distância de 100 μm entre cada uma delas. A leitura da dureza foi realizada com auxílio visual de uma objetiva de 40x de aumento.

Figura 4.6 - Imagem de um molar cariado (ICDAS 4) mostrando os pontos esquemáticos das mensurações de dureza Knoop e Berkovich em diferentes dentinas modificadas. De forma pareada, os pontos em branco representam as indentações no tecido dentinário cariado e os pontos azuis em dentina hígida, nas mesmas profundidades. As regiões analisadas foram: I: dentina superficial (cariada e hígida); II: dentina afetada média e hígida; III: dentina esclerótica e hígida profunda; IV: dentina terciária



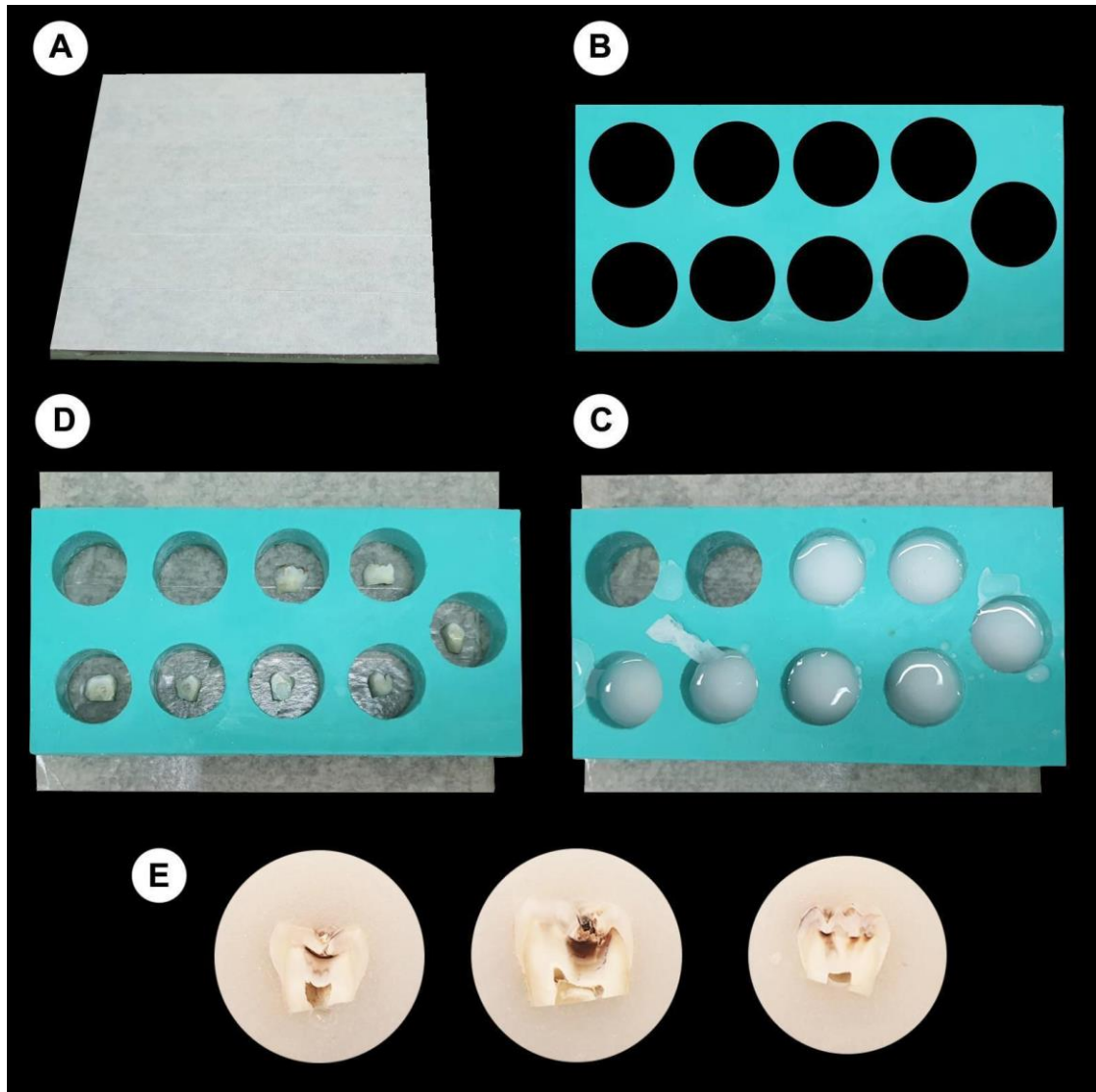
Fonte: O autor.

4.3.2 Dureza Berkovich (Ultra-microdurômetro)

Para fins comparativos, o mesmo padrão de indentações por regiões da estrutura dental, descritas anteriormente, foi realizado no ultra-microdurômetro DUH-211S (Shimadzu) (Figs 7-9). No entanto, para a leitura dos espécimes foram confeccionados discos de resina acrílica para inclusão das amostras. Em uma placa de vidro, foi fixada uma fita de dupla face, o molde de silicone e os dentes seccionados foram inseridos em cada orifício do molde com a face de interesse voltada à fita adesiva. Após isso, foi manipulada a resina acrílica e ela foi vertida em cada orifício para inclusão dos dentes (figura 4.7. A-E). Após tempo de presa, os discos foram removidos e sua base foi lixada na Politriz EcoMet/Automet 2000 (Buehler, Lake Buff,

IL, USA) utilizando lixa de granulação P250, em 140 rpm, até a obtenção de uma superfície plana para execução das leituras.

Figura 4.7 - Confeção de discos de resina acrílica para leitura de dureza Berkovich. A) Placa de vidro com fita adesiva de dupla face; B) Molde de silicone industrial; C) Espécimes inseridos em cada orifício do molde; D) Inserção de resina acrílica nos orifícios; e E) Obtenção dos discos para leitura



Fonte: O autor.

A ponta utilizada para as indentações foi a de Berkovich, as quais tiveram os parâmetros (Tabela 4.1), seguindo os critérios utilizados por Mahoney et al. (2000) e Angker et al. (2004). Todas as mensurações de dureza foram realizadas por apenas um pesquisador treinado para tal finalidade.

Tabela 4.1 - Valores atribuídos ao teste de dureza Berkovich utilizando o ultra-microdurômetro

Parâmetros do teste	
Tipo de indentador	Berkovich (triangular-piramidal)
Força de contato (mN)	0.2
Máx/Mín. força de indentação (mN):	
Esmalte:sadio/cariado	50/0.2
Dentina sadia/hipermineralizada/terciária	25.0/0.2
Dentina infectada/afetada	10/0.02
Permanência na carga máx	30.0

Fonte: O autor.

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados de dureza de esmalte e dentina, analisados com dureza Knoop e dureza Berkovich foram analisados separadamente. Em esmalte os fatores de variação testados foram o tipo de esmalte e o ICDAS. Em dentina de lesões de ICDAS 3, os fatores de variação foram os tipos de dentina e profundidade da dentina afetada. Para as lesões ICDAS 4, os fatores de variação foram tipo de dentina cariada e profundidade de dentina hígida.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov os quais apresentaram distribuição normal. Dessa forma, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas e teste complementar de Tukey ($\alpha = 0.05$), utilizando o software estatístico Jamovi versão 1.6 (Sidney, Austrália).

A correlação entre os dados de dureza Knoop e dureza Berkovich foram avaliados pelo coeficiente de correlação intraclassa (ICC); pela concordância entre os tipos de dureza, através do teste t de uma amostra para os valores das diferenças entre os métodos; e análise gráfica de Bland-Altman com um intervalo de confiança de 95%. Em complemento ao gráfico de Bland-Altman, o potencial viés de proporção das diferenças entre as médias foi realizado através de uma regressão linear simples.

5 RESULTADOS

5.1 ESMALTE

A ANOVA de medidas repetidas para valores de dureza Knoop detectou diferença significativa para o fator tipo de esmalte ($p < 0,001$) e para o fator ICDAS ($p = 0,002$), enquanto nenhuma diferença foi detectada para interação dos dois fatores ($p = 0,389$) (Tabela 5.1). De modo similar, os dados de dureza Berkovich apresentaram diferença estatística entre os tipos de esmalte ($p < 0,001$), bem como para o fator ICDAS ($p < 0,001$) (Tabela 5.1). No entanto, a interação entre esses fatores não exibiu diferença significativa ($p = 0,117$).

Tabela 5.1 - Média (desvio padrão) dos valores de dureza de lesões cariosas em esmalte classificados em ICDAS 3 e 4, utilizando as durezas Knoop e Berkovich

Escores	Dureza Knoop		Dureza Berkovich	
	Hígido	Cariado	Hígido	Cariado
3	301,5 (22,9) A	52,7 (19,8) B	297,3 (29,8) a	44,7 (20,7) b
4	314,2 (25,0) A	79,5 (39,1) C	308,4 (27,4) a	81,9 (37,9) c

Letras maiúsculas indicam os resultados das comparações dos valores de dureza Knoop.

Letras minúsculas indicam os resultados das comparações de dureza Berkovich.

Fonte: O autor.

5.2 DENTINA

5.2.1 Lesões cariosas classificadas em escore ICDAS 3

A ANOVA de medidas repetidas detectou diferença estatística para o fator tipo de dentina ($p < 0,001$) e não foi detectada diferença estatística para o fator

profundidade ($p = 0,089$) quando da análise da dureza Knoop. Contudo, houve diferença estatística para a interação entre os fatores ($p < 0,001$) (Tabela 5.2).

Quando a dureza Berkovich foi analisada com ANOVA de medidas repetidas foi detectada diferença estatisticamente significativa para o fator tipo de tecido ($p < 0,001$), para o fator profundidade da dentina afetada ($p < 0,001$), bem como para a interação entre estes fatores ($p < 0,001$) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Média (desvio padrão) dos valores de dureza de lesões em dentina de ICDAS 3, utilizando as durezas Knoop e Berkovich

Prof	Dureza Knoop			Dureza Berkovich		
	Hígido	Afetado	p	Hígido	Afetado	p
200	77,7 (4,1) Aa	38,4 (5,5) Bb	< .001	77,6 (5,8) Dd	38,9 (7,2) Ee	< .001
400	76,2 (4,9) Aa	43,2 (6,3) Cc	< .001	77,0 (6,9) Dd	45,4 (6,4) Ff	< .001
p	0,150	0,027		0,913	0,003	

Prof: profundidade; p: nível de significância de 5%.

Letras maiúsculas indicam as diferenças, na linha, analisadas para as durezas Knoop e Berkovich. Letras minúsculas indicam as diferenças, na coluna, analisadas para as durezas Knoop e Berkovich.

Fonte: O autor.

5.2.3 Lesões cariosas classificadas em escore ICDAS 4

A ANOVA de medidas repetidas exibiu diferença estatística significativa para o fator tipos de dentina ($p < 0,001$), profundidade de dentina hígida ($p < 0,001$) e também para a interação entre esses fatores ($p < 0,001$) para o teste de dureza Knoop (Tabela 5.3).

De forma similar, a ANOVA de medidas repetidas exibiu diferença estatística significativa para o fator tipos de dentina ($p < 0,001$), profundidade de dentina hígida ($p < 0,001$) e também para a interação entre esses fatores ($p < 0,001$) para o teste de dureza Berkovich (Tabela 5.3).

Além disso, ensaios de dureza Knoop e Berkovich foram realizados para comparar a dentina terciária com a dentina hígida profunda. As ANOVAS de medidas repetidas, realizadas individualmente, detectaram que a dureza Knoop da dentina terciária ($46,2 \pm 2,7$ A) foi menor do que a dentina hígida profunda ($64,5 \pm 3,0$ B) ($p < 0,001$). Dados similares foram observados para a dureza Berkovich com menor dureza para a dentina terciária ($46,5 \pm 2,9$ a) do que para a dentina hígida profunda ($63,3 \pm 3,8$ b) ($p < 0,001$).

5.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO E CONCORDÂNCIA ENTRE AS DUREZAS KNOOP E BERKOVICH

Consideramos interessante analisar se havia concordância e correlação entre os ensaios de dureza Knoop e Berkovich sobre os dados de esmalte e dentina, que foram agrupados independente da classificação ICDAS das lesões.

O coeficiente de correlação intraclassa (ICC) de medidas únicas mostrou uma excelente correlação, tanto para a dureza em esmalte (ICC: 0,98; IC 95%: 0,98 a 0,99) quanto para a dentina (ICC: 0,96; IC 95%: 0,95 a 0,97).

Além disso, um teste t de uma amostra foi realizado para verificar concordância entre as durezas Knoop e Berkovich através diferença das médias obtidas. Tanto para esmalte ($p = 0,103$; IC 95%: -0,71 a 7,5), quanto para a dentina ($p = 0,241$; IC 95%: -0,39 a 1,5) foi detectada concordância entre as durezas Knoop e Berkovich.

A Figura 5.1 mostra um gráfico de concordância entre as durezas Knoop e Berkovich através do método de Bland-Altman. A média da diferença entre os dois indentadores (Knoop e Berkovich), tanto para os dados de dureza em esmalte quanto para de dentina, foi de 3,4 e 0,6, respectivamente. Independente do tecido analisado, ambas durezas Knoop e Berkovich mostraram possuir concordância visto que os valores médios da diferença estão próximos à linha de igualdade e dentro da faixa do intervalo de confiança.

Teste de regressão linear não apresentou potencial viés de proporção entre as durezas Knoop e Berkovich analisadas para esmalte ($p = 0,60$; $R^2: 0,003$), com inclinação de 0,00882 e tampouco para a dentina ($p = 0,54$; $R^2: 0,002$) com uma inclinação de 0,0137 (Figura 5.2). Os valores das inclinações tenderam a zero, sendo insignificantes, mostrando que os dados se distribuem de forma homogênea abaixo e acima da média das diferenças entre os valores de dureza Knoop e Berkovich.

Tabela 5.3 - Média (desvio padrão) dos valores de dureza de lesões em dentina de ICDAS 4, utilizando as durezas Knoop e Berkovich

Profundidade	Dureza Knoop		p	Dureza Berkovich		p
	Hígido	Modificado por cárie		Hígido	Modificado por cárie	
Superficial	79,1 (4,2) A	21,2 (4,3) C	< .001	77,7 (4,3) a	21,7 (2,9) d	< .001
Média	75,8 (4,9) A	44,5 (4,0) D	< .001	73,7 (4,4) b	41,4 (4,9) e	< .001
Profunda	64,5 (3,0) B	86,6 (7,1) E	< .001	63,3 (3,8) c	87,8 (7,0) f	< .001

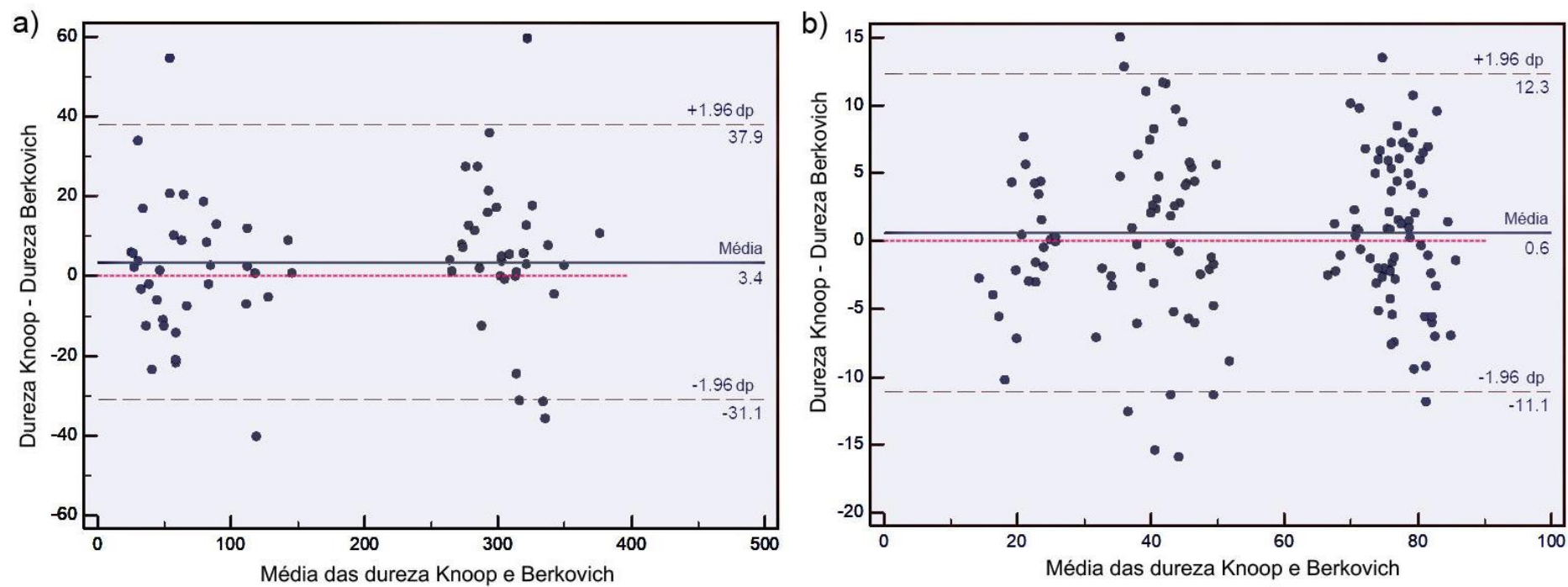
Modificado por cárie superficial = dentina infectada; modificado por cárie média = dentina afetada; modificada por cárie profunda = dentina esclerótica.
 p: nível de significância de 5%.

Letras maiúsculas indicam os resultados das comparações de dureza Knoop.

Letras minúsculas indicam os resultados das comparações de dureza Berkovich.

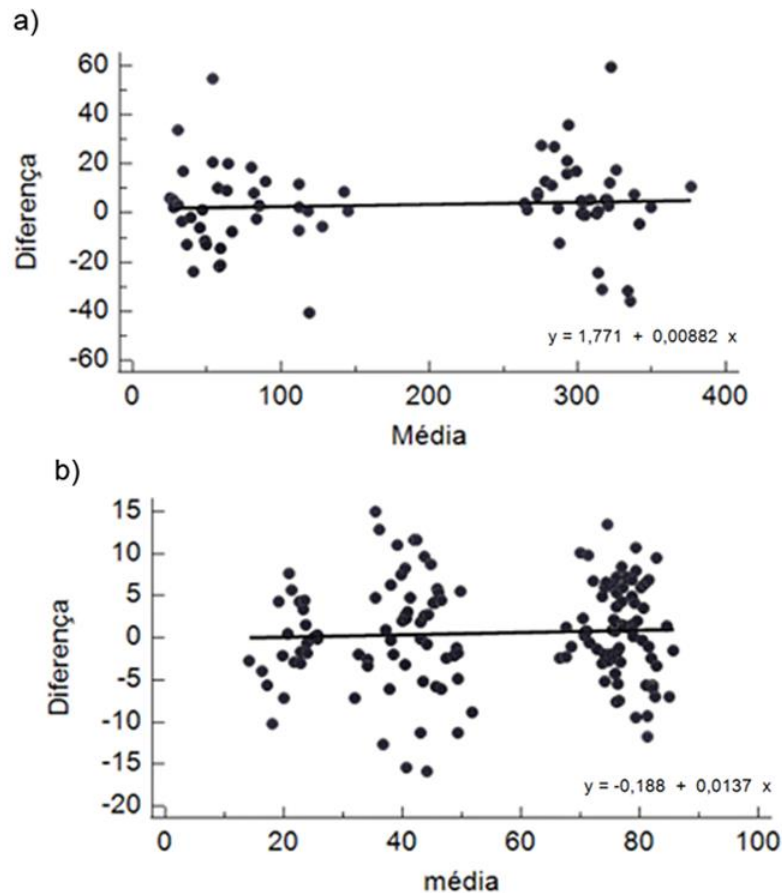
Fonte: O autor.

Figura 5.1 - Gráficos de Bland-Altman dos indentadores Knoop e Berkovich para obtenção da dureza tecidual em (a) esmalte e (b) dentina, de dentes permanentes com lesões cariosas classificadas em ICDAS 3 e 4



Fonte: O autor.

Figura 5.2 - Linha de regressão linear para avaliar o potencial viés de proporção entre as diferenças das durezas Knoop e Berkovich (eixo Y) e médias de ambas as durezas (eixo X) de dados do (a) esmalte e (b) dentina



Fonte: O autor.

5.3 ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR MULTINÍVEL

De forma complementar à análise de concordância entre as durezas Knoop e Berkovich, foram realizadas duas distintas análises multinível para o esmalte e para a dentina.

Para a dureza Knoop do esmalte, a regressão linear multinível detectou diferença estatisticamente significativa para os fatores avaliados tipos de tecido (hígido e cariado) ($p=0,001$) e o ICDAS (3 e 4) ($p=0,004$). Há uma perda de 240,2 unidades de dureza Knoop para o tecido cariado em relação ao tecido sadio. Ademais, uma

maior tendência de dureza foi observada para os dentes cariados classificados em ICDAS 4, apresentando 19,7 unidades de dureza Knoop a mais que nas lesões de ICDAS 3 (Tabela 5.4). Para a dureza Berkovich do esmalte, a regressão linear multinível detectou diferença estatisticamente significativa para os fatores avaliados tipos de tecido ($p=0,001$) e o ICDAS ($p=0,001$) (Tabela 5.4). O tecidoariado apresenta 236,6 unidades de dureza Berkovich a menos que o tecido hígido e, de forma similar à dureza Knoop, as lesões de ICDAS 4 possuem maior tendência de dureza, com 24,2 unidades de dureza a mais que as lesões de ICDAS 3 (Tabela 5.4).

De maneira complementar, buscou-se analisar o comportamento da dureza Knoop na dentina quanto aos fatores tipo de tecido ($p < 0,001$), profundidade ($p < 0,001$) e ICDAS ($p = 0,004$) (Tabela 5.5). Frente ao processo cariioso, é observado uma perda de 41,3 unidades de dureza Knoop para o tecidoariado em relação ao tecido hígido. A dentina em profundidade média possui 6,7 unidades de dureza a mais que a dentina superficial. E com relação ao ICDAS, diferente do esmalte, é observado uma menor dureza para as lesões de ICDAS 4 de 3,7 unidades de dureza a menos que nas lesões de ICDAS 3 (Tabela 5.5). De forma similar, a dureza Berkovich da dentina exibiu diferença estatística significativa para os fatores tipo de tecido ($p < 0,001$), profundidade ($p < 0,001$) e ICDAS ($p < 0,001$) (Tabela 5.5). Uma tendência de perda de 40,6 unidades de dureza Berkovich foi observado para o tecidoariado comparado ao tecido hígido. A dureza da dentina na profundidade média foi superior à dentina superficial, exibindo uma dureza de 5,8 unidades a mais. Além disso, as lesões de ICDAS 4 exibiram menor dureza que o ICDAS 3, em 6,1 unidades de dureza Berkovich (Tabela 5.5).

Tabela 5.4 - Análise de regressão linear multinível para valores de durezas Knoop e Berkovich obtidos em esmalte

Fatores	Dureza Knoop			Dureza Berkovich		
	β^*	EP	P *	β^*	EP	P *
Tecido						
Hígido	Ref.			Ref.		
Cariado	-240,2	6,7	< 0,001	-236,6	7,1	< 0,001
Escore						
Escore 3	Ref.			Ref.		
Escore 4	19,7	6,9	0,004	24,2	7,3	0,001

β : coeficiente de regressão linear ajustado

* Valor de p calculado por análise de regressão linear múltipla de multinível EP = Erro padrão

Fonte: O autor.

Tabela 5.5 - Análise de regressão linear multinível para valores de durezas Knoop e Berkovich obtidos em dentina

Fatores	Dureza Knoop			Dureza Berkovich		
	β^*	EP	P *	β^*	EP	P *
Tecido						
Hígido	Ref.			Ref.		
Cariado	-41,3	1,3	<0,001	-40,6	1,2	< 0,001
Profundidade						
Superficial	Ref.			Ref.		
Média	6,7	1,3	< 0,001	5,8	1,2	< 0,001
Escore						
Escore 3	Ref.			Ref.		
Escore 4	- 3,7	1,3	0,004	-6,1	1,3	< 0,001

β : coeficiente de regressão linear ajustado

* Valor de p calculado por análise de regressão linear múltipla de multinível

EP = Erro padrão

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

As investigações *in vitro* da dureza tecidual podem auxiliar dentistas no entendimento das propriedades mecânicas de diferentes lesões de cárie. Neste estudo foi observado uma queda de aproximadamente 83-86% das durezas Knoop e Berkovich, respectivamente, de esmalte cariado classificado em ICDAS 3 quando comparado ao tecido sadio. De acordo com Shimizu et al. (2015), é possível observar uma perda de 90% da dureza nesse tipo de lesão. Nossos achados de dureza variaram entre 44,6 (Berkovich) e 52 (Knoop). Outros trabalhos foram similares aos dados de dureza obtidos (Mohd Said et al., 2017; Alkattan et al., 2018). A redução das propriedades mecânicas do esmalte no corpo da lesão de manchas brancas está relacionada com a diminuição do pico de PO_4^{3-} frente à progressão da desmineralização (Sa et al., 2017; Al-Obaidi et al., 2018). Nesta região da cárie, a densidade mineral pode variar entre 1,35 e 2,07 g/cm³, o que está abaixo da faixa do esmalte hígido (2,34–2,7 g/cm³) (Shahmoradi; Swain, 2016).

Os dados de dureza das lesões cariosas em esmalte de ICDAS 4, constatamos uma queda da dureza de aproximadamente 73-75% para o tecido cariado em comparação ao hígido, com dureza variando entre 79,5 e 81,9 para os indentadores Knoop e Berkovich, respectivamente. Esses valores de dureza estão dentro da faixa encontrada por estudos prévios realizados em lesões cariosas naturais ou artificiais (Shimizu et al., 2015; Mohd Said et al., 2017; Alkattan et al., 2018). Ademais, se comparados aos valores de esmalte hígido do presente trabalho, bem como de outros estudos (Craig; Peyton, 1958; Wei; Koulourides, 1972; Shimizu et al., 2015), apresentam valores de dureza inferiores. Isso se explica devido à recorrente diminuição de pH proveniente dos ácidos bacterianos que promove alteração da dureza, além de propiciar a modificação da forma, função e aumento da sensibilidade dental (Feagin et al., 1969; Geddes, 1975; West; Joiner, 2014).

A dureza do esmalte diminui com o aumento do tempo de desmineralização (Sa et al., 2017; Alkattan et al., 2018). No entanto, apesar do ICDAS 4 representar um estágio mais avançado de cárie, o esmalte cariado dessa classificação apresentou maior dureza do que nas lesões de ICDAS 3, independente do indentador utilizado. Essa diferença pode ser explicada pela atividade da lesão, nas quais lesões agudas possuem menor dureza que as crônicas que tiveram um maior espaço de tempo para

se desenvolver (Fusayama et al., 1966). Os fatores protetores - melhoria da higiene oral e aplicação tópica de flúor - favorecem a estabilização ou reversão das lesões (Featherstone, 2000). É observado um aumento da dureza tecidual, *in vitro*, na presença de fluoretos (Alkattan et al., 2018; Farooq et al., 2021), podendo ocorrer uma recuperação de 61,1 a 72,6% da dureza (Alkattan et al., 2018). O flúor reduz a desmineralização do esmalte, favorece a remineralização e ainda diminui a profundidade das lesões iniciais de cárie em esmalte (Soares, Yoshikawa et al., 2021). Ademais, a película salivar confere um efeito protetor contra a desmineralização, fornecendo um aumento da dureza, embora não seja tão significativo quanto o flúor (Alkattan et al., 2018).

Em relação aos valores da dentina cariada em lesões de ICDAS 3, nossos resultados corroboram com os dados encontrados na literatura para a dentina afetada, encontrando-se nas faixas de 25 a 40 KHN (Marshall et al., 2001; Banerjee et al., 2010; Almahdy et al., 2012; Joves et al., 2014), o que demonstra a presença de alterações nas propriedades mecânicas na dentina, ainda que, clinicamente, o processo carioso pareça estar restrito ao esmalte. A dentina afetada apresenta modificações estruturais e químicas, sendo observada diminuição de fosfato e carbonato (Wang et al., 2007). Além disso, possui alterações leves na estrutura secundária do colágeno, mais especificamente nas regiões de amida I e III (Wang et al., 2007). Os picos de amida representam a conformação da proteína e são mais amplos em comparação à dentina hígida, o que sugere alterações microestruturais do colágeno (Wang et al., 2007).

Ademais, apesar da dentina afetada possuir menor dureza que o tecido hígido, como demonstrado neste estudo, o seu conteúdo mineral ($47,5 \pm 5,7\%$) e da dentina hígida ($61 \pm 2,7\%$) não são significativamente diferentes entre si (Almahdy et al., 2012). Dessa forma, a dentina afetada, por apresentar uma desmineralização parcial, colágeno não desnaturado e ausência de bactérias, é capaz de ser remineralizada, aumentando sua dureza (Fusayama, 1979). Estudos clínicos comprovam a eficácia de terapias minimamente invasivas, como selantes, na paralisação da progressão de lesões cariosas de ICDAS 3 (Muñoz-Sandoval et al., 2019; Tahani et al., 2021; Kasemkhun et al., 2021), o que é benéfico para viabilizar a recuperação de dureza tecidual do tecido afetado, porém estudos longitudinais são altamente recomendados para análise da eficácia dessa terapêutica ao longo do tempo.

Em contrapartida, nas lesões de ICDAS 4 já é observado tecido necrótico próximo à JAD, representado pela dentina infectada. A dureza dessa dentina tem sido associada ao seu grau de infecção, o que auxilia clínicos na identificação desta, que requer remoção devido à grande perda mineral, número de patógenos e matriz colágena desestruturada e consequente incapacidade de remineralização (Banerjee et al., 2010; Joves et al., 2014). A dentina infectada é mole e danificada, o que pode impedir que os testes de dureza sejam tomados com precisão (Banerjee et al., 1999). No trabalho de Banerjee et al. (1999) as medidas de dureza foram realizadas a 100 µm abaixo da JAD. Em nosso estudo, devido a grande degradação desta região, as medidas da dentina infectada foram realizadas a 200 µm da JAD. Dados publicados anteriormente indicam que os valores de dureza para esse tecido encontram-se abaixo de 25 KHN (Banerjee et al., 2010; Almahdy et al., 2012), o que é similar aos nossos achados. Nesse tecido, há uma diminuição do conteúdo mineral ($24,8 \pm 5,7\%$) e desorganização de material orgânico, o que se correlaciona com a quantidade de fluorescência de porfirinas ($37,4 \pm 5,9\%$) presentes na dentina infectada e difere significativamente de dentina hígida ($4,7 \pm 1,3\%$), o que suporta a recomendação de remoção desse tecido (Almahdy et al., 2012).

A dureza da dentina afetada por cárie obtida neste trabalho foi similar à encontrada na literatura (Marshall et al., 2001; Banerjee et al., 2010; Almahdy et al., 2012; Joves et al., 2014). Apesar de possuir dureza menor que a dentina hígida quando comparada em mesma profundidade, deve ser preservada por seu potencial de ser remineralizada. Clinicamente é descrita como dentina coriácea, na qual após ser pressionada por instrumental manual não se deforma, mas pode ser facilmente removida (Leal et al., 2020). Durante o manejo clínico dessas lesões, deve ser realizada a remoção seletiva do tecido cariado, removendo esse tecido apenas nas paredes laterais da cavidade até que se tenha tecidos saudáveis (Kher; Rao, 2020). Quando a dentina afetada é protegida por restaurações com bom vedamento marginal, há um grande potencial de ser reparada pelo complexo dentina-polpa, evitando desgaste excessivo da estrutura dental e exposição pulpar (Banerjee et al., 2010). Além disso, devido à agressão das bactérias cariogênicas, há formação de cristalitos de cálcio-fosfato que promovem a obliteração dos túbulos da dentina, dificultando a progressão da lesão cáriosa (Joves et al., 2014).

Tal mecanismo mencionado anteriormente ocorre devido a proteção conferida pelo complexo dentina-polpa, conhecido por esclerose tubular (Pashley et al., 1991).

No presente estudo, os valores de dureza para a dentina esclerótica foram superiores aos de dentina hígida. Dados de dureza similares foram obtidos em investigações anteriores (Craig et al., 1959; Grajower et al., 1977; Ogawa et al., 1983; Banerjee et al., 1999). Por ser essa dentina hipermineralizada, possui maior teor de fosfato e menores quantidades de carbonato e conteúdo orgânico quando comparada à dentina normal (Xu et al., 2009; Liu et al., 2014), o que explica os dados encontrados neste estudo. A dentina esclerótica é formada pelo complexo dentina-polpa, atuando como barreira contra a agressão bacteriana, devido a deposição de minerais no interior do lúmen dos túbulos dentinários (Smith et al., 1995; Lee et al., 2006; Farooq et al., 2021), sendo, portanto, preservada durante o manejo clínico dessas lesões. Outras pesquisas de dureza da dentina esclerótica (Martín et al., 2010; Castanho et al., 2011) quando comparados aos valores obtidos neste trabalho são significativamente mais baixos. No entanto, deve-se ter cuidado nesta análise, visto que esses estudos não avaliaram dentina esclerótica formada em decorrência do processo carioso e sim a sua formação fisiológica devido ao avanço da idade. Na cárie dental, a formação da dentina esclerótica é induzida pela ação bacteriana, com um mecanismo que envolve a dissolução do mineral intertubular circundante e sua reprecipitação no interior dos túbulos (Daculsi et al., 1987). Enquanto que a dentina esclerótica fisiológica é depositada à medida que há avanço da idade (Selvamani, 2013).

A dentina terciária, também foi analisada, porém não foi classificada em reacional ou reparativa devido a limitação desse estudo em não conhecer a história pregressa do processo carioso. Os valores de dureza Knoop e Berkovich encontrados para essa dentina foram de aproximadamente 46 KHN. Tal valor se assemelha com os dados obtidos no trabalho de Cox et al. (1980), com valor de dureza de 40,5 KHN para dentina reparativa e também a Craig et al. (1959), nos quais os valores variam entre 37-43 KHN. Após análise de nanodureza, valores de 53,6 foram encontrados para a dentina reacional (Senawongse et al., 2006). A dentina reparativa é atubular com células aprisionadas em sua matriz mineralizada, a qual é distrófica (Smith et al., 1995). Enquanto que a dentina reacional é tubular e se dá de forma contínua com as dentinas primária e secundária (Smith et al., 1995; Farooq et al., 2021). A diferença entre a dureza desses tipos de dentina pode estar relacionada à mudança na direção dos túbulos dentinários (Senawongse et al., 2006).

Após análise ultraestrutural e imunoistoquímica, autores (Cajazeira Aguiar; Arana-Chavez, 2007) detectaram a presença de uma proteína não-colagenosa,

conhecida por osteopontina (OPN), na matriz ao redor das células aprisionadas na dentina reparativa, enquanto que não foram observadas na dentina fisiológica e reacional. No entanto, não é possível observar a relação da osteopontina presente na matriz da dentina reparativa com a dureza tecidual, já que o estudo mencionado não realiza essa comparação.

Adicionalmente, diferentes profundidades da dentina hígida foram analisadas neste estudo, observando-se maior dureza próximo à JAD e diminuição à medida que se aproxima da câmara pulpar. Semelhantes resultados foram publicados anteriormente (Ogawa et al., 1983; Hosoya et al., 2000; Fuentes et al., 2003; Hamama et al., 2013). Em contrapartida, outras investigações encontraram valores inferiores para a dentina próximo à JAD (Craig et al., 1959; Banerjee et al., 1999). A dureza pode ser influenciada pelo ângulo de direção dos túbulos dentinários, na qual observa-se diminuição da dureza à medida que há aumento do ângulo de orientação (Han et al., 2012). Ademais, a interpretação e comparação entre esses dados deve ser feita com cautela, assim como no presente estudo, não foi possível obter informações dos pacientes em relação à idade e história pregressa da lesão cariada, visto que esses fatores podem exercer influência no grau de mineralização da dentina.

Nossos achados mostram que independente do indentador (Knoop ou Berkovich) utilizado, não há diferença significativa na obtenção dos valores de dureza das diferentes camadas de lesões cariosas. De forma similar, a análise de regressão multinível demonstrou um padrão similar de dureza (Knoop e Berkovich) entre os distintos tecidos, profundidades e ICDAS analisados. Embora as durezas Knoop e Berkovich sejam concordantes entre si e sigam a mesma tendência de dureza, ressaltamos a importância da calibração do pesquisador durante a realização dos ensaios de dureza. A dureza Knoop é dependente da análise visual do operador e do foco da extremidade da diagonal da indentação (Doerner; Nix, 1986; Mahoney et al., 2000). O micron final da indentação pode ser prejudicado durante a leitura da dureza, devido a menor sensibilidade deste equipamento (Collins et al., 1992). Do contrário, na dureza Berkovich, além da leitura da área de indentação, também é avaliada a profundidade, o que garante maior precisão nas mensurações e não requer medição manual (Doerner; Nix, 1986; Oliver; Pharr, 1992; Mahoney et al., 2000; Sakoolnamarka et al., 2005).

A amostra analisada deve apresentar uma boa lisura superficial e manter-se hidratada durante o armazenamento para não ocorrer alteração das propriedades mecânicas (Bobji; Biswas, 1998; Subramani et al., 2018). No entanto, para a realização do teste de dureza deve estar seca visto que a umidade pode alterar os valores de dureza (Subramani et al., 2018). Desta forma, ressaltamos a importância de treinamento prévio do operador para a obtenção de dados finais considerando como uma etapa essencial dentro das boas práticas de pesquisa.

Dentro das limitações deste estudo, está a falta de conhecimento da história pregressa do processo cariioso e do paciente, para melhor compreensão das alterações biofisiológicas dos dentes avaliados. Ainda assim, as leituras Knoop e Berkovich foram satisfatórias, concordantes e comparáveis com os parâmetros encontrados na literatura possibilitando gerar informações atualizadas sobre a dureza de tecidos dentais duros, hígidos e cariados.

7 CONCLUSÕES

Com base nos achados deste estudo, pode-se concluir que:

- As durezas Knoop e Berkovich são maiores no esmalte hígido e no ICDAS 4;
- Em lesões ICDAS 3, independente da profundidade, a dureza é sempre maior na dentina hígida do que a afetada.
- Existe efeito do tipo de dentina (infectada, afetada ou esclerótica) e da profundidade da dentina hígida sobre a dureza, independentemente do tipo de indentador utilizado;
- Devido aos mecanismos de defesa do complexo dentina-polpa verifica-se que apenas a dentina esclerótica exibiu valores de dureza superiores à dentina hígida profunda. Por sua vez, a dentina terciária exibiu valores inferiores à dentina hígida profunda;
- O pesquisador é livre para escolher o tipo de indentador quando for analisar a dureza de esmalte e dentina, pois o indentador Knoop e o Berkovich foram capazes de detectar durezas semelhantes para estes tecidos.

REFERÊNCIAS¹

Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, Bozec L, Mudera V. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11:4743. doi: 10.2147/IJN.S107624

Alkattan R, Lippert F, Tang Q, Eckert, GJ, Ando M. The influence of hardness and chemical composition on enamel demineralization and subsequent remineralization. *J Dent*. 2018 Aug;(75):34-40. doi: 10.1016/j.jdent.2018.05.002.

Almahdy A, Downey FC, Sauro S, Cook RJ, Sherriff M, Richards D, Festy F. Microbiochemical analysis of carious dentine using Raman and fluorescence spectroscopy. *Caries Res*. 2012 Apr 27; 46(5):432-40. doi: 10.1159/000339487.

Alturki M, Koller G, Warburton F, Almhöjd U, Banerjee A. Biochemical characterisation of carious dentine zones using Raman spectroscopy. *J Dent*. 2021 Feb;105:103558. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103558.

Al-Obaidi R, Salehi H, Desoutter A, Bonnet L, Etienne P, Terrer E, Cuisinier FJG. Chemical & nano-mechanical study of artificial human enamel subsurface lesions. *Sci Rep*. 2018 Mar 6;8(1):1-8. doi:10.1038/s41598-018-22459-7.

Angker L, Swain MV, Kilpatrick N. Micro-mechanical characterisation of the properties of primary tooth dentine. *J Dent*. 2003 May;31(4):261-7. doi: 10.1016/s0300-5712(03)00045-9.

Angker L, Nijhof N, Swain MV, Kilpatrick NM. Influence of hydration and mechanical characterization of carious primary dentine using an ultra-micro indentation system (UMIS). *Eur J Oral Sci*. 2004 May 24;112(3):231-6. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00123.x.

Angker L, Swain MV. Nanoindentation: application to dental hard tissue investigations. *J Mater Res*. 2006 Aug;21(8):1893-905. doi: 10.1557/jmr.2006.0257

Armstrong WG. A quantitative comparison of the amino acid composition of sound dentine, carious dentine and the collagenase resistant fraction of carious dentine. *Arch Oral Biol*. 1961 Nov; 5(2):115-24. doi: 10.1016/0003-9969(61)90005-X.

¹ De acordo com o estilo Vancouver

Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust Dent J.* 2000 Dec;45(4):235-45. doi: 10.1111/j.1834-7819.2000.tb00257.x.

Banerjee A, Sherriff M, Kidd EA, Watson TF. A confocal microscopic study relating the autofluorescence of carious dentine to its microhardness. *Br Dent J.* 1999 Aug;187(4):206-10. doi: 10.1038/sj.bdj.4800241.

Banerjee A, Watson TF, Kidd EAM. Dentine caries: take it or leave it?. *Dent Update.* 2000;27(6):272-6. doi: 10.12968/denu.2000.27.6.272.

Banerjee A, Cook R, Kellow S, Shah K, Festy F, Sherriff M, Watson T. A confocal micro-endoscopic investigation of the relationship between the microhardness of carious dentine and its autofluorescence. *Eur J Oral Sci.* 2010 Feb;118(1):75-9. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00692.x.

Banerjee A, Frencken JE, Schwendicke F, Innes NPT. Contemporary operative caries management: consensus recommendations on minimally invasive caries removal. *Br Dent J.* 2017 Aug;223(3):215-22. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.672.

Banting D, Eggertsson H, Ekstrand K, Ferreira-Zandoná A, Ismail AI, Longbottom C, Zero D. Rationale and evidence for the international caries detection and assessment system (ICDAS II). *Ann Arbor.* 2005 Sept;1001;48109-1078.

Begue-Kirn CA, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *J. Dev. Biol.* 2004 Jul 1;36(4):491-503.

Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix—limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater.* 2012 Jul 1;8(7):2419-33. doi: 10.1016/j.actbio.2012.02.022.

Bobji MS, Biswas SK. Estimation of hardness by nanoindentation of rough surfaces. *J Mater Res.* 1998 Jan 31;13(11):3227-33. doi:10.1557/JMR.1998.0438.

Braden M. Biophysics of the tooth. In *Physiology of oral tissues.* Karger Publishers. 1976;(2):1-37. doi: <https://doi.org/10.1159/000393313>

Cajazeira Aguiar M, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunocytochemical analyses of osteopontin in reactionary and reparative dentine formed after extrusion of upper rat incisors. *J Anat.* 2007 Apr 5;210(4):418-27. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00708.x.

Carvalho TS, Lussi A. Age-related morphological, histological and functional changes in teeth. *J Oral Rehabil.* 2017 Dec 8;44(4):291-8. doi: 10.1111/joor.12474.

Castanho GM, Marques MM, Marques JB, Camargo MA, Cara AAD. Micromorphological and hardness analyses of human and bovine sclerotic dentin: a comparative study. *Braz Oral Res.* 2011 Jun;(25):274-9. doi: <https://doi.org/10.1590/S1806-83242011000300014>.

Charadram N, Farahani RM, Harty D, Rathsam C, Swain MV, Hunter N. Regulation of reactionary dentin formation by odontoblasts in response to polymicrobial invasion of dentin matrix. *Bone.* 2012 Nov 4;50(1):265-75. doi: 10.1016/j.bone.2011.10.031.

Chu CH, Lo EC. Microhardness of dentine in primary teeth after topical fluoride applications. *J Dent.* 2008 Jun 36(6): 387-91. doi: 10.1016/j.jdent.2008.02.013.

Chuenarrom C, Benjakul P, Daosodsai P. Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin. *Mater Res.* 2009;(12):473-6. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392009000400016>.

Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924 Jun;5(3):141.

Collys K, Slop D, Cleymaet R, Coomans D, Michotte Y. Load dependency and reliability of microhardness measurements on acid-etched enamel surfaces. *Dent Mater.* 1992 Sep;8(5):332-5. doi: 10.1016/0109-5641(92)90110-x.

Conceição EN, Masotti AS. *Dentística, Saúde e Estética: princípios de estética aplicados à dentística.* Porto Alegre: Artmed. 2007; p. 298-319.

Conrads G. Pathophysiology of dental caries. In *Caries excavation: Evolution of treating cavitated carious lesions.* Karger Publishers. 2018;27 p. 1-10. doi: 10.1159/isbn.978-3-318-06369-1.

Coolidge TB, Jacobs MH. Enamel carbonate in caries. *J Dent Res.* 1957 Oct 1;36(5):765-8. doi: 10.1177/00220345570360052001.

Cox CF, Heys DR, Kent Gibbons P, Avery JK, Heys RJ. The effect of various restorative materials on the microhardness of reparative dentin. *J Dent Res.* 1980 Feb 1;59(2):109-15. doi: 10.1177/00220345800590020101.

Craig RG, Peyton FA. The microhardness of enamel and dentin. *J Dent Res.* 1958 Aug 1;37(4):661-8. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000300011>.

Craig RG, Gehring PE, Peyton FA. Relation of structure to the microhardness of human dentin. *J Dent Res.* 1959 May 1;38(3):624-30. doi: 10.1177/00220345590380032701.

Darling AI. Studies of the early lesion of enamel caries with transmitted light, polarized light and radiography. *Br Dent J.* 1956;(101):329-41.

Daculsi G, LeGeros RZ, Jean A, Kerebel B. Possible physico-chemical processes in human dentin caries. *J Dent Res.* 1987 Aug;66(8):1356-9. doi: 10.1177/00220345870660081401.

de Dios Teruel J, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol.* 2015 May 1;60(5):768-75. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.01.014.

De Medeiros RCG, Soares JD, De Sousa FB. Natural enamel caries in polarized light microscopy: differences in histopathological features derived from a qualitative versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence. *J Microsc.* 2012 Mar 14;246(2):177-89. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03609.x>.

Doerner MF, Nix WD. A method for interpreting the data from depth-sensing indentation instruments. *J Mater Res.* 1986 Jan 31;1(4):601-9. doi: 10.1557/JMR.1986.0601.

Eastoe JE. Organic matrix of tooth enamel. *Nature.* 1960, 187(4735):411-2.

Ekstrand KR, Ricketts DNJ, Longbottom C, Pitts NB. Visual and tactile assessment of arrested initial enamel carious lesions: an in vivo pilot study. *Caries Res.* 2005 Jul 21;39(3):173-7. doi: 10.1159/000084794.

Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR. Dental pulp defense and repair mechanisms in dental caries. *Mediators Inflamm.* 2015 Oct 11;2015. doi: 10.1155/2015/230251.

Farooq I, Ali S, Khurram SA, Anderson P. Dentin. An Illustrated Guide to Oral Histology. 2021; p. 35-53.

Feagin F, Koulourides T, Pigman W The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. *Arch Oral Biol.* 1969 Dec;14(12):1407-17. doi: 10.1016/0003-9969(69)90258-1.

Featherstone, JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999 Feb 14;27(1):31-40. doi: 10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x.

Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 2000 Jul;131(7):887-99. doi: 10.14219/jada.archive.2000.0307.

Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E. Dental caries: the disease and its clinical management. Copenhagen, Blackwell Monksgaard; 2015 May 26.

Fuentes V, Toledano M, Osorio R, Carvalho RM. Microhardness of superficial and deep sound human dentin. *J Biomed Mater. A.* 2003 Sep 15;66(4):850-3. doi: 10.1002/jbm.a.10064.

Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. Relationship between hardness, discoloration, and microbial invasion in carious dentin. *J. Dent. Res.* 1966 Jul 1;45(4):1033-46. doi: 10.1177/00220345660450040401.

Fusayama T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Oper Dent.* 1979;(4):63-70.

Geddes DA. Acids produced by human dental plaque metabolism in situ. *Caries Res.* 1975;9(2):98-109. doi: 10.1159/000260149.

Gil-Bona A, Bidlack FB. Tooth enamel and its dynamic protein matrix. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 23;21(12):4458. doi: 10.3390/ijms21124458.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci. (Elite edition).* 2011 Apr 26; 3:711. doi: 10.2741/e281.

Gurunathan D, Somasundaram S, Kumar SA. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a remineralizing agent of enamel. *Aust Dent J.* 2012 Oct 23;57(4):404-8. doi: 10.1111/adj.12006.

Gutiérrez-Salazar MD, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mater Res.* 2003 Jun;(6):367-73. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000300011>.

Grajower R, Azaz B, Bron-Levi M. Microhardness of sclerotic dentin. *J Dent Res.* 1977 Apr 1;56(4):446. doi: 10.1177/00220345770560041701.

Güçlü ZA, Alaçam A, Coleman NJ. A 12-week assessment of the treatment of white spot lesions with CPP-ACP paste and/or fluoride varnish. *Biomed Res Int.* 2016 Oct 11;1-9. doi: 10.1155/2016/8357621.

Hallsworth AS, Robinson C, Weatherell JA. Mineral and magnesium distribution within the approximal carious lesion of dental enamel. *Caries Res.* 1972;6;(2): 156-68. doi: 10.1159/000259787.

Hallsworth AS, Weatherell JA, Robinson C. Loss of carbonate during the first stages of enamel caries. *Caries Res.* 1973;7;(4): 345-8. doi: 10.1159/000259857.

Hamama HH, Yiu CKY, Burrow MF, King NM. Chemical, morphological and microhardness changes of dentine after chemomechanical caries removal. *Aust Dent J.* 2013 Aug 6;58(3):283-92. doi: 10.1111/adj.12093.

Han CF, Wu BH, Chung CJ, Chuang SF, Li WL, Lin JF. Stress–strain analysis for evaluating the effect of the orientation of dentin tubules on their mechanical properties and deformation behavior. *J Mech Behav Biomed. Mater.* 2012 Aug; (12):1-8. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.03.009.

Heymann HO, Ritter AV, Swift Jr EJ. *Studervant arte e ciência da dentística operatória.* New York University: Mosby; 2014.

Ito S, Saito T, Tay FR, Carvalho RM, Yoshiyama M, Pashley DH. Water content and apparent stiffness of non-caries versus caries-affected human dentin. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005 Jan 15;72(1):109-16. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30130>

Holmen L, Thylstrup A, Årtun J. Clinical and histological features observed during arrestment of active enamel carious lesions in vivo. *Caries res.* 1987;21(6):546-54. doi: 10.1159/000261065.

Hosoya Y, Marshall SJ, Watanabe LG, Marshall GW. Microhardness of carious deciduous dentin. *Oper Dent.* 2000;25(2):81-9.

Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, Pitts NB. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007;35(3):170-8. doi: 10.1111/j.1600-0528.2007.00347.x.

Jang HL, Lee HK, Jin K, Ahn HY, Lee HE, Nam KT. Phase transformation from hydroxyapatite to the secondary bone mineral, whitlockite. *J Mater Chem B.* 2015 Jan 3(7):1342-9. doi: 10.1039/C4TB01793E.

Joves GJ, Inoue G, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Nanoindentation hardness of intertubular dentin in sound, demineralized and natural caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed. Mater.* 2014 Apr 1; 32:39-45. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.12.017.

Kasemkhun P, Nakornchai S, Phonghanyudh A, Srimaneekarn N. The efficacy of dental sealant used with bonding agent on occlusal caries (ICDAS 2-4): A 24-month randomized clinical trial. *Int J Paediatr Dent.* 2021 Nov 21;31(6):760-6. doi: 10.1111/ipd.12758.

Kher MS, Rao A. Selective removal of carious tissue in shallow, moderately deep and deep carious lesions in pediatric patients. *Clin Dent Rev.* 2020 May 14;4(1):1-10. doi: 10.1007/s41894-020-00073-z.

Kidd E. Caries removal and the pulpo-dentinal complex. *Dent Update.* 2000 May 27;27(10): 476-82. doi: 10.12968/denu.2000.27.10.476.

Leal S, Hilgert L, Duarte D. Odontologia de mínima intervenção: dentes funcionais por toda vida. Nova Odessa, SP: Napoleão. 2020.

Lee YL, Liu J, Clarkson BH, Lin CP, Godovikova V, Ritchie HH. Dentin-pulp complex responses to carious lesions. *Caries Res.* 2006 Jan 26;40(3):256-64. doi: 10.1159/000092235.

Liu Y, Yao X, Liu YW, Wang Y. A Fourier transform infrared spectroscopy analysis of carious dentin from transparent zone to normal zone. *Caries Res.* 2014 Feb 18;48(4):320-9. doi: 10.1159/000356868.

Loesche WJ, Eklund S, Earnest R, Burt B. Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molars shortly after eruption. *Infect Immun.* 1984 Dec;46(3):765-72. doi: 10.1128/iai.46.3.765-72.1984.

Loesche WJ. Microbiology of dental decay and periodontal disease. *Med Microbiol.* 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston, TX, USA; 1996.

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit rev oral biol med.* 2002 Mar 1;13(2):171-83. doi: 10.1177/154411130201300207.

Magalhães AC, Rios D, Wang L, Buzalaf MAR. *Cariologia: da base à clínica.* Bauru: Manole 2021

Mahoney E, Holt A, Swain M, Kilpatrick N. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: an ultra-micro-indentation study. *J Dent.* 2000 Nov;28(8):589-94. doi: 10.1016/s0300-5712(00)00043-9.

Maltz M, Tenuta LMA, Groisman S, Cury JA *Cariologia: Conceitos Básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador: Série Abeno: Odontologia Essencial-Parte Clínica.* Artes Médicas. 2016.

Margolis HC, Zhang YP, Lee CY, Kent Jr RL, Moreno EC. Kinetics of enamel demineralization in vitro. *J Dent Res.* 1999 Jul;78(7):1326-35. doi: 10.1177/00220345990780070701.

Marshall Jr GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997 Nov;25(6):441-58. doi: 10.1016/s0300-5712(96)00065-6.

Marshall GW, Habelitz S, Gallagher R, Balooch M, Balooch G, Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. *J Dent Res.* 2001 Aug 1;80(8):1768-71. doi: 10.1177/00220345010800081701.

Martín N, García Á, Vera V, Garrido MÁ, Rodríguez J. Mechanical characterization of sclerotic occlusal dentin by nanoindentation and nanoscratch. *Am J Dent.* 2010 Apr;23(2):108-12.

Martuci RR. Avaliação de cerâmicas odontológicas quanto à resistência de união com a dentina, por ensaio de tração, microdurezas Knoop e Vickers, rugosidade superficial e microscopia de força atômica [Tese de doutorado], Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia. 2006.

Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, Breschi L. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res.* 2015 Dec 22;94(2):241-51. doi: 10.1177/0022034514562833.

Meredith N, Sherriff M, Setchell DJ, Swanson SAV. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Arch Oral Biol.* 1996 Jun;41(6), 539-45. doi: 10.1016/0003-9969(96)00020-9.

Mjör IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 2009; 20:3-16. doi: 10.1590/s0103-64402009000100001.

Moharam LM, Sadony DM, Nagi SM. Evaluation of diode laser application on chemical analysis and surface microhardness of white spots enamel lesions with two remineralizing agents. *J Clin Exp Dent.* 2020 Mar;12(3):e271. doi: 10.4317/jced.56490.

Mohd Said SN, Ekambaram M, Yiu CK. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int J Paediatr Dent.* 2017 Jun 27;27(3):163-73. doi: 10.1111/ipd.12243.

Moreno, EC, Zahradnik, RT. Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res.* 1974;53(2):226-35. doi: 10.1177/00220345740530020901.

Muñoz-Sandoval C, Gambetta-Tessini K, Giacaman RA. Microcavitated (ICDAS 3) carious lesion arrest with resin or glass ionomer sealants in first permanent molars: A randomized controlled trial. *J Dent* 2019 Sep;88;103163. doi: 10.1016/j.jdent.2019.07.001.

Nakornchai S, Atsawasuan P, Kitamura E, Surarit R, Yamauchi M. Partial biochemical characterisation of collagen in carious dentin of human primary teeth. *Arch Oral Biol.* 2004 Apr; 49(4):267-73. doi: 10.1016/j.archoralbio.2003.11.003.

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology-e-book: development, structure, and function. Maryland Heights, MO: Mosby; 2017 Aug 15.

Nishikawara F, Nomura Y, Imai S, Senda A, Hanada N. Evaluation of cariogenic bacteria. *Eur J Dent.* 2007 Jan;1(01):31-9.

Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent human carious dentin. *J Dent Res.* 1983 Jan 1;62(1):7-10. doi: 10.1177/00220345830620011701.

Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res.* 1992 Jan 31;7(6):1564-1583.

Paris S, Meyer-Lueckel H. Resin infiltration after enamel etching. In *Tooth Whitening*. Springer, Cham: Livro; 2016. p. 211-22. doi: 10.1007/978-3-319-38849-6_10.

Pashley EL, Talman R, Horner JÁ, Pashley DH. Permeability of normal versus carious dentin. *Dent Traumatol.* 1991 Oct;7(5):207-11.

Porter AE, Nalla RK, Minor A, Jinschek JR, Kisielowski C, Radmilovic V, Ritchie RO. A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin. *Biomaterials.* 2005 Dec;26(36):7650-60. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.059.

Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit rev oral biol. Med.* 2000;11(4):481-95. doi: 10.1177/10454411000110040601.

Ryge G, Foley DE, Fairhurst CW. Micro-indentation hardness. *J Dent Res.* 1961 Nov 1;40(6):1116-1126. doi: <https://doi.org/10.1177/00220345610400060401>.

Sa Y, Feng X, Lei C, Yu Y, Jiang T, Wang Y. Evaluation of the effectiveness of micro-Raman spectroscopy in monitoring the mineral contents change of human enamel in vitro. *Lasers Med Sci.* 2017 Apr 1;32(5):985-91. doi: 10.1007/s10103-017-2197-7.

Sakoolnamarka R, Burrow MF, Swain M, Tyas MJ. Microhardness and ca: P ratio of carious and Carisolv™ treated caries-affected dentine using an ultra-micro-indentation system and energy dispersive analysis of x-rays—A pilot study. *Aust Dent. J.* 2005 Mar 12;50(4):246-50. doi: 10.1111/j.1834-7819.2005.tb00368.x.

Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, Zaura E. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar 6;(44):S5-S11. doi: 10.1111/jcpe.12682.

Schwendicke F, Paris S, Tu YK. Effects of using different criteria for caries removal: a systematic review and network meta-analysis. *J Dent*. 2015 Jan 1;43(1):1-5. doi: 10.1016/j.jdent.2014.10.004.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *The Lancet*. 2007 Jan 6;369(9555):51-9. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2).

Selvamani M. Sclerotic or Translucent Dentin: A Review. *CODSJOD*. 2013 Mar 1;5(1):24-6. doi: 10.5005/cods-5-1-24.

Senawongse P, Otsuki M, Tagami J, Mjör I. Age-related changes in hardness and modulus of elasticity of dentine. *Arch Oral Biol*. 2006 Jun;51(6):457-63. doi: 10.1016/j.archoralbio.2005.11.006.

Shahmoradi M, Swain MV. Quantitative characterization and micro-CT mineral mapping of natural fissural enamel lesions. *J Dent*. 2016 Mar;(46):23-9. doi: 10.1016/j.jdent.2016.01.012.

Shimizu A, Yamamoto T, Nakashima S, Nikaido T, Sugawara T, Momoi Y. Measurement of surface hardness of primary carious lesions in extracted human enamel—Measurement of Knoop hardness using Cariotester. *Dent Mater. J*. 2015 Nov 18;34(2):252-6. doi: 10.4012/dmj.2014-282.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *J Dev Biol*. 1995;39(1):273-80.

Soares-Yoshikawa AL, Varanda T, Iwamoto AS, Kantovitz KR, Puppim-Rontani RM, Pascon FM. Fluoride release and remineralizing potential of varnishes in early caries lesions in primary teeth. *Microsc Res. Tech*. 2021 Dec 5;84(5): 1012-21. doi: 10.1002/jemt.23662.

Subramani K, Chan YL, Ngan AH, King NM. Nanomechanical characterization of mineralized tissues in the oral cavity. In *Emerging Nanotechnologies in Dentistry*. 2018; pp. 289-306. William Andrew Publishing.

Tahani B, Asgari I, Saied Moallemi Z, Azarpazhooh A. Fissure sealant therapy as a portable community-based care in deprived regions: Effectiveness of a clinical trial

after 1 year follow-up. *Health Soc Care Community*. 2021 Sep 30;29(5):1368-77. doi: 10.1111/hsc.13183.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998 Aug 1;77(8):1622-9. doi: 10.1177/00220345980770081001.

Vander Voort GF, Lucas GM. Microindentation hardness testing. *Adv Mater Process*. 1998 Sep;154(3), 21-5.

Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res. A*. 2007 May;81(2):279-86. doi:10.1002/jbm.a.30981.

Weber DF. Human dentine sclerosis: a microradiographic survey. *Arch Oral Biol*. 1974 Feb;19(2):163-9. doi: 10.1016/0003-9969(74)90211-8.

Wei SH, Koulourides T. Electron microprobe and microhardness studies of enamel remineralization. *J Dent Res*. 1972 Mar 1;51(2), 648-51. doi: 10.1177/00220345720510026601.

West NX, Joiner A. Enamel mineral loss. *J Dent*. 2014 Jun 1;42:S2-11. doi: 10.1016/S0300-5712(14)50002-4.

Xu C, Karan K, Yao X, Wang Y. Molecular structural analysis of noncarious cervical sclerotic dentin using Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc*. 2009 Mar 23;40(12):1780-5. doi: <https://doi.org/10.1002/jrs.2320>.

Zero DT, Zandona AF, Vail MM, Spolnik KJ. Dental caries and pulpal disease. *Dent Clin North Am*. 2011 Jan 1; 55(1): 29-46. doi: 10.1016/j.cden.2010.08.010.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOU SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de lesões de cárie em dentes humanos

Pesquisador: Adriana Bona Matos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46825321.3.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.749.509

Apresentação do Projeto:

O objetivo deste estudo é caracterizar lesões de cárie dentária em dentes humanos em seus aspectos morfológicos, químicos, mecânicos e físicos, bem como, compará-las com tecido dental sadio. Serão utilizados 80 molares e pré-molares humanos com lesão de cárie presentes em diferentes faces através de minuciosa inspeção visual. Todos os espécimes serão caracterizados por meio das seguintes metodologias: Fluorescência quantitativa induzida pela luz (QLF), fluorescência a laser (DIAGNOdent®), Tomografia de Coerência Óptica (OCT), Microdureza transversal, Espectroscopia Raman, Microscopia eletrônica de varredura e Ensaio de resistência de união. Os dados quantitativos serão analisados estatisticamente iniciando-se com a análise da distribuição do resíduo para aferição de normalidade e homogeneidade dos dados. Em caso de distribuição normal, serão utilizados testes estatísticos paramétricos. O teste paramétrico de escolha será a Análise de Variância, e teste auxiliar para comparação entre as médias, adotando-se 5% como nível de significância, e para os dados pareados. Os dados qualitativos serão descritos detalhadamente.

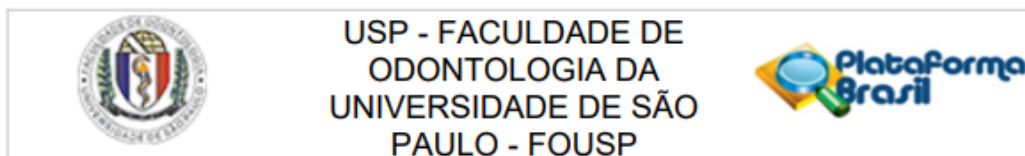
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar lesões de cárie dental em esmalte e dentina nos seus aspectos morfológicos, químicos, mecânicos e físicos, bem como, compará-las com esmalte e dentina sadios.

Objetivo Secundário:

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 4.749.509

- Comparar diferentes substratos dentais (hígidos e cariados) quanto a sua morfologia utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura.
- Comparar características químicas de diferentes substratos dentais (hígidos e cariados) utilizando Espectroscopia Raman
- Comparar características mecânicas de diferentes substratos dentais (hígidos e cariados) quanto a sua dureza
- Comparar características físicas de diferentes substratos dentais (hígidos e cariados) utilizando avaliações de fluorescência
- Comparar características físicas de diferentes substratos dentais (hígidos e cariados) utilizando Tomografia por coerência ótica (OCT)
- Comparar a resistência de união em diferentes substratos dentais (hígidos e cariados) utilizando ensaio de microtração e/ou microsialhamento

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos dessa pesquisa serão mínimos, pois será utilizada apenas dentes doados pelo Biobanco de dentes, e após o término do experimento serão devolvidas as raízes restantes. Os benefícios são indiretos, pois os resultados desta pesquisa podem fornecer mais informações sobre as características das lesões de cárie e sua diferenças quando comparados com o substrato natural.

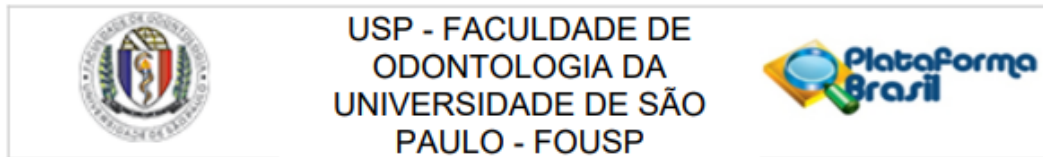
Benefícios:

Conhecimento mais aprofundado das características de lesões de cárie naturais e seu diferencial em relação aos substratos normais, nos possibilita propor novas estratégias para o desenvolvimento de materiais e técnicas que impactem na saúde da população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- 1_ Estudo Nacional, unicêntrico, in vitro
- 2_ Caráter acadêmico,
- 3_ Patrocinador- Financiamento próprio.
- 4_ País de Origem: Brasil
- 5_ Número de participantes incluídos no Brasil:80
- 6_ Centros de Pesquisa no Brasil. FOUSP
- 7_ Armazenamento de amostras em banco de material biológico no Brasil. FOUSP
- 8_ Previsão de início e encerramento do estudo.07/2021 e término 12/23.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 4.749.509

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: projeto detalhado, folha de rosto e carta do biobanco de dentes FOUSP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciados no CEP, conforme Norma Operacional CNS nº 001/13, item XI.2.d.

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "EMENDA", por meio da Plataforma Brasil, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação (Norma Operacional 001/2013 – letra H).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1752618.pdf	13/05/2021 15:25:21		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_Adriana.pdf	13/05/2021 15:23:57	Adriana Bona Matos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Adriana_final.pdf	13/05/2021 10:49:44	Adriana Bona Matos	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biobanco_AdrianaBona.pdf	13/05/2021 10:48:37	Adriana Bona Matos	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_Adriana.docx	13/05/2021 10:46:48	Adriana Bona Matos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOSP



Continuação do Parecer: 4.749.509

SAO PAULO, 01 de Junho de 2021

Assinado por:
Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))