



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO** UFRJ

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ODONTOLOGIA**

**POTENCIAL BIOATIVO DE CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE
CÁLCIO E ÁCIDO POLIACRÍLICO EM LESÕES DE CÁRIE
DENTINÁRIAS FORMADAS POR UM MODELO DE BIOFILME DE
MICROCOSMO**

PAULA MACIEL PIRES

Rio de Janeiro
2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO** UFRJ

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ODONTOLOGIA**

PAULA MACIEL PIRES

**POTENCIAL BIOATIVO DE CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE
CÁLCIO E ÁCIDO POLIACRÍLICO EM LESÕES DE CÁRIE
DENTINÁRIAS FORMADAS POR UM MODELO DE BIOFILME DE
MICROCOSMO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria).

Orientadora:

Profa. Dra. Aline de Almeida Neves

Prof. Adjunto da Disciplina de Odontopediatria da FO/UFRJ.

Pires, Paula Maciel

Potencial bioativo de cimento à base de silicato de cálcio e ácido poliacrílico em lesões de cárie dentinárias formadas por um modelo de biofilme de microcosmo / Paula Maciel Pires. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Stricto Sensu em Odontologia, 2017.

80 f.: il. ; 31 cm.

Orientadora: Aline de Almeida Neves

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Stricto Sensu em Odontologia, 2017.

Referências bibliográficas: f. 69-71.

1. Cimento de Silicato. 2. Cimento de Policarboxilato. 3. Biofilmes - crescimento & desenvolvimento. 4. Cárie Dentária. 5. Dentina. 6. Desmineralização do Dente. 7. Microtomografia por Raio-X. 8. Testes Laboratoriais. Odontopediatria. - Dissertação. I. Neves, Aline de Almeida. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. III. Faculdade de Odontologia. IV. Programa de Pós-graduação em Stricto Sensu em Odontologia. VI. Título.

DEDICATÓRIA

À Profa. Dra. Hermelinda, minha vovó Linda

A moça parou diante da vida durante uns 5 minutos. Os olhos com a súplica já vinham marejados e os braços já pediam um abraço que durou os 4 minutos de toda aquela conversa. Pousou no seu silêncio e estendeu o corpo sobre a cama. Levantou-se porque queria um copo d'água. Sorriu porque isso sempre lhe convém e retornou ao quarto. Sentiu que passos a acompanhavam. Escutou tudo com muita atenção, era uma daquelas lições que as pessoas demoram anos para aprender e que sua vó lhe ensinara com aquele simples olhar. Eram os olhos claros mais lindos que conhecia. A avó segurou a mão tão pequenininha da neta para se certificar de que ela havia entendido o que se passou. A confirmação foi quando elas se abraçaram, perceberam que muitas coisas não faziam sentido, mas que elas estavam no caminho certo.

Ao meu pai, Jeferson

Eu me pareço com meu pai todos os dias ao acordar, até os pés me denunciavam: a forma e andar. O sangue também, nele corre a cor vibrante, a bohemia e muita saudade. Eu me pareço com meu pai quando vou comer e sei que sempre ficará em mim o gosto dos pratos ofertados por ele. Temos os mesmos olhos de ressaca e aquilo que chamamos de cumplicidade, que vai muito além do amor entre um pai e uma filha. Eu me pareço com meu pai todos os dias ao me deitar e abraçar o travesseiro. Vez ou outra eu me pareço com meu pai e não saio de casa sem ele, no coração.

À minha mãe, Flávia

Se esparramava no sorriso. Escapulia no olhar. Cantava no silêncio. Fazia florescer pés de sol. Dispensava nomes e entendimentos. Havia algo que tinha um cheiro inconfundível de alegria. De vida abraçada. Um cheiro de paz risonha que me dizia: “Você tem qualidades que pode torná-la tão leve como uma pluma. Que vai voar. Mas que saiu de uma árvore tão enraizada e gigante que enxergou lá de cima a direção desse vôo. E sussurrou no seu ouvido: agora você sabe o caminho”.

À minha irmã

Bruna repete comigo:

- Aaazul.

Bruna, vamos lá, que cor é essa?

Durante muitos anos não ouvíamos música no carro, tínhamos um gravador de diversas cores e a mamãe gravava frases pra gente completar. As viagens passavam voando e talvez por isso eu tenha perdido a noção da distância. Você demorou a falar, mas aprendeu a nadar antes de mim. Porque você não tem medo.

Acho que a gente até cogitou ter medo do mundo, mas você não deixou. Você foi forte e aprendeu a abraçar, a olhar nos olhos, a sair da rotina. Sei que nada disso foi fácil pra você. Sei que hoje não está sendo fácil. E isso me faz não ter medo e sempre continuar acreditando. Porque você me ensinou a parar e observar. Olhar as pessoas pela criança que todos nós ainda carregamos. E isso é o que de mais puro e sincero elas podem nos oferecer: a leveza de um mundo azulzinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Profa. Dra. Aline de Almeida Neves que me entendeu e me deixou ser quem eu sou. Por me desafiar e com isso me fazer seguir sempre em frente. Por me comprovar que o impossível, às vezes é bem possível. Por sentar ao meu lado, entender minha forma de pensar e querer que eu chegasse junto do seu conhecimento, lá adiante. Por me buscar fora, e saber que eu preciso disso: um capítulo com uma temática diferente, uma aula em outra faculdade, uma pausa na Ilha para confissões... Poderia agradecer por várias coisas, mas tem uma em especial: Obrigada por me fazer querer permanecer.

À Profa. Dra. Andrea Fonseca-Gonçalves, por ser meu equilíbrio. Entre o êxtase e a ponderação, por ser sempre a hora e o momento certo. Por me fazer continuar sendo perfeccionista, sem precisar falar nada. Por ser mulher de opinião forte e por ser exemplo, o que me fez ter muito medo de errar. Espero não ter te desapontado, porque foi muito engrandecedor trabalhar com você.

À Dra. Ivete Pomarico, por me acompanhar. Foi a senhora quem viu esse trabalho crescer, do primeiro artigo periódico apresentado até as últimas críticas do original. Foi para senhora minha primeira aula ministrada, meu primeiro e, agora último, nervosismo durante o mestrado. Queria agradecer por todo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Frederico Sousa, pela oportunidade. É muito gratificante recebê-lo em nossa casa e não apenas isso, mas também por ter a honra de nos engrandecer com todo seu conhecimento acadêmico. Sair da zona de conforto nem sempre é fácil, não por isso seja indispensável. Muito obrigada mesmo.

“O intelecto e a força podem algumas vezes completar-se admiravelmente”.

Milan Kundera.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores da Odontopediatria da FO-UFRJ, por seus ensinamentos diários. Vocês são os maiores exemplos, cada um com sua sabedoria e qualidades capazes de engrandecer um aluno até torná-lo professor e mais, mestre para vida. Em especial às Profas. Andrea Pintor e Andrea Quirino, que me acompanharam durante as supervisões de clínica. Acredito que um bom dentista precisa enfrentar dificuldades clínicas e ensinar também é ótimo para aprender. Tenho um carinho e uma admiração muito grande por vocês. À Profa. Lucianne Cople Maia, por apostar na minha teimosia. Obrigada por todo aprendizado, principalmente na Clínica de Trauma, e pelas orientações nos casos clínicos. Entendi que existem muitas formas de ensinar e aprender.

A todas as pessoas envolvidas no crescimento e andamento deste Departamento. Cada um de vocês é uma chave essencial nesta engrenagem. Com vocês nunca faltou apoio ou um sorriso trocado pelos corredores. Aos pais e pacientes, por fortalecerem um conhecimento ainda maior como profissional. Por saírem de suas casas e confiarem em mim, no trabalho que seria realizado. Vocês me enchiam de amor a cada atendimento. Muito obrigada!

Ao Prof. Ricardo Lopes, pelas histórias. Por me aceitar em seu laboratório e ainda dividir comigo experiências únicas de vida. Guardei cada frase e cada risada com muito carinho no meu coração. Ao Carlinhos, que além de nos permitir fazer penteados exóticos, salvou meu computador e grande parte dessa dissertação. Eu fico até sem palavras para agradecer. Às meninas do LIN (Laboratório de Instrumentação Nuclear), por me abraçarem. Por dividirem comigo “A hora do lanche” e também almoço, café e janta. Sei que o LIN sempre vai ser um pouquinho LINO. Um agradecimento em especial à Thais, por ser especial. Por tornar esse trabalho possível, dividir comigo seus conhecimentos e assentos no 485. Obrigada por se tornar minha amiga!

Ao M1, por nos dar a chance de compartilhar com vocês nosso aprendizado de um ano. Por serem tão diferentes uns dos outros, mas sempre buscando mais conhecimento. Sejam fortes e cresçam juntos. Ao M2, que dividiu conosco tudo que já

sabiam. Que não mediram esforços para nos ajudar e tornar nosso dia a dia mais ameno. Por criarem o Mangue Town, nossa válvula de escape que vai de Niterói à Paraty passando por Minas. Sem vocês eu não teria tantos sorrisos! Eu amo cada um de vocês.

Minha turma! Vocês são aquele olhar cúmplice, aquele desespero ao ler um e-mail, aquele: calma que a gente se ajuda. E sim, a gente se segurou. E demos conta de todos os desafios. Crescemos muito juntas, mas crescemos ainda mais uma com a outra. Raquel. Raquel foi uma irmã, foi meu exemplo, era quem me colocava para frente. Se a gente tinha que fazer, ela já tinha começado e eu ia seguindo com todo incentivo dela. Eu te amo tanto, dupla! Sei que o menino Jesus te deu uma luz para irradiar por qualquer lugar que você vá, mas se puder ficar ao meu lado, eu vou gostar.

Aos Doutorandos, que são os exemplos para nosso próximo passo. É em vocês que vemos nossos esforços não sendo em vão. Obrigada por nos acolherem e nos ensinarem tanto! Em especial para Thais Soares, Adrielle Mangabeira e Thiago Isidro, que transportaram nossa amizade para além do Fundão. Vocês viraram amigos dos meus amigos e agora já nem sei mais quem é amigo de quem, só que somos todos grandes amigos.

Ao Thiago Garcia, que me viu crescer e me ajudou a fazer minha primeira equação. Por ter me recebido em sua casa cheia de amor. Por me apresentar o Rio de Janeiro! Por ler os artigos para mim enquanto a gente viajava e me perguntar o que era “dentina de som”. Por me levar com ele na sua viagem de volta ao mundo. E por ser meu mundo. Eu te amo.

À Luiza, Alvrú, Gabo, Assaf, Cecília, Júlia, Lívia, Thiago, Thiago e Thiago vocês são indescritíveis. Como somos bons juntos! Foram vocês que me seguraram. Alguns de longa data: seja de 26, 10, 4 ou 2 anos, todos com tanto amor dentro de cada um e que só vai aumentando. Vocês foram minha família aqui. Minha praça, meu teatro, meu cinema, meu sonho e minhas referências. Obrigada por serem meu tudo.

Ao Rio de Janeiro, “por permitir que uma menina do mato amasse tanto o mar” e fosse correspondida. Por me dar a Praça São Salvador e bons amigos. Por me deixar morar no Flamengo e conhecer o melhor time de vôlei, que não sabe jogar muito mas sabe que um time precisa estar sempre junto. Por me dar Paraty e Minas em um único lugar e encurtar distâncias. Por ser a cidade maravilhosa e continuar sempre de braços abertos para nos receber!

“O senhor saiba: eu toda minha vida pensei por mim, sou nascido diferente. Eu sou eu mesmo. Divêrjo de todo mundo... Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa. O senhor concedendo, eu digo: pra pensar longe, sou cão mestre – o senhor solte em minha frente uma ideia ligeira, e eu rastreio essa por fundo de todos os matos, amém!”

João Guimarães Rosa (2001, p. 31)

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de cimentos à base de ácido poliacrílico e silicato de cálcio em aumentar a densidade mineral da dentina desmineralizada por um modelo de biofilme de microcosmo. Além disso, a técnica de dupla energia em micro-CT foi proposta para quantificar a formação de biofilme e a densidade mineral da dentina nas amostras. Quarenta e cinco cavidades em dentina foram preparadas em 9 terceiros molares humanos sadios, sendo 5 em cada dente. As amostras receberam o inóculo bacteriano e foram incubadas em BHI (Brain Heart Infusion) adicionado com 5% de sacarose durante 96h para formação do biofilme. Em seguida, foram realizados dois escaneamentos consecutivos de cada amostra (40kv e 70kv) no micro-CT e cada cavidade foi preenchida com diferentes cimentos experimentais: policarboxilato de zinco (Poly Zinc™), ionômero de vidro convencional (Ketac Molar™) e dois materiais à base de silicato de cálcio (MTA e Biodentine™) enquanto que a cavidade central foi mantida como controle e preenchida com cera utilidade. As amostras foram mantidas durante 45 dias sob simulação da pressão intrapulpar utilizando-se SBF (*Simulated Body Fluid*) e após o período experimental foram novamente escaneadas. A reconstrução e aquisição foram realizadas utilizando parâmetros padronizados. Os resultados foram testados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk, seguido por métodos não paramétricos. O uso da dupla energia no micro-CT revelou formação de biofilme em todas as cavidades e uma correlação positiva entre o volume da cavidade e o volume do biofilme formado (0,77; $p < 0,01$) foi encontrada. A perda mineral na dentina foi alta ($\pm 90\%$) para todas as cavidades e mostraram valores de densidade mineral inferior a um limiar definido para a cárie dentinária ($1,2\text{g/cm}^3$). O aumento da densidade mineral foi maior com MTA ou Poly Zinc™ (43,56% e 41,64%), os quais foram estatisticamente semelhantes, seguido pelo Biodentine™ (36,40%) e Ketac Molar™ (32,54%). Concluiu-se que o modelo de microcosmo bacteriano humano foi capaz de produzir lesões cáries *in vitro* e que a técnica de micro-CT por dupla energia provou ser um método eficaz para quantificar a formação de biofilme e a densidade mineral da dentina cariada. Todos os cimentos utilizados apresentaram potencial de aumentar a densidade mineral da dentina desmineralizada, ressaltando o elevado potencial bioativo do cimento policarboxilato de zinco.

Palavras-chave: biofilmes, tomografia computadorizada por raios-X, dentina, remineralização dentária

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of polyacrylic acid-based and calcium silicates cements in increasing mineral density of demineralized dentin produced by a microcosm model for caries formation. Moreover, a dual energy micro-CT technique was used to quantify biofilm formation and mineral density. Forty-five dentin cavities were prepared in 9 sound human third molars, 5 in each tooth. Samples received the bacterial inoculum and were incubated in BHI (Brain Heart Infusion) added with 5% of sucrose for 96h to allow biofilm formation. After that, two consecutive micro-CT scans were acquired from each specimen (low energy - 40kv and high energy - 70kv) and then, each cavity was filled with different experimental cements, namely: a zinc polycarboxylate (Poly Zinc™), a conventional glass ionomer (Ketac Molar™) and two calcium silicate based materials (MTA and Biodentine™) while the central cavity was kept as control and filled with dental wax. Specimens were kept for 45 days under simulated pulp pressure using SBF (Simulated Body Fluid) and after the experimental period they were again scanned. Reconstruction and acquisition were accomplished using standardized parameters. Data was tested for normality using the Shapiro-Wilk test, followed by non-parametric methods. Dual-energy micro-CT technique disclosed biofilm formation in all cavities and a positive correlation between cavity volume and volume of formed biofilm was obtained (0.77, $p < 0.01$). The mineral decrease obtained in dentin was high ($\pm 90\%$) for all cavities and all demineralized areas showed mineral density values lower than a defined threshold for dentin caries ($1.2\text{g}/\text{cm}^3$). Increase in mineral density of dentin was best achieved using MTA or Poly Zinc™ (43.56% and 41.64% remineralization), where both were not statistically different. These were followed by Biodentine™ (36.40%) and Ketac Molar™ (32.54%). It is possible to conclude that a microcosm human bacterial biofilm model was able to produce carious lesions *in vitro* and a dual energy micro-CT technique proved to be an effective method to quantify biofilm formation and mineral density of carious dentin. All cements showed potential to increase mineral density, especially zinc polycarboxylate cement.

Keywords: Biofilms, Tomography, X-Ray Computed, dentin, tooth remineralization

Lista de Figuras

Figura 1: Tabela apresentada no artigo e utilizada como parâmetro para cálculo amostral no presente estudo.....	25
Figura 2: Tabelas fornecidas pelo programa Bioestat 5.3 exemplificando o cálculo amostral.....	26
Figura 3: Esquema da disposição das cinco cavidades padronizadas confeccionadas em cada amostra.....	27
Figura 4: Exemplo das reconstruções dos padrões líquidos de hidroxiapatita para calibração da densidade mineral.....	30
Figura 5: Amostra 8. A) Amostra inicial com as cavidades preparadas. B) Amostra com biofilme formado. C) Amostra com as cavidades preenchidas pelos cimentos.....	31

Artigo 1

Figure 1. Sample 5. A) Baseline tooth specimen showing sound dentin with prepared cavities. B) Same specimen after biofilm formation during 96 hours. C) Same specimen after cleaning of microbial accumulation, showing artificial caries formation. Dentinal lesion is evidenced by the darker yellow color of dentin, compared to the sound specimen.....	39
Figure 2. Sample 5. A) 40kV stack before occlusal surface alignment. B) 40kv stack after occlusal surface alignment.	40
Figure 3. Sample 5. A) Acquired 40kV stack after background removal; B) Acquired 70kV stack after background removal; C) Result of subtracting 70kV stack from 40kV stack, biofilm volume after binarization.....	40
Figure 4. Sample 5. A) Specimen showing location of mineral density measurements taken at the cavity bottom. B) Location of mineral density measurements taken at the lesion body in each prepared cavity.	41

Figure 5. Correlation between cavity volume and biofilm volume in each prepared cavity for all samples.43

Figure 6. 3D visualization of biofilm into each prepared cavity in one representative sample. A) Occlusal surface view. B) Oblique view of occlusal surface. C) Transparent enamel. D) Biofilm volume.....44

Artigo 2

Figure 1: Distribution of percentage of mineral density increase for each experimental material and control. Black circles indicate mean values. Different subscript letters indicate statistical significance (Kruskal-Wallis followed by Student-Newman-Keuls proof, $p < 0.05$).61

Lista de Tabelas

Artigo 1

Table 1. Mineral density at sound dentin (g/cm^3), demineralized dentin (g/cm^3), mineral decrease at cavity bottom (%) and mineral decrease at lesion body (%) for each studied sample.....42

Table 2. Cavity volume (mm^3) and biofilm volume (mm^3) among each sample.43

Artigo 2

Table 1. Mineral density at sound dentin (g/cm^3), demineralized dentin (g/cm^3), mineral decrease (%) for each studied sample.59

Table 2. Mean gray values (8-bit) and calibrated mineral density values for the bulk of each material in all specimens.59

Table 3. Mean mineral density values for demineralized dentin before and after treatment for each studied material.60

LISTA DE ABREVIATURAS

pH	Potencial hidrogeniônico
MMPs	Metaloproteinases de matriz
CIV	Cimento de Ionômero de Vidro
MTA	Mineral Trióxido Agregado
Micro-CT	Microtomografia Computadorizada
FO	Faculdade de Odontologia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
C	Celcius
EUA	Estados Unidos da América
UV	Ultra-violeta
dmft	Decayed, Missed, Filled, Teeth
CPOD	Dentes Cariados, Perdidos, Obturados
CFU	Unidade formadora de colônia
BHI	Brain Heart Infusion
Kv	Kilovolts
μ A	Microampere
K_2PO_4	Fosfato Tripotásico
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i> (Fluído Corporal Simulado)
ml	Mililitro
s	Segundos
mm	Milímetro
ml/min	Mililitro por minuto
g/cm^3	Gramas por centímetros cúbicos

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
X	Vezes
±	Mais ou Menos
Δ	Varição
<	Menor que
>	Maior que
™	Trade Mark
°	Graus

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	24
3.1 Desenho do Estudo	24
3.2 Calculo amostra, seleção dos dentes e preparo das amostras	24
3.3 Formação de biofilme através de um modelo de microcosmo	27
3.4 Aquisição, reconstrução e quantificação do biofilme microbiano formado sobre as superfícies dentárias e cavidades	28
3.5 Calibração dos tons de cinza em medidas de densidade mineral da dentina	29
3.6 Análise mineral da dentina cariada	30
3.7 Tratamento com cimentos bioativos	30
3.8 Densidade mineral da dentina tratada e dos cimentos restauradores	31
3.9 Análise estatística	32
4. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	33
4.1 Artigo 1: Microcosm model for artificial dentin caries formation: Demineralization potential and biofilm quantification using micro-CT	34

4.2 Artigo 2: Calcium silicates and polyacrylic acid based cement: A micro-CT investigation of dentin-cement interfacial remineralization	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
Anexos	72

1. INTRODUÇÃO

O dente é o órgão mais mineralizado do corpo humano, composto de aproximadamente 88-95% de hidroxiapatita, que corresponde a um sal de fosfato de cálcio (Sousa *et al.*, 2009). Sendo assim, apesar de possuir alta resistência, atribuída ao conjunto da sua microestrutura e gradiente de propriedades mecânicas variando da superfície do esmalte até a dentina (An *et al.*, 2012), os dentes são extremamente vulneráveis ao processo de desmineralização resultando no desenvolvimento de lesões de cárie.

A placa dentária tem sido reconhecida como um biofilme microbiano, com um elevado grau de organização, na qual as bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais (Costerton *et al.*, 1999). A doença cárie é atualmente definida como uma disbiose, onde o desequilíbrio da microflora bucal leva a um aumento da produção de ácidos (principalmente o ácido láctico) produzidos pela fermentação bacteriana. Isto induz uma queda do pH do biofilme que causa a perda mineral do esmalte e da dentina (Kidd & Fejerskov, 2004).

Em geral, modelos *in vitro* para produção de cárie artificial utilizam soluções ácidas ou géis para causar a perda mineral, o que caracteriza somente os aspectos físico-químicos da desmineralização. Sabe-se, no entanto, que a progressão de cárie *in vivo* é mediada por um biofilme microbiano metabólico ativo (ten Cate, 2015).

Modelos microbiológicos para formação de cárie artificial podem incluir uma única espécie ou um “pool” de espécies microbianas. Quando este “pool” de espécies é formado por microrganismos advindos de um ou mais doadores e não de cepas laboratoriais padrão, consideramos esta como sendo uma abordagem de microcosmo (van de Sande *et al.*, 2011). No desafio de cárie artificial de uma única espécie, uma cepa laboratorial pura de uma bactéria cariogênica conhecida é usada para crescer um biofilme organizado. Em um modelo de microcosmo, as amostras de saliva de pacientes com lesões cariosas são reunidas e incubadas (Antonio *et al.*, 2011). Estes modelos podem resultar em lesões com características muito mais próximas das lesões

formadas *in vivo*, pois contemplam também a etiologia microbiana do processo de desmineralização induzido pelas lesões de cárie.

Os conceitos mais atuais em odontologia preventiva prezam por tratamentos minimamente invasivos e conservadores dos dentes afetados por lesões de cárie no sentido de preservar o potencial para remineralização do tecido desmineralizado, mas não completamente destruído pelos processos bacterianos (Dai *et al.*, 2011). Devido à sua maior composição orgânica (30% em volume) comparada ao esmalte (5 a 10% em volume) (Goldberg *et al.*, 2011), a remineralização da dentina é mais difícil de ser alcançada do que a remineralização do esmalte (Damen *et al.*, 1998). Estratégias de remineralização biomimética visam reproduzir a dimensão e hierarquia estrutural dos depósitos de apatita no interior da matriz de colágeno desmineralizada (Tay & Pashley, 2008). Acredita-se que as proteínas não-colagenosas, juntamente com as metaloproteinases de matriz (MMPs) específicas e outras enzimas secretadas pelos odontoblastos, desempenham papéis importantes na organização da mineralização da dentina (Niu *et al.*, 2014).

A remineralização de lesões de cárie em dentina *in vitro* pode ocorrer segundo dois tipos diferentes de abordagem: a abordagem clássica (da dentina em direção à polpa), e a não-clássica (da polpa em direção à dentina). Na abordagem clássica, a remineralização da dentina é baseada no crescimento de cristais residuais de hidroxiapatita que atuam como sítios de nucleação para os minerais precipitarem quando a dentina é colocada em contato com uma solução rica em íons fosfato e cálcio (Liu *et al.*, 2011a). No entanto, a maior crítica a esta abordagem de remineralização é que ela resulta em somente remineralização extra-fibrilar da matriz de colágeno da dentina, sem que haja remineralização dos componentes intrafibrilares do colágeno (Liu *et al.*, 2011b). Portanto, nesta abordagem, a remineralização convencional não ocorre por nucleação espontânea de mineral na matriz orgânica, mas sim pelo crescimento de cristais de apatita residuais na dentina cariada parcialmente desmineralizada (Kawasaki *et al.*, 2000).

A abordagem não-clássica foi sugerida como um sistema de remineralização *in vitro* que tenta alcançar uma remineralização hierárquica biomimética da matriz

orgânica da dentina. Esse sistema envolve o uso de análogos sintéticos de algumas proteínas da matriz orgânica da dentina que possuem papel essencial no processo de biomineralização. Dois tipos de análogos são necessários: o primeiro são moléculas polianiónicas, como o ácido poliacrílico, que permitem a formação e estabilização do fosfato de cálcio amorfo. Estes, por sua vez são nano-precusores que podem infiltrar os espaços preenchidos com água entre as fibras colágenas e aí se precipitar. Esta precipitação é direcionada por um segundo análogo, que é um substituto para uma fosfoproteína da matriz orgânica da dentina (geralmente uma molécula de polifosfato), que atua como um modelo para o alinhamento dos cristais de apatita nos espaços entre as fibras colágenas, levando então à remineralização hierárquica da dentina (Watson *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2011b). Nesse contexto, o tri-metafosfato de sódio possui um papel crítico em orquestrar a mineralização da dentina, pois esta substância possui grupos funcionais carboxílicos e fosfatados que atuam como sítios para a nucleação de cálcio e fosfato (Liu *et al.*, 2011c).

A biomineralização é o processo pelo qual os organismos vivos secretam minerais inorgânicos, constituídos principalmente por íons de fosfato e cálcio e que se transformam em um composto inorgânico, a hidroxiapatita. É um processo bem regulado, mediado por proteínas da matriz extracelular (Ten Cate, 2008) que buscam a incorporação de nanoprecusores de mineralização em torno do colágeno exposto, evitando sua degradação à longo prazo (Niu *et al.*, 2014) e também pode ser aplicado ao caso da dentina desmineralizada resultante de procedimentos adesivos. Já o termo “bioatividade” pode ser definido como a propriedade de um material em resultar em uma resposta biológica específica na interface entre os tecidos e o mesmo, resultando em uma ligação química (Watson *et al.*, 2014).

Para as estratégias odontológicas preventivas, os cimentos de ionômero de vidro (CIV) possuem um papel importante, já que mantem ao seu redor um ambiente propício à remineralização devido a sua capacidade de liberar íons flúor. Embora o fluoreto aumente a captação de minerais e provoque uma hipermineralização da superfície da lesão, isto impede a remineralização eficaz das partes mais profundas da lesão de cárie (Dai *et al.*, 2011). Desta forma, níveis elevados de fluoreto são menos eficazes na

prevenção da progressão da lesão na dentina do que no esmalte (ten Cate & Van Duinen, 1995).

A recuperação do conteúdo mineral da dentina pela aplicação de cimento de Portland em cáries artificiais já foi relatada (Liu *et al.*, 2011b). Entretanto, este material não possui aplicabilidade clínica devido a sua baixa radiopacidade e alta toxicidade. O agregado trióxido mineral (MTA) tem encontrado importantes aplicações clínicas nestas situações devido à sua biocompatibilidade e bioatividade (Camilleri *et al.*, 2004, Parirokh & Torabinejad, 2010, Torabinejad & Parirokh, 2010b), produzindo apatita ao entrar em contato com fluidos contendo fosfato (Qi *et al.*, 2012). Outro material da classe dos silicatos de cálcio é o Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-des-fossés, França) lançado como um material para “substituição da dentina”. Além disso, apresenta propriedades físico-químicas melhoradas em relação ao MTA, como menor tempo de presa, resistência mecânica e facilidade de manipulação (Malkondu *et al.*, 2014).

A busca por materiais biocompatíveis e com baixa sensibilidade técnica estimula as pesquisas nessa área. Dentre as substâncias químicas que estimulam a nucleação de apatitas no interior de tecidos de colágeno, análogos do ácido policarboxílico tem apresentado grande potencial em estimular a remineralização da dentina (Qi *et al.*, 2012), sendo capazes de estabilizar polímeros de fosfato de cálcio e com isso provocar uma deposição de apatita intrafibrilar de maneira ordenada dentro das fibrilas de colágeno (Liu *et al.*, 2011c). Os cimentos de policarboxilato de zinco, embora tenham caído em desuso com o advento dos CIV, podem vir a preencher esta necessidade quando aplicados com o objetivo de remineralizar a dentina cariada, pois possuem em sua composição estes precursores de remineralização (Paul *et al.*, 2015).

A microtomografia computadorizada (micro-CT) é uma técnica de imagem tridimensional com grande aplicação na avaliação do volume e densidade mineral de tecidos duros de forma não-destrutiva (Neves *et al.*, 2010). De fato, sistemas tomográficos que utilizam fontes microfocadas de raios-X e detectores de alta resolução permitem adquirir projeções em 360° e reconstruir, em 3D as imagens das amostras. Estas imagens correspondem a mapas de distribuição espacial de coeficientes de

atenuação linear, determinados pela energia da fonte de raios-X e a composição atômica do material (Swain & Xue, 2009).

Seu potencial em avaliar processos de biomineralização deve ser explorado, pois ela permite avaliar os mesmos espécimes antes e após os tratamentos propostos, inclusive obtendo-se valores de densidade mineral de hidroxiapatita quando devidamente calibrados, permitindo, assim a avaliação do potencial de remineralização de materiais restauradores (Qi *et al.*, 2012).

Além disso, a técnica de micro-CT de dupla energia é uma variação do seu emprego capaz de detectar sutis variações no coeficiente de atenuação de um objeto usando imagens obtidas através de dois escaneamentos com energias distintas (Hsieh, 2009). Esta técnica pode ser utilizada para detectar materiais de baixa absorção de raios-X, e foi recentemente aplicada para detectar um biofilme dental "artificial" criado com hidrogel em torno de superfícies dentárias (Vyas *et al.*, 2014). Por esta razão, uma aquisição de projeções em dupla energia pode ser útil na caracterização da formação de biofilme, uma vez que seu volume pode ser estimado.

Visando avaliar o potencial bioativo de cimentos utilizados comercialmente, este estudo visa comparar diferentes materiais a base de silicato de cálcio e poliacrilato de zinco com o padrão-ouro, o CIV através de micro-CT, um método experimental cada vez mais usado na odontologia que permite a análise dos espécimes sem a destruição da amostra. Além disso, o presente estudo utiliza um novo método de produção de cáries artificiais em dentina através de um modelo microcosmo e realiza a mensuração volumétrica do biofilme formado pela aplicação da técnica de dupla energia no micro-CT.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Desenvolver um protocolo de formação de lesão artificial de dentina através de um modelo de biofilme pela técnica de microcosmo.
- Avaliar o uso da técnica de dupla energia no micro-CT como método alternativo para quantificação volumétrica de biofilme microbiano formado através do modelo em microcosmo.

2.2 Objetivo Específico

- Comparar a eficácia dos cimentos MTA, Biodentine, CIV e poliacarboxilato de zinco na recuperação da densidade mineral da dentina artificialmente cariada.

3. DELINEAMENTO DA PESQUISA

3.1 Desenho do estudo

O presente estudo trata de uma análise experimental, laboratorial, longitudinal, quantitativa e prospectiva, realizada no Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO/UFRJ). O estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF–UFRJ) e aprovado sob o protocolo nº 54941416.9.0000.5257 (Anexo 1), com a justificativa de se utilizar um biorrepositório de dentes. Um biorepositório representa uma coleção organizada de material biológico humano coletado com finalidade da realização de uma determinada pesquisa científica, sendo descartado totalmente ao final dela, conforme definido pela Resolução CNS Nº 441 de 2011 (Art. 1º) e Portaria MS Nº 2.201 de 2011 (Art. 3º).

3.2 Cálculo amostral, seleção dos dentes e preparo das amostras

O cálculo amostral foi feito através do programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Tefé, AM, Brasil) e usou como base o artigo de Liu *et al.* 2011 (Figura 1). Foi utilizado o teste T para calcular os três parâmetros avaliados no artigo: profundidade da lesão, conteúdo mineral relativo e ΔZ (Figura 2), no período de 2 meses. O nível de significância utilizado foi de 0,01% e o poder do teste foi de 0,95.

Table 1 – Changes in lesion depth, lesion surface relative mineral content and ΔZ in artificial lesions (with or without dentin adhesive) remineralized biomimetically using sodium trimetaphosphate as a templating analog of matrix phosphoproteins.

Parameter	Time period	Without adhesive ^a (N = 8)	With adhesive ^a (N = 8)
Lesion depth (μm)	Baseline	291.4 \pm 7.3	291.9 \pm 7.0
	1 month	211.8 \pm 7.5	246.4 \pm 26.4
	2 months	158.1 \pm 19.3	205.8 \pm 28.7
	3 months	119.7 \pm 15.1	179.9 \pm 24.6
	4 months	77.2 \pm 9.4	138.6 \pm 20.9
Changes in lesion depth after 4 months (%)		73.5 \pm 3.0 ^A	52.6 \pm 6.7 ^B
Relative mineral content along lesion surface (vol.%)	Baseline	11.1 \pm 1.6	10.8 \pm 1.1
	1 month	18.4 \pm 1.8	12.0 \pm 3.7
	2 months	26.4 \pm 4.5	14.1 \pm 2.8
	3 months	37.8 \pm 4.3	18.0 \pm 5.7
	4 months	41.4 \pm 6.1	21.0 \pm 8.7
Changes in relative mineral content along lesion surface after 4 months (%)		30.2 \pm 2.9 ^a	11.0 \pm 3.5 ^b
ΔZ ($\mu\text{m vol.}\%$)	Baseline	5312.2 \pm 409.6	5685.3 \pm 248.8
	1 month	3704.2 \pm 369.2	4998.8 \pm 384.8
	2 months	2123.1 \pm 430.0	4218.1 \pm 537.2
	3 months	1127.8 \pm 357.1	3390.0 \pm 503.6
	4 months	489.4 \pm 153.3	2486.0 \pm 613.6
Changes in ΔZ after 4 months ($\mu\text{m vol.}\%$)		4822.9 \pm 324.0	3198.4 \pm 440.8
Remineralization efficacy after 4 months (%) ^b		90.9 \pm 2.5 ¹	56.6 \pm 9.5 ²

^a Values are means \pm standard deviations. For each parameter summary, groups with different upper case letters, lower case letters or numerals are significantly different ($p < 0.05$).

^b Remineralization efficacy = $(\Delta Z_{\text{baseline}} - \Delta Z_{4 \text{ months}}) / \Delta Z_{\text{baseline}} \times 100\%$, where ΔZ represents the integrated mineral loss from the artificial carious lesion.

Figura 1: Tabela apresentada no artigo e utilizada como parâmetro para cálculo amostral no presente estudo.

Profundidade da lesão:

Conteúdo mineral relativo ao longo da lesão:

Tamanho: t teste duas amostras		
Imprimir		
Entrada de dados		
	1a. amostra	2a. amostra
Média	158.1	205.8
Desvio padrão	19.3	28.7
Amostra 1 Amostra 2		
Relação entre as amostras	1	: 1
Poder do teste	0.95	
Nível alfa	0.01	
<input type="radio"/> Teste Unilateral. <input checked="" type="radio"/> Teste Bilateral		
Resultados		
Tamanho da 1a. amostra	9	
Tamanho da 2a. amostra	9	
Cancelar		

N: 9 amostras

Tamanho: t teste duas amostras		
Imprimir		
Entrada de dados		
	1a. amostra	2a. amostra
Média	24.6	14.1
Desvio padrão	4.5	2.8
Amostra 1 Amostra 2		
Relação entre as amostras	1	: 1
Poder do teste	0.95	
Nível alfa	0.01	
<input type="radio"/> Teste Unilateral. <input checked="" type="radio"/> Teste Bilateral		
Resultados		
Tamanho da 1a. amostra	5	
Tamanho da 2a. amostra	5	
Cancelar		

N: 5 amostras

ΔZ :

Tamanho: t teste duas amostras		
Imprimir		
Entrada de dados		
	1a. amostra	2a. amostra
Média	2123.1	4218.1
Desvio padrão	430	537.2
Amostra 1 Amostra 2		
Relação entre as amostras	1	: 1
Poder do teste	0.95	
Nível alfa	0.01	
<input type="radio"/> Teste Unilateral. <input checked="" type="radio"/> Teste Bilateral		
Resultados		
Tamanho da 1a. amostra	2	
Tamanho da 2a. amostra	2	
Cancelar		

N: 2 amostras

Figura 2: Tabelas fornecidas pelo programa Bioestat 5.3 exemplificando o cálculo amostral.

Sendo assim, nove terceiros molares humanos hígidos extraídos foram obtidos após o consentimento por escrito dos pacientes, realizado através do Termo de Cessão de Dentes (Anexo 2) e foram armazenados em solução de timol à 0,1% sob

refrigeração (4°C) até serem utilizados. A completa remoção do esmalte oclusal e dois terços apicais da raiz do dente foi realizada usando um disco de diamante de 300µm de espessura em uma máquina de corte (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Cinco cavidades regulares em dentina foram preparadas em cada dente com uma broca esférica de diamante (1013, KG Sorensen) usando uma peça de mão dental de alta velocidade com cuidado para não expor a polpa. No total, 45 cavidades foram preparadas inserindo pelo menos metade do diâmetro da broca (± 1 mm) na dentina (Figura 3). Os fragmentos de dentes foram fixados em placas de cultura de poliestireno (TPP, Zellkultur Testplatte 24F) com cera dura que também foi aplicada na superfície externa dos dentes para assegurar que o biofilme formado iria entrar em contato apenas com a superfície oclusal da amostra. As placas foram então esterilizadas sob luz UV durante 40 minutos antes de receber o inóculo microbiano (Bertolini *et al.*, 2014).

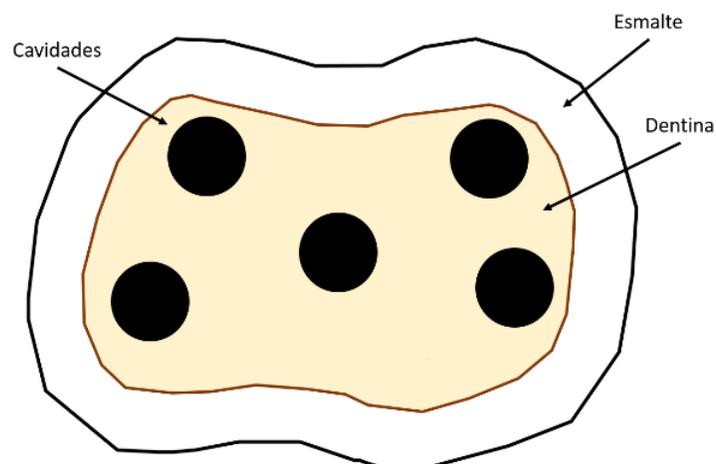


Figura 3: Esquema da disposição das cinco cavidades padronizadas confeccionadas em cada amostra.

3.3 Formação de biofilme através de um modelo de microcosmo

O inóculo inicial foi formado pela saliva mista não estimulada recolhida de três voluntários com idade entre 7-13 anos (média 9,6 anos) num tubo estéril graduado. Os voluntários e seus cuidadores deram o seu consentimento informado para a participação do trabalho (Anexos 3.1 e 3.2). Os indivíduos apresentavam-se em boa saúde geral e não fizeram uso de antibiótico por um período mínimo de 30 dias. O critério de inclusão foi a presença de pelo menos um primeiro molar permanente com lesão de cárie em dentina. A saliva total não estimulada produzida nos primeiros 30s foi

descartada e depois disso ela foi coletada por exatamente 5 min. Foram registradas as médias de dmft, CPOD e média da vazão salivar total de cada voluntário (4,3; 2,0 e 0,58 mL / min, respectivamente).

Um mililitro de saliva de cada voluntário foi colocado em um tubo graduado e misturado utilizando um vórtice. Cada poço contendo uma amostra de dente recebeu 20 μ L do inóculo ($1,5 \times 10^8$ / poço) e foi completado com meio de crescimento BHI acrescido de 5% de sacarose. O sistema foi incubado em microaerofilia durante 7 dias a 37 °C para permitir o crescimento do biofilme. A cada 24 horas, o meio de crescimento em cada poço foi renovado (1000 μ L / poço). Todos os procedimentos foram realizados dentro de uma câmara de fluxo de ar, em ambiente asséptico.

3.4 Aquisição, reconstrução e quantificação do biofilme microbiano formado sobre as superfícies dentárias e cavidades

Após o período de formação do biofilme, o meio de cultura foi removido de cada poço com uma pipeta e as amostras foram escaneadas em um micro-CT de alta energia (Skyscan 1173, Bruker micro-CT, Kontich, Bélgica). A primeira aquisição foi realizada em baixa energia (40kV, 200 μ A), enquanto que para a segunda foi utilizada raios-x de alta energia (70kV, 114 μ A). Com exceção da energia, ambos escaneamentos usaram parâmetros de aquisição semelhantes: tamanho de pixel de 14,25 μ m, filtro de Al de 1mm de espessura, passo de rotação de 0,5° sobre 360°, média de quadros (5) e movimentos aleatórios (40). A amostra não foi movida entre os escaneamentos. Feito isso, os espécimes foram lavados em água destilada e colocados em um aparelho de ultrassom para remover o biofilme aderente.

As projeções foram reconstruídas em cortes transversais através de um software dedicado (nRecon, Bruker) utilizando-se parâmetros selecionados (correção de artefatos de anel 10, correção de endurecimento do feixe de 50% e padronização dos limites de contraste entre 0 e 0.08. As imagens dos cortes transversais foram salvas em tons de cinza (8-bit) com formato BMP.

Para a quantificação do biofilme formado, a primeira aquisição (40kV) foi individualmente alinhada de modo que a superfície oclusal ficasse completamente paralela ao plano oclusal. Depois disso, a segunda aquisição (70kV) foi registrada em relação à primeira, usando um algoritmo de registro rígido implementado na interface de usuário do software 3DSlice (Fedorov *et al.*, 2012). Depois de aplicar a mesma máscara de fundo na aquisição de 40kV, a aquisição de 70Kv foi subtraída da aquisição de 40Kv, resultando em uma nova aquisição contendo a imagem relativa ao biofilme formado em cada cavidade. Esta aquisição foi então binarizada e volumetricamente quantificada.

3.5 Calibração dos tons de cinza em medidas de densidade mineral da dentina

A calibração dos tons de cinza obtidos através do micro-CT e a densidade mineral da dentina foi realizada. Para isto, padrões de fosfato hidrogenado bi-potássico (K_2PO_4) foram produzidos nas concentrações de 0,3; 0,6; e 0,8 g/cm^3 diluídos em água destilada, como proposto anteriormente (Zou *et al.*, 2009). Ainda, outros padrões, com concentração de 1,2; 1,5; 1,8 e 2,1 g/cm^3 também foram produzidos para se conseguir calibrar a densidade da dentina em toda a sua variação de densidade mineral (0 – 1,2 g/cm^3). Os padrões foram escaneados com os mesmos parâmetros de aquisição e reconstrução das amostras dentárias. A Figura 4 exemplifica a aquisições de padrões líquidos de hidroxiapatita em suas respectivas reconstruções.

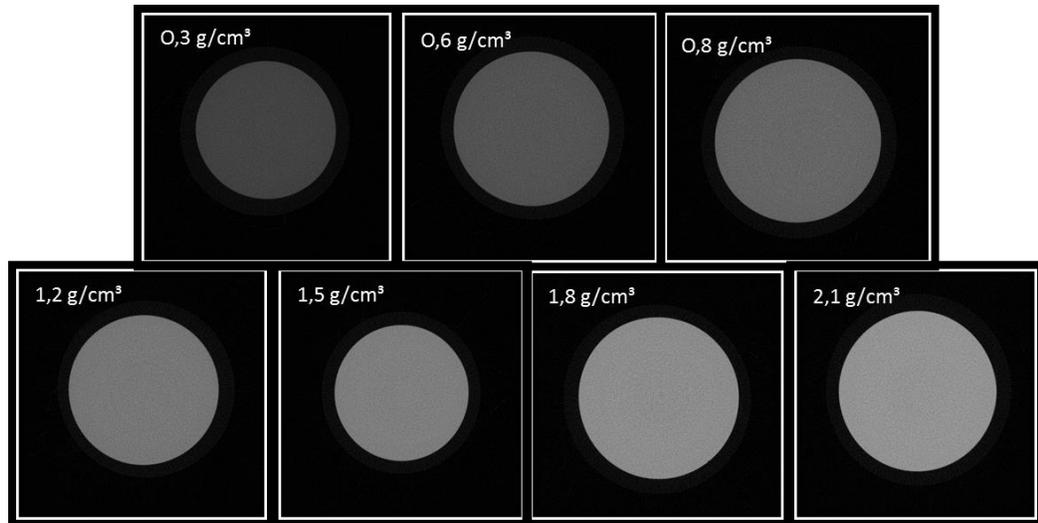


Figura 4: Exemplo das reconstruções dos padrões líquidos de hidroxiapatita para calibração da densidade mineral.

3.6 Análise mineral da dentina cariada

Duas medidas bidimensionais de densidade mineral foram obtidas: A primeira foi tomada 70 μ m abaixo do fundo da cavidade, usando um círculo de 90 pixels de diâmetro ($\pm 1,3$ mm de diâmetro) e a segunda foi tirada de um volume de interesse (VOI) selecionado de 30 pixels de espessura no corpo da lesão, imediatamente abaixo do fundo da cavidade. Todas as medidas de densidade mineral em regiões de dentina cariada foram seguidas por medidas na região de dentina sadia adjacente, para obtenção de valores de referência. Um limiar de densidade mineral para cárie dentinária (1,2g/cm³) foi utilizado como ponto de corte para dentina cariada versus hígida, conforme descrito anteriormente (Neves *et al.*, 2010).

3.7 Tratamento com cimentos bioativos

Cada cavidade no dente foi restaurada com um cimento diferente, desta forma todos os grupos estavam nas mesmas condições com relação ao substrato dentário. A cavidade central sempre foi o grupo controle, que foi restaurada com cera “soft” (Lysanda, São Paulo, Brasil). Os grupos experimentais foram preenchidos com Poly Zinc™ (Prevest DenPro, Índia), Ketac Molar™ (3M ESPE, Seefeld, Alemanha), MTA (Angelus, Londrina, Brasil) e Biodentine™ (Septodont, Saint Maur des Fosses, França) que foram manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes. Cada amostra foi

fixada com adesivo de cianoacrilato (Superbond™ Gel) sobre uma base acrílica transpassada por cânula de metal em seu centro.

Esta cânula foi preparada com uma agulha hipodérmica descartável 18 (12x40), de modo que a extremidade da cânula ficasse contida dentro da câmara pulpar e onde a outra extremidade ficasse ligada à uma seringa hipodérmica de 20 ml contendo 10 ml de fluido corporal simulado (“simulated body fluid” – SBF em pH 7,4). A seringa foi colocada a uma altura de 15 cm em relação à coroa do dente, considerando o menisco (Scheffel *et al.*, 2014). Todos os espécimes foram então mantidos sob simulação da pressão intrapulpar durante 45 dias. Todas as amostras foram mantidas a 100% de umidade relativa.

Após o período de tratamento com os cimentos bioativos, as amostras foram novamente escaneadas em alta energia (70Kv) utilizando-se os mesmos parâmetros de aquisição e reconstrução citados anteriormente. A figura 5 apresenta uma amostra no período inicial com as cavidades preparadas (A), a mesma amostra após a formação de biofilme (B) e as cavidades preenchidas pelos cimentos (C).



Figura 5: Amostra 8. A) Amostra inicial com as cavidades preparadas. B) Amostra com biofilme formado. C) Amostra com as cavidades preenchidas pelos cimentos.

3.8 Densidade mineral da dentina tratada e dos cimentos restauradores

Para o cálculo da densidade mineral da dentina tratada, os parâmetros foram os mesmos utilizados para o cálculo da densidade da dentina cariada. Entretanto, a área de interesse para medição volumétrica correspondia apenas à dentina remineralizada. O potencial de remineralização foi medido como a variação percentual nos valores de

densidade mineral na dentina desmineralizada antes e após o tratamento com os cimentos.

Para os cimentos restauradores, cada material foi identificado na cavidade através de um VOI e a média do seu tom de cinza (8-bit) foi registrada.

3.9 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi empregado para verificar a normalidade dos dados. Por resultarem em dados não-paramétricos o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido pela correlação de Spearman, Mann Whitney ou teste de Wilcoxon dependendo da variável. O nível de significância foi de 5%.

4. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.1 Artigo 1: Microcosm model for artificial dentin caries formation: Demineralization potential and biofilm quantification using micro-CT

Microcosm model for artificial dentin caries formation: Demineralization potential and biofilm quantification using micro-CT

Paula Maciel Pires^a, Thais Pires dos Santos^b, Andrea Fonseca-Gonçalves^a, Matheus Melo Python^c, Ricardo Tadeu Lopes^b, Aline de Almeida Neves^{*a}

^aDepartment of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bLaboratory for Nuclear Instrumentation, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cState University of Southwestern Bahia, Jequié, BA, Brazil

Corresponding Author

Aline de Almeida Neves

Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco, 325 – Cidade Universitária – RJ – Brazil

Zip code 21941-617

e-mail: alineves@ufrj.br

Abstract

Objective: The aim of this study was to induce artificial caries in sound dentin by means of a microcosm model using human saliva as source of bacteria and to apply a novel dual-energy micro-CT technique to quantify biofilm formation and evaluate its demineralization potential. Design: Eight sound human third molars had the occlusal enamel removed by cutting with a diamond disk and five cylindrical cavities (± 2 mm diameter; ± 1.5 mm depth) were prepared over the dentin surface in each specimen (n=40 cavities). After sterilization, each specimen received the bacterial salivary inoculum obtained from healthy individuals presenting dentin caries lesions and were incubated in BHI added of with 5% sucrose for 96h to allow biofilm formation. After that, two consecutive micro-CT scans were acquired from each specimen (40kv and 70kv). Reconstruction of the images was performed using standardized parameters. After alignment, registration, filtering and image calculations, a final stack of images containing the biofilm volume was obtained from each prepared cavity. Dentin demineralization degree was quantified by comparison with sound dentin areas. All data were analyzed using Shapiro-Wilk test and Spearman correlation using $\alpha=5\%$. Results: Dual-energy micro-CT technique disclosed biofilm formation in all cavities. Biofilm volume inside each cavity varied from 0.30 to 1.57mm³. A positive correlation between cavity volume and volume of formed biofilm was obtained (0.77, $p<0.01$). The mineral decrease obtained in dentin was high ($\pm 90\%$) for all cavities and all demineralized areas showed mineral density values lower than a defined threshold for dentin caries (1.2g/cm³). Conclusion: A microcosm human bacterial biofilm was able to produce carious lesions *in vitro* and a dual-energy micro-CT technique was successful in the quantification of its demineralization potential.

Keywords: Dental biofilm, Microcosm model, Micro-CT, Dual-energy

Introduction

The oral cavity is inhabited by more than seven hundred microbial species (Marsh & Martin, 1999) and dental plaque has nowadays been recognized as a microbial biofilm. Biofilms are specifically defined as a “matrix-enclosed bacterial population adherent to each other and/or to surfaces or interfaces” (Costerton, Stewart, & Greenberg, 1999). Many intrinsic and extrinsic factors impact the composition, metabolic activity, and pathogenesis of these highly diversified oral microenvironments (Zaura & ten Cate, 2004). However, organic acid production due to bacterial metabolism on the tooth surface is considered to be the major cause of dental caries, leading to mineral loss and cavitation of the teeth.

Some experimental studies have demonstrated formation of *in vitro* enamel and dentin caries-like lesions using various demineralizing agents or organic acids (Marquezan *et al.*, 2009; Moron *et al.*, 2013; Pacheco *et al.*, 2013; ten Cate, 2015). In general, *in vitro* artificial caries models produced by acid solutions or gels are dealing only with physico-chemical aspects of demineralization, whereas the *in vivo* caries progression is mediated by a metabolic active microbial biofilm. Moreover, demineralization in genuine caries-affected dentin is often manifested as sporadic islands of demineralization, instead of a continuous demineralization gradient from the lesion surface to the inner region, ranging in lesion depth and degree of tubular occlusion (Qi *et al.*, 2012). For this reason, a biological *in vitro* model which mimics the oral conditions seems to be more reliable than experiments based on subsurface acid demineralization (Arnold *et al.*, 2001).

Microbiological models of artificial caries formation include single-species or a microcosm approach. In the single-species artificial caries challenge, a pure strain of a known cariogenic bacteria is used to grow into an organized biofilm. In a microcosm model, saliva samples from patients presenting carious lesions are pooled and incubated (Antonio *et al.*, 2011).

Micro-CT is becoming popular in dental research, as it allows non-destructive morphological, volumetric and mineral density measurements of hard tissues. Dual-energy micro-CT is a variation of the technique capable to detect subtle variation in the

attenuation coefficient of one object using two image stacks obtained after data acquisition in two distinct input energies (Hsieh, 2009). In fact, this technique can be especially used to detect low x-ray absorption materials and has been recently applied to detect an “artificial” dental biofilm created with hydrogel around tooth surfaces (Vyas *et al.*, 2014). For this reason, a dual-energy acquisition could be of aid in the characterization of microbial induced caries models, since the volume of produced biofilm after the microbiological assay could possibly be estimated.

Thus, the aim of this study was to apply a dual-energy micro-CT technique to visualize and quantify biofilm formation over sound human dentin submitted to a microcosm model for artificial caries formation using saliva as a source of cariogenic bacteria. Moreover, this biofilm model was also characterized regarding demineralization potential in sound dentin using a micro-CT and digital image processing approach.

Materials and Methods

Tooth selection and sample preparation

Eight sound human third molars were obtained from patients living in the city of Rio de Janeiro, Brazil. The experimental protocol of the present study was approved by the Ethical Committee of the host institution (CEP-HUCFF) and was registered at government databases (Plataforma Brazil) under the number 54941416.9.0000.5257. All methods were performed in accordance with the CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) guidelines and regulations. They were randomly numbered (1 to 8) and stored in a 0.1% thymol solution at 4°C until used. Complete removal of occlusal enamel and two apical thirds of the tooth root was performed using a diamond disk mounted on a cutting machine (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Five regular cavities in dentin were prepared with a spherical diamond drill (1013, KG Sorensen) using a high speed dental handpiece without exposing the pulp. In total, 40 cavities were prepared by inserting at least half of the bur diameter (± 1 mm) into the dentin. The tooth fragments were fixed in 24-well polystyrene tissue-culture plates (TPP, Zellkultur Testplatte 24F) with hard wax which was also applied on the outer surface of the teeth to ensure that the formed biofilm would contact only the occlusal surface of the specimen. The plates were then sterilized under UV light for 40 min before receiving the

microbial inoculum (Bertolini *et al.*, 2014).

Biofilm formation by a microcosm model

The inoculum comprised unstimulated whole mixed saliva collected from three volunteers aged 7–13 years (mean 9.6 years) into a graduated collection tube. The subjects were in good general health and not taking any medication. Inclusion criteria included having at least one first permanent molar presenting a dentinal caries lesion. The volunteers and their caregivers gave their informed consent for participation. Unstimulated whole saliva produced in the first 30s was discarded and after that, it was collected for exactly 5 min. The mean dmft, DMFT and mean whole saliva flow rate of each volunteer were registered (4.3, 2.0, and 0.58 mL/min, respectively).

One milliliter of saliva from each volunteer was placed into a tube and mixed using a vortex. From this suspension, 8.1×10^7 CFU/mL of all oral microorganisms were counted. From those, 1.6×10^3 CFU/mL of *Streptococcus mutans*, 4.9×10^5 CFU/mL of *Lactobacillus* ssp. and 3.6×10^2 CFU/mL of *Candida* ssp. were identified. Each well containing one tooth specimen received 20 μ L of the inoculum (1.5×10^8 /well), 5% sucrose and was completed with Brain-Heart infusion (BHI) growth media. The system was incubated in microaerofilia for 7 days at 37°C to allow biofilm growth. Every 24 hours, growth media in each well was renewed (1000 μ L/well). All procedures were performed inside a laminar air-flow chamber, under aseptic environment. Figure 1 illustrates a baseline specimen, the same specimen after biofilm formation and after removing the microbial accumulation.

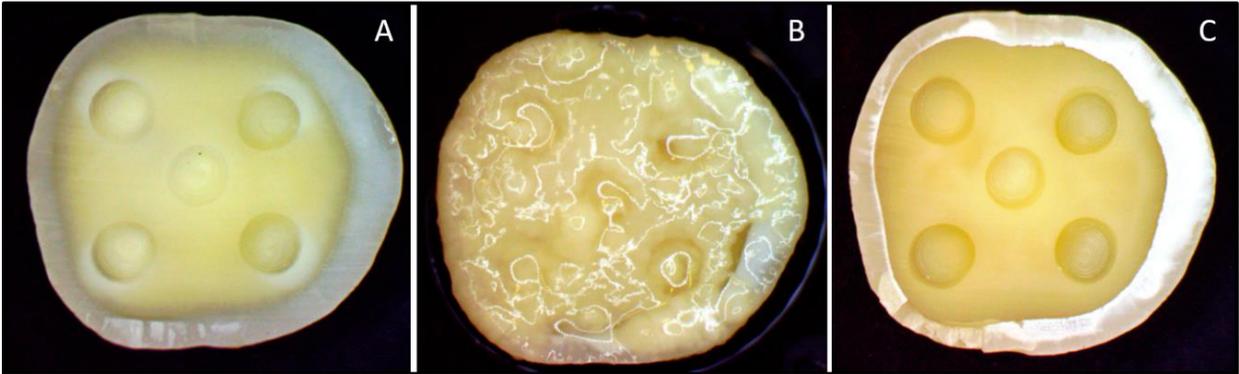


Figure 1. Sample 5. A) Baseline tooth specimen showing sound dentin with prepared cavities. B) Same specimen after biofilm formation during 96 hours. C) Same specimen after cleaning of microbial accumulation, showing artificial caries formation. Dentinal lesion is evidenced by the darker yellow color of dentin, compared to the sound specimen.

Micro-CT acquisition and reconstruction

After the period of biofilm formation, BHI culture medium was removed from each well with a pipette and the specimens were scanned in a micro-CT (Skyscan 1173, Bruker, Kontich, Belgium). The first acquisition was performed in low energy (40kV, 200 μ A source current) while the second used high energy x-rays (70kV, 114 μ A source current). Apart from these, both scans used similar acquisition parameters: 14.25 μ m pixel size, 1mm thick Al filter, 0.5° rotation step over 360°, frame averaging (5) and random movements (40). The sample was not moved between scans. After the scanning procedures, the specimens were washed in distilled water and sonicated to remove the adherent biofilm.

Biofilm quantification

Reconstruction of both acquired stacks of images (40kV and 70kV) was performed with specific standardized parameters (ring artifact correction 10, beam hardening correction 75% and input of similar contrast limits), for all specimens. For the biofilm quantification, the first acquired stack (40kV) was individually aligned so that the occlusal surface was completely parallel to the occlusal plane (Figure 2). After that, the second stack (70kV) was registered against the first, using an affine algorithm implemented on the 3DSlice software interface (Fedorov et al., 2012). Then, background from the outer part of the tooth and from inside the cavities were extracted from the higher energy stack using a

minimum threshold algorithm (Prewitt & Mendelsohn, 1966) implemented on the ImageJ/FIJI software interface (Schindelin *et al.*, 2012).

After applying the same background mask at the 40kV stack, the 70Kv stack was subtracted from this, resulting in stack containing biofilm formed at each prepared cavity. This stack was further binarized and volumetrically quantified (Figure 3).

For determination of cavity volume, a threshold algorithm was applied on the 70KV stack (Li & Tam, 1998), which, by using higher scanning energies, is able to obtain clear contours of dense materials with minimum amount of noise. Individual cavities were then obtained. Specimens 1 and 2 were micro-CT scanned on the same day which the microbiology assay was stopped, while specimens 3 to 8 were scanned after 1 day of freezing.

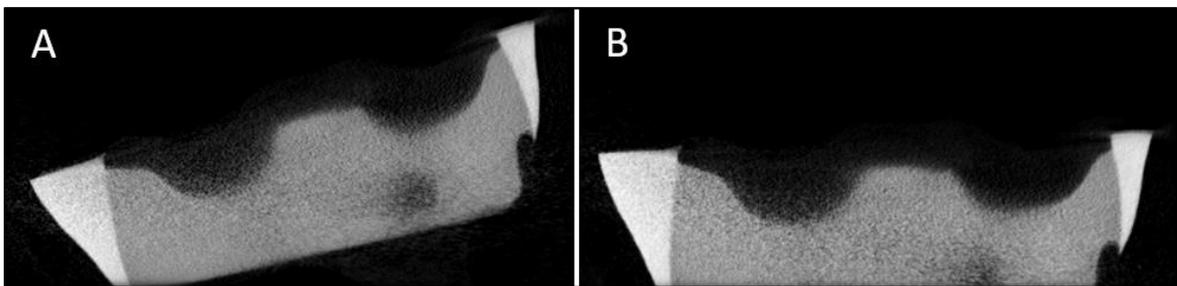


Figure 2. Sample 5. A) 40kV stack before occlusal surface alignment. B) 40kv stack after occlusal surface alignment.

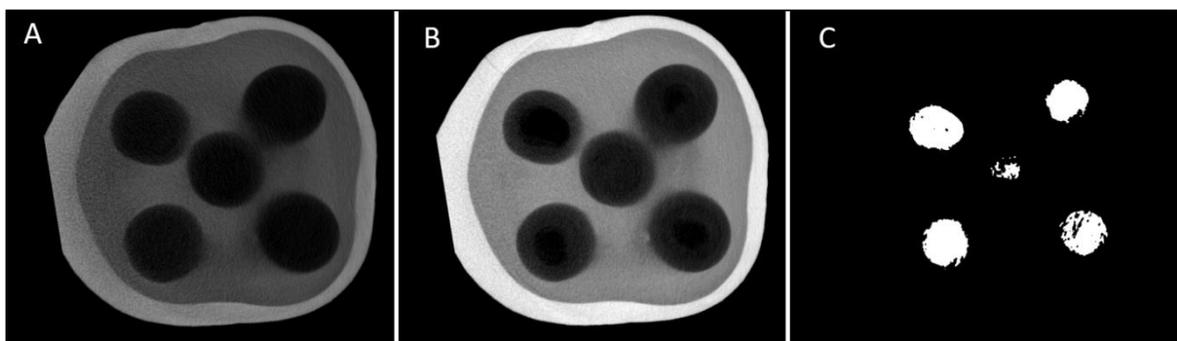


Figure 3. Sample 5. A) Acquired 40kV stack after background removal; B) Acquired 70kV stack after background removal; C) Result of subtracting 70kV stack from 40kV stack, biofilm volume after binarization.

Mineral density analysis of carious dentin

Mineral density in dentin was obtained after calibration of micro-CT gray values against a set of reconstructed phantoms obtained from K_2HPO_4 solutions prepared in the

following concentrations: 0.3, 0.6, 0.8, 1.2, 1.5 and 1.8 g/cm³. The acquisition and reconstruction procedures were performed using similar parameters used for the tooth specimens, as described earlier (Zou, Gao, Jones, Hunter, & Swain, 2009). Two mineral density measurements were obtained: 1) the first was taken 70µm below the cavity bottom, using a 90 pixel diameter circle ($\pm 1,3$ mm diameter) (Figure 4A); 2) the second was taken from a selected 30 pixel thick (0,4mm) volume of interest (VOI) at the lesion body, immediately below the cavity bottom (Figure 4B). All mineral density measurements at carious dentin regions were followed by measurements on the adjacent sound dentin region, for obtaining reference values of mineral density decrease. A mineral density threshold for dentin caries (1.2g/cm³) was used as the cut-off point for carious versus sound dentin, as previously described (Neves, Coutinho, Vivian-Cardoso, Jaecques, & Van Meerbeek, 2010).

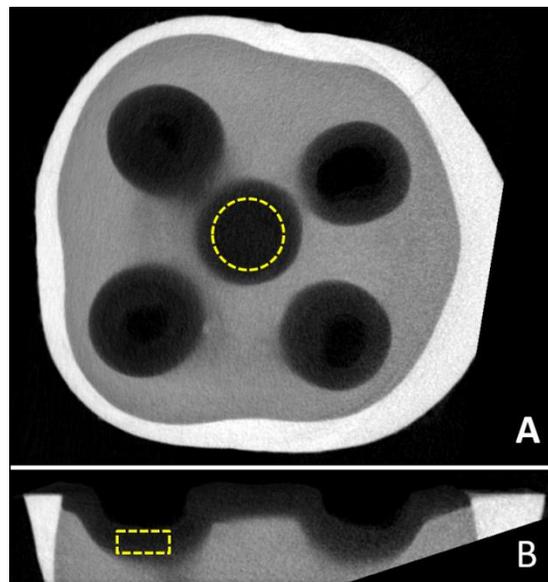


Figure 4. Sample 5. **A) Specimen showing location of mineral density measurements taken at the cavity bottom. B) Location of mineral density measurements taken at the lesion body in each prepared cavity.**

Statistical Analysis

Shapiro–Wilk test was employed to verify the normality of the obtained data. Kruskal–Wallis tests were then used to identify differences among the groups, whereas Spearman correlation test was performed to determine correlation between two interest variables. All statistical analysis were used with a level of significance set at 5%.

Results

Table 1 shows mineral density values of sound dentin (baseline), demineralized dentin, percentage of mineral decrease at the bottom of the cavity and at lesion body for each sample. All specimens showed mineral density values at the bottom of the cavity and lesion body lower than the threshold for dentin caries (1.2 g/cm³).

Table 1. Mineral density at sound dentin (g/cm³), demineralized dentin (g/cm³), mineral decrease at cavity bottom (%) and mineral decrease at lesion body (%) for each studied sample.

Sample	Sound dentin (g/cm ³)	Demineralized dentin (g/cm ³)	Mineral decrease at cavity bottom (%)	Mineral decrease at lesion body (%)
1	1.71	0.15	90.85%	71.50%
2	2.16	0.50	76.61%	64.19%
3	1.99	0	100%	98.28%
4	1.86	0	100%	98.98%
5	2.00	0	100%	97.24%
6	2.20	0.09	95.27%	85.92%
7	1.94	0.03	98.13%	91.84%
8	1.93	0	100%	91.64%

Table 2 shows distribution of mean cavity volume and corresponding mean biofilm volume in each specimen. Regarding cavity volume, specimen 4 presented lower values (0.622 mm³) than the other specimens. Although specimens 5 to 8 did not show difference in biofilm volume compared to specimens 1 and 2, these resulted in higher volume of biofilm (1.568 mm³ and 1.350 mm³), specially compared to specimens 3 and 4 (0.305 mm³ and 0.416 mm³).

Table 2. Cavity volume (mm³) and biofilm volume (mm³) among each sample.

Sample	Cavity volume (mm ³)	Biofilm volume (mm ³)
1	1.852 ± 0.423 ^a	1.568 ± 0.441 ^a
2	1.637 ± 0.524 ^a	1.350 ± 0.509 ^a
3	0.881 ± 0.506 ^{a,b}	0.305 ± 0.295 ^b
4	0.622 ± 0.118 ^b	0.416 ± 0.111 ^b

5	$1.152 \pm 0.226^{a,b}$	$0.557 \pm 0.129^{a,b}$
6	1.849 ± 0.584^a	$0.898 \pm 0.299^{a,b}$
7	$1.536 \pm 0.306^{a,b}$	$1.012 \pm 0.221^{a,b}$
8	$0.849 \pm 0.322^{a,b}$	$0.609 \pm 0.260^{a,b}$

Means followed by different superscript letters are statistically significant (Kruskal-Wallis followed by Dunn's proof, $p > 0.05$).

Spearman coefficient test showed a positive correlation between the cavity volume and biofilm volume (0.77, $p < 0.01$) (Figure 5). Figure 6 shows tridimensional visualization of biofilm formed into the individual cavities for one representative specimen.

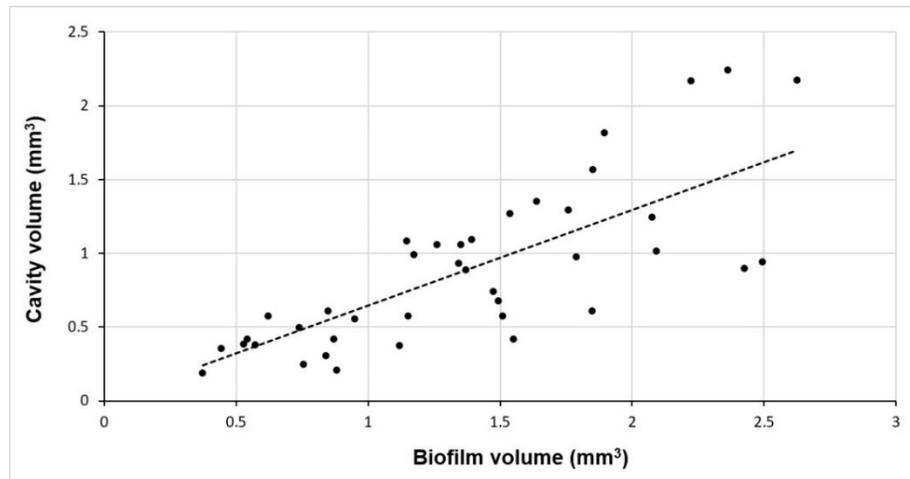


Figure 5. Correlation between cavity volume and biofilm volume in each prepared cavity for all samples.

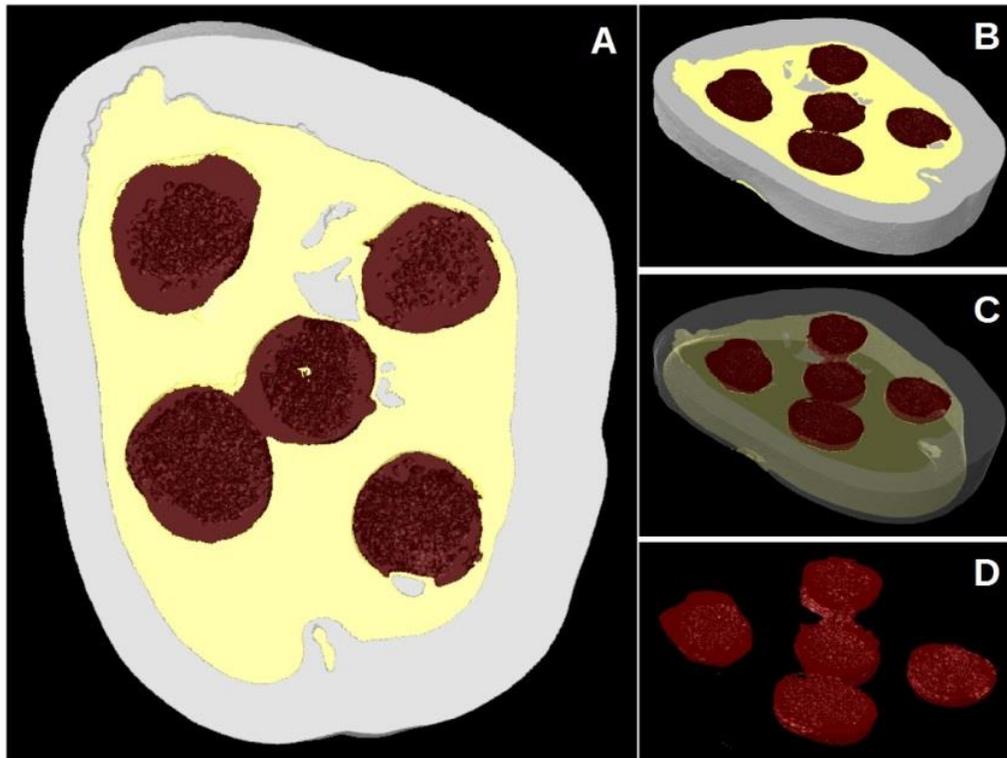


Figure 6. 3D visualization of biofilm into each prepared cavity in one representative sample. A) Occlusal surface view. B) Oblique view of occlusal surface. C) Transparent enamel. D) Biofilm volume.

Discussion

Studies dealing with *in vitro* artificial caries production which mimic oral conditions are important in order to evaluate anticariogenic potential of materials and/or techniques. In this study, human bacterial biofilm was able to produce artificial caries in sound teeth. To detect dentin caries, the demineralization cut-off point was based on mineral density values obtained by micro-CT values (Neves, Coutinho, De Munck, & Van Meerbeek, 2011; Neves *et al.*, 2010) and a biomechanical characterization (Pugach *et al.*, 2009) of dentin tissue that should be removed from the cavity during preparation (biomechanically failed dentin). In this regard, values lower than 1.2 g/cm³ of hydroxyapatite were considered as carious dentin. In this study, all specimens demonstrated mineral density in lesion body or at the cavity bottom lower than this threshold (Table 1), confirming the ability of this microcosm biofilm model to produce mineral density decrease in dentin similar to caries lesions.

The specific microbial composition of the employed salivary pool could influence the cariogenic potential of the resulting biofilm. In order to restrict biofilm composition into a more cariogenic microflora, in this study, volunteers should have at least moderate dmft/DMFT scores and minimum of one permanent molar showing dentin caries lesion.

The high percentage of mineral decrease (more than 90%) seen in almost all the specimens in this study can be probably explained by this high cariogenic potential of the biofilm but also increased by the absence of vital pulp. Although it invariably occurs at *in vitro* experiments, vital pulp tissue responds to a dentinal (or even at a surface enamel) injury by laying down reactionary dentin secreted by pre-dentin odontoblasts or reparative dentin elaborated by odontoblast-like cells that differentiate from precursor cells in the absence of inner dental epithelium and basement membrane (Farges *et al.*, 2015). As in this *in vitro* study the reparative potential of dentin is suppressed and only demineralization occurs, the rate of dentin demineralization was probably highly increased.

There are different types of *in vitro* caries-like lesion induction models, each presenting different patterns of lesion development. They can include microbiological models, acidic gels (Carvalho, de Fucio, Sinhoreti, Correr-Sobrinho, & Puppini-Rontani, 2008) or

buffered solutions (ten Cate, 2015). However, these methods cannot simulate primary factors involved in the natural process, such as biofilm, saliva and collagen degradation (Rodrigues, Delbem, Pedrini, & Cavassan, 2010). 5% of sucrose was also added in the inoculum in the present study to simulated a cariogenic diet.

The use of microorganisms as acid producers in cultures for caries-like lesions induction can be considered a biological model. Standard strains of *S. mutans* are generally used for this purpose. For decades, the sugar-fermenting ability from this acidogenic specie has been considered the main causative agent of dental caries and most diagnostic and therapeutic strategies have been targeted toward this specific microorganism. However, recent DNA- and RNA-based studies from carious lesions have uncovered an extraordinarily diverse ecosystem where *S. mutans* accounts only a tiny fraction of the bacterial community. This supports the concept that consortia formed by multiple microorganisms act synergistically, to initiate and progress with enamel demineralization (Simon-Soro & Mira, 2015) followed by cavity breakdown due to physiological masticatory forces (Neves, Coutinho, Alves, & Assis, 2015). Therefore, a biofilm model formed by a salivary pool can increase the ability of an artificial caries model to mimic the real carious lesion.

Thus, development of *in vitro* methodologies for caries-like lesion production is a very important issue nowadays, where new techniques and materials are on the pipeline and need to be tested in clinical-like situations. Artificial caries lesions are used to test adhesiveness of dental materials to sound or diseased dental tissues, remineralization studies and secondary caries induction in restored teeth (Pacheco *et al.*, 2013). In this study, five cavities were produced on each tooth, and for this reason, different materials could be tested in one same sample presenting similar mineral density characteristics.

One of main advantages of the micro-CT is its non-destructive characteristic regarding hard tissues samples. During the scanning procedure some loss of biofilm biomass will occur probably due to heat generation (Shields & Burne, 2015). After freezing, probably some loss of biomass can occurs as well, maybe explained why samples 1 and 2 (scanned at the same day that microbiologic assay finished) had the highest biofilm volumes.

There are several available methods of quantitative biofilm analysis, each with specific strengths and weaknesses. All of them require specific techniques and more than one step to be performed (Klinger-Strobel, Suesse, Fischer, Pletz, & Makarewicz, 2016). This novel model using dual-energy micro-CT has been able to reproduce and quantify the biofilm volume formed by a human salivary model. Furthermore, the demineralization potential of this model in sound dentin has also been quantified without any sample preparation.

Conclusion

A microcosm human bacterial biofilm was able to produce artificial caries in sound teeth and a dual-energy micro-CT technique was able to produce volumetric quantification and 3D visualization of biofilm formation. Characterization of the demineralization potential of the biofilm model in producing *in vitro* caries lesions was also accomplished.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the Post-Graduation Program in Pediatric Dentistry peer review seminars at the Federal University of Rio de Janeiro for the critical comments put forth.

Funding

This work was supported by Brazilian Research Funding agencies CAPES, CNPq and FAPERJ (grant number E-26/203.185/2016).

References

Antonio, A.G., Iorio, N.L., Pierro, V.S., Candreva, M.S., Farah, A., dos Santos, K.R., & Maia, L.C. (2011). Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Archives of Oral Biology*, 56(6), 556-564.

Arnold, W.H., Gaengler, P., Sabov, K., Schmitz, I., Gedalia, I., & Steinberg, D. (2001). Induction and 3D reconstruction of caries-like lesions in an experimental dental plaque biofilm model. *Journal of Oral Rehabilitation*, 28(8), 748-754.

Bertolini, M.M., Portela, M.B., Curvelo, J.A., Soares, R.M., Lourenco, E.J., & Telles, D.M. (2014). Resins-based denture soft lining materials modified by chlorhexidine salt incorporation: an in vitro analysis of antifungal activity, drug release and hardness. *Dental Materials*, 30(8), 793-798.

Carvalho, F.G., de Fucio, S.B., Sinhoreti, M.A., Correr-Sobrinho, L., & Puppim-Rontani, R.M. (2008). Confocal laser scanning microscopic analysis of the depth of dentin caries-like lesions in primary and permanent teeth. *Brazilian Dental Journal*, 19(2), 139-144.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.

Farges, J. C., Alliot-Licht, B., Renard, E., Ducret, M., Gaudin, A., Smith, A.J., & Cooper, P. R. (2015). Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators of Inflammation*, 2015, 230251.

Fedorov, A., Beichel, R., Kalpathy-Cramer, J., Finet, J., Fillion-Robin, J. C., Pujol, S., Kikinis, R. (2012). 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magnetic Resonance Imaging*, 30(9), 1323-1341.

Hsieh, J. (2009). *Major components of the CT scanner*. In J. Hsieh (Ed.), *Computed tomography: Principles, design, artifacts, and recent advances* (pp. 147-165). Bellingham: SPIE Press.

Klinger-Strobel, M., Suesse, H., Fischer, D., Pletz, M.W., & Makarewicz, O. (2016). A Novel Computerized Cell Count Algorithm for Biofilm Analysis. *PLoS One*, 11(5), e0154937.

Li, C.H., & Tam, P.K.S. (1998). An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition Letters*, 18(8), 771-776.

- Marquezan, M., Correa, F.N., Sanabe, M.E., Rodrigues Filho, L.E., Hebling, J., Guedes-Pinto, A.C., & Mendes, F.M. (2009). Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Archives of Oral Biology*, 54(12), 1111-1117.
- Marsh, P., & Martin, M.V. (1999). *Dental Plaque*. In P. Marsh & M.V. Martin (Eds.), *Oral Microbiology* (pp. 58-81). Oxford: Wright.
- Moron, B.M., Comar, L.P., Wiegand, A., Buchalla, W., Yu, H., Buzalaf, M.A., & Magalhaes, A.C. (2013). Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: hardness and mineral content correlation. *Caries Research*, 47(2), 162-170.
- Neves, A.A., Coutinho, E., Alves, H.D., & Assis, J.T. (2015) Stress and Strain Distribution in Demineralized Enamel: A Micro-CT Based Finite Element Study. *Scanning*, 37(2), 258-264.
- Neves, A.A., Coutinho, E., De Munck, J., & Van Meerbeek, B. (2011). Caries-removal effectiveness and minimal-invasiveness potential of caries-excitation techniques: a micro-CT investigation. *Journal of Dentistry*, 39(2), 154-162.
- Neves, A.A., Coutinho, E., Vivan-Cardoso, M., Jaecques, S., & Van Meerbeek, B. (2010). Micro-CT based quantitative evaluation of caries-excitation. *Dental Materials*, 26(6), 579-588.
- Pacheco, L.F., Banzi, E., Rodrigues, E., Soares, L.E., Pascon, F.M., Correr-Sobrinho, L., & Puppim-Rontani, R.M. (2013). Molecular and structural evaluation of dentin caries-like lesions produced by different artificial models. *Brazilian Dental Journal*, 24(6), 610-618.
- Prewitt, J.M., & Mendelsohn, M.L. (1966). The analysis of cell images. *Annals of the New York Academy of Science*, 128(3), 1035-1053.

- Pugach, M.K., Strother, J., Darling, C.L., Fried, D., Gansky, S.A., Marshall, S.J., & Marshall, G.W. (2009). Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. *Journal of Dental Research*, 88(1), 71-76.
- Qi, Y.P., Li, N., Niu, L.N., Primus, C.M., Ling, J.Q., Pashley, D.H., & Tay, F.R. (2012). Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomaterialia*, 8(2), 836-842.
- Rodrigues, E., Delbem, A.C., Pedrini, D., & Cavassan, L. (2010). Enamel remineralization by fluoride-releasing materials: proposal of a pH-cycling model. *Brazilian Dental Journal*, 21(5), 446-451.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682.
- Shields, R.C., & Burne, R.A. (2015). Conserved and divergent functions of RcrRPQ in *Streptococcus gordonii* and *S. mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 362(16).
- Simon-Soro, A., & Mira, A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, 23(2), 76-82.
- ten Cate, J. M. (2015). Models and role models. *Caries Research*, 49 Suppl 1, 3-10.
- Vyas, N., Walmsley, A. D., Pecheva, E., Dehghani, H., Grover, L., & Sammons, R. L. (2014). Visualizing synthetic dental biofilm on teeth using micro computed tomography. Bruker micro-CT User Meeting Available at: http://bruker-microct.com/company/UM2014/000_AbstractBook2014.pdf
- Zaura, E., & ten Cate, J.M. (2004). Dental plaque as a biofilm: a pilot study of the effects of nutrients on plaque pH and dentin demineralization. *Caries Research*, 38 Suppl 1, 9-15.

Zou, W., Gao, J., Jones, A.S., Hunter, N., & Swain, M.V. (2009). Characterization of a novel calibration method for mineral density determination of dentine by X-ray microtomography. *Analyst*, 134(1), 72-79.

4.2 Artigo 2: Calcium silicates and polyacrylic acid based cement: A micro-CT investigation of dentin-cement interfacial remineralization

Paula Maciel Pires^a, Thais Pires dos Santos^b, Andréa Fonseca-Gonçalves^a, Matheus Melo Pithon^c, Ricardo Tadeu Lopes^b, Aline de Almeida Neves^a

^aDepartment of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^bLaboratory for Nuclear Instrumentation, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^cState University of Southwestern Bahia, Jequié, BA, Brazil

Corresponding Author

Aline de Almeida Neves

Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco, 325 – Cidade Universitária – RJ – Brazil

Zip code 21941-617

e-mail: alineves@ufrj.br

Abstract

Objective: To test the hypothesis that polyacrylic acid-based and calcium silicates cements are able to increase mineral density of demineralized dentin produced by a microcosm *in vitro* model for caries formation. **Methods:** Forty-five dentin cavities were prepared in 9 sound human third molars (5 in each tooth). Samples received the bacterial inoculum and were incubated in BHI added with 5% of sucrose for 96h to allow biofilm formation. After the artificial caries formation, the specimens were scanned in a high energy micro-CT and after that, each cavity was filled with different experimental cements, namely: a zinc polycarboxylate (Poly Zinc), a conventional glass ionomer (Ketac Molar) and two calcium silicate based materials (MTA and Biodentine) while the central cavity was kept as control in all specimens by filling with conventional dental wax. Specimens were kept for 45 days under simulated intrapulp pressure using SBF and after the experimental period they were again scanned. Reconstruction was accomplished using standardized parameters and the % of mineral density change were calculated in demineralized dentin areas. Data was tested for normality using the Shapiro-Wilk test, followed by non-parametric methods. **Results:** The microcosm biofilm artificial caries model was able to decrease mineral density in sound dentin ($\pm 90\%$). Increase in mineral density on dentin was best achieved using MTA or Poly Zinc (43.56% and 41.64% remineralization), followed by Biodentine (36.40%) and Ketac Molar (32.54%). **Significance:** All cements proved to increased the mineral density in demineralized dentin *in vitro*, but zinc polycarboxylate cement showed high bioactive potential. Micro CT proved to be an effective method to evaluate mineral density changes.

Keywords: Microcosm model, Micro-CT, demineralized dentin, remineralization

1. Introduction

Dentin is a complex tissue, containing apatite, collagen, proteins and water. Dental caries lesions affect the mineral phase of dentin by demineralization and expose collagen fibers, creating conditions for rapid destruction the entire dentin network [1]. Remineralization can be defined as the process of restoring minerals into the dental tissue using materials/substances which should be able to: 1) deliver mineral ions, 2) bind to collagen (acting as template of calcium and phosphorus and stimulate nucleation of apatite crystallization), 3) protect collagen from degradation, 4) provide an adequate pH to inhibit collagenolytic enzymes and 5) favour new mineral formation [2]. In fact, minimally invasive operative dentistry concepts nowadays require using bioactive restorative materials which are able to induce remineralization of carious tissue as part of the restorative therapy [3].

Zinc polycarboxylate cements were the first dental cements showing some chemical adhesion to the tooth [4]. The powder contains zinc oxide, magnesium oxide, tin oxide, bismuth oxide and/or alumina. The liquid is an aqueous solution of polyacrylic acid. As the amount of fluoride released from this type of cement is small, it was soon replaced by glass-ionomer cements (GICs). Conventional GICs are water-based materials which sets by an acid-base reaction between a polyalkenoic acid and a fluoroaluminosilicate glass. Polyacrylic acid (pAA) mediate the cation and anion interaction processes when in contact with dentin by mimicking the function of various mineralization proteins producing amorphous mineral phases [5].

Mineral trioxide aggregate (MTA) is indicated as a repair material for endodontic perforations and root-end fillings due its excellent biocompatibility and ability to induce mineralized tissue formation [6, 7]. Another calcium-silicate restorative material has been recently launched (Biodentine, Septodont, Saint Maur des Fosses, France), to be used not only as an endodontic repair material but also as material for dentin replacement. Recent studies have shown that calcium and silicon ions leached from calcium silicate cements have the potential to stimulate proliferation and odontoblast-related gene expression in pulp tissue [8].

The aim of this study was to compare the remineralization potential of polyacrylic dental

cements and calcium silicate (zinc polycarboxylate, MTA and Biodentine) to conventional glass ionomer over demineralized human dentin produced by a microcosm model for artificial caries formation using saliva as a source of cariogenic bacteria. Micro-CT was used to quantify assess mineral density changes before and after the experimental period.

2. Materials and Methods

2.1. Tooth selection and sample preparation

Nine sound human third molars were obtained from patients living in the city of Rio de Janeiro, Brazil. The teeth were fully or partially erupted and were extracted for clinical reasons and collected after written consent. The experimental protocol of the present study was approved by the Ethical Committee of the host institution (CEP-HUCFF) and was registered at government databases (Plataforma Brazil) under the number 54941416.9.0000.5257.

They were randomly numbered (1 to 9) and stored in a 0.1% thymol solution at 4°C until used (less than 3 months). Complete removal of occlusal enamel and the two apical thirds of the tooth root was performed using a 300 µm thick diamond disk mounted on a cutting machine (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). After that, five regular cavities in dentin were prepared with a spherical diamond drill (1013, KG Sorensen) using a high speed dental handpiece. In total, 45 cavities were prepared by inserting at least half of the bur diameter (\pm 1mm) into the dentin.

After, the specimens were fixed in 24-well polystyrene tissue-culture plates (TPP, Zellkultur Testplatte 24F) with hard wax which was also applied on the outer surface of the teeth to ensure that the formed biofilm would contact only the occlusal surface of the specimen. The plates were then sterilized under UV light for 40 min before receiving the microbial inoculum [9].

2.2. Biofilm formation by a microcosm model

The inoculum comprised unstimulated whole mixed saliva collected from three volunteers aged 7–13 years (mean 9.6 years) into a graduated collection tube. The

subjects were in good general health and not taking any medication. Inclusion criteria comprised individuals having at least one first permanent molar showing a dentinal caries lesion. The volunteers and their caregivers gave their informed consent for participation. Unstimulated whole saliva produced in the first 30s was discarded and after that, it was collected for exactly 5 min. Mean dmft, DMFT and mean whole saliva flow rate of each volunteer were registered (4.3, 2.0, and 0.58 mL/min, respectively).

One milliliter of saliva from each volunteer was placed into a tube and mixed using a vortex. From this suspension, 8.1×10^7 CFU/mL of total microorganisms were counted, where 1.6×10^3 CFU/mL of *S. mutans*, 4.9×10^5 CFU/mL of *Lactobacillus ssp.* and 3.6×10^2 CFU/mL of *Candida ssp.* were identified. Each well containing one tooth specimen received 20 μ L of the inoculum (1.5×10^8 /well), 5% sucrose and was completed with Brain-Heart infusion growth media (BHI). The system was incubated in microaerofilia for 7 days at 37°C to allow biofilm growth. BHI was renewed every 24 hours (1000 μ L/well). All procedures were performed inside a laminar air-flow chamber, under aseptic environment.

2.3. Micro-CT acquisition and reconstruction

After the period of biofilm formation, BHI culture medium was removed from each well with a pipette and the specimens were scanned in a high energy micro-CT (Skyscan 1173, Bruker, Kontich, Belgium) using the following parameters: 70kV, 114 μ A source current, 14.25 μ m pixel size, 1mm thick Al filter, 0.5° rotation step over 360°, frame averaging (5) and random movements (40). After the scanning procedures, the specimens were washed in distilled water and sonicated to remove the adherent biofilm. After the experimental period, a second acquisition was performed using the same parameters describe above.

Micro-CT gray values were calibrated into dentin mineral density values using a set of aqueous K_2HPO_4 phantoms prepared in the following concentrations: 0.3, 0.6, 0.8, 1.2, 1.5 and 1.8 g/cm³, as described earlier [10]. Phantoms were scanned and reconstructed using similar parameters used for the tooth specimens. A mineral density threshold for dentin caries (1.2g/cm³) was used as the cut-off point for carious versus sound dentin, as previously described [11].

2.4. Experimental period with bioactive cements

In each specimen, each cavity was restored using a different cement to ensure that all experimental groups were exposed to the same substrate condition. The central cavity was always assigned to the control, which was restored with soft dental wax (Lysanda, São Paulo, Brazil). Experimental groups were filled with the following dental cements: 1) a zinc polycarboxylate cement (Poly Zinc, Prevest DenPro, India), 2) conventional glass ionomer (Ketac Molar, 3M ESPE, Seefeld, Germany), 3) mineral trioxide aggregate (MTA, Angelus, Londrina, Brazil) and a calcium silicate cement (Biodentine, Septodont, Saint Maur des Fosses, France) mixed according to each manufacturer's instructions and applied to the cavities directly after mixing.

After that, each specimen was fixed with cyanoacrylate adhesive (Superbond Gel) onto an acrylic base with a metal cannula (12x40) transfixed into the pulp chamber. The cannula was connected to a 20ml hypodermic syringe containing 10ml of Simulated Body Fluid (SBF) in pH 7.4 by means of a polyethylene hose [12]. The syringe was placed at height of 15 cm (11.1 Hg) in relation to the tooth crown (considering the meniscus). The specimens were kept under simulated intrapulp pressure [13] for 45 days at 100% relative humidity.

2.5 Mineral density analysis

Reconstruction of the acquired stacks of images (baseline and after the experimental period) was performed with standardized parameters (ring artifact correction of 0, 75% beam hardening correction and input of similar contrast limits of 0 – 0.1), for all specimens.

For mineral density quantification, the baseline stack was individually aligned so that the occlusal surface was completely parallel to the occlusal plane. After that, the second stack (experimental) was registered against the baseline, using an affine algorithm implemented on the 3DSlice software interface [14]. Then, background from the outer part of the tooth was extracted from the restored stack using a minimum threshold algorithm [15], implemented on the ImageJ/FIJI software interface [16].

Mineral density in dentin was obtained in micro-CT gray values (8-bit) after calibration.

After applying the same background mask at the baseline stack, the restored stack was subtracted from the baseline stack, resulting in a stack containing remineralized density at each prepared cavity. This stack was further binarized and volumetrically quantified. All mineral density measurements at carious dentin regions were followed by measurements on the adjacent sound dentin region, for obtaining reference values of mineral density changes.

Remineralization potential was measured as the % change in mineral density values at demineralized dentine before and after treatments. Mineral density of each material used was also calculated by applying a minimal threshold algorithm to separate the material volume from the background cavity. After binarization, mineral density values were obtained under the FIJI software interface.

2.6 Statistical Analysis

Shapiro–Wilk test was used to verify the normality of the obtained data. Kruskal-Wallis followed by Mann Whitney ($p < 0.05$) were then employed for analyses of significant difference among groups and cements. Kruskal-Wallis followed by Wilcoxon test ($p < 0.01$) was employed for analyses of significant differences among baseline and treated specimens. The magnitude of the effect was estimated using the following formula:

$$Effect\ Size = \frac{Median_{Treated} - Median_{Baseline}}{0.75(IQR)}$$

Where: IQR= interquatile range

3. Results

Table 1 shows mineral density values of sound and demineralized dentin and percentage of mineral density decrease at the bottom of the cavity in each specimen. All specimens showed mineral density values lower than the threshold for dentin caries (1.2 g/cm³), confirming the ability of this microcosm biofilm model to produce a mineral density decrease in dentin similar to natural caries lesions.

Table 1. Mineral density at sound dentin (g/cm³), demineralized dentin (g/cm³), mineral decrease (%) for each studied sample.

Specimen	Sound Dentin (g/cm ³)	Demineralized Dentin (g/cm ³)	Mineral Decrease at cavity bottom (%)
1	1.71	0.15	90.85%
2	2.16	0.50	76.61%
3	1.99	0	100%
4	1.86	0	100%
5	2.00	0	100%
6	2.20	0.09	95.27%
7	1.94	0.03	98.13%
8	1.93	0	100%
9	1.95	0	100%

Table 2 shows resulting mean gray values and corresponding calibrated mineral density for the bulk of each material in all specimens. Dental wax presented the lowest values (24.47) while zinc polycarboxylate cement showed the highest (195.32). GIC showed statistically significant higher values than the control (wax) and both were also statistically different from the other cements. Biodentine™, MTA and zinc polycarboxylate cement showed similar gray values.

Table 2. Mean gray values (8-bit) and calibrated mineral density values for the bulk of each material in all specimens.

Material	Gray value	Mineral Density value
Zinc Polycarboxylate cement	195.32 ± 33.88 ^c	2.95 ± 0.02
GIC	119.23 ± 21.35 ^b	1.57 ± 0.03

MTA	177.52 ± 14.56 ^c	2.63 ± 0.03
Biodentine	190.17 ± 31.52 ^c	2.86 ± 0.02
Control (dental wax)	24.47 ± 6.49 ^a	0.15 ± 0.00

Means followed by different letters shows statistical significance (Kruskal-Wallis followed by Mann Whitney, $p < 0.05$).

Table 3 shows mean mineral density values for demineralized dentin at the baseline period and after treatment with the tested cements. Except for the control (dental wax), all tested cements caused increase in mineral density values in dentin. Zinc polycarboxylate and MTA showed the higher values, followed by GIC and Biodentine.

Table 3. Mean mineral density values for demineralized dentin before and after treatment for each studied material.

Material	Baseline	Treated	Effect size	N
Control	0.04 ± 0.15 ^{Aa}	0.13 ± 0.07 ^{Aa}	-	8
GIC	0.08 ± 0.11 ^{Aa}	0.28 ± 0.21 ^{Bb}	1.61	9
Zinc polycarboxylate	0.09 ± 0.14 ^{Aa}	0.35 ± 0.21 ^{Cc}	1.80	9
Biodentine	0.07 ± 0.13 ^{Aa}	0.26 ± 0.14 ^{Bb}	2.18	9
MTA	0.07 ± 0.11 ^{Aa}	0.33 ± 0.17 ^{Cc*}	2.00	9

In each column, means followed by similar upper case letters do not show statistically significant differences (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). In each row, means followed by different lower case letters are statistically significant (Wilcoxon signed rank test, $p < 0.05$).

Figure 1 shows percentage of mineral change increase for each material. Control showed the lowest mean % remineralization (13.81%) while MTA and polycarboxylate cement showed the highest mean percentages of mineral density increase (43.56% and 41.64%, respectively), followed by Biodentine (36.40%) and GIC (32.54%).

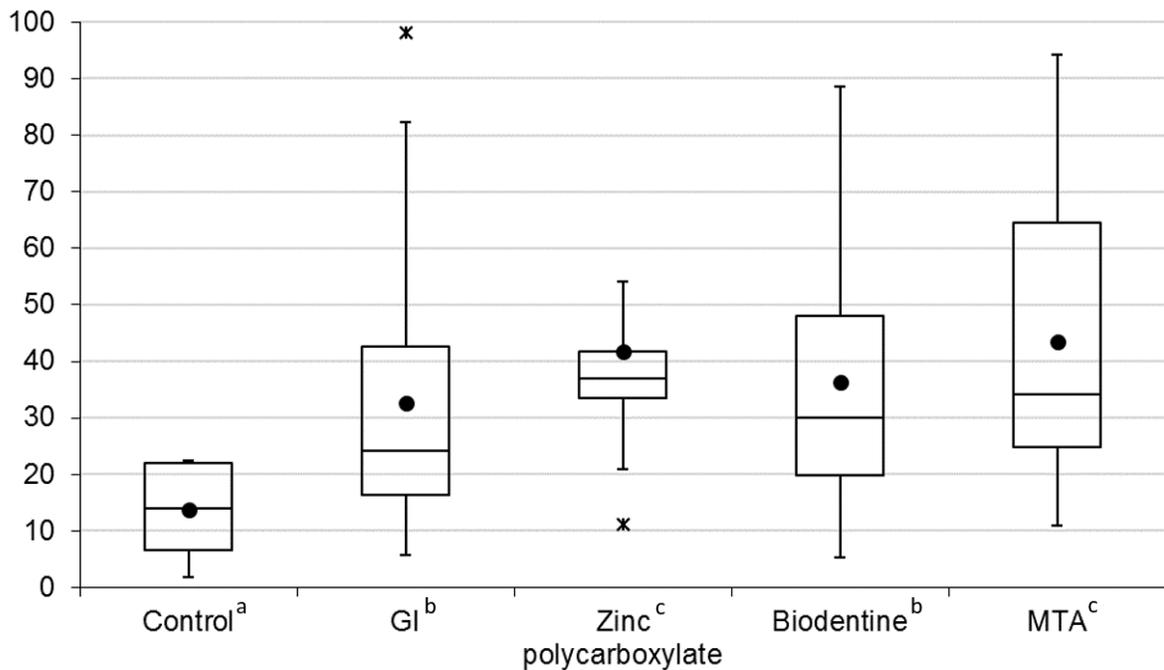


Figure 1: Distribution of percentage of mineral density increase for each experimental material and control. Black circles indicate mean values. Different subscript letters indicate statistical significance (Kruskal-Wallis followed by Student-Newman-Keuls proof, $p < 0.05$).

4. Discussion

In the present study, a model consisting of a human bacterial inoculum to produce cariogenic biofilm and artificial caries in sound dentin was used. This model is somewhat different from the more conventionally used artificial caries model consisting in pH cycling challenges [17]. It is known however, that *in vitro* artificial caries models produced by acid solutions or gels are dealing solely with physico-chemical aspects of demineralization, whereas the *in vivo* caries progression is mediated by a metabolic active microbial biofilm. In a microcosm model, saliva samples from patients presenting carious lesions are pooled and incubated [18], providing more reliable conditions regarding the oral cavity. The high percentage of mineral decrease in sound dentin (more than 90%) seen for almost all the specimens in this study (Table 1) support the value of this artificial caries model. It is important to disclose, however that demineralization potential of a microcosm model is highly dependent on the cariogenicity of the pooled sample and that absence of vital pulp and the subsequent

dentin reactions in extracted tooth samples also increase demineralization results.

Microtomography represents a novel quantitative assay to evaluate the remineralization potential of restorative materials. Any conventional optical or electron microscope allows visualization of specimen's surface or corresponding thin slices in two dimensions [19]. However, micro-CT allows the operator to measure distance, density, volume and other variables on tridimensional images of the specimen. This non-destructive imaging method, opposed to microhardness or microradiograph tests or traditional microscopic studies, results in before and after treatment comparisons on the same specimen and to measure the effect of remineralization (Table 3).

Gray values / mineral density values of the bulk materials were obtained to verify if they could have influenced measurement of the mineral density values after treatment in adjacent regions of demineralized dentin. Control (dental wax) presented lower gray values, followed by GIC. Biodentine, MTA and zinc polycarboxylate cements showed significantly higher values. Changes in mineral density were most probably not influenced by these values since GIC and Biodentine for example, showed similar % mineral density changes although Biodentine was significantly more radiodense than GIC.

All treated groups showed remineralization of carious dentin. MTA and polycarboxylate cement showed the highest potential and did not differ statistically among each other, followed by Biodentine and GIC. Although the control material (dental wax) values were also increased, they were not statistically significant ($p < 0.01$). We attribute this increase to the use of a simulated body fluid (SBF) as a source of pulpal pressure in this study. This solution contains ion concentrations nearly equal to those in human blood plasma. Contact of bioactive materials with these solutions are essential to trigger its bioactive properties [12]. We extrapolated that over a demineralized dentin surface this ionic fluid may have also potential of apatite formation.

It is well-known in biomineralization processes that non-collagenous proteins, or their biomimetic analogs, like polyacrylic acid (pAA), are required for generation of apatites of the dimensions and order which can fit into the gap zones of type I collagen fibrils [20].

This polymer has acidic characteristics and have a predisposition to bind cations [21], and stabilized amorphous calcium phosphate nanoprecursors [22]. Zhang *et al.* [23] used bile acid groups on poly (3 α -methacrylic cholic acid methyl ester), which formed fibrils with diameters of 1nm in aqueous solution. Mineralization in SBF resulted in plate-like hydroxyapatite crystals. The relatively short mineralization time indicates that these polymeric fibrils efficiently promoted local supersaturation, nucleation, or crystal growth. The liquid in zinc polycarboxylate and conventional glass-ionomer cements is a solution of polyacrylic acid. Zinc polycarboxylate cement showed the higher percentage of remineralization (41.64%) GIC showed the lowest one (32.54%) among the tested materials. This could be due competitive interactions between pAA and powder compounds of GIC. In polycarboxylate cement the pAA is more freely available to interact with the tooth [4].

However, the mechanism for remineralization might be different in calcium-silicate cements, due to the alkaline nature of these materials compared with acidic GICs and zinc polycarboxylate cements. This could be attributed to a dual effect of calcium-hydroxide-releasing cement and an alkaline caustic etching followed by mineral diffusion [21]. As the material lacks phosphate, it become bioactive and produces apatite only when it comes into contact with phosphate-containing fluid, like SBF [24]. The proposal of an intrapulp pressure simulation in the present study intended to reproduce what occurs in the oral cavity, thus obtaining results that were closer to the clinical reality.

MTA and Biodentine™ have been also currently used as pulp capping materials. Investigations over its interactions with the pulp cells have shown its biocompatibility and ability to induce odontoblast differentiation and mineralization in pulp cells cultures [25]. However, it is still unclear how they could affect the secretion of growth factor from pulp cells.

5. Conclusion

Micro-CT was able to quantify mineral density in human dentin. Compared to GIC, Zinc polycarboxylate and MTA resulted in higher % of mineral density increase, while Biodentine showed similar increase as GIC.

6. Acknowledgments

This project was funded by FAPERJ. Dr. Paula Maciel Pires and Thais Maria Pires dos Santos were funded by CAPES.

7. References

1. Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ, et al. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. *J Dent Res.* 2009;88:71-6.
2. Osorio R, Osorio E, Cabello I, Toledano M. Zinc induces apatite and scholzite formation during dentin remineralization. *Caries Res.* 2014;48:276-90.
3. Holmgren C, Gaucher C, Decerle N, Domejean S. Minimal intervention dentistry II: part 3. Management of non-cavitated (initial) occlusal caries lesions--non-invasive approaches through remineralisation and therapeutic sealants. *Br Dent J.* 2014;216:237-43.
4. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. Dental Cements. In: Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR, editors. *Phillips' Science of Dental Materials.* Philadelphia: Saunders; 2012. p. 418-73.
5. Osorio R, Toledano M. Biomaterials for catalysed mineralization of dental hard tissues. In: Aparicio C, Ginebra MP, editors. *Biomineralization and Biomaterials Fundamentals and Applications.* Waltham: Woodhead Publishing; 2016. p. 365-76.
6. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995;21:349-53.
7. Yoshimine Y, Ono M, Akamine A. In vitro comparison of the biocompatibility of mineral trioxide aggregate, 4META/MMA-TBB resin, and intermediate restorative material as root-end-filling materials. *J Endod.* 2007;33:1066-9.
8. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, et al. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod* 2014;40:1194–200.
9. Bertolini MM, Portela MB, Curvelo JA, Soares RM, Lourenco EJ, Telles DM. Resins-based denture soft lining materials modified by chlorhexidine salt incorporation: an in vitro analysis of antifungal activity, drug release and hardness. *Dent Mater.* 2014;30:793-8.
10. Zou W, Gao J, Jones AS, Hunter N, Swain MV. Characterization of a novel calibration method for mineral density determination of dentine by X-ray microtomography. *Analyst.* 2009;134:72-9.

11. Neves AA, Coutinho E, Vivan-Cardoso M, Jaecques S, Van Meerbeek B. Micro-CT based quantitative evaluation of caries-excavation. *Dent Mater.* 2010;26:579-88.
12. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res.* 1990;24:721-34.
13. Scheffel DL, Estrela RP, Pires PM, Mariusso MR, Costa CA, Hebling J. Effect of time between adhesive application and photoactivation on adhesion and collagen exposure. *American Journal of Dentistry*, v. 27, p. 330-334, 2014.
14. Fedorov A, Beichel R, Kalpathy-Cramer J, Finet J, Fillion-Robin JC, Pujol S, et al. 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magnetic resonance imaging.* 2012;30:1323-41.
15. Prewitt JM, Mendelsohn ML. The analysis of cell images. *Ann N Y Acad Sci.* 1966;128:1035-53.
16. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods.* 2012;9:676-82.
17. ten Cate JM. Models and role models. *Caries Res.* 2015;49 Suppl 1:3-10.
18. Antonio AG, Iorio NL, Pierro VS, Candreva MS, Farah A, dos Santos KR, et al. Inhibitory properties of Coffea canephora extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Arch Oral Biol.* 2011;56:556-64.
19. Lee HS, Berg JH, Garcia-Godoy F, Jang KT. Long-term evaluation of the remineralization of interproximal caries-like lesions adjacent to glass-ionomer restorations: a micro-CT study. *Am J Dent.* 2008;21:129-32.
20. Kim YK, Yiu CK, Kim JR, Gu L, Kim SK, Weller RN, et al. Failure of a glass ionomer to remineralize apatite-depleted dentin. *J Dent Res.* 2010;89:230-5.
21. Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res.* 2012;91:454-9.
22. Qi YP, Li N, Niu LN, Primus CM, Ling JQ, Pashley DH, et al. Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomater.* 2012;8:836-42.
23. Zhang X, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Remineralization of partially demineralized dentine substrate based on a biomimetic strategy. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23:733-42.
24. Darvell BW, Wu RC. "MTA"-an Hydraulic Silicate Cement: review update and setting reaction. *Dent Mater.* 2011;27:407-22.
25. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012;45:439-48.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo mostraram que a formação de cárie *in vitro* por um modelo de biofilme de microcosmo foi possível, resultando em um volume de biofilme considerável em todas as cavidades das amostras e apresentando um potencial de desmineralização alto para todas elas (maior de 90%). Um modelo que se assemelha às condições que ocorrem na cavidade bucal é importante em diversos aspectos, inclusive para estudos com materiais.

No entanto, uma crítica para a reprodução deste modelo é o fato de ser difícil a padronização do grau de agressividade das lesões. Dependendo da cariogenicidade das cepas bacterianas coletadas dos pacientes, pode se ter maior ou menor grau de desmineralização dos tecidos dentários. No presente estudo consideramos que as lesões formadas foram bastante severas.

Sabe-se que a odontologia minimamente invasiva tem grande interesse em materiais biocompatíveis e de fácil manuseio, com isso surge no mercado os materiais bioativos, capazes de remineralizar a dentina afetada. Esse potencial remineralizador é mediado também por análogos biomiméticos de proteínas da matriz extracelular. Devido a isso, além dos materiais à base de silicato de cálcio que são comumente utilizados para este fim, como MTA e Biodentine™, neste trabalho estudamos também o Poly Zinc™, um material composto por policarboxilato de zinco. Este cimento caiu em desuso com o advento dos cimentos ionômero de vidro, porém tem sido proposto que ele seja capaz de estimular a nucleação de apatitas no interior dos tecidos de colágeno (Liu et al., 2011b) e sua efetividade foi comprovada no presente estudo.

Um material comumente utilizado, principalmente em odontopediatria é o cimento de ionômero de vidro, conhecido por sua capacidade de liberar íons flúor. No presente estudo ele apresentou aumento significativo da densidade mineral da dentina cariada, similar ao Biodentine™, porém, inferior aos cimentos MTA e policarboxilato de zinco.

De fato, este estudo demonstrou que todos os cimentos utilizados apresentaram potencial remineralizador, porém o processo pelo qual a remineralização acontece,

possivelmente é diferente entre eles, devido à natureza alcalina ou ácida de cada um (Atmeh et al., 2012). Isso pode sugerir novos estudos, com novas interações e composições de cada material, desempenhando sua função específica quando em contato com a dentina cariada. Sugerimos também a verificação das propriedades mecânicas da dentina “remineralizada” com estes cimentos no sentido de se verificar se houve aumento da dureza deste tecido.

O presente estudo foi realizado pela técnica de micro-CT, visando manter a integridade da amostra e permitindo a análise antes e após o tratamento com os cimentos. Vários estudos já utilizaram o micro-CT como método para análise da densidade mineral de tecidos duros, entretanto este é o primeiro estudo que utiliza a técnica de dupla-energia para visualizar e quantificar o biofilme formado. E utilizando a técnica convencional de microtomografia, foi possível comprovar a ação de desmineralização deste biofilme e também o potencial de aumento da densidade mineral da dentina desmineralizada submetido ao tratamento com cimentos bioativos.

6. CONCLUSÕES

Segundo as análises dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Todos os cimentos utilizados apresentaram potencial de aumentar a densidade mineral da dentina desmineralizada, porém os cimentos policarboxilato de zinco e MTA apresentaram os maiores valores percentuais de aumento da densidade mineral da dentina cariada, seguidos do Biodentine™ e do cimento ionômero de vidro;
- O modelo de biofilme de microcosmo foi capaz de produzir lesões de cárie em dentina com características semelhantes à dentina cariada *in vivo*;
- A técnica de microtomografia foi capaz de promover a visualização e quantificação do biofilme formado na dentina, além de mensurar a densidade mineral da dentina hígida, da dentina cariada e da dentina tratada nos mesmos espécimes;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

An B, Wang R, Arola D and Zhang D (2012). The role of property gradients on the mechanical behavior of human enamel. *J Mech Behav Biomed Mater* 9: 63-72.

Antonio AG, Iorio NL, Pierro VS, Candreva MS, Farah A, Santos KR and Maia LC (2011). Inhibitory properties of coffee canephora extract against oral bacteria and its effect on demineralization of deciduous teeth. *Arch of Oral Biol* 56: 556-564.

Arends J, Ruben JL, Inaba D (1997). Major topics in quantitative microradiography of enamel and dentin: R parameter, mineral distribution visualization, and hyper-remineralization. *Adv Dent Res* 11: 403-414.

Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF (2012). Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res* 91: 454-459.

Bertolini MM, Portela MB, Curvelo JA, Soares RM, Lourenço EJ, Telles DM (2014). Resins-based denture soft lining materials modified by chlorhexidine salt incorporation: an in vitro analysis of antifungal activity, drug release and hardness. *Dent Mater* 30: 793-798.

Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F and Pitt Ford TR (2004). Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int End J* 37: 699-704.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318–22.

Dai L, Liu Y, Salameh Z, Khan S, Mao J, Pashley DH and Tay FR (2011). Can caries-affected dentin be completely remineralized by guided tissue remineralization? *Dent Hypotheses* 2: 74-82.

Damen JJ, Buijs MJ and ten Cate JM (1998). Fluoride-dependent formation of mineralized layers in bovine dentin during demineralization *in vitro*. *Caries Res* 32: 435-40.

Fedorov A, Beichel R, Kalpathy-Cramer J, Finet J, Fillion-Robin JC, Pujol S, Bauer C, Jennings D, Fennessy F, Sonka M, Buatti J, Aylward S, Miller JV, Pieper S, Kikinis R (2012). 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn Reson Imaging* 30, 1323-41.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M and Boskey A (2011). Dentin: Structure, composition and mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Frontiers in Bioscience* 3: 711-735.

Hsieh, J (2009). Computed Tomography: Principles, Design, Artifacts, and Recent Advances. New York, 2 ed., p.153-161.

Kawasaki K, Ruben J, Tsuda H, Huysmans MC and Takagi O (2000). Relationship between mineral distributions in dentine lesions and subsequent remineralization *in vitro*. *Caries Res* 34: 395-403.

Kidd EA and Fejerskov O (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 83: Spec No C: C35-8.

Liu Y, Mai S, Li N, Yiu CK, Mao J, Pashley DH and Tay FR (2011a). Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially demineralized collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia* 7: 1742-51.

Liu Y, Kim YK, Dai L, Li N, Khan SO, Pashley DH and Tay FR (2011b). Hierarchical and nonhierarchical mineralisation of collagen. *Biomaterials* 32: 1291-300.

Liu Y, Li N, Qi Y, Niu LN, Elshafiy S, Mao J, Breschi L, Pashley DH and Tay FR (2011c). The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin. *Dent Mater* 27: 465-77.

Malkondu O, Karapinar Kazandag M and Kazazoglu E (2014). A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *Biomed Res Int* 2014: 160951.

Neves AA, Coutinho E, Vivan-Cardoso M, Jaecques S and Van Meerbeek B (2010). Micro-CT based quantitative evaluation of caries-excavation. *Dent Mater* 26: 579-588.

Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH and Tay FR (2014). Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater* 30: 77-96.

Parirokh M and Torabinejad M (2010). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 36: 400-13.

Paul J (2015). Dental Cements - A review to proper selection. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 4: 659-669.

Qi YP, Li N, Niu LN, Primus CM, Ling JQ, Pashley DH and Tay FR (2012). Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomaterialia* 8: 836-42.

Scheffel DLS, Estrela RP, Pires PM, Mariusso MR, Costa CAS, Hebling J (2014). Effect of time between adhesive application and photoactivation on adhesion and collagen exposure. *Am J Dent* 27: 330-334.

Sousa FB, Vianna SS and Santos-Magalhaes NS (2009). Dental enamel birefringence for a wide mineral content range and for different immersion media's refractive indexes: an improved mathematical interpretation. *J Microscopy* 233: 69-75.

Swain MV and Xue J (2009). State of the art of micro-CT applications in dental research. *Int J Oral Sci* 1: 177-88.

Tay FR and Pashley DH (2008). Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials* 29: 1127-37.

ten Cate B (2008). *Histologia Oral: Desenvolvimento, estrutura e função*, Elsevier.

ten Cate JM and Van Duinen RN (1995). Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. *J Dent Res* 74: 1266-71.

ten Cate JM (2015). Models and role models. *Caries Res* 49 (Suppl 1): 3–10.

Torabinejad M and Parirokh M (2010). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 36: 190-202.

van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MCD, Cenci MS (2011). An *in vitro* biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial doseresponse studies. *Biofouling* 27: 1057–1063.

Vyas N, Walmsley AD, Pecheva E, Dehghani H, Grover L, Sammons RL (2014). Visualizing synthetic dental biofilm on teeth using micro computed tomography. *Bruker micro-CT User Meeting Abstract Book* p.75. Available in http://bruker-microct.com/company/UM2014/000_AbstractBook2014.pdf

Watson TF, Atmeh AR, Sajini S, Cook RJ and Festy F (2014). Present and future of glassionomers and calcium-silicate cements as bioactive materials in dentistry: biophotonics-based interfacial analyses in health and disease. *Dent Mater* 30: 50-61.

Zou W, Gao J, Jones AS, Hunter N and Swain MV (2009). Characterization of a novel calibration method for mineral density determination of dentine by X-ray micro-tomography. *Analyst* 134: 72-9.

Anexos

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Potencial bioativo de cimentos à base de silicato de cálcio e policarboxilato de zinco em lesões de cárie artificiais em dentina

Pesquisador: Paula Maciel Pires

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54941416.9.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.588.462

Apresentação do Projeto:

Protocolo 078-16. Respostas recebidas em 2.6.2016.

INTRODUÇÃO:

O dente é o órgão mais mineralizado do corpo humano, composto de aproximadamente 88-95% de hidroxiapatita, que é essencialmente um sal de fosfato de cálcio (Sousa et al., 2009). Sendo assim, apesar de possuir alta resistência mecânica, atribuída ao conjunto da microestrutura e ao gradiente de propriedades mecânicas, que se inicia na superfície do esmalte até a dentina subjacente (An et al., 2012), os dentes são extremamente

vulneráveis aos processos de desmineralização que podem ocorrer durante toda a vida útil do mesmo. Lesões de cárie dentária são caracterizadas pela perda mineral, no qual a ação de ácidos, principalmente o ácido lático, produzido pela fermentação bacteriana leva à desmineralização do esmalte e da dentina (Kidd & Fejerskov, 2004). Os conceitos mais atuais em odontologia preventiva prezam por tratamentos minimamente invasivos e conservadores dos dentes afetados por lesões de cárie no sentido de preservar o potencial para remineralização do tecido desmineralizado, mas não completamente destruído pelos processos bacterianos (Dai et al., 2011). Nesse contexto, sabe-se que a diminuição do conteúdo mineral leva à redução das propriedades mecânicas do tecido

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.588.462

Pesquisadores	apresenta_da_equipe0001.pdf	03:37:02	Paula Maciel Pires	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	03/04/2016 03:34:33	Paula Maciel Pires	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 14 de Junho de 2016

**Assinado por: Carlos
Alberto Guimarães
(Coordenador)**

Anexo 2

TERMO DE CESSÃO DE DENTES HUMANOS

Eu, _____,
portador do RG: _____, nascido em ___/___/_____, sexo (M) (F),
residente à rua: _____
nº _____, bairro: _____ na cidade de _____,
Estado _____, CEP: _____, telefone:
_____/_____, estou consciente de que de que o(s)
dente(s) abaixo descrito(s) foi (foram) extraído(s) por indicação terapêutica para a
melhoria da minha saúde , como documentado em meu prontuário.

Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas,
concordo em doar de forma voluntária o(s) dente(s) humano(s)
_____ (identificação do(s) dente(s)) para o Biorrepositório
criado exclusivamente para a pesquisa de estudo da aluna de pós- graduação da
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Assinatura do doador ou seu representante legal

Anexo 3.1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Para autorização da participação da criança/adolescente)

Título do projeto de pesquisa: **“POTENCIAL BIOATIVO DE CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO E POLICARBOXILATO DE ZINCO EM LESÕES DE CÁRIE ARTIFICIAIS EM DENTINA”**

Prezado Senhor(a),

Seu filho (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre materiais dentários. As pesquisadoras responsáveis, Aline de Almeida Neves, Andréa Golçalves Antônio e Paula Maciel Pires, pretendem realizar um estudo com as seguintes características:

Objetivo do estudo: Comparar o efeito de diferentes materiais odontológicos e sua ação em cáries produzidas artificialmente.

Pesquisa: A saliva do participante será coletada na Clínica de Odontopediatria do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ. Para isso ele deverá cuspir em um tubo a quantidade de saliva que acumular na boca durante 5 minutos, podendo cuspir quantas vezes quiser e quando quiser durante esse tempo. O participante não deve ter feito uso de antibióticos no último mês, nem ter ingerido qualquer tipo de alimento na última 1 hora antes da coleta. A saliva do participante será levada para o laboratório e será feito a contagem de microorganismos orais (bactérias presentes na boca). Essa saliva com os microorganismos será utilizada para produzir lesões de cárie artificiais e em seguida será descartada.

Riscos: Os riscos envolvidos na pesquisa são todos aqueles relacionados a obtenção dos dados, tais como desconfortos durante a entrevista ou durante as avaliações e exames clínicos do paciente (desconforto pela luz do equipamento, pela manipulação da boca e suas partes, desconforto devido ao uso de jato de água e ar, desconforto com o uso do instrumental, espelho e sonda) e o constrangimento de cuspir em um recipiente. Porém, o pesquisador responsável se compromete em minimizar ao máximo esse risco explicando para o paciente todo o procedimento.

Benefícios: Um melhor entendimento sobre a ação de materiais em dentes cariados e também, o benefício direto para o participante será o tratamento dentário e instrução de higiene oral.

Garantia de acesso aos pesquisadores: Em qualquer fase do estudo você terá pleno acesso a pesquisadora responsável, Paula Maciel Pires, pelos telefones 3938-2098, 3938-2101 r.7, Rua Rodolpho Paulo Rocco, 325 Faculdade de Odontologia, Cidade Universitária, Rio de Janeiro.

Garantia de liberdade: Sua participação neste estudo é absolutamente voluntária. Dentro

deste raciocínio, todos os participantes estão integralmente livres para, a qualquer momento, negar o consentimento ou desistir de participar e retirar o consentimento, sem que isto provoque qualquer tipo de penalização ou interrompa seu tratamento odontológico. Lembramos, assim, que sua recusa não trará nenhum prejuízo à relação com o pesquisador ou com a instituição e sua participação não é obrigatória. Mediante a aceitação, espera-se que você compareça as consultas.

Direito de confidencialidade e acessibilidade: Os dados colhidos na presente investigação serão utilizados para elaborar artigos científicos. Porém, todas as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o absoluto sigilo de sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação do participante e ninguém, com exceção dos próprios pesquisadores, poderá ter acesso aos resultados da pesquisa. Cada participante somente poderá ter acesso aos próprios resultados.

Despesas e compensações: Você não terá, em momento algum, despesas financeiras pessoais. É garantido ao participante da pesquisa o pagamento de despesas, tais como transporte e alimentação, nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames. Também, não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Todo tratamento necessário a realização desta pesquisa será livre de custo.

Dúvidas e questionamentos: Em caso de dúvidas ou questionamentos, você pode se manifestar agora ou em qualquer momento do estudo para explicações adicionais. Em caso de dúvidas entre em contato com: Paula Maciel Pires na Faculdade de Odontologia da UFRJ, Rua Rodolpho Paulo Rocco, 325, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, ou pelos telefones 3938-2101 r.5. Caso surja alguma dúvida quanto à ética do estudo, você deverá se reportar ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos – subordinado ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Ministério da Saúde que avalia e autoriza pesquisas que envolvem pessoas, através de solicitação ao representante de pesquisa, que estará sob contato permanente, ou contactando o Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição, no endereço Rua Rodolpho Paulo Rocco, 255 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão, 1º andar; Contato: 3938-2480 Fax: 3938-2481; Horário de funcionamento: De segunda a sexta-feira, das 8h às 16h. É assegurado o completo sigilo de sua identidade quanto a sua participação neste estudo, incluindo a eventualidade da apresentação dos resultados deste estudo em congressos e periódicos científicos.

Consentimento

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do meu filho (a) é isenta de despesa. Concordo, voluntariamente, que meu filho (a) participe desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou

perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido em seu atendimento nesta instituição. Eu receberei uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Nome

Data: _____

Assinatura do informante

Data: _____

Assinatura do pesquisador

Data: _____

Anexo 3.2

TERMO DE ASSENTIMENTO

Título do projeto de pesquisa: **“POTENCIAL BIOATIVO DE CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO E POLICARBOXILATO DE ZINCO EM LESÕES DE CÁRIE ARTIFICIAIS EM DENTINA”**

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre materiais dentários. As pesquisadoras responsáveis, Aline de Almeida Neves, Andréa Golçalves Antônio e Paula Maciel Pires, pretendem realizar um estudo com as seguintes características:

Objetivo do estudo: Comparar a ação de diferentes materiais que os dentistas usam e sua ação em cáries (doença causada por bichinhos que moram na boca) produzidas artificialmente.

Pesquisa: A saliva do participante será coletada (o sujeito irá cuspir em um potinho) na Clínica de Odontopediatria do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ. Para isso ele deverá cuspir em um tubo a quantidade de saliva que acumular na boca durante 5 minutos, podendo cuspir quantas vezes quiser e quando quiser durante esse tempo. O participante não deve ter feito uso de antibióticos (um tipo de remédio) no último mês, nem ter comido qualquer tipo de alimento na última 1 hora antes da coleta. A saliva do participante será levada para o laboratório e será feito a contagem de microorganismos orais (bactérias presentes na boca). Essa saliva com os microorganismos será utilizada para produzir lesões de cárie artificiais e em seguida será descartada.

Riscos: Os riscos envolvidos na pesquisa são todos aqueles relacionados à obtenção dos dados, tais como desconfortos durante a entrevista ou durante as avaliações e exames clínicos do paciente (desconforto pela luz do equipamento, pela manipulação da boca e suas partes, desconforto devido ao uso de jato de água e ar, desconforto com o uso do instrumental, espelho e sonda) e o constrangimento de cuspir em um recipiente. Porém, o pesquisador responsável se compromete em minimizar ao máximo esse risco explicando para o paciente todo o procedimento.

Benefícios: Um melhor entendimento sobre a ação de materiais em dentes doentes e também, o benefício direto para o participante será o tratamento de dente e instrução de como escovar os dentes.

Garantia de acesso aos pesquisadores: Em qualquer fase do estudo você terá pleno acesso a pesquisadora responsável, Paula Maciel Pires, pelos telefones 3938-2098, 3938-2101 r.7, Rua Rodolpho Paulo Rocco, 325 Faculdade de Odontologia, Cidade Universitária, Rio de Janeiro.

Garantia de liberdade: O sujeito é livre para aceitar ou para recusar a participação no presente estudo. Também será livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento sem que haja penalidades ou perdas de benefícios.

Direito de confidencialidade e acessibilidade: Os resultados da pesquisa serão

divulgados com objetivo científico, em literatura científica especializada, sejam favoráveis ou não, estando também disponíveis para consulta na Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFRJ). As informações obtidas durante a pesquisa serão apenas utilizadas por membros da equipe do projeto, mantendo-se em caráter confidencial e de total sigilo (segredo) todos os dados que comprometam a privacidade dos sujeitos.

Despesas e compensações: Você não terá, em momento algum, despesas financeiras (gastos) pessoais. É garantido ao participante da pesquisa o pagamento de despesas, tais como transporte e alimentação, nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames. Também, não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Todo tratamento necessário a realização desta pesquisa será livre de custo.

Dúvidas e questionamentos: Em caso de dúvidas ou questionamentos, você pode se manifestar agora ou em qualquer momento do estudo para mais explicações. Ou entre em contato com: Paula Maciel Pires na Faculdade de Odontologia da UFRJ, Rua Rodolpho Paulo Rocco, 325, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, ou pelos telefones 3938-2101 r.5. Diante de qualquer dúvida a respeito dos direitos e deveres como participante da pesquisa ou caso tenha alguma dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ, pelo telefone (21) 3938-2480, pelo e-mail cep@hucff.ufrj.br, ou no endereço Rua Professor Rodolpho Paulo Rocco, 255, salas 01D - 46 – Cidade Universitária, Rio de Janeiro/RJ. Informamos que este termo de consentimento livre e esclarecido deve ser redigido e assinado pelo representante legal da criança/adolescente, pelo responsável pela pesquisa e pelo coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho. É assegurado o completo sigilo de sua identidade quanto a sua participação neste estudo, incluindo a eventualidade da apresentação dos resultados deste estudo em congressos e periódicos científicos. Informamos ainda que este termo deva ser redigido e assinado em duas vias, uma a ser retida pelo pesquisador e outra a ser entregue ao responsável legal pela criança, ambas numeradas à parte. Além disso, o representante legal e o pesquisador responsável por esta pesquisa deverão rubricar (assinar de forma reduzida) todas as folhas e assinar a última folha do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Consentimento

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado.

Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do menor é isenta de despesas e que ele terá garantia de acesso a tratamento odontológico quando necessário. Concordo voluntariamente em deixar o menor participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou

perda de qualquer benefício que ele possa ter adquirido, ou no atendimento dele nesta Instituição.

Rio de Janeiro, ____ de _____, 2016.

Nome

Data: _____

Assinatura do informante

Data: _____

Assinatura do pesquisador

Data: _____