



MICAELA CARDOSO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES
ARTIFICIAIS DE CÁRIE EM ESMALTE,
SIMILARES ÀS DO PROTOCOLO
ICDAS II, POR BIOFILME BACTERIANO DE
*STREPTOCOCCUS MUTANS***

Piracicaba

2014

i



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

MICAELA CARDOSO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES
ARTIFICIAIS DE CÁRIE EM ESMALTE,
SIMILARES ÀS DO PROTOCOLO
ICDAS II, POR BIOFILME BACTERIANO DE
*STREPTOCOCCUS MUTANS***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Mestra em Odontologia –
Área de Odontopediatria.

Orientadora: Regina Maria Puppini Rontani

Este exemplar corresponde à versão final da
dissertação defendida por Micaela Cardoso e
orientada pela Prof^a Dr^a Regina Maria Puppini
Rontani.

Assinatura da Orientadora

Piracicaba

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Josidelma Francisca Costa de Souza - CRB 8/5894

C179p Cardoso, Micaela, 1988-
Produção e caracterização de lesões artificiais de cárie em esmalte, similares às do protocolo ICDAS II, por biofilme bacteriano de Streptococcus mutans / Micaela Cardoso. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Regina Maria Puppim Rontani.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Desmineralização do dente. 2. Esmalte dentário. 3. In Vitro. 4. Streptococcus mutans. 5. Biofilme. I. Puppim-Rontani, Regina Maria, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Production and characterization of enamel caries lesion similar to ICDAS II criteria by Streptococcus mutans biofilm

Palavras-chave em inglês:

Tooth desmineralization

Dental caries

Enamel

In Vitro

Streptococcus mutans

Área de concentração: Odontopediatria

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Regina Maria Puppim Rontani [Orientador]

Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Giselle Maria Marchi Baron

Data de defesa: 15-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 15 de Maio de 2014, considerou a candidata MICAELA CARDOSO aprovada.



Profa. Dra. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI



Profa. Dra. LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES



Profa. Dra. GISELLE MARIA MARCHI BARON

RESUMO

Este estudo teve por objetivos: produzir lesões artificiais de cárie em esmalte bovino, com características clínicas similares às aquelas identificadas pelo protocolo ICDAS II 2009 (International Caries Detection and Assessment System), códigos 1, 2, e 3, através da inspeção visual; identificar o tempo de desmineralização necessário para a produção de lesões artificiais de cárie em esmalte bovino; caracterizar segundo a área de secção transversal, profundidade (LD) e volume da lesão, topografia da superfície, a razão entre a porcentagem de perda mineral e a profundidade da lesão (*ratio*) e perda mineral das lesões, por meio de diferentes metodologias de análise: Análise visual, Microtomografia (μ -CT) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microrradiografia Transversal (TMR) e Microscopia óptica em Luz Polarizada (MLP). Foram utilizados 45 blocos de esmalte bovino distribuídos em 3 grupos ($n=15$), de acordo com o Código ICDAS 1, 2 e 3, e submetidos ao desafio ácido pelo método biológico, com *S. mutans*. Os blocos foram imersos em meio BHI suplementado por sacarose a 1% com inóculo de *S. mutans*, sendo o meio trocado a cada 24h, e para identificação do tempo de produção das lesões (estudo piloto). Em seguida, os espécimes foram removidos do meio de cultura de acordo com o período de tempo identificado para cada grupo (24h, 4 dias e 14 dias), fotografados (análise visual), submetidos à análise por μ -CT, MEV e posteriormente, seccionados longitudinalmente em relação à lesão de cárie e avaliados em TMR e MLP. Os dados obtidos da MEV foram avaliados descritivamente; aqueles provenientes da μ -CT, TMR e MLP foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey ($p<0,05$). O tempo necessário para produção de lesões clinicamente semelhantes às aquelas para cada código ICDAS II foi identificado visualmente. Para a produção de lesões *in vitro* similares ao código 1, o tempo necessário foi de 24 horas; para o código 2, 4 dias; e para o código 3, 14 dias. Para as lesões similares às aquelas Código 1, a MLP e TMR identificaram a presença de lesões subsuperficiais de cárie, porém o μ -CT não permitiu visualizá-las. O MEV mostrou superfície mais regular, na maioria das amostras, sem sinais de erosão e com pequenos orifícios provocados pelo *S. mutans*. Para as lesões Código 2 a análise por μ -CT identificou áreas e volume

de lesão menores do que para o Código 3. A profundidade da lesão não pode ser identificada pelo μ -CT para ambos os Códigos. MLP e TMR identificaram maiores profundidades de lesão para o Código 3, comparado ao 2, porém, evidenciaram a presença de desmineralização e cavitação, também maiores no grupo ICDAS 3. A profundidade média das lesões dos três grupos foi mensurada pelos métodos TMR e MLP, e ambas as análises evidenciaram que, quanto maior o código ICDAS, maior a profundidade das lesões; porém, não foi observada correlação significativa entre estes dois métodos. Baseando-se nos resultados obtidos pode-se concluir que o método biológico de produção de cárie por *S. mutans* possibilita a produção de lesões similares às observadas clinicamente pelo protocolo ICDAS II. Diferentes metodologias empregadas podem ser recomendadas de acordo com o tipo de lesão produzida artificialmente.

Palavras-chave: desmineralização, cárie dentária, esmalte, *in vitro*, *S. mutans*, biofilme.

ABSTRACT

This study was developed in order to identify the effect of demineralization process to provide bovine enamel caries-like lesions, using *Streptococcus mutans* biofilms with clinical features similar to those found in ICDAS II (2009) criteria, codes 1, 2 and 3 by visual inspection; to identify the time required for providing the demineralization; to characterize the lesions obtained from different analysis methodologies: X-ray microtomography (μ -CT), Scanning Electron Microscopy (SEM), Transversal Microradiography (TMR) and light polarized optical microscopy (MLP). It was used 45 enamel block divided into 3 groups (n =15) submitted to caries-like lesions by biological method, with *Streptococcus mutans* biofilm. The specimens were immersed in BHI broth supplemented with 1% sucrose inoculum of *S. mutans* and the medium was changed every 24 hours. Then, the specimens were removed from the culture media in each period of time (24h, 4 and 14 days) and pictures were taken from their demineralized surface (visual analysis). Next, the specimens were submitted to μ -CT and SEM evaluations and longitudinally sectioned by the caries lesions and they were evaluated in TMR e MLP. Data obtained from SEM were descriptively evaluated. Data from μ -CT, TMR and MLP were submitted to ANOVA and Tukey`s tests ($p < 0,05$). The time required to produce clinical lesions similar to those ICDAS II for each protocol code was visually identified. For the production of lesions *in vitro* similar to code 1, the time required was 24 hours, code 2 for 4 days and code 3 for 14. For the similar lesion to those from code 1, the MLP and TMR identified the presence of subsurface carious lesions, but μ -CT did not allow viewing it. The SEM analysis showed smoother surface, mostly without signs of erosion and pinholes caused by *S mutans*. For code 2 lesions the μ -CT analysis identified lesions areas and volume smaller than Code 3. The lesion depth cannot be identified by μ -CT for both codes. MLP and TMR identified higher depths to code 3 as compared to 2, however, showed the presence of demineralization and cavitation also higher than code 3 ICDAS. The lesion depth average from the three groups was measured by TMR and MLP methods, and both analyses showed that the higher the ICDAS II

code, the deeper the lesions were. Different methods may be employed in accordance with the recommended type of lesion produced artificially.

Key Words: desmineralization, dental caries, enamel, *in vitro*, *S. mutans*, biofilm

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
3. PROPOSIÇÃO.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO 01.....	74
ANEXO 02.....	75

DEDICATÓRIA

Esta pesquisa é fruto do esforço do meu trabalho para alcançar um grande sonho. Para torná-lo realidade foi necessária determinação, paciência e muita compreensão. A luta diária resultou em aprendizados que serão levados para o resto de minha vida.

DEDICO ESTE TRABALHO

À Deus por sempre estar presente, mesmo quando estou ausente.

Aos meus pais, Fábio Zani Cardoso e Ana Cristina Proença Paes Zani Cardoso, por me oferecerem esta oportunidade me apoiando em todos os sentidos, aos meus irmãos, Jéssica Maria Cardoso e Lenon Cardoso, pela compreensão dos momentos ausentes, pela paciência, incentivo e, principalmente, por me dar amor e aturar meus momentos de “stress”.

Obrigada por tudo que fizeram para que meu sonho se tornasse realidade.
Sem vocês eu não estaria aqui!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. **REGINA MARIA PUPPIN RONTANI**, pelos anos de convívio e aprendizado; por sempre acreditar e confiar no meu trabalho e na minha pessoa; pela brilhante inteligência e capacidade de ensino para transmitir os conhecimentos, contribuindo para o meu aprimoramento profissional e pessoal. Exemplo de seriedade, competência e dedicação. Espero ter atingido suas expectativas. A senhora é meu exemplo.

À minha parceira de trabalho e co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. **FABIANA SCARPARO NAUFEL**, por sua contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal, estar sempre entusiasmada em me ensinar e disposta a me ajudar, me incentivando e motivando; acreditando no meu potencial e ajudando-me nas minhas inúmeras dificuldades. Espero ter contribuído à altura com a parceria. A você, sem palavras!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas do Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior** e do Diretor Associado **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**.

À **Profª. Drª. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, Coordenadora Geral do Programa de Pós-Graduação e à **Profª. Drª Cinthia Pereira Machado Tabchoury**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP-Unicamp.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo ao Pesquisador do Estado de São Paulo), pela bolsa concedida durante esses dois anos.

Às professoras do Departamento de Odontologia Infantil da área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Profa. Drª. Fernanda Miori Pascon**, **Profa. Drª. Maria Beatriz Duarte Gavião** e **Profa. Drª. Marinês Nobre dos Santos Uchôa**, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos, por toda a atenção e incentivo durante o curso. Agradeço a oportunidade proporcionada e pela grande contribuição para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Às Pós-Doutorandas do Departamento de Odontologia Infantil da área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Profa. Drª. Kamila Rosamília Kantovitz** e **Profa. Drª. Taís de Souza Barbosa**. E à Pós-Doutoranda do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Piracicaba **Profa. Drª. Andréia Bolzan de Paula**, pelo carinho que teve comigo nesses dois anos.

Aos professores do Departamento de Odontologia Infantil da área de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Prof. Dr. João Sarmiento Pereira Neto**, **Profa Drª. Maria Beatriz B. de Araújo Magnani** e **Profa Drª. Vânia Célia Vieira de Siqueira**, por todos os ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Rafael Nobrega Stipp**, professor da área de Microbiologia e Imunologia, pela ajuda e paciência na orientação de parte da pesquisa, por ter me recebido com carinho no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Aos funcionários **Marcelo Corrêa Maistro** e **Shirley Rosana S. Moreto** da Área de Odontopediatria, pela amizade e disposição em ajudar. E aos biólogos responsáveis pelas microscopias: **Adriano Luis Martins** e **Eliene Narvaes Romani**, pela paciência que tiveram em seus ensinamentos. Aprendi muito com vocês.

À **Profª Drª Ana Carolina Magalhães**, professora da área de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo por além de me receber com carinho, me ensinar e me mostrar o quão é importante sermos fortes e persistentes e nunca desistirmos de nossos objetivos por mais difícil que seja a jornada. Ao laboratório de Bioquímica da FOB, em Bauru, principalmente à técnica **Larissa** que teve paciência e dedicação nos ensinamentos para manusear o equipamento de TMR.

Aos **Prof. Dr. Ronald Ordinola Zapata** e **Prof. Dr. Marco Antônio Hungaro Duarte**, por auxiliarem no desenvolvimento da análise de Microtomografia, tendo grande paciência e me recebendo com carinho no Laboratório de Microtomografia da área de Endodontia, na Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Às minhas colegas de turma: **Fabiana Freitas**, **Juliana Amato**, **Luciana**, **Vanessa**, **Alexsandra**, **Bheatriz**, **Maria Carolina**, **Lívinha**, **Maribel**, **Larissa**, **Thayse**. E ao meu companheiro **Filipe**.

Às amigas que conquistei neste mestrado: **Lenita**, **Darlle**, **Natália**, **Thais** e **Daniele**, obrigada pela companhia, risadas, choros, viagens. Vocês foram essenciais nesses dois anos de trabalho. De vocês, não esqueço jamais.

À **Marcele**, amiga e vizinha. Obrigada por tudo o que você fez por mim, pela ajuda com minha pesquisa, apoio moral e todo o companheirismo. Você é especial, uma amizade verdadeira que conquistei e que levarei para vida toda.

Aos colegas que conquistei no Laboratório de Microbiologia pelo carinho que tiveram comigo e pela positiva recepção. Em especial à colega **Thaís Oliveira**, por ser esse encanto de pessoa prestes a ajudar em qualquer ocasião. Você é muito querida e jamais esquecerei as ajudas e os puxões de orelha que me deu.

Aos amigos de outras áreas, **Marília, Melissa, Rafael Pacheco, Isabela e Caio**, tenho muito carinho por vocês e agradeço a ajuda que cada um deu. A participação de vocês foi essencial. Em especial, **Isabela e Caio** por levarem e trazerem minhas amostras esterilizadas. Espero um dia retribuir toda a ajuda.

Às amigas de infância que aturaram todo o meu estresse durante essa jornada: **Marcela, Carol, Renata, Karina e Sâmia**, nossa amizade é eterna!

1. INTRODUÇÃO

O esmalte dentário é composto por, em média, 98% de hidroxiapatita, representando a fase mineral, e a fase orgânica por volta de 2%, apresentando um equilíbrio de proteínas não-colagenosas e água, as quais separam um cristal do outro. Como consequência dos fatores de desenvolvimento e dos efeitos da exposição ao meio bucal, a composição do esmalte é bastante variável, entre e dentro de cada dente (Dowker *et al.*, 1999). Quando o mesmo mostra-se clinicamente sadio, apresenta aspecto de transparência, resultante da disposição dos cristais de hidroxiapatita e do cristal hidratado de fosfato de cálcio. A estreita aproximação desses cristais indica uma superfície de consistência dura e aspecto brilhante. Caso haja diminuição dos cristais de hidroxiapatita, os espaços intercristalinos alargar-se-ão, aumentando sua porosidade e alterando as propriedades ópticas (Thylstrup & Fejerskov, 2001).

O processo inicial de desmineralização inicia-se na superfície do esmalte com a penetração de ácidos sintetizados pelo biofilme bacteriano que se adere a essa superfície, difundindo-se pelos espaços interprismáticos e, por fim, para o interior dos prismas. A exposição do esmalte aos desafios ácidos/cariogênicos, rapidamente dissolve os minerais do cristal liberando cálcio, fosfato e carbonato (Featherstone *et al.*, 1979; Featherstone, 2000). Este processo determina o surgimento da lesão de mancha branca, vista clinicamente como opacidades do esmalte. Trata-se da perda mineral subsuperficial passível de ser remineralizada, por meio do controle do biofilme. (Alexandria *et al.*, 2008). O corpo da lesão de subsuperfície pode perder tanto quanto 50% do seu conteúdo mineral original e muitas vezes, apresenta-se coberto por uma camada de superfície aparentemente intacta (Featherstone, 2000).

A etiologia da lesão de cárie encontra-se diretamente influenciada pela ação de microrganismos presentes no biofilme bacteriano, os quais apresentam essencial importância na patogênese da cárie, atuando como fator primário, colonizando o biofilme. Sendo assim, microrganismos acidogênicos sintetizam polissacarídeos extracelulares e produzem ácidos orgânicos por meio do metabolismo de carboidratos fermentáveis que em contato com a superfície dental, iniciam uma série de reações químicas que provocam a perda de minerais, resultando na dissolução da estrutura inorgânica do esmalte (Issa *et al.*, 2003). A desmineralização irá progredir até que o pH

e a atividade de força iônica do cálcio e do fosfato alcancem níveis que tornem a fase mineral estável (Featherstone *et al.*, 1986).

O estudo tanto do processo de produção de cárie quanto daqueles que podem remineralizar, paralisar ou reestruturar a porção dental perdida são de suma importância para o controle dos danos causados pela cárie. Dessa forma, a simulação de situações mais próximas daquelas encontradas na clínica é desejável para o controle da doença, uma vez que estudos clínicos randomizados são muitas vezes inviáveis devido aos comprometimentos éticos que envolvem (Arends *et al.*, 1995).

Para simular toda essa ação, modelos de produção de lesões cariosas *in situ* e *in vitro* têm sido estudados, procurando aproximar-se da produção da lesão natural de cárie. Alguns autores relatam que os modelos *in vitro* possuem grande importância em pesquisas pela baixa variabilidade dos resultados e alto nível de controle no experimento (White, 1995). Devido a este fato, estes modelos são considerados a alternativa mais viável para produção de lesões de cárie para estudos experimentais, que simulam o desafio cariogênico da cavidade bucal sem, contudo, expor os voluntários às variáveis das pesquisas. Estes modelos podem ser do tipo químico: estático – imersão do substrato dental em soluções (Paes Leme *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2007) e géis ácidos (White, 1992), ou dinâmico – ciclos de desmineralização e remineralização (Ten Cate & Duijsters, 1982; Ten Cate, 2001). Esses modelos são utilizados de acordo com o objetivo proposto para cada estudo em relação à formação de diferentes graus de lesão de esmalte (Featherstone, 1986), desenvolvimento, progressão e até a paralização das mesmas (Ten Cate & Duijsters, 1982; Delbem & Cury, 2002; Argenta *et al.*, 2003; Paes Leme *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2006). Porém, além dos períodos de tempo de desenvolvimento e progressão da lesão de cárie variarem de acordo com o desafio cariogênico a ser determinado, as características da lesão produzida também diferem em cada método (Amaechi *et al.*, 1998).

Assim, a utilização de estudos *in vitro* de indução de cárie artificial em esmalte dentário são realizados constantemente para avaliar o processo da desmineralização e suas características.

Modelos microbiológicos de produção de lesões artificiais de cárie podem também ser desenvolvidos a partir da exposição do substrato a uma ou mais espécies de microrganismos cariogênicos (Gilmour *et al.*, 1990; Gilmour & Edmunds, 1998; Francci *et al.*, 1999; Torii *et al.*, 2001; Hashizume, 2002) por meio de biofilme

monoespécie. Noorda *et al.*, 1986a,b desenvolveram um modelo empregando *Streptococcus mutans*. O modelo utilizando microrganismo (modelo biológico) simula a sintetização de polissacarídeos extracelulares produzindo ácido láctico, a partir da fermentação de sacarose por bactérias aderentes (Francci, 1999). Estas moléculas insolúveis são consideradas contribuintes importantes na integridade estrutural e nas propriedades patogênicas do biofilme. Isto posto, o modelo biológico utilizando *Streptococcus mutans* parece ser apropriado para utilização na promoção de desafios cariogênicos mais similares aos que acontecem na cavidade bucal.

Com o conhecimento do processo da cárie dentária seja por estudos *in vitro* ou *in vivo*, é possível projetar medidas para a detecção das lesões em estágio precoce, e avaliar a eficácia de procedimentos terapêuticos, visando limitar o dano pela interferência na progressão da lesão ou, melhor ainda, permitindo a reversão do processo (Zandoná *et al.*, 2010). Diferentes avanços na desmineralização do esmalte pelo processo carioso requerem diferentes abordagens terapêuticas e o estudo dos diferentes estágios das lesões, de forma a simular as lesões encontradas clinicamente são de grande valia neste processo de estabilização e remodelação da estrutura perdida pela cárie.

Assim, a identificação de diferentes aspectos da lesão de cárie em esmalte pode ser de grande utilidade na aplicação de novas abordagens terapêuticas. As lesões de cárie podem ser classificadas clinicamente utilizando-se o Sistema Internacional de Avaliação e Detecção de Cárie (ICDAS), idealizado pela Comissão do ICDAS em 2005. Esta classificação baseia-se no conhecimento obtido a partir de uma revisão sistemática da literatura (Ismail, 2004). Assim, concluiu-se que, embora estes critérios de detecção da lesão avaliassem diferentes fases do processo da lesão de cárie, havia inconsistências na forma como este era avaliado, bem como entre os critérios para medir a extensão do dano causado pelo processo, criando-se o protocolo ICDAS, reeditado em 2009 (ICDAS II). Este resume as principais decisões e critérios clínicos para diagnóstico e classificação destas lesões, o qual compreende códigos que variam de 0 a 6, dependendo da severidade da lesão e compreendem as seguintes características: (0) hígido; (1) primeira mudança visual no esmalte vista somente após prolongada secagem com ar; (2) mudança visual distinta em esmalte; (3) lesão de esmalte localizada sem sinais clínicos visuais de envolvimento dentinário; (4) sombreamento escuro subjacente à dentina (5) distinta cavidade com dentina visível (6) extensa cavidade distinta com dentina visível.

Os estudos das lesões artificiais de cárie em esmalte, com vistas a avaliar o efeito remineralizador do fluoreto, enfocam necessariamente lesões não cavitadas, ou seja, lesões subsuperficiais que preservem a camada superficial, ao invés de lesões que apresentem erosão (Buzalaf *et al.*, 2010). Outras abordagens, como a infiltração de lesões de cárie por meio de monômeros resinosos de baixa viscosidade, como reforço estrutural em lesões até ICDAS 3, tem sido propostos, com resultados positivos. (Martingnon *et al.*, 2006) Enquanto que estudos de reversibilidade da lesão de cárie apontam que lesões do tipo ICDAS 1, 2 e 3 são passíveis de sofrerem paralização e remineralização (Zandoná *et al.*, 2012).

Então, torna-se importante analisar se a produção de cárie por meio de biofilme de *S. mutans* seria capaz de mimetizar os diversos estágios de progressão de lesões de cárie em esmalte classificadas como ICDAS 1, 2 e 3 e dessa forma possibilitar o estudo *in vitro* de alternativas viáveis de prevenção, interceptação e limitação do dano produzida pelo processo de cárie, com alta relevância, uma vez que além dos períodos de tempo de desenvolvimento e progressão da lesão de cárie variarem de acordo com o desafio cariogênico a ser determinado, as características da lesão produzida também diferem em cada método (Amaechi *et al.* 1998).

As características dessas lesões de importância para o monitoramento das lesões de cárie devem ser abordadas, de forma que tanto a produção dessas diferentes lesões quanto a identificação dos aspectos morfológicos de superfície, os parâmetros de profundidade e volume mineral perdidos, e os aspectos histomorfológicos devem ser estudados e diferentes metodologias podem ser aplicadas para a busca destas respostas.

Cada método de avaliação das características de lesões de cárie fornece informações que são complementares e que, quando associadas, permitem o melhor entendimento do processo. Algumas formas de acompanhar a evolução destas lesões clinicamente são as inspeções visuais e radiográficas periódicas, além de obtenção de réplicas para análise de superfície em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e verificação de erosão de superfície. A associação destas informações permitiria a caracterização das lesões classificadas pelos códigos ICDAS II (2009), assim como a comparação destes achados com os obtidos em trabalhos clínicos (Holmen *et al.*, 1985, 1987a, b). Em estudos *in vitro*, há possibilidade de avaliar a extensão, profundidade, utilizando-se métodos como μ -TC, microdureza em corte transversal (KHN), microscopia de luz polarizada e microscopia confocal de varredura a Laser. A

verificação da relação entre esses parâmetros laboratoriais e os achados clínicos poderiam fornecer evidência da progressão ou paralisação do processo de cárie e facilitar o monitoramento do paciente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

I) Modelos *in vitro* de produção de lesões artificiais de cárie em esmalte

A cárie dentária pode ser definida como uma doença multifatorial resultante de um processo dinâmico, que se processa no meio ambiente oral, em períodos alternados de dissolução e deposição de minerais no substrato dentário (Delbem *et al.*, 2006; Tenuta *et al.*, 2005; Thystrup *et al.*, 1995).

Segundo Featherstone (2008), a cárie dentária é uma doença provocada por metabolismo ácido de bactérias que se difunde para dentro do esmalte e da dentina, dissolvendo o mineral presente. Essas bactérias produzem ácidos orgânicos como um sub-produto do metabolismo de carboidratos fermentáveis, sendo o processo de cárie o resultado contínuo de muitos ciclos de desmineralização e remineralização. A desmineralização começa no nível atômico da superfície dos cristais dentro do esmalte ou dentina e continua, se não for interrompida, até formar uma cavidade.

A desmineralização consiste de 2 processos: (1) dissolução do mineral ao longo da lesão, e (2) difusão dos íons ácidos que são transportados da placa para o interior da lesão, e íons do mineral do substrato dentário solubilizados transportados para fora da lesão (Chow, 1990).

Kidd (2004) definiu que a forma das lesões de mancha branca é determinada pela distribuição do biofilme e da direção dos prismas de esmalte. Dentro do esmalte, a dissolução se propaga ao longo destes prismas. Em corte transversal, a lesão suave de superfície é cônica. Este formato cônico é resultado de variações sistemáticas da dissolução ao longo dos prismas de esmalte. A maior parte ativa da lesão está localizada ao longo do centro transversal. A lesão de forma cônica representa uma série de etapas crescentes da progressão da lesão de cárie.

Para Arends (1995), em modelos *in vitro*, pode-se investigar a desmineralização, remineralização, ou processos des-remineralização. No processo de cárie *in vivo*, as condições são, infelizmente, mais complexas do que *in vitro*. Os processos mencionados de desmineralização e remineralização que ocorrem *in vivo* são influenciados por inúmeros fatores ambientais, ou seja, o biofilme dental, a saliva, os hábitos alimentares, e outros. Além disso, *in vivo*, os períodos de des-remineralização são variáveis e geralmente desconhecidos, e encontram-se

associados à abrasão decorrente de movimentos musculares, alimentação e abrasão mecânica pela escovação.

Holmen *et al.* (1987a) realizaram um estudo para examinar as características clínicas e histológicas que ocorrem no dente *in vivo* durante o período inicial da atividade de lesão de cárie no esmalte. Inicialmente, os autores desenvolveram as lesões de cárie durante quatro semanas em pacientes que estavam utilizando bandas ortodônticas. Após o período, todos os pacientes apresentaram lesão de mancha branca correspondente à retenção de placa bacteriana no local. Nenhuma limpeza profissional foi feita e nenhum fluoreto foi adicionado durante o teste. Os pacientes foram orientados a manter a higiene bucal normalmente. Uma redução gradual das lesões de mancha branca e certo grau de opacidade foram notadas nas 3 semanas seguintes. Após a remoção das bandas, nenhuma progressão das lesões de mancha branca foi notada. Foi notada, também, uma certa diminuição na porosidade do esmalte principalmente na parte mais profunda da lesão, enquanto que a superfície externa apresentou maior porosidade. Foi concluído neste estudo que a causa observada que levou a inativação natural da atividade de cárie foi unicamente relatada para a remoção mecânica da produção de ácido pelo biofilme dental, tendo em vista que nenhum fluoreto e/ou outro agente químico foi usado. Portanto, a única razão para a regressão na lesão de mancha branca foi somente remover o foco da doença, com a higiene oral, que cessou a produção de ácidos no local.

Alteração nos conteúdos de íons minerais conseqüentemente altera, também, a dureza do esmalte. Em um estudo *in vitro*, estabeleceu-se uma relação entre a microdureza de superfície do esmalte e o conteúdo dos minerais cálcio e fósforo. O experimento resultou na redução da microdureza de superfície de espécimes submetidos à desmineralização sob diferentes condições experimentais, sempre ocasionando relação na redução do conteúdo de cálcio e fósforo em espécimes de esmalte bovino e humano (Feagin *et al.*, 1969).

Estudos *in vitro* de indução de cárie artificial em esmalte dentário são realizados constantemente para avaliar o processo da desmineralização e suas características. Diversos modelos são descritos na literatura tais como, biológico, químico estático e dinâmico, e são utilizados de acordo com o proposto por cada estudo para formação de diferentes níveis de lesão de esmalte (Featherstone, 1986), desenvolvimento, progressão e até a paralização das mesmas (Ten Cate & Duijsters, 1982; Delbem & Cury, 2002; Argenta *et al.* 2003; Paes Leme *et al.*, 2003; Paris *et al.*,

2006). Porém, além dos períodos de tempo de desenvolvimento e progressão da lesão de cárie variarem de acordo com o desafio cariogênico a ser determinado, as características da lesão produzida também diferem em cada método (Amaechi *et al.* 1998).

Em um estudo feito por Alexandria *et al.*, (2008) foram avaliados fatores como variações de pH, tempo de imersão da amostra e solução (ciclagem de pH), simulando o processo de desmineralização de esmalte equivalendo com seu processo clínico em pacientes de alta atividade de cárie. Foram observadas lesões subsuperficiais em um único grupo, no qual o esmalte de dente bovino permaneceu em solução com pH 5,0 por 16 horas, enquanto que nos demais, foram observadas áreas típicas de erosão.

Porém, foi observado que a inclusão de fluoretos em modelos de ciclagem de pH para produzir lesões de cárie artificial em esmalte, permite a formação de lesão subsuperficial, evitando-se assim, o efeito erosivo observado quando do uso da ciclagem de pH (Argenta *et al.*, 2003).

Ferreira *et al.* (2007) investigou um modelo de indução de desmineralização subsuperficial do esmalte para avaliação diagnóstica de métodos de imagem. Cinquenta coroas de dentes hígidos foram cobertas com verniz ácido-resistente, deixando uma janela circular de 7 mm² esmalte exposta em uma das faces proximais. Os espécimes foram divididos em 5 grupos (controle e 4 experimentais) e mantidos imersos em solução tampão pH 4,8, 50% saturada em relação ao esmalte, por 60, 75, 90 e 120 dias, ou não foram expostos à solução. As radiografias digitais foram obtidas antes e após cada período de imersão, sendo interpretadas por um radiologista. Para a validação, o esmalte foi submetido à análise de microdureza. Além disso, foram analisadas as concentrações de fósforo (P) e cálcio (Ca) da solução. Os valores de microdureza para o grupo controle variaram entre 405-432 KHN. Dos quatro grupos experimentais, o grupo de 60 dias demonstrou os maiores valores (179-370 KHN) e o grupo de 120 dias, os valores mais baixos (103-277 KHN). As menores concentrações totais de P e Ca (1,74 mM e 2,63 mM), respectivamente, foram encontradas nas soluções dos grupos de 60 dias, indicando a menor taxa de perda mineral; no entanto, não houve diferença significativa entre os outros grupos experimentais. O desempenho para detecção de imagens compatíveis com lesões de cárie foi alta ($\Delta Z = 8,89$). Portanto, este modelo *in vitro* de indução de desmineralização pode ser considerado adequado para investigação de cárie.

Um modelo *in vitro* de produção de cárie artificial deve ter as seguintes características: a facilidade de esterilização dos diferentes componentes, a capacidade para manipular os componentes do modelo sob condições assépticas, a facilidade de acesso para as amostras de teste, a reprodutibilidade dos experimentos e simulação do ambiente bucal (Bowden *et al.*, 1979).

II) Modelo biológico com biofilme bacteriano

Embora muitos pesquisadores utilizem modelos químicos estáticos com soluções ácidas ou dinâmicos com ciclagem de pH, o modelo biológico por meio de biofilme bacteriano tem sido a escolha de outros pesquisadores, pois o mesmo é capaz de formar lesões semelhantes às que ocorrem *in vivo* além de permitir o estudo do comportamento dos materiais restauradores/remineralizadores frente às espécies bacterianas e seus produtos (Fontana *et al.*, 1999; Gama-Teixeira *et al.*, 2007; Gilmour *et al.*, 1990; Lobo *et al.*, 2005).

Modelos biológicos bacterianos cuja microbiota é controlada pelo meio *in vitro* apresentam condições de nutrientes que proporcionam maneira adequada para se estudar os ecossistemas microbianos complexos, tais como o biofilme e o seu efeito sobre o desenvolvimento de cárie dentária. A microbiota do biofilme dental é extremamente complexa, consistindo de espécies bacterianas variadas. Muitas delas são capazes de produzir ácido por meio da metabolização de carboidrato. As bactérias mais comumente encontradas no biofilme são *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Lactobacillus* (Feldchtein *et al.*, 1998); porém a espécie que desempenha papel primordial na patologia da cárie em esmalte, durante a iniciação e a progressão é o *Streptococcus mutans*.

Dentre os métodos biológicos de produção de cárie *in vitro* encontram-se modelos que utilizam biofilme multi-espécie (Gilmour *et al.*, 1990; Yue *et al.*, 1992; Steiner-Oliveira *et al.*, 2007) ou de espécie única (Marsh, 1995; Koo *et al.*, 2003; Lobo *et al.*, 2004; Seemann *et al.*, 2005; Vásquez & Cury, 2010)

É provável que um modelo *in vitro* de biofilme bacteriano apresente menor variabilidade inerente que um experimento *in vivo*, desde variáveis como fluxo periódico de ingestão de carboidratos e composição da população bacteriana, os quais podem ser controlados com maior precisão *in vitro*, e por permitir o controle das demais variáveis de um ambiente experimental. Além disso, um modelo *in vitro* que utiliza

biofilme bacteriano, provavelmente, seja mais representativo do que os sistemas químicos, uma vez que na cárie dentária o processo liderado pelo ácido produzido pelas bactérias inseridas num biofilme é muito diverso. Somado a isso, outros subprodutos bacterianos que não somente o ácido são liberados e podem interferir no processo de cárie (Grossman *et al.*, 1999; Aldsworth *et al.*, 2001).

As primeiras preocupações com este método residiram no fato de que o método não produziria lesões subsuperficiais, mas permitiriam a “quebra” da superfície do esmalte, por meio de erosão da superfície. Os primeiros estudos utilizando um modelo microbiológico para produção de lesões de cárie foram publicados por Zahradnik *et al.* (1977) que reportaram ter produzido lesões similares as naturais, na subsuperfície do esmalte, em dentes suspensos em meio contendo *S. mutans*. Dummer *et al.* (1982) usando *S. mutans* NCTC 10832 em um meio de cultura, foram capazes de produzir lesões similares à cárie subsuperficial em esmalte, observando-as em microscopia óptica de luz polarizada.

Clarkson *et al.*, (1984) realizaram um estudo a fim de produzir lesões de esmalte subsuperficial e lesões de cárie em superfície radicular, *in vitro*, utilizando *Streptococcus mutans* FA1 cultivadas em caldo tioglicolato (NHI) contendo 3,57% w/v de dextrose e 2% w/v de gelatina. Após o período de duas semanas, os blocos de esmalte foram seccionados longitudinalmente e as fatias novamente expostas aos desafios ácidos no gel bacteriano. Desta forma, o progresso de cada lesão foi seguido por um total de seis semanas. As fatias de cada espécime, com 80 µm de espessura, foram submetidas para avaliação em microscopia óptica em luz polarizada e microrradiografia. Quando visto em luz polarizada após embebição em água, as lesões de esmalte tinham uma zona de superfície negativamente birrefringente e corpo positivamente birrefringente da lesão. Essas lesões produzidas depois de seis semanas, após embebição em quinolina, exibiram uma zona escura. A superfície radicular lesões de cárie exibiu uma zona de superfície menos radiolúcida acima de um corpo de lesão fortemente desmineralizado. No entanto, nenhuma dentina reacional foi vista nas lesões *in vitro*.

Muitos estudos com *S. mutans* tentaram mostrar que este microrganismo foi específico para o processo de cárie e identificar como isso poderia ocorrer em seres humanos. Aspectos extensivamente investigados incluíram a capacidade do *S. mutans* de: (1) produzir de ácido a partir de carboidratos rapidamente fermentáveis e baixar o pH, (2) sobreviver e continuar a produzir ácido no pH ácido, (3) produzir altos níveis de

polissacarídeos intra e extracelulares, em grande parte como componentes de armazenamento para prolongar a formação de ácido e um pH ácido, e (4) além dos polissacarídeos extracelulares, produzir polímeros para facilitar a aderência às superfícies dos dentes e a acumulação de grandes depósitos bacterianos (Kleinberg 2002).

Yue *et al.*, (1992) realizaram um estudo com o objetivo de produzir um modelo utilizando placa dentária multibacteriana para produção de cárie artificial. Uma placa artificial multibacteriana foi estabelecida *in vitro* em blocos de esmalte incubadas em cultura mista de *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans* (sorotipo c), *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*. A mesma estrutura típica da placa natural era vista em microscópio. A lesão de cárie, como produzido sob a placa foi observada em seções de esmalte. A lesão foi semelhante em aparência aos naturais tanto visualmente como em microscópio eletrônico de varredura. Os ácidos produzidos em ambos os meios de cultura e a placa artificial foram similares em composição e ao tipo dos produzidos na placa natural após exposição ao açúcar. Concluiu sugerindo que este tipo de modelo de placa pode ser útil no estudo de processos de cárie, *in vitro*, uma vez que é facilmente controlado, quer alterando a composição de bactérias ou através da adição de diferentes tipos de nutrientes nos meios. Além disso, os resultados serão mais fáceis de explicar quanto os produzidos naturalmente.

Marsh, em 1995, realizou uma revisão sobre modelos de cárie dentária (laboratório, animais e humanos em modelos *in situ*), pois variam muito em sua complexidade microbiológica. Concluiu que modelos laboratoriais variam de culturas mono-espécies cariogênicas que proporcionam um desafio ácido ao esmalte, ao desenvolvimento de diversas culturas mistas crescendo num meio artificial simulando ao que ocorre no meio bucal. Os últimos sistemas são de valor para determinar tanto mecanismos de ação ou de causa e efeito relacionamentos, por exemplo, entre os componentes dietéticos ou agentes antimicrobianos e da microflora. Modelos laboratoriais mostraram também que a sensibilidade de bactérias orais para inibidores é marcadamente reduzida quando crescendo formando biofilmes, tais como placa dentária. Os modelos animais têm demonstrado de forma inequívoca que a cárie é uma doença infecciosa. A utilização desses modelos permitiu comparações quanto a: (a) cariogenicidade de diferentes espécies bacterianas, (b) o papel da dieta, e (c) os efeitos de potenciais agentes anti-cárie. Pode-se dizer que a desmineralização pode

ser acelerada através da inoculação de bactérias cariogênicas adicionais juntamente com suplementação por sacarose intra ou extra-orais.

Aldsworth *et al.*, (2001) realizaram um estudo com o objetivo de desenvolver um simples modelo *in vitro* utilizando um sistema de crescimento bacteriano para estudar os aspectos da cárie dentária. Utilizaram suspensões padronizadas de bactérias as quais foram inoculadas em Ultrafree -CL (Millipore) em várias densidades de unidade de infiltração. Estas foram incubadas durante vários intervalos de tempo, com uma gama de fontes de carbono. As películas bacterianas reprodutivas que atingiram entre 10^7 e 10^8 UFC cm^{-2} , independentemente do número inoculado, não apresentaram mudanças significativas por 14 dias. No entanto, *Streptococcus mutans* cresceram através de membranas com poros de diâmetro maior do que o 0-A1 μm após 6 dias. A cultura de biofilmes na sacarose ou na água em 6 dias levou a uma diminuição do número de unidades formadoras de colônias, mas retorná-las no caldo reverteu isso. Os autores concluíram que biofilmes reprodutíveis de bactérias orais podem ser cultivadas em unidades Ultrafree-CL. Este estudo mostrou que as unidades Ultrafree-CL podem ser usadas como um modelo de sistema simples para crescimento de biofilmes que poderiam ser utilizados para a pesquisa de cárie dentária.

De acordo com Hashizume (2002), o *Streptococcus mutans* é implicado como um potente indutor cariogênico no homem. Por causa disso, os mecanismos pelos quais o *S. mutans* se adere nas superfícies dentárias são muito estudados e são considerados potencialmente importantes no alcance de intervenções anti-cariogênicas. Este estudo teve como objetivo utilizar secções não descalcificadas de esmalte para observar a sequência de alterações ultra-estruturais de cristais de esmalte com biofilme de *Streptococcus mutans* nas fases iniciais de cárie. Blocos de esmalte foram incubados de 1 a 7 dias com suspensão de *S. mutans* e o pH do biofilme foi medido. Eles foram observados em microscopia de luz polarizada e microscopia eletrônica de transmissão, e o número de bactérias localizadas na área adjacente à superfície do esmalte foram contadas. Foi observado que o pH do biofilme caiu para 4 , depois de 1 dia de incubação e o número de *S. mutans* aumentado em 4 dias. Cristais de esmalte de forma redonda foram observados nas amostras de 2 dias e a partir do dia 4, as imagens dos cristais que mostraram defeitos e perfurações foram visualizados, tornando-se mais defeituoso ao longo dos dias de incubação. O período de tempo que o esmalte foi exposto ao biofilme foi o principal fator para que ocorra a desmineralização dos cristais do esmalte. Geralmente, o sistema de indução de cárie *in*

vitro pode normalizar as alterações relacionadas com o tempo do estabelecimento do biofilme de *Streptococcus mutans* e a sua relação com a desmineralização dos cristais de esmalte em nível ultra-estrutural, e assim, proporcionar um modelo útil para a avaliação dos efeitos de vários agentes anticariogênicos.

Seeman *et al.*, (2005) relataram sobre o desenvolvimento e os testes iniciais de um novo modelo de cárie microbiológico. Para isto, as amostras foram fixadas em um suporte giratório dentro de uma câmara de reação hermeticamente cercada por uma caixa de luvas esterilizadas. Um ambiente cariogênico foi obtido pela inoculação com *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), combinado com um suplemento continuamente repetido de solução de sacarose, caldo de soja tripticase e saliva artificial aplicada por gotejamento. Foram utilizados vinte e cinco pré-molares superiores livres de cárie. As áreas mesiais das fissuras oclusais tinham sido seladas com um selante à base de resina (grupo de teste 1). Para produzir fendas marginais, as partes distais foram umedecidas com saliva antes da aplicação de resina (grupo de teste 2). Cinco dentes serviram como controle e foram expostos a todos os fluidos sob condições estéreis, antes de ser removidos do sistema após 7 dias. Os espécimes testes foram infectados com *S. mutans* e foram incubados durante mais de 14 dias. Nenhuma contaminação ocorreu durante o período de 3 semanas de operação. As desmineralizações foram avaliadas por meio de microscopia confocal de varredura a laser. Apenas os espécimes testes mostraram sinais claramente visíveis de formação de biofilme e lesões de cárie. A profundidade média da lesão primária não diferiu significativamente entre os grupos de teste. As profundidades de lesão da parede e as áreas de superfície desmineralizada debaixo dos selantes de fissuras foram significativamente maiores no grupo de teste 2. Assim, este modelo permitiu a produção simultânea de lesões de cárie de esmalte - como primários e secundários - em um considerável número de espécimes e facilitou a possibilidade de manipular e transferi-los sem necessariamente encerrar o experimento, abrindo novas possibilidades para a investigação *in vitro* de cárie.

Koo *et al.*, (2003) realizaram um estudo com o objetivo de investigar a influência da apigenina e tt-farnesol, isolados e em combinação, sobre o acúmulo, composição do polissacarídeo e viabilidade de biofilmes de *S. mutans* UA159. Para tal, os biofilmes foram cultivados por 54 horas e, em seguida, os biofilmes formados primeiramente foram tratados durante 1 minuto, duas vezes por dia, com uma das seguintes formas: (i) 1,33 mM de tt - farnesol; (ii) . 1,33 mM apigenina; (iii) apigenina +

tt- farnesol (1,33 mM cada); (iv) veículo controle (etanol a 20 % com 0,75 % de dimetil - sulfóxido); (v) Clorexidina 0,12% (1,33 mm); ou (vi) salina fisiológica (NaCl 145 mM). O procedimento foi repetido em idades de biofilme 78 e 102 horas, e os biofilmes foram colhidos em 126 horas. Foram determinados o peso seco, a concentração de proteína, quantidade de UFC e composição do polissacarídeo por biofilme. Os pesos secos dos biofilmes tratados com os agentes de teste foram significativamente menor (30-50%) do que aqueles tratados com o veículo controle ($P < 0,05$). Os biofilmes tratados com os agentes testados também resultaram em valores mais baixos de glucanos – alcalinos solúveis extracelulares, polissacáridos-iodofólicos intracelulares e, em menor extensão, os frutanos. A atividade frutossiltransferase foi afetada apenas pela apigenina e apigenina + tt-farnesol. As contagens viáveis de *S. mutans* recuperáveis estavam ligeiramente mais baixas (0,5 a 1 \log_{10} diminuição em UFC/biofilme) após tratamentos apigenina e tt-farnesol comparado com o veículo controle. A clorexidina exibiu potente atividade bactericida e praticamente destruiu o maior acúmulo de biofilmes (54h de idade) formados primeiramente. Foi concluído que a apigenina e tt-farnesol afetaram o acúmulo e conteúdo de polissacarídeo de biofilmes de *S. mutans*, sem grande impacto sobre a viabilidade bacteriana.

Em um estudo realizado por Steiner-Oliveira *et al.* (2007) observou-se que o modelo microbiológico multi-espécie utilizado de *S. mutans* e *S. sobrinus* foi capaz de produzir lesões de cárie em todas os blocos de dentes, trocando-se o meio a cada 12 horas em alguns grupos e a cada 24 horas em outros, mas não foram encontradas diferenças entre a cariogenicidade dos microorganismos. Também concluíram que, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de trocas do meio, ou nas estirpes de bactérias utilizadas para produzir a desmineralização, o período mais adequado para mudar o meio, seria a cada 24 horas, seja através de *S. mutans* ou *S. sobrinus*.

Vásquez & Cury (2010) realizaram um estudo com objetivo de validar um modelo de formação de biofilme de *S. mutans* que simulasse episódios “feast-famine” (nutrição e fastio) na exposição à sacarose, que ocorrem na cavidade oral, mostrando susceptibilidade na dose-resposta aos antimicrobianos e permitindo a avaliação de substâncias com potencial anticárie. Para tal estudo, biofilmes de *S. mutans* UA159 foram cultivados durante 5 dias em blocos de esmalte bovino a 37°C, em 10 % de CO₂. Para validar o modelo, os biofilmes foram tratados 2x/dia com digluconato de clorexidina (CHX) a 0,012 , 0,024 e 0,12% (concentração com reconhecido efeito anti-

placa) e 0,05% NaF (concentração com reconhecido efeito anticárie). CHX mostrou efeito dose - resposta de diminuição da biomassa, a viabilidade bacteriana e desmineralização do esmalte ($p < 0,05$). Enquanto que 0,05 % de NaF não mostrou efeito antimicrobiano, mas teve um efeito semelhante ao de 0,12 % de CHX diminuindo a desmineralização do esmalte ($p < 0,05$). Foi concluído que o modelo desenvolvido tem potencial para avaliar o efeito das substâncias sobre o crescimento de biofilme e na desmineralização do esmalte.

Ribeiro *et al.*, (2012), realizaram um estudo com objetivo de testar a hipótese de que o Ferro (Fe) pudesse ter um efeito anti-cárie, por inibição específica da enzima glicosiltransferase (GTF) de *Streptococcus mutans*, que ainda não foi claramente estudada. No estudo, os biofilmes de *S. mutans* foram formados em blocos de esmalte bovino com uma dureza de superfície pré-determinada (SH). Os biofilmes foram expostos oito vezes ao dia em 10 % de sacarose, e foram submetidas a um dos seguintes tratamentos duas vezes ao dia: G1 - NaCl a 0,9% como controle negativo; G2 - 0,12% de digluconato de clorexidina (CHX) como controle positivo anti-bacteriano; G3 - 0,05% de NaF (225 ppm F) como controle positivo anticárie; G4, G5 e G6 - sulfato ferroso (Fe^{2+}) em concentrações de 1,0; 10,0; e 100,0 mg Fe/mL, respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata e foi repetido três vezes ($n=9$). O pH do meio de cultura foi trocado a cada 24 horas, como um indicador de acidogenicidade do biofilme. O biofilme formado em cada bloco foi recolhido para a determinação de bactérias viáveis e concentração de polissacarídeos extracelulares (EPS). A dureza da superfície (SH) do esmalte foi novamente determinada e a porcentagem de perda de dureza (%SS) foi calculada como um indicador de desmineralização. O tratamento com ferro reduziu o número de bactérias viáveis formadas no biofilme *S. mutans* ($p=0,04$), de uma forma dependente da dose e também reduziu a porcentagem de perda de dureza do esmalte ($p = 0,005$). Em 100 μ g/mL, o ferro reduziu a desmineralização do esmalte de forma tão eficaz como clorexidina e NaF ($p < 0,05$), mas não inibiu a produção de EPS. Em conclusão, os dados sugerem que o mecanismo de ação anti-cárie do Fe pode não envolver a inibição da oxidação de GTFs .

III) Diagnóstico clínico das lesões de cárie

O diagnóstico é um julgamento clínico que antecede uma decisão de tratamento para as lesões de cárie. Quando esta lesão está em causa, o diagnóstico

implica a detecção de uma lesão de cárie, estimando sua profundidade e grau de desmineralização. A natureza dinâmica da progressão da lesão de cárie pode exigir que a classificação de lesões de cárie faça distinções em cada estado de atividade. (Nyvad e Fejerskov, 1997).

A cárie de esmalte é observada, inicialmente, como uma lesão de mancha branca. Esta é uma pequena área de desmineralização de subsuperfície que fica abaixo do biofilme dentário. O corpo da lesão de subsuperfície pode ter perdido tanto quanto 50% do conteúdo mineral original e muitas vezes o mesmo é coberto por uma camada de superfície aparentemente intacta. O processo de desmineralização continua cada vez que é feita ingestão de carboidratos que são metabolizados pelos microrganismos (Silverstone, 1973; Featherstone, 2000). Clinicamente, aparenta uma mancha branca opaca, devido à mudança do índice de refração da área de perda mineral, quando comparada com o do esmalte hígido que aparenta translucidez (Featherstone, 2000).

Quando se realiza a secagem da superfície da área desmineralizada (mancha branca), os poros das diferentes zonas da lesão são preenchidos com ar resultando num índice de refração 1,0, e ao contrário disso, previamente à secagem, eles estão preenchidos com água, onde o índice de refração resulta em 1,33. Já ambos os valores são diferentes de uma superfície mineralizada, a qual possui um índice de refração de 1,62. E devido a isso, essa diferença nos índices de refração, associada à rugosidade da superfície, faz com que a lesão de mancha branca ativa apresente-se com característica branca opaca (Thylstrup & Fejerskov, 1995).

Nyvad e Fejerskov (1997) realizaram um estudo onde tiveram como objetivo compilar e discutir a literatura que se refere à avaliação clínica da atividade de lesão de cárie e examinar se os recentes desenvolvimentos na investigação microbiológica podem justificar a utilização de métodos microbiológicos para avaliação da atividade de cárie. As observações clínicas sugerem que a progressão da lesão pode ser presa em qualquer fase do desenvolvimento de lesões, desde que clinicamente condições livres de placa sejam obtidas. Os diagnósticos de cárie ativa e inativa foram validados por uma série de métodos histológicos e químicos que têm apoiado a separação em categorias clínicas distintas. Métodos microbiológicos simples até agora não têm sido úteis na diferenciação entre lesões de cárie ativas e inativas. Poucos estudos avaliaram a confiabilidade inter- e intra-examinador dos critérios de diagnóstico de cárie com base na avaliação do estado das lesões ativas, mas dados recentes indicam que as lesões

de cárie ativas e inativas podem ser identificadas com um alto grau de confiabilidade. Um esquema de decisões para a cárie dentária é apresentada por meio do qual é possível associar a avaliação de sua atividade com uma modalidade de tratamento adequado. Concluiu-se que pesquisas incluindo melhores métodos de avaliação da atividade clínica de cárie deveriam ser estimuladas.

Segundo Kidd & Fejerskov (2004), relataram que as características da superfície dentária fornecem informações valiosas, por exemplo, uma lesão de mancha branca visível apenas em uma superfície seca, provavelmente, está restrita a superfície do esmalte, ao passo que uma lesão visível em uma superfície úmida, provavelmente, penetrou mais através do esmalte e pode, ou não, ter chegado à dentina. A formação da cavidade pode ser considerada um momento muito importante clinicamente, devido ao fato do biofilme penetrar dentro de uma microcavidade e permanecer lá protegido pela mesma, e, a menos que o paciente seja capaz de limpar a área, o processo de progressão de cárie continuará. O biofilme que penetra no interior dessas microcavidades favorece uma mudança ecológica devido à presença de bactérias anaeróbias produtoras de ácido. Presumivelmente, a cavidade é criada pela primeira vez por injúrias mecânicas durante a mastigação, microtraumas durante o desgaste interdental, ou até mesmo, descuidado por sondagem realizada pelos dentistas.

Segundo Ismail (2004) há muitos critérios para diagnosticar lesões de cárie. Os estudos de levantamento epidemiológico para detecção de lesões de cárie devem ser conduzidos de forma a identificar protocolos cientificamente fundamentados que possam levar a verificação de um elevado grau de confiabilidade entre examinadores. Todo diagnóstico de cárie e suas questões envolvidas devem ser baseados em evidências científicas para avançarem no campo da detecção de cárie, diagnóstico e gestão em saúde.

As lesões de cárie têm sido tradicionalmente avaliadas com critérios da OMS, incluindo apenas as lesões de cárie óbvias. O critério "International Caries and Assessment System" (ICDAS) foi desenvolvido para incluir lesões de cárie iniciais em esmalte de acordo com o estágio de sua evolução, bem como para categorizar os "óbvios", as lesões de cárie em dentina de acordo com sua progressão (Pitts, 2004, 2005 e 2009). O critério ICDAS foi desenvolvido como um sistema padronizado com base em evidências de que deve levar a melhor informação de qualidade para iluminar as decisões sobre o diagnóstico apropriado, prognóstico e manejo clínico das lesões de cárie tanto em nível individual como a saúde pública. O ICDAS parece dar informações

adequadas a partir da ocorrência de lesões de cárie e suas correlações entre as superfícies dos dentes decíduos e permanentes (Pitts, 2004; Honkala *et al.*, 2011).

Um objetivo importante no desenvolvimento ICDAS é fornecer flexibilidade para clínicos e pesquisadores para escolher a etapa de processo de cárie e outras características que atendam às necessidades de suas pesquisas ou práticas. Por isso, o comitê ICDAS desenvolveu o conceito "wardrobe", onde os usuários podem decidir em que fase (não cavitada ou cavitadas) e gravidade que pretendem mensurar a cárie dentária. A única condição é a exigência de que as definições ICDAS usadas para qualquer fase da cárie dentária seja escolhido para um estudo específico (Ismail *et al.*, 2007)

Alguns estudos *in vitro* já testaram a validade e reprodutibilidade dos ICDAS (Jablonski-Momeni *et al.*, 2008; Diniz *et al.*, 2009; Shoaib *et al.*, 2009) e outros *in vivo* (Braga *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2010).

Os novos critérios para a detecção e avaliação de cárie dentária foram referidos como ICDAS II. Participantes de um seminário realizado concluíram a deliberação do método ao reconhecer que o sistema ICDAS continuará a evoluir à medida que novas informações e ferramentas forem desenvolvidas e validadas. O ICDAS II apresenta uma base sobre a qual os instrumentos de avaliação de novas lesões de cárie poderiam ser incorporados para auxiliar na tomada de decisões mais precisas para a prática clínica, bem como para a investigação clínica e epidemiológica. O sistema ICDAS II se esforça para alcançar a integração e coordenação do emergente campo da avaliação de cárie. Pequenas revisões foram feitas após *in vivo* e *in vitro* em exercícios de treinamento de uma reunião do ICDAS.

Um estudo feito por Piovesan *et al.* (2013), teve como objetivo propor uma metodologia de laboratório para simular os exames realizados para detectar lesões de cárie utilizando o índice Internacional e Sistema de Avaliação (ICDAS), em levantamentos epidemiológicos. Dezesesseis alunos de graduação receberam um treinamento de diagnóstico clínico utilizando os parâmetros ICDAS, o qual foi conduzido por um examinador de referência que conduziu todas as sessões. Um total de 67 dentes decíduos esfoliados, variando de hígidos até com cavitação extensa, foram fixados em sete arcos em modelos para simular bocas completas na dentição decídua. Os alunos avaliaram todas as superfícies dos dentes sob iluminação, usando espelhos bucais e sonda ponta romba, em duas ocasiões, utilizando apenas nas superfícies oclusais de lesões de cárie primárias, do ICDAS. Como padrão de

referência, dois examinadores avaliaram as diferentes faces proximais por inspeção visual direta, classificando-as em híginas, lesões não-cavidadas, ou cavidadas. Depois, os dentes foram seccionados no sentido vestibulo-lingual, e os examinadores avaliaram as seções em estereomicroscópio, classificando as superfícies oclusais e lisas de acordo com a profundidade da lesão. A reprodutibilidade inter-examinador foi avaliada utilizando índice kappa ponderado. Sensibilidade e especificidade foram calculadas em dois limites: todas as lesões iniciais e lesões avançadas (lesões cavidadas em superfícies proximais e lesões atingindo a dentina em superfícies oclusais e lisas). Concluiu-se que a metodologia proposta para treinamento e calibração dos vários examinadores designados para levantamentos epidemiológicos de cárie dentária em crianças pré-escolares utilizando o ICDAS é viável, permitindo a avaliação da confiabilidade e precisão dos examinadores previamente para o desenvolvimento da pesquisa.

IV) Métodos de avaliação de lesões de cárie *in vitro*

Nakata *et al.*, (2012) realizaram um estudo, para indicar a possibilidade de uma nova abordagem para a criação de perfis de densidade mineral e para examinar as mudanças longitudinais na taxa de remineralização (R_A) e densidade mineral (DAs) em 4 diferentes profundidades do esmalte: zona de superfície (SZ), o corpo da lesão (LB), zona intermediária (MZ), zona de profundidade perto da área hígina: (DZ) em lesões de subsuperfície de esmalte, onde oito blocos de esmalte-dentina bovinos desmineralizados foram remineralizados por 1 a 4 semanas e investigados usando microtomografia computadorizada (μ -CT). Após a tomografia computadorizada, foram criados perfis de densidade mineral. A densidade mineral em cada profundidade, após desmineralização, foram $SZ \cong LB < MZ < DZ$. O aumento na R_A era o maior na primeira semana de remineralização e diminuiu ao longo do tempo. Incrementos da densidade mineral foram maiores no fim de $SZ \cong LB > MZ > DZ$. Este estudo indicou uma nova abordagem para criar um perfil de densidade mineral e sugeriu maior o valor da densidade mineral antes da remineralização, os incrementos menores de densidade mineral.

Magalhães *et al.*, (2009) realizaram um estudo com os seguintes objetivos: (1) correlacionar dureza da superfície (SH) e dureza em corte transversal (CSH) com parâmetros microrradiográficos de lesões artificiais de esmalte; (2) para comparar as

lesões preparadas por protocolos diferentes. Para o estudo, cinquenta espécimes de esmalte bovino foram alocados por randomização estratificada de acordo com seus valores iniciais de dureza de superfície em cinco grupos de lesões produzidas por diferentes métodos: gel MC (ácido láctico gel de metilcelulose, pH 4,6; 14 dias); Gel de PA (ácido poliacrílico/ácido láctico/hidroxiapatita, pH 4,8; 16 horas); MHDP (difosfonato tampão lactato subsaturada/metilo, pH 5,0; 6 dias); tampão (tampão subsaturado de acetato/flúor, pH 5,0; 16 horas), e ciclagem de pH (7 dias). A dureza da superfície das lesões (SH1) foi medida. Os espécimes foram seccionados longitudinalmente para análise por microrradiografia transversal (TMR) e microdureza longitudinal (CSH) medido de 10 - 220 μm de profundidade a partir da superfície. No geral, houve uma correlação média, mas não-linear e relação variável entre o conteúdo mineral e $\sqrt{CSH} \cdot \sqrt{SH_1}$, foi de fraca a moderada, correlacionadas com as propriedades da camada superficial, fracamente correlacionadas com a profundidade da lesão, mas não correlacionadas com a perda mineral integrada. As lesões MHDP mostraram maior perda mineral da subsuperfície, seguida por ciclagem de pH, tampão, gel PA e lesões a partir de gel MC. As conclusões foram: (1) CSH, como uma alternativa ao TMR, não estima o conteúdo mineral de forma muito precisa, mas dá informações sobre as propriedades mecânicas das lesões; (2) SH não deve ser utilizado para analisar as lesões; (3) os protocolos para a produção de lesões de cárie artificiais diferem especialmente quando se considera o método de análise. O impacto das diferentes propriedades das lesões produzidas por estes cinco protocolos mais a remineralização devem ser analisados.

Field *et al.*, (2014) realizaram um estudo com o objetivo de testar a hipótese nula de que não existem diferenças significativas nas características de superfície inicial de espécimes de esmalte humanos, ovinos e bovinos preparados usando o mesmo método para ambos. Vinte blocos de esmalte de coroas de incisivos bovinos, humanos e ovinos foram preparados e polidos com pasta de óxido de alumínio 3 μm . A rugosidade média (Ra), tendo parâmetros (MR1, MR2, RPK, Rk, Rvk), microdureza superficial e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizados para comparar os diferentes substratos. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar quantitativamente características de superfície entre os tipos de substrato. A rugosidade de esmalte humano, bovino e ovino e a microdureza foram significativamente diferentes um do outro no baseline ($P < 0,001$); esmalte ovino foi o mais rugoso e com menor dureza, e o esmalte bovino foi o que apresentou menor

rugosidade e maior dureza. A MEV permitiu uma comparação visual a ser feita entre tipos de substratos, o que confirma os dados quantitativos. Os autores concluíram que o esmalte de espécimes humanos, bovinos e ovinos mostraram significativamente características diferentes da superfície depois de preparados. A hipótese nula foi rejeitada, reconhecendo que as mesmas técnicas de preparo não resultarão necessariamente em características consistentes iniciais de rugosidade ou de superfície entre os tipos de substratos. As superfícies de estudos devem ser preparadas e polidas de forma padrão para garantir que os dados iniciais sejam registrados para uma possível comparação.

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo verificar a possibilidade de se produzir *in vitro*, por um modelo biológico (biofilme de *Streptococcus mutans*), lesões de cárie em esmalte bovino, com características clínicas similares às aquelas do protocolo ICDAS II, códigos 1, 2, e 3; identificar o tempo de desmineralização necessário para a produção de lesões de cárie em esmalte Códigos 1, 2 e 3; e caracterizar estas lesões quanto a profundidade, análise de superfície, área e volume da lesão, perda mineral e características clínicas, por meio de métodos qualitativos e quantitativos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos espécimes

Para obtenção de 45 blocos de esmalte, foram utilizados 141 incisivos bovinos, recém extraídos, livres de cárie e trincas, os quais foram armazenados em água dentro de frasco plástico e congelados em freezer a -20° C até o uso. A fim de se obter os blocos, as raízes foram seccionadas 1 mm aquém da junção amelocementária e descartadas, então as coroas foram seccionadas perpendicularmente ao longo eixo do dente, no sentido Mesio/Distal, com disco diamantado dupla face, (Dia. Wafer Blade 12205, Extec Corp.) montado em máquina de corte de baixa velocidade (Isomet; Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), resfriado a água, obtendo os blocos da face vestibular (5 x 5 x 5 mm), sendo 1 bloco por dente.

Os blocos de esmalte foram fixados em discos de acrílico com cera para escultura, com a face de dentina exposta para serem planificadas e polidas com lixas de carbetto de silício (Carbinet, Buehler Ltd, Lake Buff, IL, USA) em politriz metalográfica, objetivando a obtenção de uma superfície plana e paralela à base. Para obter-se o paralelismo, a dentina foi planificada com lixa de granulação 340, sob refrigeração com água deionizada por 30 segundos em baixa velocidade. Consequentemente, as amostras foram fixadas expondo o esmalte externo, acoplados com cera nos discos de acrílicos para obtenção de uma superfície plana e paralela à base. O polimento do esmalte seguiu-se com lixas de carbetto de silício, de granulação 340, 600, 1200, 2400 e 4000 até a obtenção de superfícies de esmalte polidas. As amostras foram limpas em ultrassom por 10 minutos a cada troca de lixa, para remoção de resíduos da superfície da amostra.

Foi realizada a medida da microdureza de superfície (SMH), utilizando durômetro (HVM 9000 /Shimatzu Corporation, Japan) com diamante Knoop, sob carga de 25 gF por 5 segundos, produzindo três endentações espaçadas lateralmente 100 µm uma da outra (Figura 1), no centro da superfície do esmalte (Vasquez & Cury, 2010). A média dos três valores de cada bloco foi calculada e os espécimes foram selecionados de acordo com a média \pm 10% (Giacaman *et al*, 2013), sendo selecionados 15 blocos para cada grupo. Ao final do experimento, para cada grupo foram aleatoriamente selecionados 15 espécimes para o estudo.

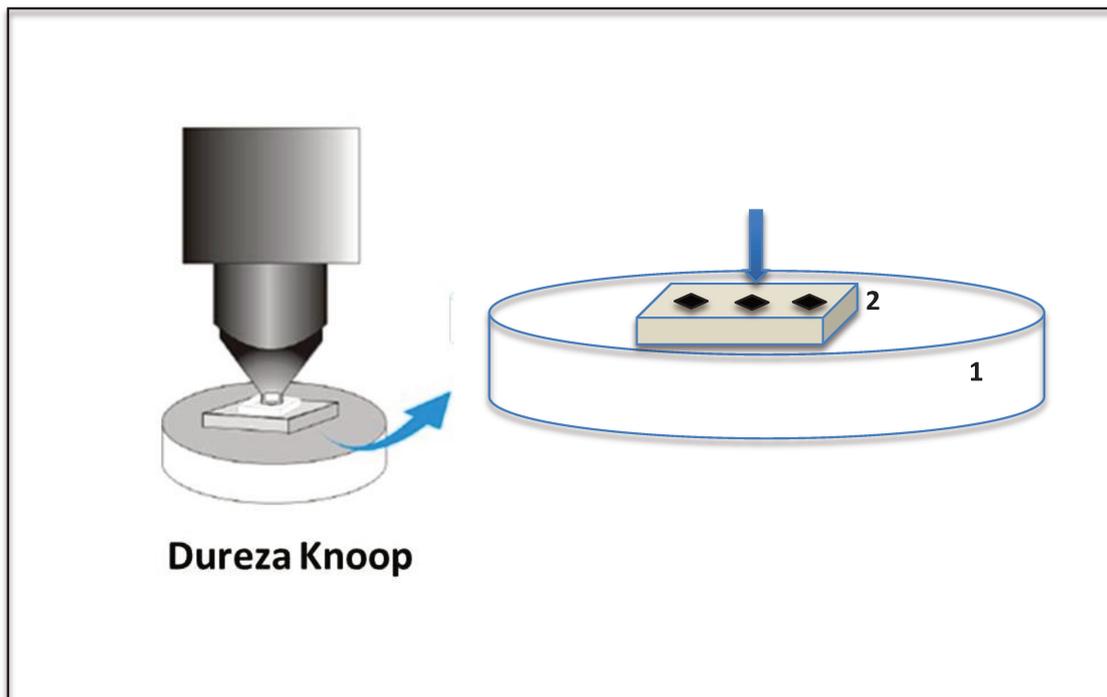


Figura 01: Esquema da localização das endentações para mensuração da dureza Knoop na superfície de esmalte para seleção dos espécimes. 1 – Placa de acrílico; 2. Bloco de esmalte; Seta azul – endentações espaçadas a cada 100 μm .

Após a seleção dos blocos, foram cobertas duas áreas laterais da superfície dos espécimes, cada uma com 1,5 x 5 mm, com verniz ácido resistente (Colorama; CEIL Com Exp Ind. Ltda, São Paulo, SP, Brasil), com exceção da área central de 2 x 5 mm, equivalente à área a ser exposta ao desafio cariogênico (Figura 02).



Figura 02 – Espécime coberto com verniz ácido resistente (vermelho), deixando exposta uma área de 2 x 5 mm (branca).

Os 45 espécimes foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=15). Feito isso, os mesmos foram fixados nas placas de acordo com os grupos: Código 1, Código 2 e Código 3. Foram utilizadas três placas de poliestireno de 24 poços (EasyPath, São Paulo Brasil), uma para cada grupo. O posicionamento dos espécimes nos poços foi feito por meio de um fio ortodôntico com 9 mm de comprimento (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) que foi fixado à tampa da placa com cera para escultura (Kota, São Paulo, Brasil) (Figura 03).

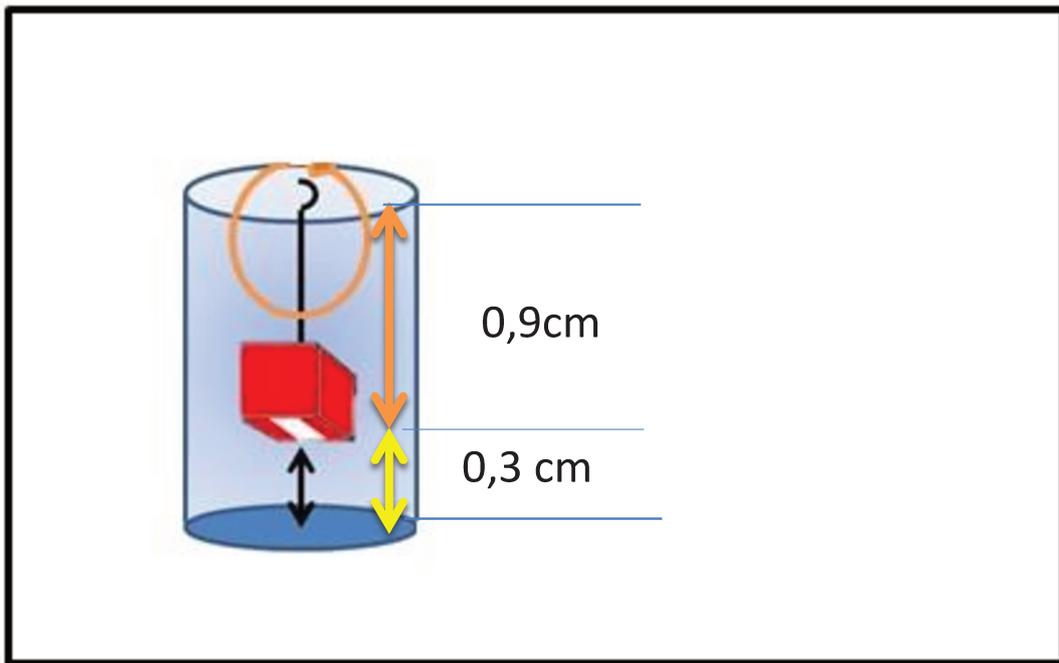


Figura 03: Disposição do dente dentro do poço, fixado pelo fio ortodôntico de 0,9 cm de comprimento.

Após a fixação dos espécimes, as placas foram embaladas em gral cirúrgico e esterilizadas em óxido de etileno na Acecil (Central de Esterilização Com. Ind. Ltda. Campinas-SP, Brasil).

Desenvolvimento de Lesão Artificial de Cárie em Esmalte com Biofilme de *Streptococcus mutans*.

l) Preparo do meio de cultura e do concentrado de sacarose

O meio de cultura utilizado foi o BHI (Brain Heart Infusion – BD Difco Laboratories), que após o preparo foi dividido em alíquotas de 160 mL, armazenadas em frascos de vidro com tampa rosca (Uniglass – 250 mL), os quais foram esterilizados em autoclave (Primatec – Autoclave vertical; 220 V) por 15 minutos, em temperatura 120° C a 1 kg/cm². Após o esfriamento, as misturas foram armazenadas em geladeira comum.

A sacarose foi diluída em meio BHI, em concentração de 20%, sendo esterilizada por sistema de filtragem (Corning® Incorporated 430769 – 500 mL Filter

System – NY, USA) seguindo as instruções do fabricante, com auxílio de bomba a vácuo. A mistura esterilizada de sacarose foi fracionada em alíquotas de 9 mL, que foram armazenadas em tubos Falcon de 15 mL. Este procedimento foi realizado em ambiente asséptico, em capela de fluxo laminar. Esses tubos foram congelados em freezer a - 20° C (Figura 04).



Figura 04 – Preparo do meio de cultura enriquecido com sacarose a 20%. A – Filtragem do meio + sacarose para total esterilização; B- Bomba a vácuo; C – tubos Falcon com mistura preparada.

II) Desenvolvimento do biofilme

Neste estudo foi utilizada a cepa de *Streptococcus mutans* UA159, obtida do Departamento de Microbiologia e Imunologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas. A cepa foi cultivada a partir dos estoques congelados, em meio *skim-milk* (Difco Labs, Sparks, EUA) (Figura 05A), dos quais foram removidos 10 μ L de suspensão com alça de platina calibrada esterilizada, estriados em MSA (Mitis Salivarius Agar - Difco Labs, Sparks, EUA) e incubados a 37° C, sob atmosfera de 10% CO₂ (Water-Jacked CO₂ Incubators/Cole Parmer Instruments, EUA) durante 24 horas (Figura 05B).

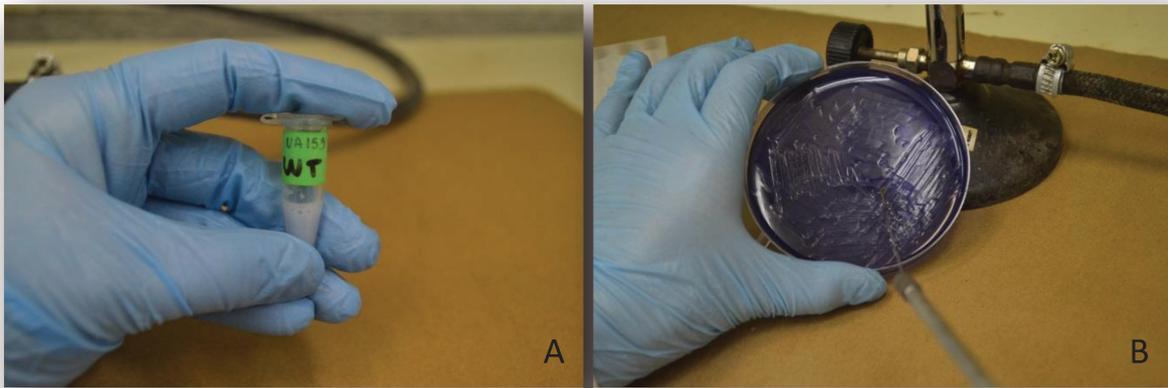


Figura 05 – A: Cepas de *S. mutans* em *ependorfs* retirados do freezer; B: Semeadura do *S mutans* UA159 em placa com MSA.

Após crescimento, as colônias (Figura 06A) foram inoculadas em 20 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion* Difco Labs, Sparks EUA) (Figura 06B), agitadas (Figura 06C) e incubadas sob as mesmas condições durante 24 horas. Esses tubos serviram como fonte do inóculo *starter*.

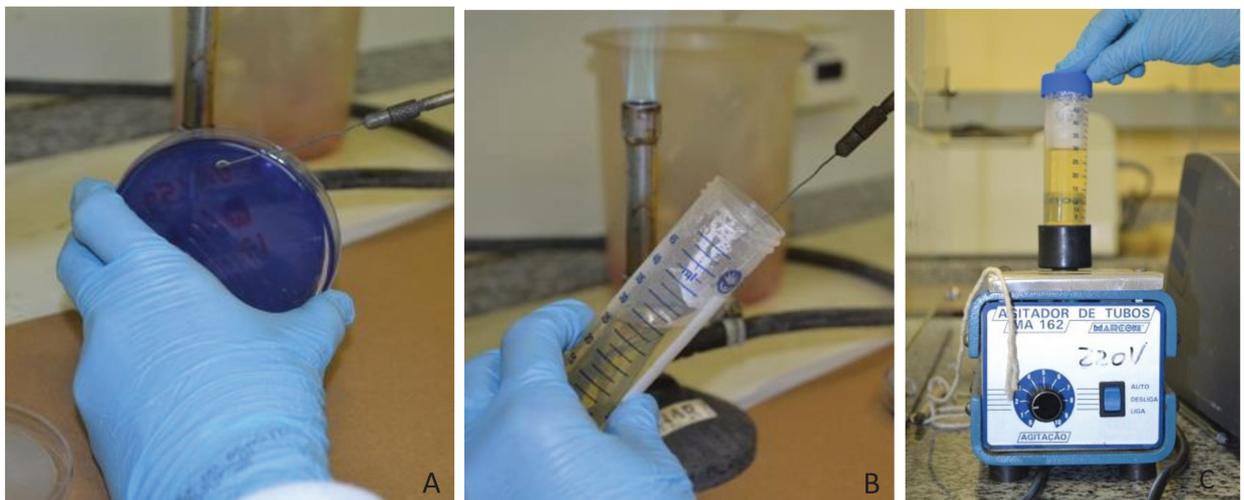


Figura 06 – Crescimento das colônias de *S. Mutans* - A: Seleção das colônias mais isoladas; B: Diluição das colônias em BHI esterilizado; C: Dispersão das colônias utilizando agitador elétrico.

Após o período de 24 horas, a sacarose em concentração inicial de 20% foi diluída em BHI esterilizado, para obtenção da concentração final de 1% no meio. Para isso, foi feito o seguinte cálculo:

$$\begin{aligned}C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\20\% V_1 &= 1\% \times 160\text{mL} \\V_1 &= 8\text{mL}\end{aligned}$$

C₁ - 20%: concentração inicial

V₁ - volume da alíquota do concentrado de sacarose, a ser adicionado para 160 mL de BHI

C₂ - 160mL: volume de BHI previamente preparado

V₂ - 1%: concentração final de sacarose no BHI

De acordo com o exposto acima, do volume total (160 mL) de BHI, eram retirados e desprezados 8 mL, para então adicionar o mesmo volume (8 mL) do concentrado de sacarose, afim de não alterar o volume final.

Paralelamente, foi analisado o crescimento bacteriano por meio da avaliação da turbidez. As leituras de absorvância foram realizadas no comprimento de onda de 550 nanômetros ($A_{550\text{nm}}$) em espectrofotômetro *Genesys 2* (Spectronic Unicam, Madison, EUA). Previamente à leitura, o aparelho foi zerado (*Blank*) com o valor do meio puro (Figura 07). O BHI com o inoculo crescido, após as 24 horas, possuíam valores de absorvância que podem variar entre 0,7 e 0,9, a depender da variação do crescimento *overnight* do microrganismo. A partir do valor obtido, utilizou-se a fórmula apresentada na Figura 08, sendo este o valor de C_1 . Ainda, a concentração bacteriana *starter* (C_2) tem um valor fixo de $A_{550}=0,05$.

$$\begin{aligned}C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\0,700 \times V_1 &= 0,05 \times 160 \text{ mL} \\V_1 &= 11,42\text{mL}\end{aligned}$$

C₁ - 0,700 = D.O. do meio BHI inoculado com *S. mutans*

V₁ - o volume da alíquota do BHI inoculado a ser adicionado para 160 mL de BHI, ajustar a D.O. a 1A

C₂ - 0,05 = D.O. do meio BHI não inoculado

V₂ - 160 mL = Quantidade de meio de BHI + 1% de sacarose

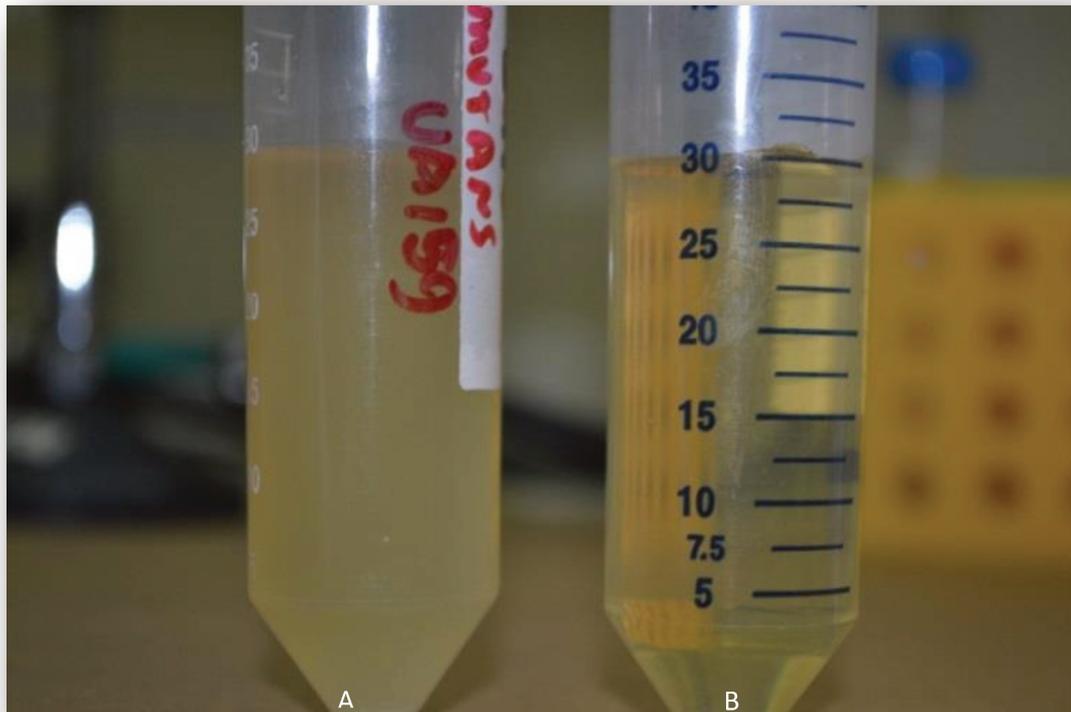


Figura 07 - Diferença no turvamento do BHI com *S. mutans* (A) e o BHI não inoculado (B), após 24 horas em estufa de CO₂.

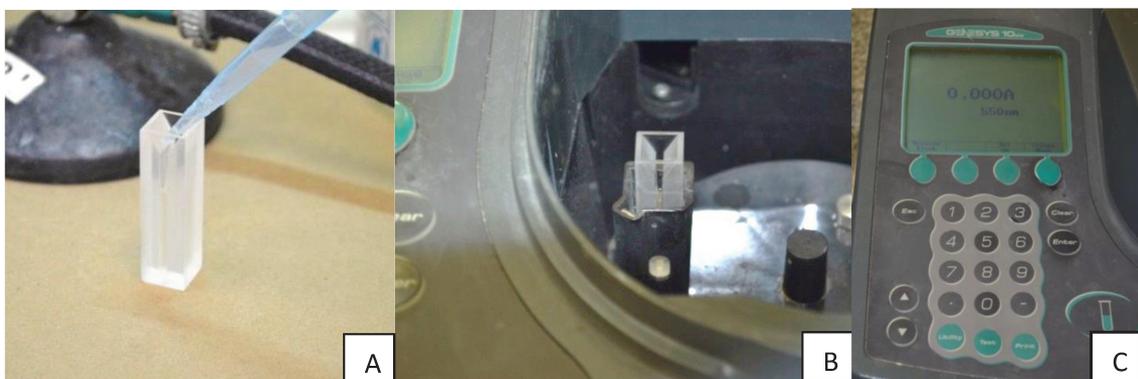


Figura 08 – Análise do crescimento bacteriano em meio BHI (A, B e C) A: deposição do meio na cubeta; B: inserção da cubeta no espectrofotômetro; C: calibração do espectrofotômetro com meio puro.

Através do mesmo procedimento realizado para a sacarose, as células de *S. mutans* foram inoculadas em 160 mL do meio BHI-Sacarose 1%. O frasco foi agitado e imediatamente utilizado. As placas foram abertas e dispensados 2 mL da mistura (BHI, *S. Mutans* e Sacarose a 1%) em cada poço da placa de cultura (Figura 09).



Figura 09: Inserção de 2 mL de solução em cada poço.

III) Tempo de produção das lesões de cárie pelo modelo biológico

Para produzir as lesões artificiais de cárie por este modelo, os substratos foram expostos ao biofilme bacteriano de *S. mutans* por diferentes tempos, de acordo com os grupos, observados os tempos determinados previamente em estudo piloto realizado comparados aos parâmetros clínicos ICDAS II (códigos 1, 2 e 3). A troca do meio (BHI + Sacarose a 1%) foi realizada a cada 24 horas. O tempo de exposição dos espécimes ao desafio cariogênico determinado para cada grupo pode ser observado no quadro 1. (Anexo 2)

Quadro 1 – Tempo determinado para exposição dos espécimes ao biofilme de *S mutans*.

Código ICDAS	Tempo
Código 1	24 horas
Código 2	4 dias
Código 3	14 dias

O critério ICDAS compreende códigos que variam de 0 a 6, dependendo da severidade da lesão, mas nesse estudo foram utilizados apenas os códigos 1, 2 e 3, os quais equivalem às seguintes características: (1) primeira mudança visual no esmalte vista somente após prolongada secagem com ar; (2) mudança visual acentuada em esmalte (seco ou úmido); (3) lesão cavitada de esmalte, localizada, e sem sinais clínicos visuais de envolvimento dentinário.

Após os períodos de desmineralização, as amostras foram lavadas com solução tampão PBS, três vezes durante dois minutos por vez, enxaguadas com água deionizada (Milli-Q) por dois minutos cada, e por fim, mantidas em umidade relativa para as posteriores análises.

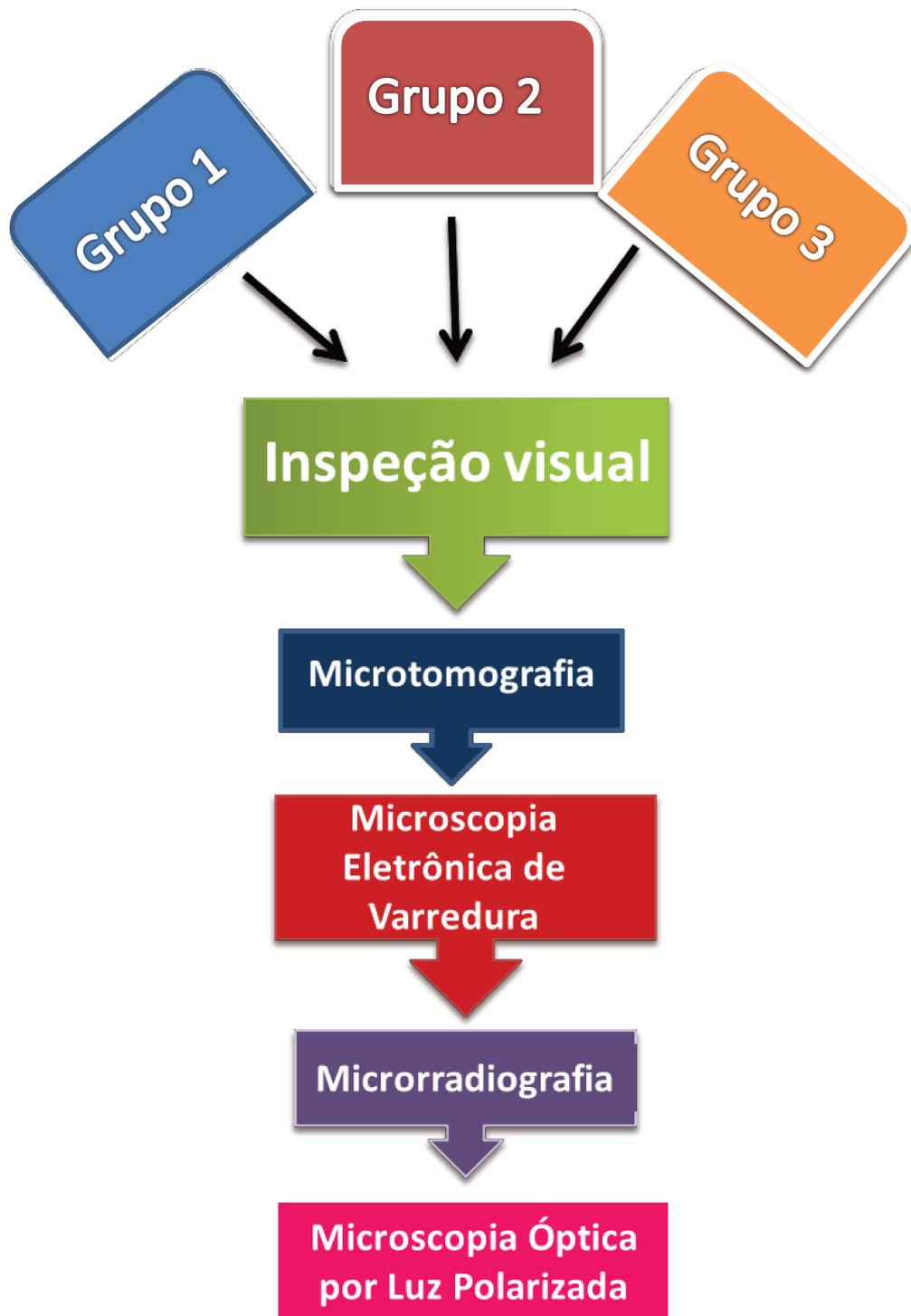


Figura 10 - Fluxograma das análises realizadas

Métodos de Análise

1. Inspeção visual dos espécimes

Previamente a análise inicial, no estudo piloto, o examinador foi previamente calibrado em estudo piloto usando fotos clínicas e um sistema de treinamento no *site* do ICDAS <https://www.icdas.org/elearning-programmes>, no link “90-minute e-learning programme available here”, um programa em parceria com a Colgate, com duração de uma hora e trinta minutos, que explica o protocolo de exame ICDAS e revisa o sistema de codificação com questões de pergunta e resposta para o treinamento (Figura 32 – Anexo 1). Após a calibração do examinador feita por treinamento no *site* o protocolo ICDAS apresenta elevada validade e reprodutibilidade, tanto para lesões *in vivo* quanto *in vitro*. (Teo *et al.*, 2014)

Os espécimes, um a um, eram cuidadosamente removidos da placa de poços, sem tocar a superfície desmineralizada, e então enxaguados em álcool 70º para a remoção do biofilme, lavados em água deionizada por um minuto, e por fim, armazenados em umidade relativa em estufa à 37ºC.

Após os espécimes serem limpos, os mesmos foram observados tanto secos (com secagem prolongada através de jato de ar) como úmidos (enxaguando o espécime em água deionizada) (Figura 11) - a fim de se observar a diferença da coloração da superfície de esmalte notando a presença ou ausência de “manchas brancas” características de lesões iniciais de cárie, de acordo com os parâmetros clínicos ICDAS II. Todos os espécimes que foram submetidos ao desafio ácido foram comparados com um espécime hígido (Figura 12).



Figura 11 - Diferença da coloração do esmalte úmido e seco, identificando lesão de mancha branca apenas no substrato seco, condizente ao código 1 ICDAS.

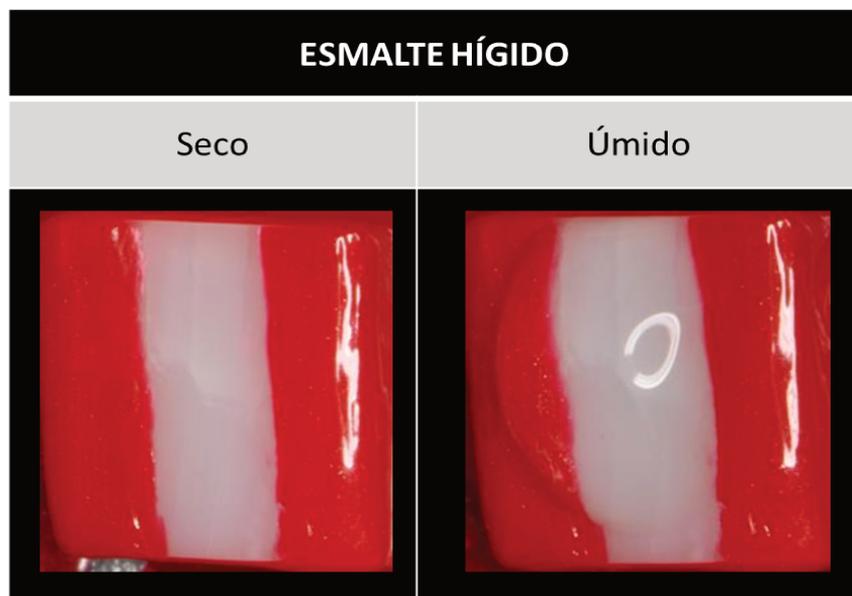


Figura 12 – Espécime hígido (sem ter sido submetido ao desafio ácido) tanto seco como úmido para comparação e identificação dos grupos.

2. Avaliação por Microtomografia Computadorizada (μ -CT)

Após os registros fotográficos, todos os espécimes foram submetidos à análise por μ -CT. Inicialmente, o verniz ácido resistente foi removido. Os blocos foram fixados com cola a base de cianocrilato (Superbonder Loctite, São Paulo, Brasil), formando 'totens' compostos por 4 blocos cada, fixados lateralmente, com a superfície que foi exposta ao desafio cariogênico pelo biofilme livre e dispostas na mesma direção, como mostrado na Figura 13. Esses 'totens' foram submetidos à exposição no scanner μ -CT SkyScan 1174 de alta resolução (SkyScan, Kontich, Belgium) sob 50 kV e 800 μ A, usando filtro de alumínio de 0,5 mm para eliminar os raios X de baixa potência. Como parâmetros, foi selecionado nas configurações do programa: "*small camera pixels*" (30,04 μ m) e os passos de rotação foram ajustados para 0,80°, permitindo a rotação de 360° do espécime. As imagens foram gravadas em computador para análise em 2D e 3D. Cada espécime foi escaneado na totalidade de suas dimensões durante um tempo de 2 horas e 40 minutos.+.

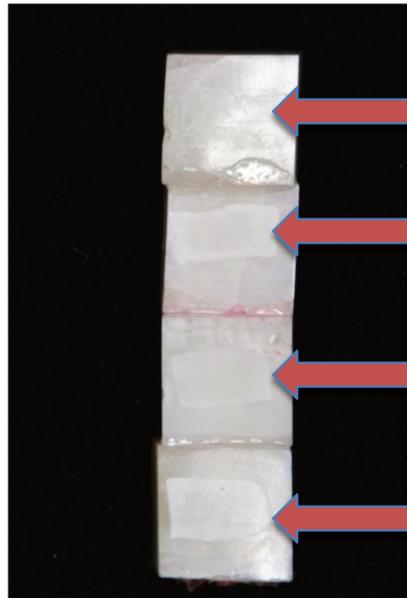


Figura 13 – Totem montado a partir de 4 espécimes do mesmo grupo fixados lateralmente. Seta rosa aponta a área desmineralizada do espécime.

Para reconstrução das imagens, foi utilizado o programa do equipamento μ -CT SkyScan, chamado NRecon (NRecon, SkyScan, Kontich, Belgium) (Figura 14). O programa lê imagens de projeção de 16 bits angulares salvos pelo programa de controle e reconstrói as fatias virtuais (seções transversais). Antes da reconstrução,

foram realizadas as correções necessárias da imagem, como a compensação de desalinhamento (máximo de $\pm 8,0^\circ$) e a redução de artefatos em anel, mantendo os mesmos parâmetros de digitalização, visando máxima nitidez de imagem e a entrada dos limites de contraste ideal, com base no escaneamento prévio e reconstrução do espécime. Para isto, foram realizados dois escaneamentos prévios em cada amostra, sendo as imagens reconstruídas em 3D, conforme instruções do fabricante.

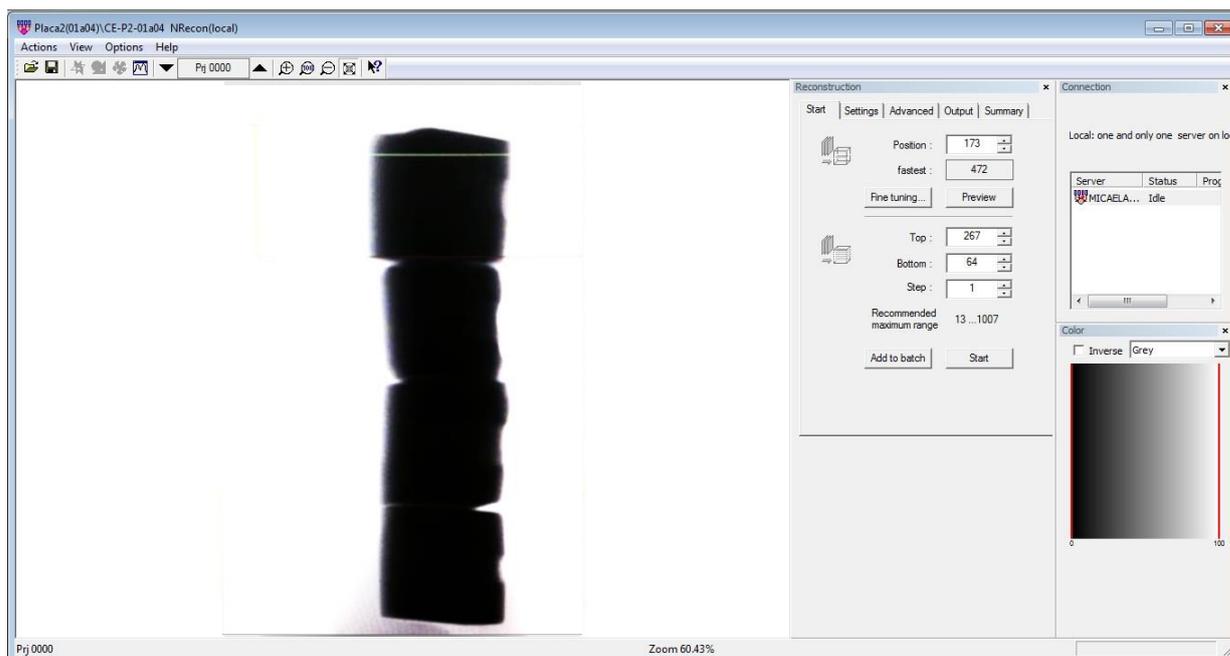


Figura 14 – Ilustração de página do Programa NRecon durante a reconstrução das imagens.

Após a reconstrução, as fatias seccionais foram abertas no programa Dataviewer (Dataviewer, SkyCan, Kontich, Belgium), o qual foi usado para salvar as vistas coronal, sagital e transaxial, permitindo selecionar a vista coronal para a análise, como demonstrado na figura 15.

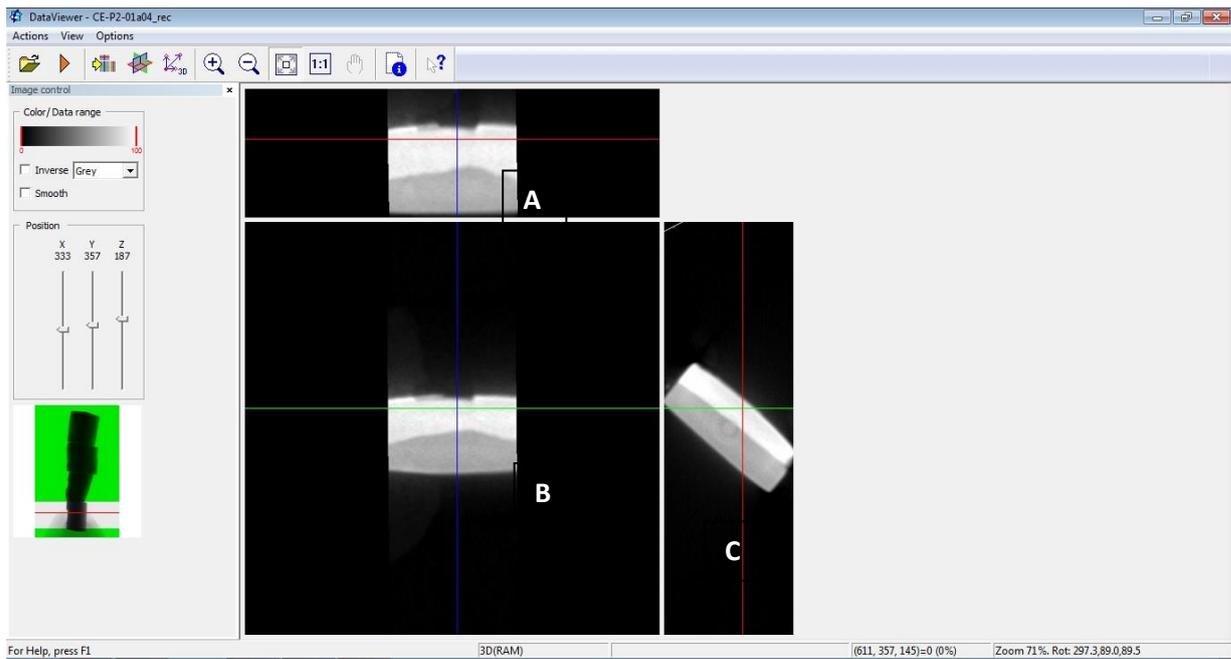


Figura 15 – Tela do programa DataViewer durante a gravação das imagens em cortes coronal (A), sagital (B), e transaxial (C).

As imagens da vista coronal foram selecionadas para realizar as mensurações desejadas. Então, todas as fatias coronais de cada amostra (uma a uma) foram abertas no programa CTAn (SkyScan, Kontich, Belgium) (Figura 17), sendo selecionada a região de interesse (ROI) para as mensurações, que compreendem um total de 102 fatias localizadas na região central do espécime, conforme ilustra a Figura 16, cujas dimensões de superfície eram aproximadamente de 5 x 2 mm (10 mm²). A largura da ROI (5,0 mm) incluía as duas faixas laterais, de 1,5 mm, equivalentes à área controle, que estiveram cobertas por verniz ácido resistente e, entre estas, uma faixa de 2,0 mm de largura compreendendo a lesão (2 x 2mm).

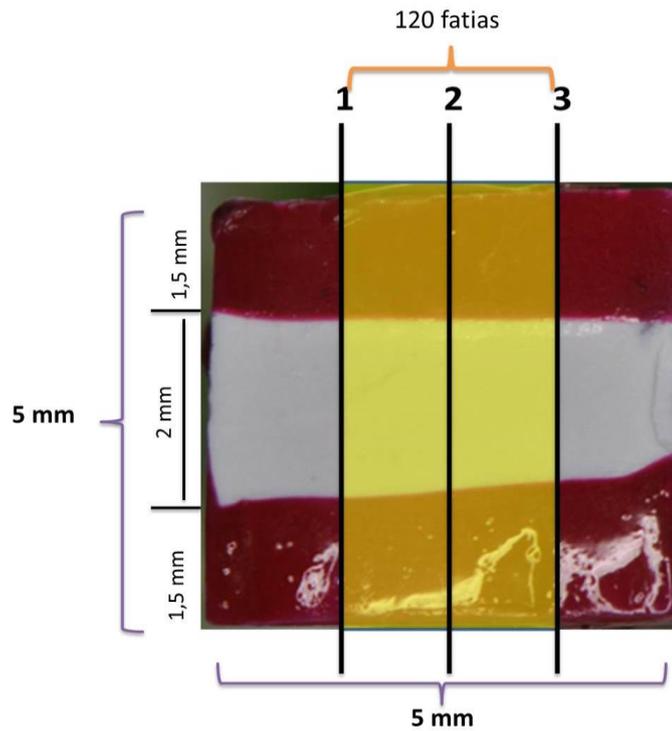


Figura 16: Ilustração da região selecionada para as análises em μ -CT (ROI), e a localização das três fatias selecionadas para as análises 2D sendo 1, 2 e 3 – as fatias selecionadas para análise.

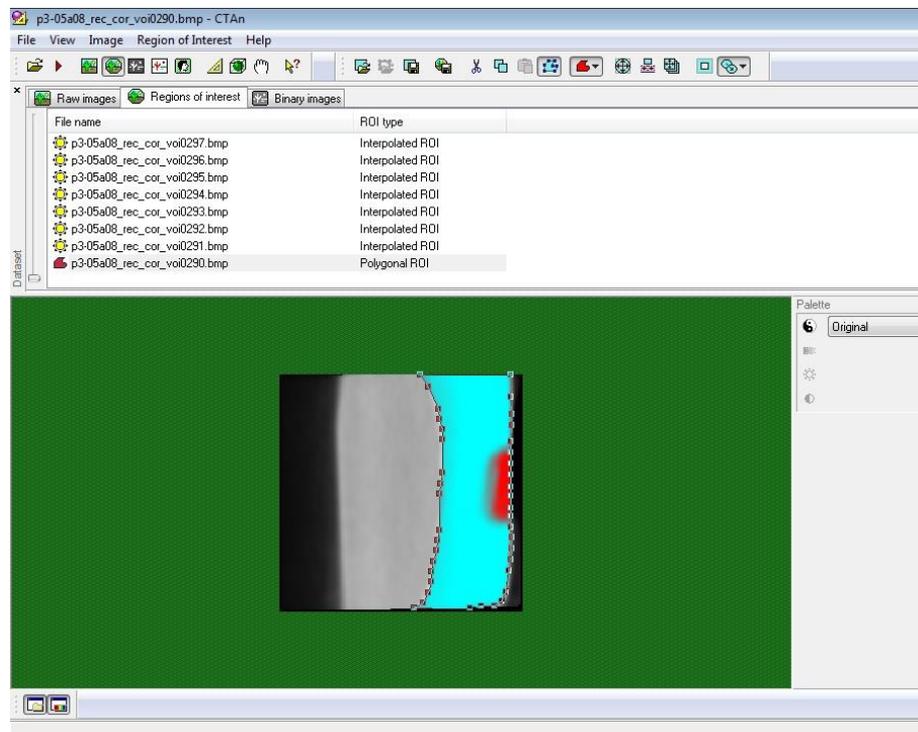


Figura 17 – Programa CTAn com a área a ser mensurada selecionada (em azul esmalte hígido e, em vermelho, lesão de cárie).

As análises em μ -CT, permitiram a avaliação dos seguintes parâmetros:

1. Análise 2D área da lesão e do esmalte hígido das fatias (mm^2);
2. Análise 3D – volume hígido total e volume total da lesão (mm^3). Compreende a média da leitura das áreas hígida e de lesão das três fatias selecionadas na ROI, conforme ilustrado na Figura 16.

Por meio desta metodologia foram avaliados e comparados dois dos três grupos, grupo 2-ICDAS 2, e grupo 3 – ICDAS 3. Os dados obtidos a partir das análises 2D (área de lesão e de esmalte hígido abaixo da lesão, em %, das fatias longitudinais) e 3D (volume total da lesão e do esmalte hígido) foram tabulados e submetidos a testes estatísticos, que após a verificação da distribuição normal dos dados, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. Análise da Topografia de superfície do esmalte em microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Após a análise dos espécimes no μ -CT, todos os espécimes ($n=15$) foram moldados com silicone polimerizado por adição (Figura 18A) extra leve (Aquasil XL – Dentisply - Figura 18B) e replicados com resina epóxica (Epoxicure™, Buheler - Figura 18C). Estas réplicas foram montadas em *stubs* específicos para uso no MEV e metalizadas com ouro-paládio em metalizador (Balzers-SCD 050 Sputter Coater, Liechtenstein), por 120 segundos (Figura 18D). As réplicas foram observadas em MEV (JEOL – JSM 5600LV, Japan) em tensão de aceleração de 15 kV e distância de trabalho de 12 a 15 mm. A superfície de todos os espécimes, foram analisadas segundo os aspectos estruturais do esmalte hígido e da área da lesão de cárie, em aumentos de 35x e 500x. Foi realizada análise descritiva das áreas observadas.

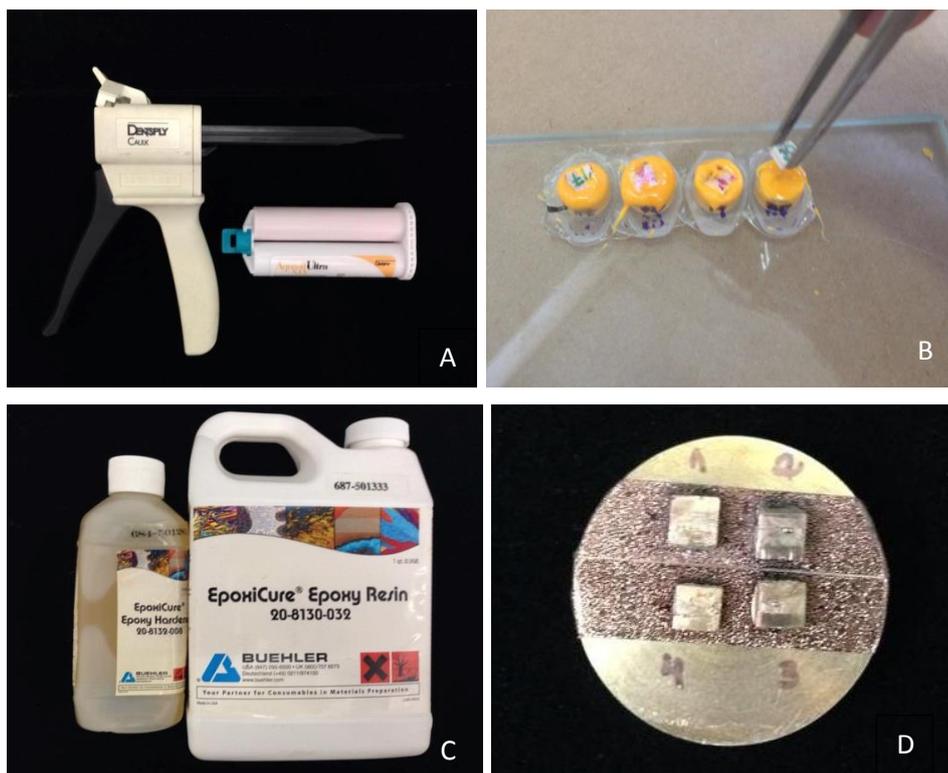


Figura 18 – Confeção das réplicas para análise da topografia de superfície em MEV – A: Material de moldagem; B: Moldagem das amostras; C: Resina epóxica; D: Amostras metalizadas com ouro paládio montadas em *stub*.

4. Análise por Microrradiografia Transversal (TMR)

Após a moldagem para confecção das réplicas para análise em MEV, os espécimes foram seccionados em três fatias com disco de disco diamantado dupla face (Dia. Wafer Blade 12205, Extac Corp., CT, USA) perpendicularmente à superfície exposta, obtendo-se fatias de aproximadamente 0,5 mm de espessura, as quais foram polidas manualmente de ambos os lados com lixas de SiC P1200 e P2500 (Carbinet, Buehler Ltd, Lake Buff, IL, USA) sob constante irrigação com água deionizada até atingir a espessura de 100 μm (n=10) verificada com paquímetro digital (Mytutoyo, Suzano, São Paulo, Brasil) (Figura 19 A e B).

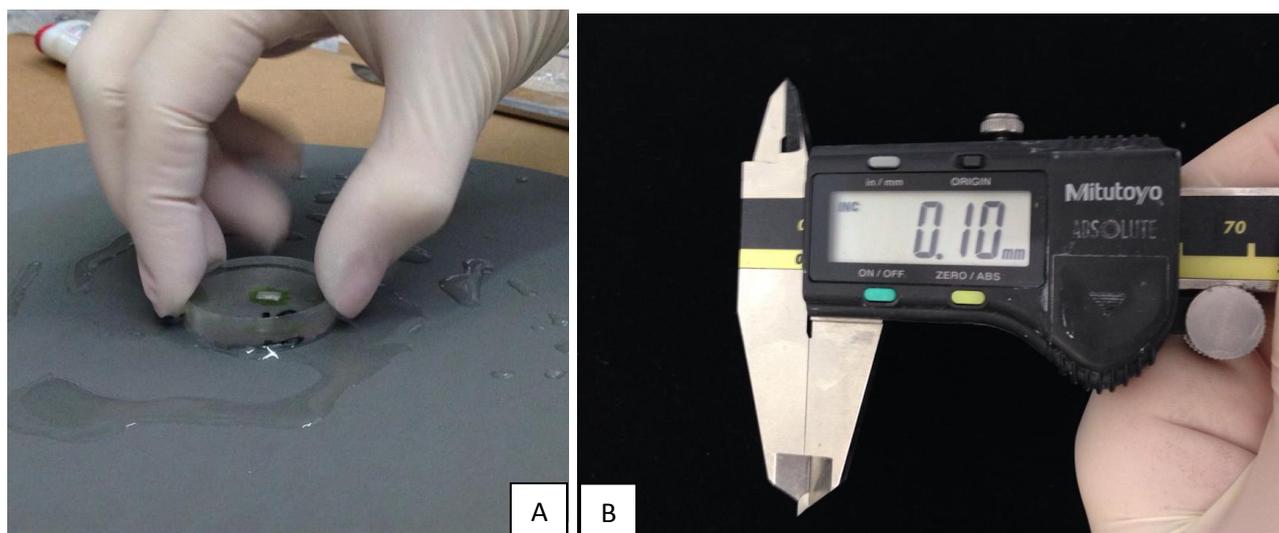


Figura 19 (A e B) – A: Polimento manual dos espécimes com lixa de carbeto de silício; B: Mensurando a espessura da amostra com paquímetro digital.

Os espécimes foram dispostos com fita adesiva em retângulos vazados na placa de PVC (Schutkaarter PVC, Kangaro, Zupten, Holanda), de 300 μm de espessura, medindo 51 x 51 mm. Em cada placa foram fixadas, aproximadamente, 24 amostras. Em um terceiro retângulo vazado, localizado centralmente na placa, foi fixado o padrão de alumínio ('*Stepwedge*') com 14 diferentes espessuras, que permitiu gerar a imagem controle para calibração dos tons de cinza no software. A placa foi inserida em um *cassette* (Figura 20 A) juntamente com uma placa de vidro de alta resolução própria para análise em Microrradiografia, medindo 5 x 5 mm (PXHW HPP, HRP-SN-2, Konica Minolta, Japan), em ambiente escuro, e este conjunto foi inserido em revestimento negro dentro do gerador de raios X (Softex, Japan; na FOB/USP) (Figura 20 B), o qual ajustado para exposição a 20 kV e 20 mA, por 20 minutos. Após a exposição, as placas de vidro foram reveladas e fixadas em ambiente escuro a 20 °C e, então, lavadas em água corrente por 10 minutos. (Figura 21 A)

Em seguida, as imagens radiográficas de alta resolução obtidas foram analisadas em microscópio de luz transmitida com objetiva de 20x (Axioplan; Zeiss, Oberkochen, Germany) e uma câmera CCD (XC-77CE, Sony, Tóquio, Japão) conectada a um computador com uma placa de captura, aquisição de dados e software de cálculo TMR 2012.4.0.0.9 (Inspector Research BV, Amsterdam, Holanda) (Figura 21 B). O sinal analógico da câmera CCD foi digitalizado com a placa de captura (Flashpoint 3D; Integral Technologies, Indianapolis, Indiana, EUA). Uma área de 400 x

315 μm da fatia da amostra original foi exibida e fotografada usando os parâmetros descritos a seguir.

Para o grupo ICDAS 1, os parâmetros analisados foram: ΔZ (produto da diferença entre a porcentagem de volume mineral do esmalte sadio e a porcentagem de volume mineral desmineralizado em relação à profundidade da lesão, LD (*'lesion depth'*, que é a distância da superfície até a profundidade em que o esmalte volta a apresentar um conteúdo mineral igual ou maior que 95% do conteúdo mineral do esmalte sadio – (Arends *et al.*, 1987; Magalhães *et al.*, 2009) e *ratio* ($\Delta Z/LD$, que representa a média de perda mineral ao longo da lesão). Para os códigos 2 e 3 apenas foi possível identificar os valores de LD, pois os espécimes apresentavam erosão.

Os resultados foram tabulados e submetidos a testes estatísticos, que após a verificação da distribuição normal dos dados, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov considerando-se $p < 0,05$, foram submetidos à análise de variância para experimento inteiramente casualizado, que evidenciou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,01$). Foi, então, realizado o teste complementar de Tukey a 5% a fim de identificar estas diferenças.



Figura 20 (A e B) – A: As amostras dispostas em placa de PVC e montada no cassete; B: O equipamento de RX da TMR.



Figura 21 – A: Lavagem da placa de vidro durante 10 minutos; B: Microscópio para análise das imagens.

5. Avaliação em microscopia óptica por luz polarizada (MLP)

Para a análise em MLP, espécimes de 100 μm de espessura ($n=10$), utilizados na TMR foram utilizados para análise por Microscopia Óptica por Luz Polarizada. Os espécimes foram dispostos sobre lâminas de vidro para microscopia óptica, embebidos em água para visualização no microscópio de luz polarizada (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemanha), usando a interface do filtro lambda (ampliação) de uma câmera digital de alta resolução (DFC 280; Leica Microsystems; Wetzlar, Alemanha). Foi utilizado o software LAS de análise de imagem (Leica Microsystems). As imagens captadas com aumento de 5x e 10x e foram transferidas para o computador por meio do programa Luz Polarizada, Leica, DMPL. A análise descritiva foi realizada em ambas as lentes e a mensuração da profundidade da lesão de cada espécime foi realizada somente nas micrografias obtidas com a lente de aumento 5x. Para mensuração foram realizadas duas mensurações (uma em cada extremidade da lesão) e a média aritmética dessas duas medidas foi considerada como sendo a profundidade da lesão do espécime.

Os dados foram tabulados e submetidos aos testes estatísticos Kolmogorov-Smirnov a 5%, que após a verificação da distribuição normal dos dados, foram submetidos à análise de variância para experimento inteiramente casualizado ($p<0,05$).

5. RESULTADOS

5.1) Inspeção visual

Foi possível produzir lesões artificiais de cárie pelo modelo biológico (Figura 22), semelhantes aos parâmetros clínicos ICDAS II, códigos 1, 2 e 3, respectivamente nos tempos de 24 horas, 4 e 14 dias em desafio ácido por biofilme de *S. mutans*.

Seca	Úmida	Código ICDAS	Características
		1	Primeira mudança visual no esmalte vista somente após prolongada secagem com ar
		2	Mudança visual distinta em esmalte. Não há mudança na coloração com a amostra seca e úmida.
		3	Lesão cavitada de esmalte localizada sem sinais clínicos visuais de envolvimento dentinário.

Figura 22 – Lesões artificiais de cárie, com aspecto visual semelhante ao estabelecido pelo Protocolo ICDAS II, códigos 1, 2 e 3.

Nas lesões cariosas dos espécimes caracterizados como código 1, o esmalte quando úmido, apresentou-se sem nenhuma mudança visual na característica de sua cor e translucidez em relação ao esmalte não desmineralizado, apresentando-se translúcido quando úmido. Porém, após a prolongada secagem observou-se o aparecimento da coloração branca opaca sobre a superfície do esmalte, confirmando presença de alteração por desafio ácido caracterizado como lesão de mancha branca.

Nos espécimes caracterizados como código 2, tanto com o esmalte úmido como após prolongada secagem, o aspecto de estrias brancas eram evidentes.

Nos espécimes caracterizados como código 3, pode-se notar a presença de perda estrutura do esmalte, sugerindo cavitação.

5.2) Microtomografia Computadorizada (μ -CT)

Os resultados obtidos por meio do microtomógrafo SkyScan 1174 (Bruker – MicroCT, Kontich, Belgium) mostraram que as análises por μ -CT, só permitem visualizar e mensurar os lesões do tipo ICDAS 2 e 3, cujas lesões são mais avançadas, ou seja, de maiores profundidades.

Na tabela 1 podem ser encontrados os valores médios e desvio padrão da área e do volume da lesão de cárie para as lesões códigos ICDAS 2 e 3 e os resultados da análise estatística ANOVA.

Tabela 1 – Média e desvio padrão das porcentagens de área e volume de esmalte hígido e de lesão de cárie para os grupos ICDAS 2 e 3 (Análise 2D/3D).

Substrado de esmalte	Área		Volume	
	ICDAS 2	ICDAS 3	ICDAS 2	ICDAS 3
Lesão	5,36 (1,41) B	10,47 (2,88) A	8,24 B	10,04 A

*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as lesões ICDAS 2 e 3, para Área e Volume, individualmente. ($p < 0,05$).

A análise estatística (ANOVA) mostrou diferença significativa, quanto à área e ao volume da lesão de cárie para os códigos ICDAS 2 e ICDAS 3, sendo significativamente maiores para o grupo ICDAS 3. Para o grupo ICDAS 1, a análise evidenciou que o teste não foi viável ou não apresentou sensibilidade para detecção das lesões de subsuperfície, uma vez que não foi possível observá-las em nenhum dos espécimes.

5.3) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens da superfície do esmalte dos diferentes grupos estão apresentadas nas Figuras 23 A, B, C, D, E e F. O esmalte da área controle dos três grupos apresentou aparência organizada, sem evidenciar irregularidades ou qualquer espaçamento entre os cristais (Figuras 23 A, C, e E). Ainda, eventualmente, em alguns espécimes dos três grupos, pôde ser observada a presença de *Streptococcus mutans* residuais (Fig 23 B – seta branca). Áreas desmineralizadas foram encontradas nos três grupos, evidenciando aumento de alteração estrutural a medida que o tempo de exposição ao biofilme aumentou. Para o grupo ICDAS 1, demonstrado na Figura 23 B, em aumento 500x, pode-se observar lisura de superfície, com discreta irregularidade, com aspecto de orifícios (seta branca), que são produzidos pela penetração do *S. mutans*. Também pode ser evidenciada alterações moderadas na superfície pelo aumento de porosidades. Para o grupo ICDAS 2, demonstrado na Figura 23 C e D, em aumento de 500X, pode-se observar que a área da lesão apresenta superfície irregular, com perda da lisura inicial, e também orifícios provocados pelos *S. mutans* (seta branca), semelhantes àqueles observados no grupo ICDAS 1. No grupo ICDAS 3, a irregularidade da superfície do esmalte apresentava-se mais acentuada do que no grupo ICDAS 2 (Figura 23 E e F), apresentando-se totalmente irregular com intensa erosão, grande perda de características de seus prismas e desorganização da estrutura do esmalte.

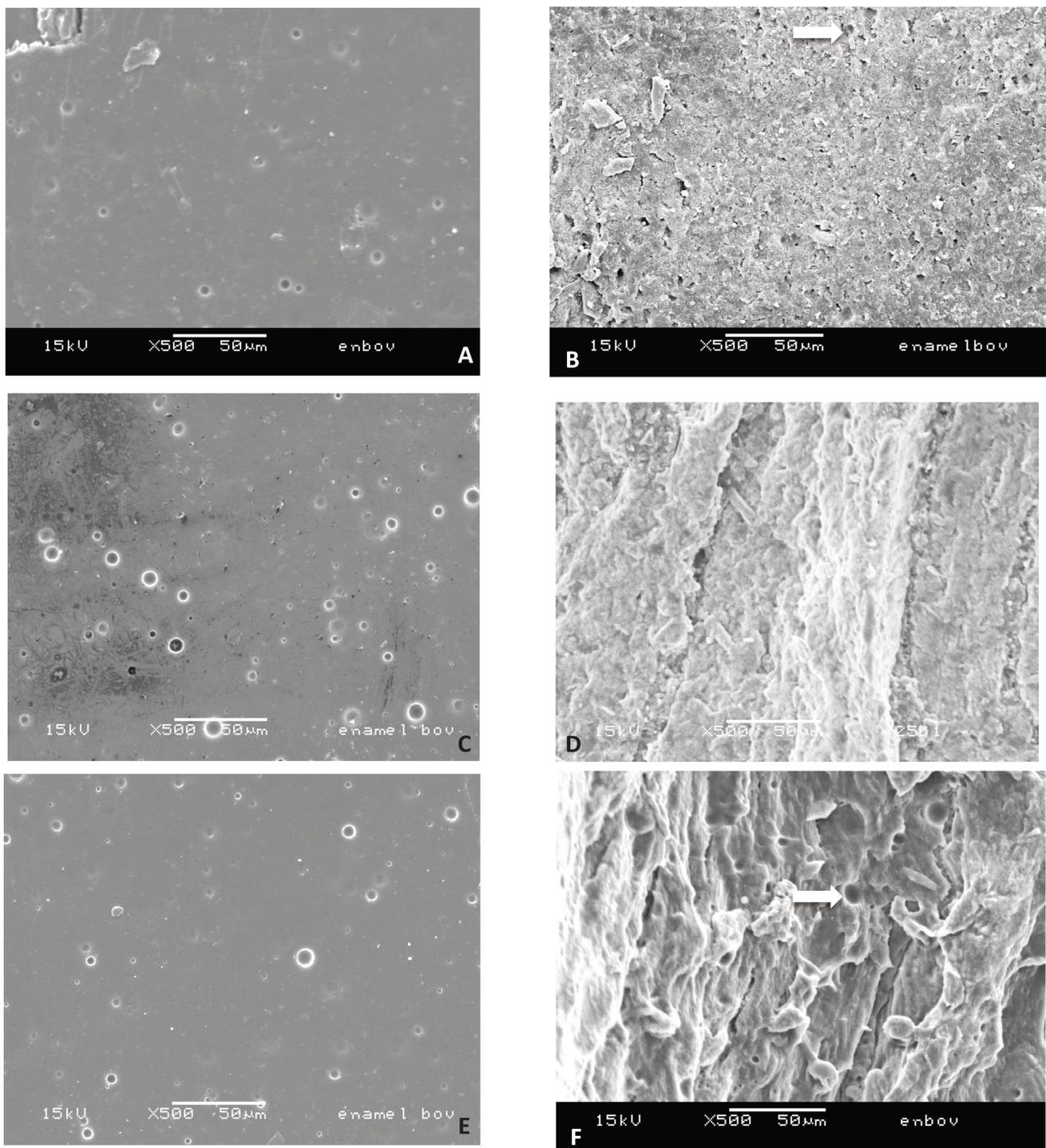


Figura 23 – alterações da superfície das áreas de desmineralização. A e B - Lesão identificada como Código ICDAS 1 – (A) área controle, hígida; (B) aparentes alterações superficiais menos extensas, com alguma porosidade superficial e orifícios atribuídos a atividade dos *S. mutans* (seta branca); C e D - Lesão identificada como Código ICDAS 2 – (C) área controle, hígida; (D) alterações superficiais de maior intensidade, com alterações com perda da lisura superficial; F e G – Lesão identificada como Código ICDAS 3 – (E) área controle, hígida; (F) após 14 dias de exposição ao biofilme de *S. mutans* a superfície aparenta intensa alteração de estrutura, aumento de porosidades e erosão, presença de *S. muntans* remanescente na estrutura do esmalte desmineralizado (seta branca).

5.4) Análise por Microrradiografia (TMR)

Para o código 1, foram identificados os seguintes parâmetros: ΔZ , LD e a razão entre a perda mineral integrada vezes a porcentagem do volume mineral (*ratio*). Para os códigos 2 e 3 apenas foram identificados os valores de LD, pois nestes grupos as lesões apresentaram erosão e destruição da camada superficial.

A tabela 2 apresenta a média e o desvio padrão de LD, ΔZ e *ratio* do grupo ICDAS 1 estão apresentados abaixo, na Tabela 3.

Tabela 2 – Média e desvio padrão de LD (grupos ICDAS 1, 2 e 3), ΔZ e *ratio* do grupo ICDAS 1.

	LD (μm)	ΔZ (% do vol. μm)	Ratio (%)
ICDAS 1	50,71(9,04) C	1634,0(439,53)	31,86(4,99)
ICDAS 2	183,36 (13,21) B	_____	_____
ICDAS 3	383,00 (5,27) A	_____	_____

*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as lesões ICDAS 1, 2 e 3, quanto a profundidade da lesão (LD). ($p < 0,05$).

Pode-se observar que na lesão classificada como ICDAS 1, a profundidade média de lesão produzida pelo biofilme de *S. mutans* foi de 51 μm , apresentando ΔZ de 1634% vol. μm e taxa de desmineralização de 32%. Os resultados de LD evidenciam o aumento progressivo da profundidade da lesão de acordo com o tempo de exposição ao biofilme (24h- ICDAS 1, 48h-ICDAS 2 e 14 dias – ICDAS 3).

A seguir podem ser observadas imagens representativas de TMR, nas Figuras 24 A, B e C respectivamente ICDAS 1, 2 e 3.

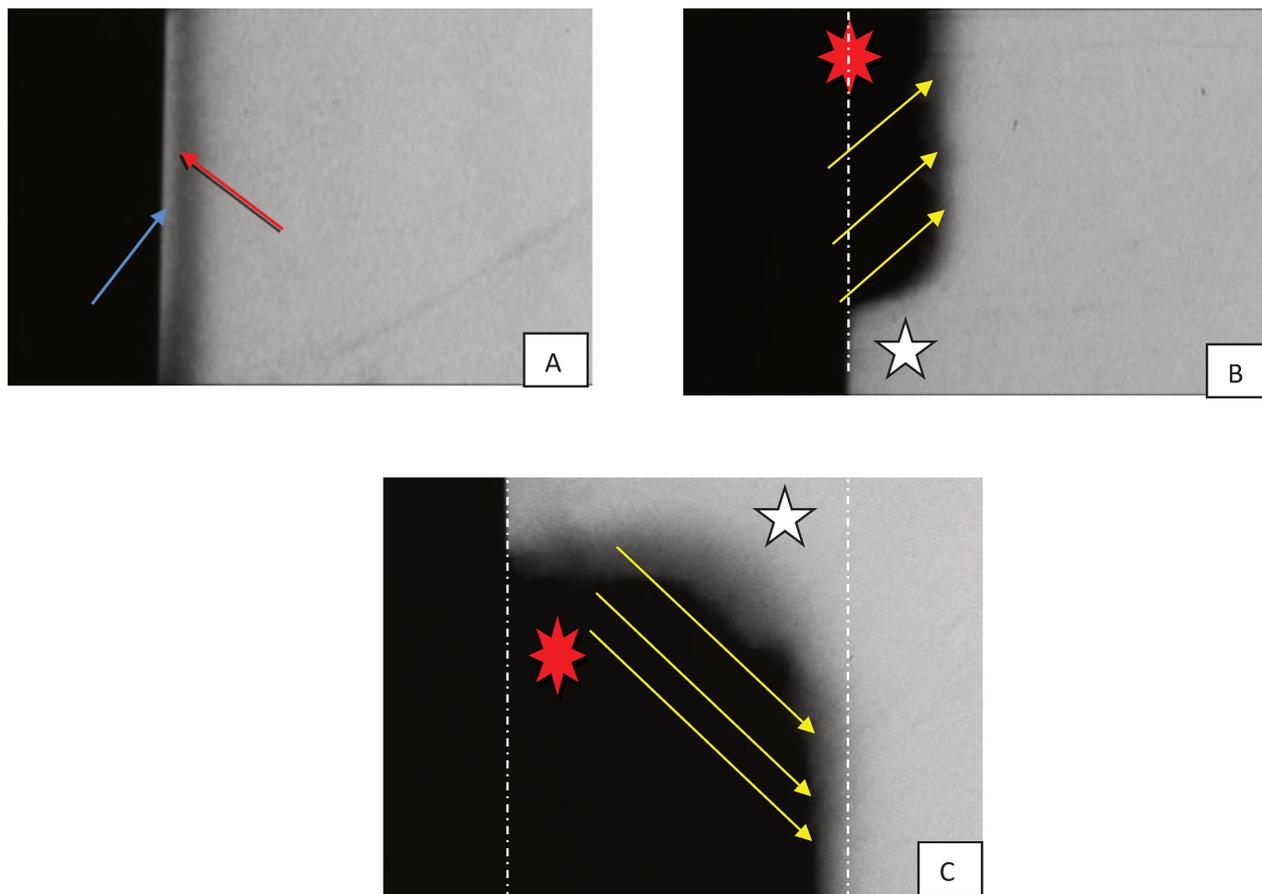


Figura 24 – (A) Lesão ICDAS 1 (Lente 20x). Foi detectada lesão de subsuperfície de esmalte, identificando-se duas principais regiões: superficial, mais mineralizada (seta azul); subsuperficial – área abaixo da região mineralizada apresentando-se desmineralizada (seta vermelha). – (B) Lesão ICDAS 2 (Lente 20x). Região hídrica apresenta-se regular (estrela branca); estrela vermelha – região com perda de estrutura do esmalte; setas amarelas – indicam presença de área desmineralizada. (C) Lesão ICDAS 3 (Lente 20x). Região hídrica apresenta-se regular (estrela branca); estrela vermelha – região com grande perda de estrutura do esmalte; setas amarelas – indicam presença de área desmineralizada.

5.5) Avaliação em microscopia óptica em luz polarizada (MLP)

As análises, quantitativa da profundidade de lesão (5x) e descritiva das imagens obtidas em microscopia óptica em luz polarizada (5x e 10x), permitem afirmar que houve diferença entre os grupos. O grupo ICDAS 1 apresentou lesão de subsuperfície, com presença de superfície mineralizada (Figura 25); o grupo ICDAS 2 exibiu ausência de superfície mineralizada, apresentando cavitação, com área desmineralizada circundando a cavidade (Figura 26); e o grupo ICDAS 3 apresentou

cavitação mais profunda em relação ao grupo ICDAS 2, com grande perda de estrutura do esmalte, também circundada por área desmineralizada (Figura 27).

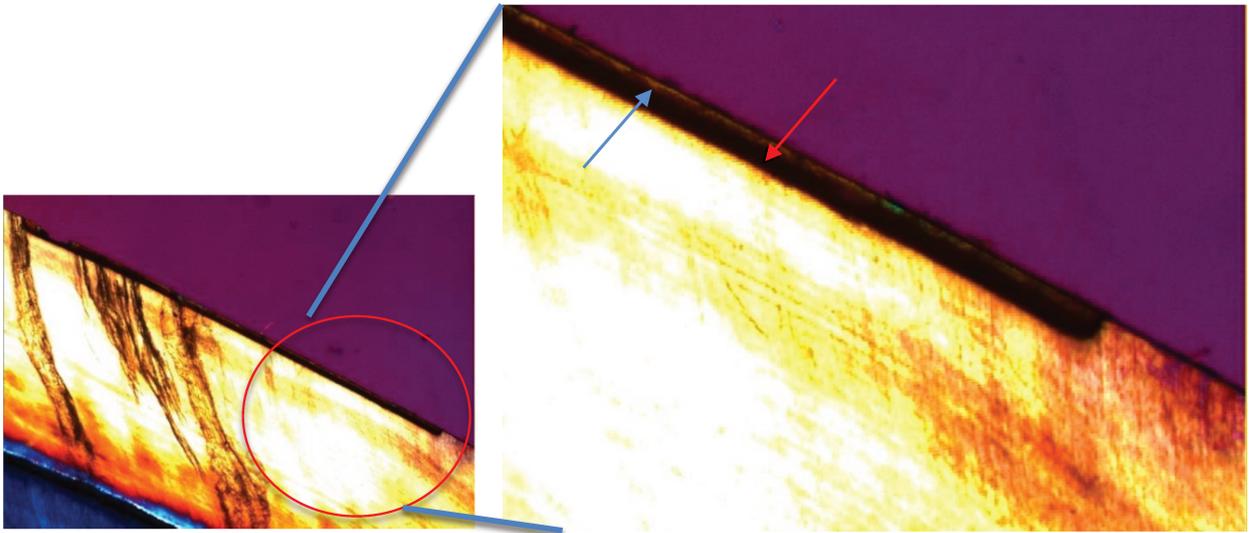


Figura 25 - Lesão de Cárie do Grupo ICDAS 1 – Aumento 5x: pode ser observada a lesão de subsuperfície de esmalte (imagem à esquerda); Detalhe 10x: região superficial, mais mineralizada (seta azul); subsuperficial – área desmineralizada logo abaixo, apresentando-se mais escura (seta vermelha).

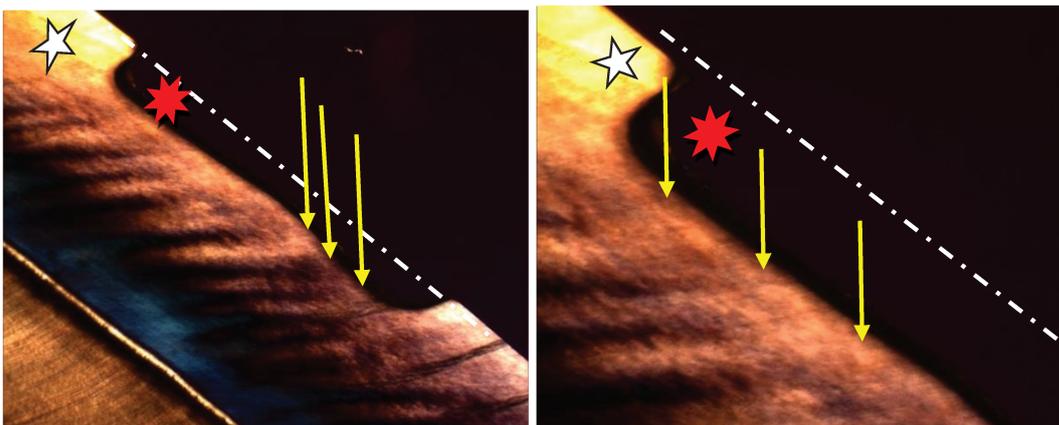


Figura 26 - Lesão de Cárie do Grupo ICDAS 2 – Aumento 5x e 10x - Região hígida apresenta-se regular (estrela branca); estrela vermelha – área cavitada; setas amarelas – indicam presença de área desmineralizada.

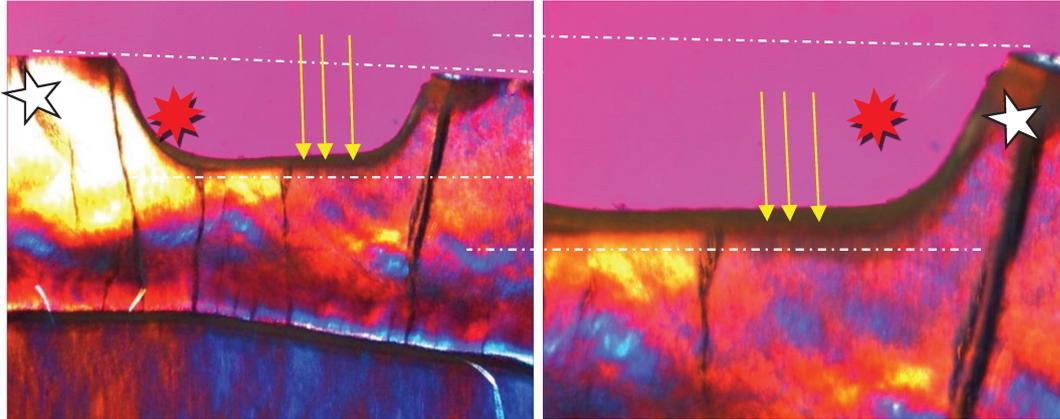


Figura 27 - Lesão de Cárie do Grupo ICDAS 3 – Aumento 5x e 10x - Região hígida apresenta-se regular (estrela branca); estrela vermelha – área acentuadamente cavitada; setas amarelas – indicam presença de área desmineralizada.

Além da análise descritiva das lesões, também foi mensurada, por meio do software LAS, a profundidade de cada lesão, obtida pela pelo cálculo da média de duas medidas, tendo como parâmetro a área controle (Figura 28).

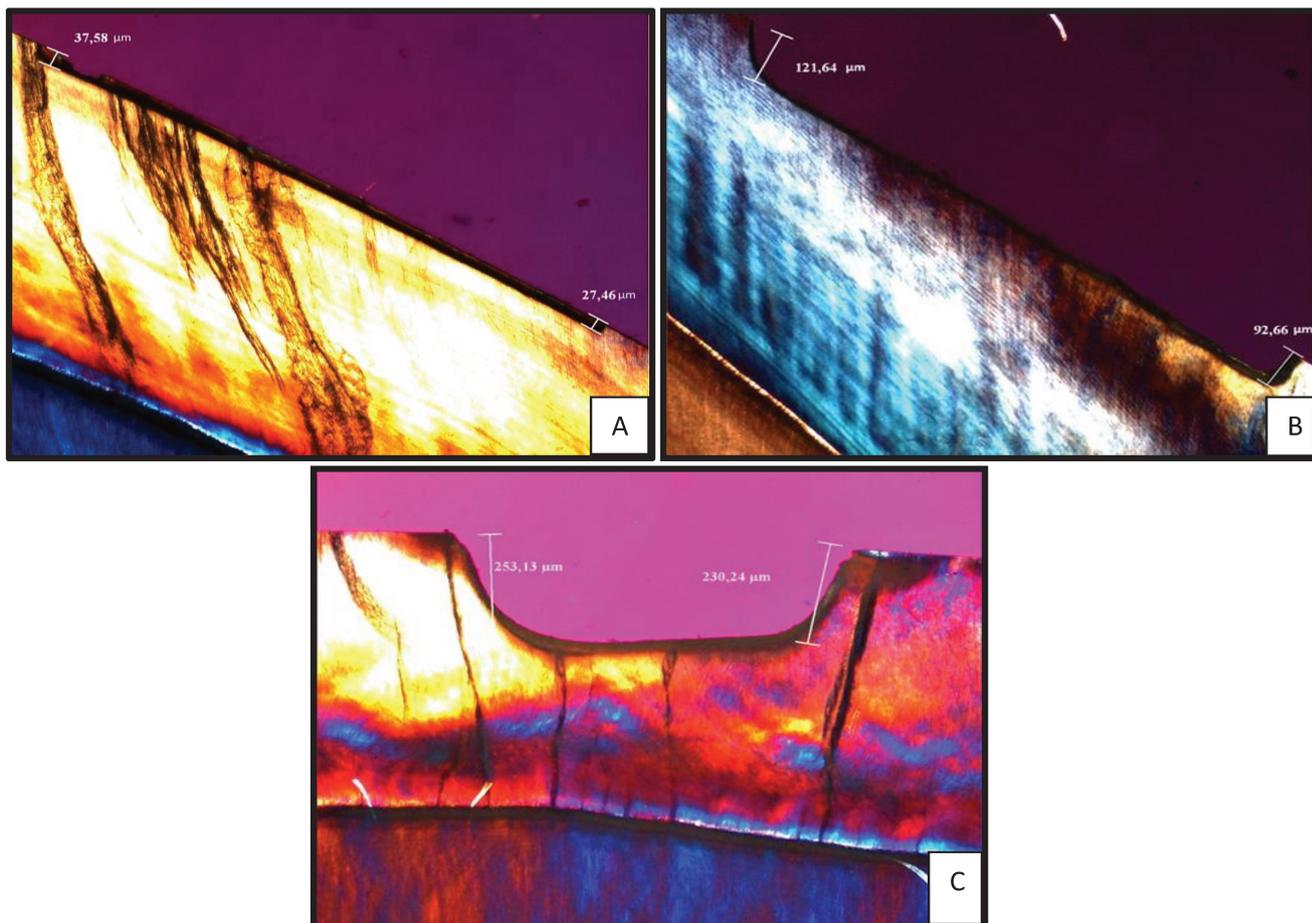


Figura 28 – Ilustração da mensuração da profundidade de lesão de cada grupo: ICDAS 1 (A), ICDAS 2 (B) e ICDAS 3 (C).

Na tabela 3 podem ser encontradas as médias e desvio padrão da profundidade de lesão observada em MLP.

Tabela 3 - Média e desvio padrão para a profundidade da lesão para os grupos ICDAS 1, 2 e 3.

	ICDAS 1	ICDAS 2	ICDAS 3
Média (DP)	46,24 (7,40) C	124,35 (10,30) B	242,13 (25,86) A

*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as lesões ICDAS 1, 2 e 3. ($p < 0,05$).

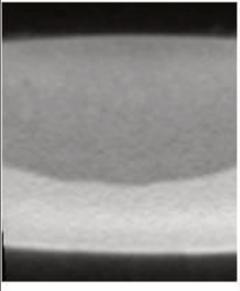
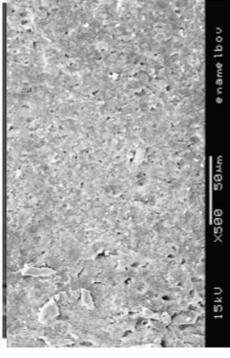
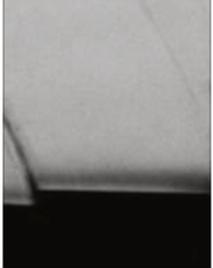
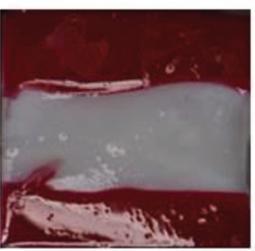
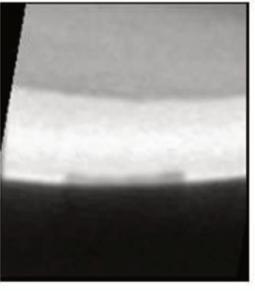
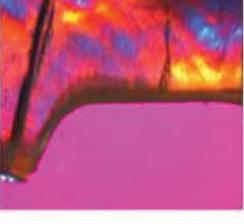
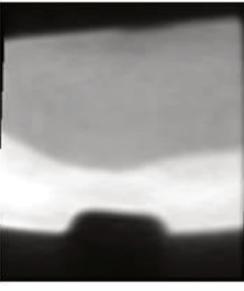
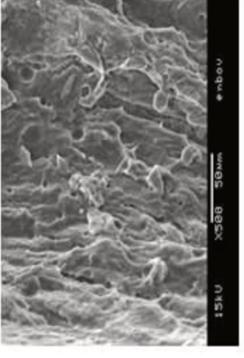
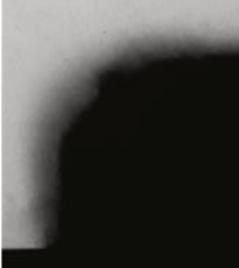
Pode-se observar que os resultados evidenciam o aumento progressivo da profundidade da lesão de acordo com o tempo (24h- ICDAS 1, 48h-ICDAS 2 e 14 dias

– ICDAS 3), sendo a menor profundidade atribuída para o grupo ICDAS 1 (46,24 μm) e a maior para o grupo ICDAS 3 (242,13 μm).

Na Figura 32, a seguir, podem ser analisadas as diferentes codificações das lesões de cárie artificial em esmalte, determinadas pelos diferentes tempos de desmineralização em biofilme de *S. mutans*, avaliadas por diferentes análises.

Pelas análises realizadas neste estudo, resumidas na próxima figura, pode-se dizer que em 24 horas o biofilme de *S. mutans* produziu lesões artificiais de cárie em esmalte, visualmente similares às aquelas classificadas como ICDAS 1, que foram identificadas pela MLP como lesões subsuperficiais. Similares resultados foram observados quando utilizada a TMR, porém o μ -CT não permitiu visualizá-las. Lesões visualmente similares às lesões ICDAS 2 e 3, foram produzidas, respectivamente, em 4 e 14 dias pelo biofilme de *S. mutans*. As análises por MLP, TMR e μ -CT evidenciaram maior desmineralização e cavitação no grupo ICDAS 3. Para os três grupos, a análise em MEV fornece apenas informações qualitativas da topografia de superfície das lesões.

Figura 32 - Características das lesões código 1, 2 e 3, produzidas artificialmente por biofilme de *S mutans*, referindo-se a microscopia de luz polarizada, MEV, μ CT e TMR.

Código ICDAS		Avaliação por Microscopia				
Avaliação visual		Luz polarizada	μ -CT	MEV	TMR	
1	 					
2	 					
3	 					

6. DISCUSSÃO

A aparência de um dente natural é determinada pelas características ópticas da estrutura do esmalte e da dentina. Essas características diferem de acordo com o meio, ar ou água, uma vez que são estruturas porosas e com arranjo cristalino. Alguns fatores podem influenciar o índice de refração do esmalte, como o efeito do filme agindo como um produto de reflexão da luz, o efeito da água sobre a translucência e, principalmente, o efeito da água na subsuperfície do esmalte. Brodbelt *et al.*, 1981, estudando a transmissão de luz no esmalte hígido verificaram diminuição de 82% com a secagem da superfície com ar por 10 segundos, e que esta pode retornar aos valores iniciais após a reidratação, como resultado do deslocamento do ar pela água ao redor dos prismas de esmalte. A translucência alterada pode ser explicada como resultado de um aumento na diferença dos índices de refração entre os prismas de esmalte e o meio ao redor quando o ar é substituído pela água.

Similar evento ocorre de forma mais intensa quando da desmineralização do esmalte, onde a quantidade de ar ao redor dos prismas desmineralizados aumenta pelo aumento da porosidade na estrutura. Dessa forma, o diferenciado aspecto visual encontrado neste estudo para as lesões pode ser atribuído aos diferentes índices de refração da luz produzidos pela desmineralização do esmalte em diferentes profundidades, uma vez que durante o processo de cárie são formadas microporosidades devido a diluição parcial de cristais. Esses pequenos poros, desviando a luz, comportam-se como centros de espalhamento da luz visível e próximos ao índice de refração da luz (Darling *et al.*, 2006).

Da mesma forma, Vaarkamp *et al.*, 1997, verificaram que a desmineralização do esmalte produz alteração no cristal de hidroxiapatita do esmalte analisando em “optical coherence technique” (OCT), Meng *et al.*, 2009, observaram um índice de refração do esmalte da ordem de 1,631. Assim, em lesões do tipo ICDAS 1, onde o aspecto do esmalte úmido não permitia visualizar as áreas desmineralizadas, uma vez que a água preenchia os poros do esmalte desmineralizado, porém, após a secagem, ocorre o aparecimento de uma área branco-opaca, característica da desmineralização do esmalte, decorrente da ação do biofilme. Entretanto, ao ser reidratado, o esmalte tinha seu aspecto inicial devolvido.

Em lesões do tipo ICDAS 2, a umidade presente parece não garantir a penetração da água em toda a extensão/volume da lesão, evidenciando um aspecto de

manchamento na superfície, uma vez que como demonstrado neste estudo, tanto a área quanto o volume da lesão são significativamente maiores que nas lesões ICDAS 1. Além disso, esse aspecto visual pode ser atribuído à maior profundidade das lesões, uma vez que o ar não foi desalojado totalmente pela água, alterando o índice de refração da área. Lesões do tipo ICDAS 1 apresentaram aspecto branco opaco somente após a secagem da superfície. A imagem inicial, similar ao esmalte hígido, pode ser atribuído ao incremento de água no corpo da lesão, devolvendo o índice de refração da área, semelhante ao da hidroxiapatita o que torna a imagem similar ao esmalte vizinho não desmineralizado. Enquanto que as lesões 2 e 3, onde foram encontradas profundidade de desmineralização maior, provavelmente a inclusão do ar, alterando o índice de refração da área não foi alterado pelo umedecimento da superfície, pois a água parece não ter conseguido penetrar até a total profundidade da lesão.

Similar aos resultados obtidos na literatura por Marsh, 1995; Koo *et al.*, 2003; Lobo *et al.*, 2005; Seemann *et al.*, 2005; Vásquez & Cury, 2010; a desmineralização do esmalte acontece de forma muito rápida quando da presença de biofilme, em estudos *in vitro*, o que determina o aparecimento de erosão da superfície, o que foi evidenciado neste estudo em lesões do tipo ICDAS 3. Visualmente, o esmalte apresentava-se branco opaco com estrias na superfície decorrentes da perda da estrutura do esmalte, mesmo sem abrasão mecânica da superfície.

Como uma forma de caracterizar essas lesões obtidas *in vitro*, foram realizados outros métodos de avaliação, como a **μ-CT**, **TMR** e **MLP**. Cada uma dessas metodologias permitiu identificar as alterações associadas com a progressão da lesão de cárie.

A avaliação por microtomografia computadorizada de raios-X (**μ-CT**) permitiu caracterizar lesões do tipo ICDAS 2 e 3, mais avançadas, com intensa perda mineral. Observou-se, dessa forma, que tanto em relação à área quanto ao volume, as lesões de cárie ICDAS 2 apresentaram valores significativamente menores que as lesões 3. As lesões ICDAS 1 não puderam ser observadas em **μ-CT**.

Essa dificuldade de identificação das lesões ICDAS 1, provavelmente foi decorrente do tipo de equipamento utilizado, uma vez que a qualidade da visualização está diretamente ligada ao processo de aquisição da imagem, pois a separação dos diversos “objetos” dentro da reconstrução depende da qualidade da radiação e da resolução do sistema. O sistema utilizado neste estudo foi com tubo de raios X e uma

câmera integrada CCD 1.3 MP acoplada ao cintilador por lente com 1:06 faixa de zoom. A ampliação é variável (6-30 mM tamanho do pixel) sendo combinada com o posicionamento do objeto de forma a facilitar a seleção da digitalização do mesmo. O tamanho do tubo e do filtro determina a quantidade de penumbra, quanto maior a amplitude do foco, maior a quantidade de penumbra e perda da resolução da imagem digital. Outro fato que pode ter impedido a avaliação das lesões do tipo ICDAS 1 pode ser atribuído à energia dispersada na amostra e à profundidade da lesão de cárie em relação à superfície. A lesão do tipo ICDAS 1 apresentou profundidade quase 4 vezes menor que a do tipo ICDAS 2, e 8 vezes menor que a tipo ICDAS 3. A intensidade na projeção das imagens não são proporcionais a espessura do objeto, causando bordas pronunciadas, faixas e artefatos ambientais na reconstrução da imagem, o que pode levar a problemas quantitativos e complicar a calibração e as medidas de densidade. Assim, a acurácia dos valores do CT reconstruídos assume que a atenuação do feixe incidente de raios-X está exponencialmente relacionado à espessura do objeto. Dessa forma, o mesmo material pode resultar em diferentes valores de cinza dependendo do material circundante, que é conhecido como artefato de densidade ambiental. Então, uma relação não linear entre a atenuação e a espessura do material torna complicada a interpretação de imagens. Como a desmineralização atingia uma área muito pequena e muito próxima à borda da amostra, esses fatos podem ter dificultado a visualização da mesma.

A lesão de cárie artificial deve apresentar a camada superficial relativamente intacta e rica em mineral e a camada subsuperficial pobre em conteúdo mineral, como ocorre com as lesões iniciais de esmalte na cavidade bucal (Amaechi *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2003). Neste caso, os resultados desse presente estudo, somente para o grupo ICDAS 1 foi constatado a presença da lesão de subsuperfície em MLP e TMR. Embora, visualmente tenham sido observados os parâmetros descritos para as lesões naturais (*in vivo*), neste estudo, nas lesões ICDAS 2 e 3 não foi observada a presença de lesões subsuperficiais, mas sim, a erosão da superfície (ICDAS 2) com perda de densidade mineral (Figuras 23 A e 24) e perda de estrutura do esmalte (ICDAS 3), observadas na avaliação por μ -CT.

Em relação ao tempo de exposição do esmalte ao biofilme, é correto afirmar que o grau de perda mineral está proporcionalmente relacionado ao tempo em que o substrato fica exposto à desmineralização (Amaechi *et al.*, 1998). Foi achado neste estudo que, conforme o tempo de troca do meio BHI com sacarose a 1% ia

umentando, mais espesso o biofilme bacteriano de *Streptococcus mutans* ia se tornando. Pode se constatar que as lesões ICDAS 1 apresentaram perda mineral de 1634%vol.µm e a razão entre a taxa de perda mineral integrada e o volume mineral foi de 32%. É provável que as lesões ICDAS 2 e 3 tenham apresentado perda mineral muito maior, uma vez que o processo de moldagem levou à extração da maior parte da área desmineralizada, não permitindo a quantificação da perda mineral. Entretanto, a cavitação formada permitiu avaliar o aumento da profundidade da lesão em até 8 vezes para a ICDAS 3 e 4x para ICDAS 2, comparadas a ICDAS 1.

Neste estudo, os espécimes ficaram imersos em BHI com sacarose a 1% dentro de estufa de CO₂ em temperatura de 37°C, de acordo com a norma ISO/TR 14569-1.

Segundo Buzalaf *et al*, 2010, as lesões de cárie produzidas artificialmente (lesões de subsuperfície com superfície mineral intacta) não devem apresentar erosão, e que, para a preservação da superfície mineralizada, deve haver fatores importantes como: presença de cálcio, fosfato e flúor na solução, o pH e o tempo depois da desmineralização inicial, tal como sua saturação, podem ser alcançados com o tempo, dependendo do volume e da viscosidade da solução de desmineralização em relação à área de esmalte exposta aos desafios ácidos nos modelos de ciclagem de pH. No presente estudo, as lesões de cárie de ambos os grupos mostraram-se erodidas, desde as lesões ICDAS 2 até as lesões cavitadas (ICDAS 3). Isto deve-se ao fato de que os modelos biológicos através de biofilme bacteriano são mais “agressivos” ao produzirem uma lesão de cárie artificial, uma vez que o processo de trocas iônicas na remineralização é omitido. Uma vez que, o tempo de produção das lesões de cárie de cada grupo, também influenciou esse fator.

Tanto para o ICDAS 2 quanto o 3, ou seja, quanto mais avançado o código ICDAS, maior o percentual de área e volume de lesão e, portanto, menor o de esmalte hígido, o que é perfeitamente justificado pelo maior tempo de desafio ácido, e consequente desmineralização do substrato.

Embora seja evidente na literatura, a TMR analisa a perda mineral da estrutura desmineralizada pelo processo de cárie (Arends *et al.*, 1987; Magalhães *et al*, 2009). Entretanto, neste estudo não foi possível analisar as lesões ICDAS 2 e 3 devido ao artefato de técnica produzido durante a execução da réplica para a análise topográfica em MEV. Devido a alta fragilidade da estrutura, que pode ser observada em µ-CT, na área da lesão, a moldagem com silicone removeu a estrutura desmineralizada, não

sendo possível sua avaliação por TMR, constituindo a principal limitação do desenho experimental determinado.

Na análise topográfica realizada pelo MEV, Para o grupo ICDAS 1, pode-se observar a superfície da lesão de cárie, com perda de parte da estrutura fragilizada pela desmineralização por *S. mutans*, e a lisura de superfície, com discreta irregularidade. No grupo ICDAS 2, pode ser observada a superfície da lesão de cárie com maior perda mineral, irregularidades de superfície e diferença na topografia (depressão), que representa área de erosão, apresentando superfície irregular, com perda da lisura inicial. No grupo ICDAS 3, a irregularidade da superfície do esmalte foi mais acentuada ainda do que no grupo ICDAS 2, apresentando-se totalmente irregular com intensa erosão, grande perda de características de seus prismas e desorganização da estrutura do esmalte. A ocorrência de cavitação (erosão) está relacionada à velocidade de desmineralização do método biológico utilizado neste estudo por *S. mutans* de produção de cárie e à impossibilidade de adição de Cálcio, Fósforo ou Fluoreto (Buzalaf *et al*; 2010) ao meio BHI, pela inviabilidade técnica.

No grupo ICDAS 1, a profundidade média de lesão foi de 51 µm, perda mineral de 1634% vol.µm e taxa de desmineralização de 32%, valores próximos aos encontrados por Magalhães, *et al*; 2009.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) representa o método mais utilizado para o estudo qualitativo da erosão dentária. Para isso, a amostra necessita de uma preparação especial a fim de que seja possível identificar as alterações estruturais decorrentes do processo erosivo (Schlueter *et al.*, 2011) e a destruição da amostra. Neste estudo, em função da análise da mesma amostra em diferentes metodologias utilizadas, optou-se pela confecção de réplicas e resina epóxica na tentativa de preservar a amostra. Entretanto, esta técnica não se mostrou favorável, provavelmente devido a fragilidade na área da lesão inicial de cárie, a superfície apresentou-se mais fragilizada nas lesões ICDAS 2 e 3, ocorrendo a extração desta superfície durante a moldagem.

Entretanto, tornou-se de grande valia para a avaliação da superfície da lesão. Nos casos de remoção da área fragilizada da amostra, o resíduo aderido à resina epóxica foi removido por lavagem (banho em ultrassom); porém, a transcrição da superfície foi perfeitamente estampada no molde. Dessa forma, a topografia de superfície dos espécimes pôde ser replicada de modo fiel, permitindo a análise qualitativa da morfologia de superfície.

Em relação ao substrato bovino, alguns estudos mostraram que o grau de dissolução deste substrato é três vezes maior do que a do esmalte humano (Brown *et al.*, 2007; Brunton & Hussain, 2001). Além disso, as substâncias ácidas podem afetar significativamente o esmalte bovino. Apesar de existir diferenças entre esmalte humano e bovino, este último pode ser considerado aceitável, considerando que, se ocorrer qualquer interferência específica no mesmo, produzirá efeitos iguais em todos os grupos experimentais, tornando a experiência geralmente válida (Zanet *et al.*, 2007). Apesar das lesões deste estudo serem semelhantes às lesões dos dentes humanos, a lesão de subsuperfície em dentes humanos, em corte transversal, apresenta-se cônica. Este formato cônico é resultado de variações sistemáticas da dissolução ao longo dos prismas de esmalte. A maior parte ativa da lesão está localizada ao longo do centro transversal. A lesão de forma cônica representa uma série de etapas crescentes da progressão da lesão de cárie, se iniciando-se com a dissolução, em nível estrutural, até a borda da lesão (Kidd, 2004). Enquanto que neste estudo, foi encontrado lesão de forma regular e delimitada tanto nas lesões de subsuperfície (ICDAS 1) como para ambas as profundidades (ICDAS II e III).

De maneira geral, este estudo demonstrou que foi possível produzir lesões artificiais de cárie, com aspectos visuais semelhantes àqueles estabelecidos pelo Protocolo ICDAS II, pelo método biológico com biofilme de *S. mutans* e, quanto maior o tempo de exposição dos espécimes ao biofilme, mais avançadas são as lesões. Embora sendo *in vitro*, com substrato bovino, os resultados obtidos representam uma possibilidade de oferecimento de subsídios para que terapêuticas que visam aprimorar a prevenção e interceptação de lesões de cárie possam ser realizadas em curto período de tempo, sem envolvimento de voluntários humanos e sem ferir princípios éticos, uma vez que lesões de cárie similares ao ICDAS II foram produzidas.

Outros estudos envolvendo diferentes parâmetros de observação, como a realização de MEV em amostras independentes, modificações nos parâmetros de m- μ -CT, quantificação mineral por meio de μ -EDX deverão ser realizadas para elucidar melhor as características das lesões encontradas.

7. CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. É viável a produção de lesões artificiais de cárie em esmalte, visualmente semelhantes às aquelas do protocolo ICDAS II, sendo que para o código 1, o tempo necessário foi de 24 horas; para o código 2, 4 dias; e para o código 3, 14 dias.

2. Para os três grupos a análise em **MEV** forneceu apenas informações qualitativas da morfologia de superfície das lesões. A área e volume da lesão são parâmetros identificados apenas pelo **μ-CT** e para as lesões Código 2 e 3, sendo que foram observadas maiores médias para o Código 3. Em relação à profundidade de lesão, perda mineral e *ratio*, foram somente identificados pela **TMR**, para o Código 1. A profundidade da lesão, tanto pelo método **TMR** quanto **MLP**, foram mensurados nos três grupos (Código 1, Código 2, Código 3).

3. Diferentes metodologias de análise devem ser empregadas dependendo dos parâmetros desejados como referência e de acordo com o tipo de lesão.

4. Dentes bovinos podem ser utilizados quando se utiliza o método biológico para produção de lesão de cárie do código 1 do critério ICDAS II.

REFERÊNCIAS

Aldsworth TG, MacFarlane TW. A novel *in vitro* model system to grow films of oral bacteria for the study of human tooth root surface caries. J Appl Microbiol. 2001; 91: 139-46.

Alexandria AKF, Valença AMG, Lima SJG, Nóbrega CBC, Lima AL, Claudino LV. Avaliação *in vitro* da Desmineralização do Esmalte Bovino Submetido a Variações de pH e Tempo de Imersão em Solução Indutora de Cárie Pesq Bras Odontoped Clin Integr.,2008;8(2): 233-238.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Factors affecting the development of carious lesions in bovine teeth *in vitro*. Archives Oral Biology. 1998; 43 (8): 619-628.

Argenta RMO, Tabchoury CPM, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. Braz Oral Res. 2003.17:241-246.

Arends J, Dijkman TI, Christoffersen J: Average mineral loss in dental enamel during demineralization. Caries Res 1987; 21: 249–254.

Arends J. The application of *in vitro* models to research on demineralization and remineralization of the teeth: Reaction paper Adv Dent Res 1995;9(3): 194-197.

Bowden GHW, Ellwood DC, Hamilton IR. Microbial ecology of the oral cavity. Adv Microb Ecol. 1979; 3: 135-216.

Brodbelt RHW, O'Brien WJ, Fan PL, Frazer-Dib JG, Yu R. Translucency of Human Dental Enamel J Dent Res 1981;60(10):1749-1753.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Braga MM, Oliveira LB, Bonini GAVC, Bonecker M, Mendes FM. Feasibility of the international caries detection and assessment system (ICDAS-II) in epidemiological surveys and comparability with standard world health organization criteria. *Caries Res* 2009;43(4):245–249.

Brown CJ, Smith G, Shaw L, Parry J, Smith AJ. The erosive potential of flavoured sparkling water drinks. *Int J Paediatr Dent*. 2007; 17 (2):86-91.

Brunton PA, Hussain A. The erosive effect of herbal tea on dental enamel. *J Dent*. 2001 Jul;29(8):517-20.

Buzalaf MAR, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem ACB. pH- cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci*. 2010;18(4):316-34.

Clarckson BH, Wefel JS, Miller I. A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacterial *in vitro*. *J Dent Res*. 1984; 63(10):1186-1189.

Chow LC. Tooth-bound fluoride and dental caries. *J Dent Res* 1990;69 (Special Tissue): 595-600.

Darling CL, Huynh GD, Fried D. Light Scattering Properties of Natural and Artificially Demineralized Dental Enamel at 1310-nm. *J. Biomed. Optics*. 2006;11(034023):1–11.

Delbem ACB, Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent*. 2002; 15 (3): 169-172.

Delbem ACB, Bergamaschi M, Sasaki KT, Cunha RF. Effect of fluoridated varnish and silver diamine fluoride solution on enamel demineralization: pH-cycling study. *J Appl Oral Sci* 2006; 14(2):88- 92.

Diniz MB, Rodrigues JÁ, Hug I, Cordeiro RCI, Lussi A. Reproducibility and Accuracy of the ICDAS-II for Occlusal Caries Detection. *Community Dent Oral Epidemiol* 2009; 37(5):399–404

Dowker SEP, Anderson P, Elliot JC, Gao XJ. Crystal chemistry and dissolution of calcium phosphate in dental enamel *Mineralogical Magazine*, December 1999; 63(6): 791 800.

Dummer PMH, Edmunds DH, Green RM. Demineralization of human enamel by *Streptococcus mutans* NCTC 10832 using a sequential batch culture technique. *Caries Res.* 1982;16(2):193-6.

Feagin F, Koulourides T, Pigman W. The characterization of enamel surface demineralization, remineralization and associated hardness changes in humane and bovine material. *Arch. Oral Biol.*, 1969;14(12):1407-17.

Featherstone JDB, O' Reilly MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralisation in vitro and in vivo. In: Leach SA. Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth. Oxford: IRL Press. 1986; 19 (4) 23-34.

Featherstone JDB. The Science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* 2000;131;887-899.

Featherstone JDB. The continuum of dental caries-evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res* 2004;83(Spec Iss C):39-42.

Featherstone JDB. Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal* 2008; 53: 286–291.

Feldchtein FI, Gelikonov GV, Gelikonov VM, Iksanov RR, Kuranov RV, Sergeev AM. *In vivo* OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity. *Optics Express* 1998;3(6):239-50.

Ferreira RI, Haiter-Neto F, Tabchoury CPM, Bóscolo FN. In Vitro Induction of Enamel Subsurface Demineralization For Evaluation of Diagnostic Imaging Methods. *J Appl Oral Sei.*; 2007;15(5): 392-8.

Field JC, Germam MJ, Waterhouse PJ. Qualifying the lapped enamel surface: A profilometric, electron microscopic and microhardness study using human, bovine and ovine enamel. *Arch. Oral Biol.* 2014 18;59(5):455-60.

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

Francci C, Deaton TG, Arnold RR, Swift EJ, JR, Perdigão J, Bawden JW. Fluoride release from restorative materials and its effects on dentin demineralization. *J Dent Res.*1999; 78(10): 1647-54.

Gama-Teixeira A, Simionato MRL, Elian SN, Sobral MAP, Luz MAACL. Streptococcus mutans-induced secondary caries adjacente to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations *in vitro*. *Braz Oral Res.* 2007;21(4):368-74.

Giacaman RA, Campos P, Muñoz-Sandoval C, Castro RJ. Cariogenic potential of comercial sweeteners in na experimental biofilm caries modelo n enamel. *Arch of Oral Biol.* 2013.

Gilmour ASM, Edmunds DH, Dumme MH. The production of secondary caries-like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using a *in vitro* microbial caries system. *J Oral Rehab* 1990;17:573-578.

Gilmour AS, Edmunds DH. The polarized light microscopic appearance of caries-like lesions adjacent to restored cavities in the crowns and roots of extracted human teeth. *J Oral Rehabil.*1998; 25(12): 929-39.

Grossman ES, Matejka JM. Histological features of artificial secondary caries adjacent to amalgam restorations. *J Oral Rehabil* 1999;26(9):737-44.

Hashizume LN, Shinada K, Kawaguchi Y, et al. Sequence of ultrastructural changes of enamel crystals and *Streptococcus mutans* biofilm in early enamel caries *in vitro*. *J Med Dent Sci* 2002;49(2): 67-75.

Holmen L, Thylstrup A, Øgaard B, Kragh FA. Scanning electron microscopy study of progressive stages of enamel caries *in vivo*. *Caries Res.*1985 19:355-367.

Holmen L, Thylstrup A, Årtun J. Clinical and histological features observed during arrestment of active enamel carious lesions *in vivo*. *Caries Res* 1987a;21:546-554.

Holmen L, Thylstrup A, Årtun J (1987b). Surface changes during the arrest of active enamel carious lesions *in vivo*. A scanning electron microscope study. *Acta Odontol Scand* 45:383-390.

Honkala E, Runnel R, Honkala S, Olak J, Vahlberg T, Saag M, Makinen KK. Measuring Dental Caries in the Mixed Dentition by ICDAS. *International Journal of Dentistry* 2011 (Volume 2011) 6p.

International Caries Detection and Assessment System Coordinating Committee, "Criteria Manual. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II) Workshop," Baltimore, Md, USA, March 2005.

International Caries Detection and Assessment System Coordinating Committee (2009). International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II). Updated Bogota December 8-11th 2008.

Issa AI, Preston KP, Preston AJ, Toumba KJ, Duggal MS. A study investigation the formation of artificial sub-surface enamel caries-like lesions in deciduous and permanent teeth in the presence and absence of fluoride, Arch Oral Biol, Oxford. 2003;48(8):567-71.

Ismail AI. Visual and Visuo-tactile Detection of Dental Caries. J Dent Res. 2004; 83(Spec Iss C):C56-C66.

Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring. Community Dent Oral Epidemiol 2007; 35: 170–17.

Jablonski-Momeni A, Stachniss V, Ricketts DN, Heinzl- Gutenbrunner M, Pieper K. Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for detection of occlusal caries *in vitro*. Caries Res 2008;42(2):79–87.

Kidd EAM, Fejerskov, O. What Constitutes Dental Caries Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms. J Dent Res, 2004.83(Spec Iss C).

Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Vacca-Smith AM, Bowen WH. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm

accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt*-farnesol J Antimicrob Chemother. 2003;52(5):782-9.

Lobo MM, Gonçalves RB, Ambrosano GMB, Pimenta LAF. Chemical or Microbiological Models of Secondary Caries Development Around Different Dental Restorative Materials. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 74B. 2005. 725–31.

Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MAR. Comparison of Cross-Sectional Hardness and Transverse Microradiography of Artificial Cariouls Enamel Lesions Induced Different Demineralising Solutions and Gels. Caries Res. 2009; 43;474-483.

Maltz, M.; Carvalho, J. Diagnóstico da doença cárie. In: Kriger, L. (Coord.) Promoção de saúde bucal - Aboprev. São Paulo: Artes Médicas, 1997. cap.4, p.70-91.

Martignon S, Ekstrand KR, Ellwood R. Efficacy of sealing proximal early active lesions: an 18-month clinical study evaluated by conventional and subtraction radiography. Caries Res. 2006;40(5):382-8.

Marsh PD. The role of microbiology in models of dental caries. Adv Dent Res. 1995; 9: 244-54.

Mendes FM, Braga MM, Oliveira LB, Antunes JLF, Ardenghi TM,. Bonecker M. Discriminant validity of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and comparability with World Health Organization criteria in a cross-sectional study. Com Dent and Oral Epidemiolog 2010;38(5):398–407.

Meng Z, Yao H, Liang Y, Li Y, Lan S, Wang G, Liu T, Yao XS. (Measurement of the refractive index of human teeth by optical coherence tomography *J. Biomed. Opt.* 2009;14(3):034010.

Nakata K, Nikaido T, Nakashima S, Nango N, Tagami N. An approach to normalizing micro-CT depth profiles of mineral density for monitoring enamel remineralization progress. *Dental Mat J* 2012; 31(4): 533–540.

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

Noorda, WD., van Montfort, AMAP, Purdell-Lewis, DJ, Weerkamp, AH. Developmental and metabolic aspects of a monobacterial plaque of *Streptococcus mutans* C67-1 grown on human enamel slabs in an artificial mouth model. I. Plaque data. *Caries Research.* 1986a; 20, 300-307.

Noorda, WD, Purdell-Lewis, DJ, van Montfort, A.M.A.P., Weerkamp, AH.. Developmental and metabolic aspects of a monobacterial plaque of *Streptococcus mutans* C 67-1 grown on human enamel slabs in an artificial mouth model. II. Enamel data. *Caries Research.* , 1986b; 20, 308-314.

Paes Leme AF, Tabchoury CPM, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent.* 2003; 16 (2): 91-5.

Paris S, Meyer-Lueckel H, Mueller J, Hummel M, Kielbassa AM. Progression of Sealed Initial Bovine Enamel Lesions under Demineralizing Conditions *in vitro*. *Caries Res.*2006;40(2):124-9.

Piovesan C, Moro BL, Lara JS, Ardenghi TM, Guedes RS, Haddad AE, Braga MM, Mendes FM. Laboratorial training of examiners for using a visual caries detection system in epidemiological surveys. *BMC Oral Health*. 2013 3;13:49.

Pitts N: 'ICDAS': an international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries epidemiology, research and appropriate clinical management. *Community Dent Health* 2004;21(3): 193–8.

Pitts N. "The impact of diagnostic criteria on estimates of prevalence, extend and severity of dental caries," in *Dental Caries. The Disease and Its Clinical Management*, O. Fejerskov and E. Kidd, Eds., Blackwell Munksgaard, Singapore, 2005.

Pitts NB, "Detection, assessment, diagnosis and monitoring of caries," in *Monographs in Oral Science*, N. B. Pitts, Ed., vol. 21, p. 222, Karger, Basel, Switzerland, 2009

Ribeiro CC, Ccahuana-Vásquez RA, Carmo CD, Alves CM, Leitão TJ, Vidotti LR, Cury JA. The effect of iron on *Streptococcus mutans* Aug;26(4):300-5.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:13-23

Seemann R, Bizhang M, Kluck I, Loth J, Roulet JF. A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation--development and initial testing *Caries Res*. 2005;39(3):185-90.

Shoab L, Deery C, Ricketts DNJ, Nugent ZJ. Validity and reproducibility of ICDAS II in primary teeth. *Caries Res* 2009;43(6):442–448.

Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. Oral Sci Rev 1973;3:100-60.

Steiner-Oliveira C, Maciel FA, Rodrigues LKA, Napimoga MH, Pimenta LA, Hofling JF, Gonçalves RB. An *in vitro* microbial model for producing caries-like lesions on enamel Braz J Oral Sci. 2007; 6(22):1392-1396.

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

Ten Cate JM. Remineralization of caries lesions extending into dentin. J Dent Res.2001; 80(5): 1407-1411

Tenuta LMA, Cury JA. Fluoreto: da ciência à prática clínica. In: Assed S. Odontopediatria: bases clínicas para a prática clínica. São Paulo: Artes Médicas, 2005. Cap. 4, p.113-52.

Teo TKY, Ashley PF, Louca C. An *in vivo* and *in vitro* investigation of the use of ICDAS, DIAGNOdent pen and CarieScan PRO for the detection and assessment of occlusal caries in primary molar teeth. Clin Oral Invest. 2014; 18:737–744.

Thylstrup A, Fejerskov O. Características clínicas e patológicas da cárie dentária. In: Thylstrup A, Fejerskov O. Cariologia clínica. 2. ed. São Paulo: Santos, 1995. p.111-57.

Thylstrup A, Fejerskov O. Tratado de Cariologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001, 421p. 2001.

Torii Y, Itota T, Okamoto M, Nakabo S, Nagamine M, Inoe K. Inhibition of artificial secondary caries in root by fluoride releasing restorative materials. Oper Dent.2001; 26(1): 36-43.

Vásquez RAC, Cury JA. S Mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel desmineralization. Braz Oral Res. 2010;24(2):135-41.

J Vaarkamp, J J Ten Bosch, E H Verdonschot, S Tranaeus Quantitative diagnosis of small approximal caries lesions utilizing wavelength-dependent fiber-optic transillumination. J Dent Res 1997;76 (4): 875-882.

White DJ. The comparative sensitivity of intra-oral, in vitro, and animal models in the “profile” evaluation of topical fluorides. J Dent Res.1992; 71: 884-94.

White D. The application of *in vitro* models to research on desmineralization and remineralization of the teeth. Adv Dent Res.1995; 9(3): 175-193.

Yue SL, Zhou XD, Li J. Multibacterial artificial plaque. A model for studying carious process. Chin Med J. 1992; 105: 25-9.

Zandoná AF, Santiago E, Eckert G, Fontana M, Ando M, Zero DT. Use of ICDAS Combined with Quantitative Light-Inuced Fluorescence as a Caries Detection Method. Caries Res.2010; 44:317–322.

Zandoná AF, Santiago E, Eckert GJ, Katz BP, Pereira de Oliveira S, Capin OR, Mau M, Zero DT. The natural history of dental caries lesions: a 4-year observational study. J Dent Res. 2012 Sep;91(9):841-6.

Zanet CG, Fava M, Alves, LAC. *In vitro* evaluation of the microhardness of bovine enamel exposed to acid solutions after bleaching. Braz Oral Res. 2007;25(6):562-7.

ANEXO 01

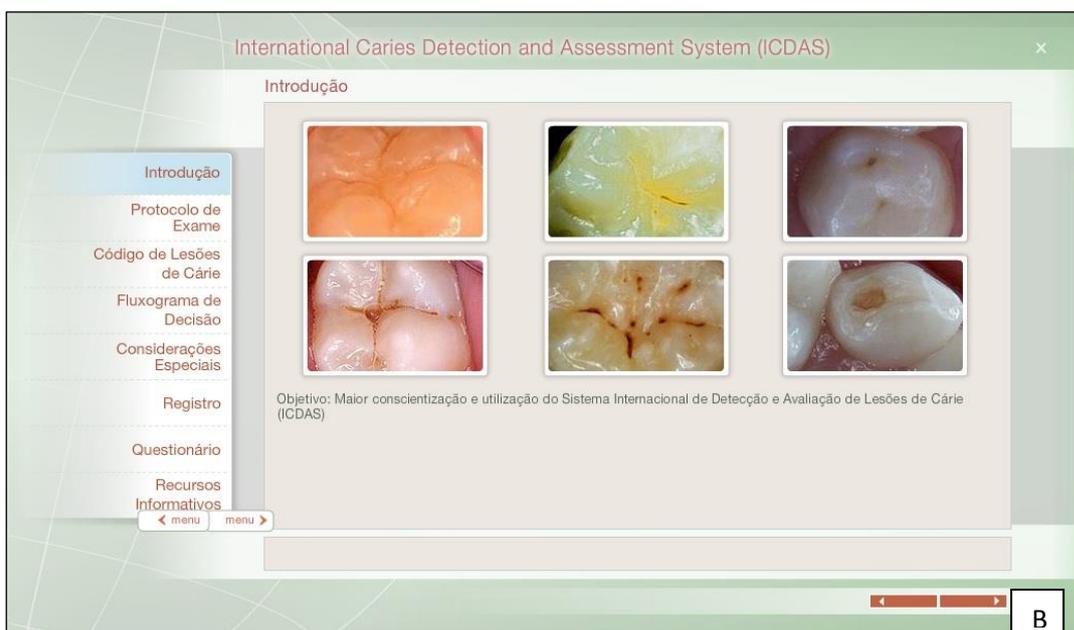
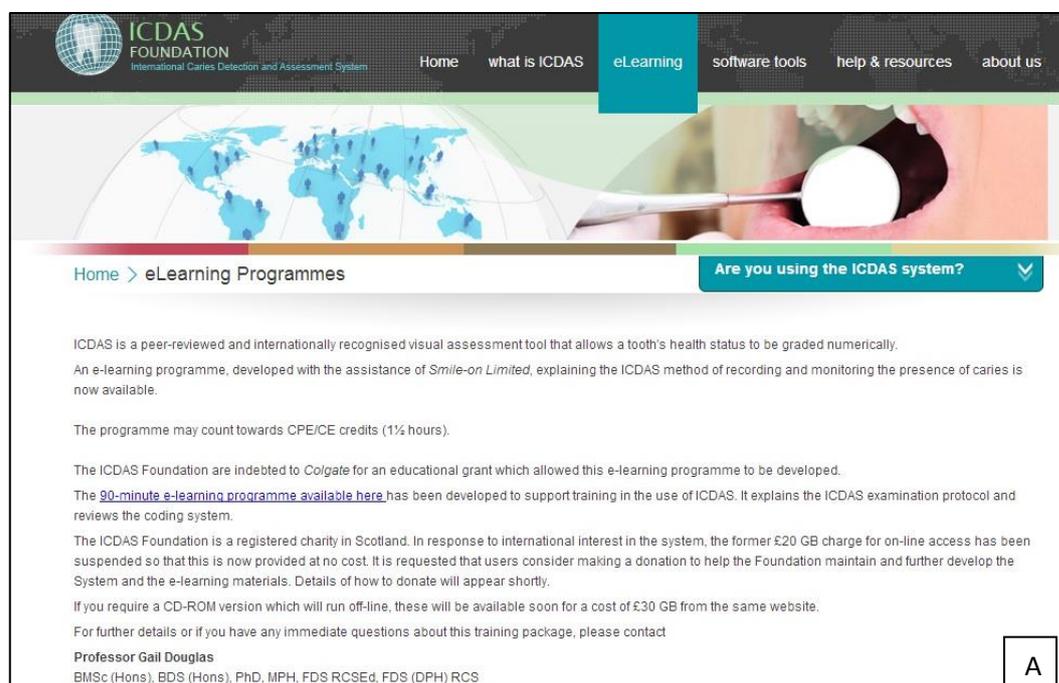


Figura 33 – A: Vista do site [<https://www.icdas.org/elearning-programmes>] B: Página da calibração e exercícios de treinamento [<https://www.icdas.org/courses/portuguese/course/nav.html>]

ANEXO 02

Estudo piloto:

Foi realizado um estudo piloto previamente ao experimento a fim de identificar o tempo necessário para a obtenção das lesões de cárie dos códigos ICDAS 1, 2 e 3. Dessa forma, foram utilizados 5 espécimes para cada grupo distribuídos em três placas de cultura de poliestireno de 24 poços. O protocolo para produção de cárie foi o mesmo detalhado na Metodologia e a troca do meio de cultura (BHI + sacarose a 1%) foi realizada a cada 24 horas.

Para determinar o aparecimento da lesão de cárie do código 1 em todos os espécimes, os mesmos foram avaliados em um período de 18 horas após a inoculação da mistura de BHI + 1% de sacarose + *S. mutan*. Para essa primeira avaliação, a qual foi realizada dentro de capela de fluxo laminar, a placa determinada para o grupo do código 1 era aberta e a tampa onde os espécimes eram fixados era posta sobre a mesa com os espécimes voltados para cima, tomando cuidado para evitar a contaminação, e enfim, deixadas secarem em condições ambientes. Neste momento, 3 dos 5 espécimes foram identificados como código 1. Então, a tampa foi fechada e a placa colocada na estufa suplementada por 10% de CO₂ à 37°C. Uma nova análise foi realizada após 24 horas, sob as mesmas condições relatadas acima, observando-se que todos os espécimes apresentavam lesões de cárie dentro do código 1 do critério ICDAS.

Para determinar o código 2, foi realizada a inspeção dos blocos de esmalte sob as mesmas condições relatadas acima, sendo que em 48 horas, 2 dos 5 espécimes começaram a evidenciar algumas lesões de mancha branca visíveis com o mesmo molhado pelo meio de cultura. Em 72 horas, 4 dos 5 espécimes apresentavam lesões de mancha branca do código 2. E em 96 horas, foi o período em que a lesão de mancha branca visível com o espécime úmido, apresentava-se uniforme nos 5 espécimes, sendo 4 dias o tempo necessário para formação de lesão de cárie do código 2 do critério ICDAS, de forma homogênea em toda a superfície dos espécimes.

Para determinar o código 3, as lesões de mancha branca, foram inspecionadas sob as mesmas condições detalhadas acima. Somente após 10 dias de troca do meio, 2 dos 5 espécimes começaram a apresentar erosão

visível na superfície. Nesse tempo o biofilme aderido na superfície do bloco de esmalte já era bem espesso e o mesmo não foi removido para inspeção da lesão para não haver contaminação. Em 12 dias, 3 dos 5 espécimes apresentaram erosão visível na superfície das amostras. E em 14 dias, todos os espécimes da placa, apresentavam erosão superficial homogênea, de forma visível, sendo este tempo o determinado para produção de lesão de cárie do código 3 do critério ICDAS.