



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA

ANGELINNE RIBEIRO ANGELO GOMES

**EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE O FLÚOR E A IRRADIAÇÃO COM
LASER Nd: YAG NA PREVENÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO *IN VITRO***

Recife – PE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA

ANGELINNE RIBEIRO ANGELO GOMES

**EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE O FLÚOR E A IRRADIAÇÃO COM
LASER Nd: YAG NA PREVENÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO *IN VITRO***

Tese apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros.
Co-orientador (a): Profa. Dra. Ana Marly Araújo Maia

Recife –PE

2015

TÍTULO DO TRABALHO: EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE O FLÚOR E A IRRADIAÇÃO COM LASER Nd: YAG NA PREVENÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO *IN VITRO*.

NOME DO ALUNO: ANGELINNE RIBEIRO ANGELO GOMES

TESE APROVADA EM: 14/08/2015

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dr. Richard Jonh Heck

Profa. Dra. Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota

Profa. Dra. Gabriela Queiroz de Melo Monteiro

Profa Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Recife – PE
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof.Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dra. Bruna de Carvalho Farias Vajgel

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof.Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Profa.Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Prof.Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof.Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

MEMBRO COLABORADOR

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

Dedico este trabalho ao anjo que passou em minha vida: meu filho Marcelo Ribeiro Angelo Gomes. A sua rápida passagem deixou lições profundas que variaram de uma imensa alegria a uma saudade que não passa. Ao mesmo tempo fui abençoada com o entendimento e o desejo de seguir em frente e ser capaz de vencer os obstáculos com fé e amor.

A conclusão dessa etapa “doutorado” é uma vitória nossa!

Obrigada Deus pela oportunidade de sentir o Teu amor na pureza de um anjo que me confiaste. Sigo com fé nessa vida efêmera com a certeza da eternidade do laço que nos une.

AGRADECIMENTOS

À Deus, na sua infinita bondade, pela oportunidade de crescimento e amadurecimento profissional e realização de mais um sonho.

Aos meus pais e a estrutura familiar criada e cultivada por eles, o que nos possibilitou uma base sólida para o crescimento pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Annelise, Andrei e Angello e sobrinhos Anna Clara, Victor, Andrei Filho e João Pedro pelo apoio e companheirismo incondicional nos momentos de alegrias e tristezas.

Ao meu esposo, Márcio Henrique Augusto Gomes pelo amor, amizade e lealdade compartilhados diariamente e pelo nosso amado filho Marcelo que passou pelas nossas vidas para nos ensinar o que é o verdadeiro e mais puro amor.

À Universidade Federal de Pernambuco, em nome do Reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em nome da coordenadora Prof. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho, entre professores, alunos e funcionários que compartilharam comigo as alegrias e “aflições” dessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros, meu orientador, pela sugestão do tema do trabalho, orientação precisa durante a idealização, desenvolvimento e conclusão da pesquisa e pela confiança em mim depositada.

A minha Co-orientadora, Prof. Dra. Ana Marly Araújo Maia, pela amizade, disponibilidade e atenção em todos os momentos. As palavras se tornam insuficientes para agradecer os conhecimentos compartilhados de forma tão doce, firme e sensata. Serei sempre grata!

Ao grupo de pesquisa do Departamento de Física (DF), aos Prof. Dr. Richard Heck e Antônio Celso D. Antonino do Departamento de Energia Nuclear (DEN), ao Prof. Dr. Fernando José Ribeiro Sales do Departamento de Biomédica e aos alunos da pós-graduação da UFPE, em especial a Rodrigo, Bruno, Marina, Cássia e Carol que participaram direta ou indiretamente da execução desse trabalho e contribuíram de forma essencial para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos do Hospital Naval de Recife, que me acompanharam em todas as fases do Doutorado e me ajudaram muito nos momentos de assistir aulas, participação em congressos e desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

Introdução. Esforços têm sido direcionados para a redução do risco à cárie dentária através da adoção de medidas preventivas e motivacionais. Evidências recentes apontam que a irradiação com laser é eficaz no aumento da resistência dentária à desmineralização promovida durante o processo cariogênico. No entanto, ainda não há um consenso quanto a melhor forma de uso clínico do laser. **Objetivos.** Este estudo visou avaliar, num modelo *in vitro*, o efeito da interação entre e a irradiação do laser Nd:YAG com um verniz de flúor na prevenção da desmineralização do esmalte dentário. **Materiais e Métodos.** Cento e dez espécimes de esmalte foram distribuídos em 5 grupos, a saber: Grupo 1 – Controle, Grupo 2 – Flúor, Grupo 3 – Laser, Grupo 4 – Flúor/Laser e Grupo 5 – Laser/Flúor. Os grupos 3,4 e 5 foram subdivididos em 3 subgrupos cada de acordo com as potências utilizadas (0,5, 075 e 1W), totalizando 11 grupos com 10 espécimes cada. Os tratamentos superficiais consistiram no uso do laser Nd:YAG e verniz fluoretado isolados e em associação, seguido de um processo de desmineralização *in vitro* por 48 horas. Em sequência, as amostras foram escaneadas em um microtomógrafo de raios-X (XTEK XT-H 225 ST *microfocos*) e as imagens obtidas foram reconstruídas e processadas para quantificar a perda mineral e a diferença de densidade mineral entre as áreas exposta e não-exposta do esmalte dentário. **Resultados.** O grupo 1 apresentou maior perda mineral ($89,8 \pm 24,6\mu\text{m}$) ($p<0,001$). Amostras tratadas com flúor apresentaram perda mineral semelhante aos grupos tratados com laser e associações de laser flúor ($p>0,05$). A diferença de densidade mineral do esmalte apresentou-se maior no grupo 1 ($1.756 \pm 746\text{HU}$) ($p<0,001$). O uso isolado do flúor e os tratamentos laser/flúor demonstraram as menores médias na variação da densidade. **Conclusões.** O uso exclusivo do laser e suas associações com o verniz fluoretado mostraram-se semelhantes ao uso exclusivo do flúor. A associação do verniz fluoretado com o laser apresenta melhor performance quando o laser Nd:YAG é utilizado previamente ao verniz.

Palavras-chave: Cárie dentária . Flúor . Laser . Microtomografia por raio-x.

ABSTRACT

Introduction. Efforts have been directed to reducing the risk of caries adopting preventive and motivational measures. New found evidence suggests that the laser irradiation is effective in increasing the resistance to tooth demineralization promoted during the cariogenic process. However, there is still no consensus on the best way of laser clinical use. **Objectives.** This study aimed to evaluate an in vitro model, the effect of interaction between the radiation and the Nd:YAG laser with a fluoride varnish on the prevention of demineralization of dental enamel.

Materials and methods. One hundred and ten enamel specimens were distributed into 5 groups as follows: Group 1 - Control, Group 2 - Fluoride, Group 3 - Laser, Group- 4 - Fluoride/Laser, Group 5 - Laser /Fluoride. Groups 3,4 and 5 were each subdivided into 3 subgroups according to the power (0.5, 075, and 1W), a total of 11 groups of 10 specimens each. The surface treatment consisted in the use of Nd: YAG laser and fluoride varnish isolated and in combination, followed by a process of demineralization in vitro for 48 hours. In the following, the specimens were scanned at a X-ray microtomography (XT-H Xtek microfocus ST 225) and images were reconstructed and processed to quantify the mineral loss and the mineral density difference between the exposed and non-exposed areas enamel. Results. Group 1 showed higher mineral loss ($89.8 \pm 24.6\mu\text{m}$) ($p <0.001$). Samples treated with fluoride mineral loss showed similar to the groups treated with laser and Fluorine laser associations. The difference mineral density was higher in Group 1 ($1.756 \pm 746\text{HU}$) ($p <0.001$). The isolated use of fluoride and treatments laser/fluoride promoted smaller mean of density. Conclusions. The exclusive use of laser and their association with fluoride varnish were similar to the exclusive use of fluoride. The association of fluoride varnish with laser shows better performance when the Nd: YAG laser is first used to varnish.

Keywords: Dental caries . Fluor . Laser- X-Ray Microtomography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Corte coronal de uma amostra do grupo controle com representação da área exposta e não exposta, profundidade de análise da densidade e perda mineral entre AE e ANE.....	18
Figura 2. Distribuição do percentual de proteção de perda mineral dos grupos que receberam tratamento de superfície em relação ao grupo controle.....	20
Figura 3. Distribuição do percentual de proteção de densidade mineral dos grupos que receberam tratamento de superfície em relação ao grupo controle.....	21

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Descrição da fórmula utilizada para calcular o percentual de proteção conferido à superfície do esmalte dentário pelos tratamentos de superfícies em relação ao grupo sem tratamento.....	18
Tabela 1. Descrição dos protocolos de tratamento realizados.....	16
Tabela 2. Valores médios de perda mineral (μm), desvio-padrão dos grupos avaliados, n=10.....	19
Tabela 3. Diferença de densidade mineral (HU) e desvio padrão entre as áreas expostas e não expostas de acordo com o protocolo de tratamento, n=10.....	21

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CaF₂ - Fluoreto de cálcio

CO₂ - Dióxido de carbono

Er:YAG – Érbio: ítrio, alumínio, granada

HA- Hidroxiapatita

Hz- Hertz

HU- Hounsfield

JAD- junção amelodentinária

KV- Kilovolt

Laser - Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

MEV- microscopia eletrônica de varredura

MicroCT- Microtomografia computadorizada

mA- miliampère

MO- Microscopia óptica

MLP- Microscopia de luz polarizada

NaF- Fluoreto de sódio

Nd:YAG – neodímio: ítrio, alumínio, granada

pH- Potencial hidrogeniônico

ROI- Região de interesse

TCP- Tricalcio fosfato

TMR – Microradiografia transversal

W: Watts

µm- micrômetro

SUMÁRIO

1. EFEITO DO TRATAMENTO COM LASER ND:YAG E FLÚOR NA PREVENÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE.....	13
1.1 INTRODUÇÃO.....	13
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
1.3 RESULTADOS.....	19
1.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	25
APÊNDICE A.....	28
ANEXO A	42

1. EFEITO DO TRATAMENTO COM LASER ND:YAG E FLÚOR NA PREVENÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE

1.1 INTRODUÇÃO

A otimização dos métodos usuais de prevenção da cárie e o desenvolvimento e aprimoramento de novas estratégias de prevenção são de fundamental importância para a promoção de saúde bucal¹. A ação benéfica do flúor está associada à formação de precipitados semelhantes ao fluoreto de cálcio (CaF₂), que se incorporam à superfície do esmalte dentário conferindo-lhe uma maior resistência^{2,3}.

O uso tópico de fluoretos é comprovadamente uma medida que interfere na progressão natural da lesão de cárie e contribui para o seu controle, uma vez que a presença constante do fluoreto na cavidade bucal proporciona uma superfície de esmalte mais resistente à desmineralização. Isso explica a vasta utilização dessa substância no cotidiano, principalmente nos dentifrícios, na água de abastecimento público, soluções para bochechos e agentes fluoretados de uso profissional como géis e vernizes^{4,5}. Contudo, em situações de alto risco de cárie, usualmente associadas a significativa redução do fluxo salivar ou alteração da sua composição, métodos tradicionais tem se mostrado pouco efetivos na prevenção da cárie⁶.

Visando um melhor controle clínico do processo cariogênico, a irradiação dos tecidos dentários com laser tem se mostrado um método eficaz, promovendo aumento da resistência do esmalte à desmineralização^{7,8,9,10}. O laser Nd:YAG (neodímio: ítrio, alumínio e granada) tem mostrado resultados promissores tanto em estudos laboratoriais quanto clínicos^{11,12,13,14}. Este laser possui comprimento de onda de 1.064µm e mostra-se capaz de promover alterações na estrutura do esmalte e na morfologia dos cristais de hidroxiapatita quando associados a um fotoabsorvedor, conferindo uma maior resistência à desmineralização^{9,12}. Estudos buscaram determinar os melhores parâmetros do laser Nd:YAG^{10,11,15,16,17,18,19,20}, visto que a transferência de energia entre o laser, fotoabsorvedores e estrutura dentária, bem como os fluoretos associados, nem sempre demonstra o sinergismo esperado^{21,22}.

Diversos métodos têm sido propostos para a avaliação *in vitro* da desmineralização dos tecidos dentários, incluindo microradiografia transversal (TMR), considerada atualmente o padrão-ouro, microscopia de luz polarizada (MLP), microdureza e, mais recentemente, a microtomografia computadorizada de raios-X (microCT)²³. Sistema de MicroCT usando fontes micro focais de raios-X e detectores de alta resolução permitem projeções em múltiplas direções para produzir imagens para reconstrução 3D de amostras. As imagens representam mapas de distribuição espacial de coeficientes de atenuação linear determinados pela energia da fonte de

raios X e a composição atômica do material^{24,25,26}. Por ser um método não destrutivo e de alta resolução, têm sido utilizados em pesquisas para avaliação de densidade tecidos duros dentários, tanto na morfologia e preparo do canal radicular, bem como no processo de desmineralização e remineralização^{27,28,29}, dessa forma, têm se destacado como método válido para avaliação de cárie²³.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da interação entre a irradiação do laser Nd:YAG com um verniz de flúor na prevenção da desmineralização em esmalte dentário bovino. O presente estudo testou duas hipóteses nulas: (I) não há diferença na resistência ao desafio cariogênico da superfície do esmalte causados pelas potências do laser a 0,5W, 0,75W e 1W e (II) a sequência operatória utilizada na associação do laser ao verniz fluoretado não influencia no aumento da resistência do esmalte à desmineralização.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Processo: 23076.045898/2012-17). Foram utilizados 40 incisivos bovinos desinfetados em solução de clorammina a 2% durante 10 dias.

Desenho do estudo

Foi realizado um estudo experimental *in vitro*, no qual foram utilizados 110 blocos de esmalte de 5x4x5mm, sendo esses divididos em 5 grupos: Controle, Flúor, Laser, Flúor/Laser e Laser/Flúor. Os grupos Laser, Flúor/Laser e Laser/Flúor utilizaram as potências de 0,5, 075 e 1W, com 10 amostras por grupo. Os tratamentos superficiais consistiram no uso do laser Nd: YAG e verniz fluoretado isolados e associados, em seguida todos os grupos foram submetidos a um processo de desmineralização *in vitro* por 48 horas. Na sequência, as amostras foram escaneados em um microtomógrafo de raios-X (XTEK XT-H 225 ST *microfocos*) e as imagens obtidas foram reconstruídas e processadas para quantificar a perda mineral e a diferença de densidade mineral entre as áreas exposta e não-exposta do esmalte.

Preparo dos blocos de esmalte

Foi realizado com o auxílio de micromotor elétrico (Modelo Marathon, Talmaz, Curitiba, PR-Brasil) e disco flexível diamantado (KG Sorensen, São Paulo, SP-Brasil). Esses fragmentos dentários foram incluídos individualmente em resina acrílica autopolimerizável (Jet Clássico Ind., São Paulo, SP, Brasil) com o auxílio de uma matriz de silicôna de formato cilíndrico, de modo que a superfície do esmalte ficasse exposta. Na sequência as amostras foram polidas em politriz giratória (South Bay Technology Lapping and Polishing Machine, San Clemente, CA-

EUA), sob refrigeração com lixas d'água (3M, São Paulo, SP, Brasil) de granulações crescentes 600, 800 e 1200 durante 1 minuto para cada lixa e para finalizar foi utilizado um disco de feltro e pasta de diamante de 1 micron durante 2 minutos. Em seguida, os blocos foram submetidos a um banho no ultrassom (USC-1400-Unique, São Paulo, SP- Brasil) durante 20 minutos e armazenamento em meio úmido.

Com o intuito de definir a área exposta (AE) e a área não exposta (ANE), os blocos de esmalte tiveram parte da superfície cobertos com verniz cosmético (Colorama, São Paulo, SP, Brasil) e cera amarela, deixando apenas uma área de esmalte pré-estabelecida de aproximadamente 10mm², que recebeu os tratamentos - AE.

Protocolo de tratamento com o flúor

Para o tratamento com flúor, foi aplicada uma única e fina camada do verniz fluoretado - Duraphat 5% NaF, 2,26% F, pH 4,5 (Colgate-Palmolive Ind. E Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) com auxílio de um microbrush (Aplicador Microbrush –KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) sendo mantidos em meio úmido por 4 horas³⁰. Após esse período, o verniz foi cuidadosamente removido com o auxílio de uma lâmina de bisturi n° 15 (Solidor, China).

Protocolo de irradiação com Laser Nd:YAG

A irradiação com o Laser Nd:YAG (Fotona Fidelis®, Ljubljana, Eslovénia) foi realizado no Centro de Ensino e Pesquisa de Laser em Odontologia (CEPLO) da UFPE. O laser foi aplicado perpendicularmente à superfície da amostra com fibra ótica de 300 µm de diâmetro em modo de varredura, a aproximadamente 1mm de distância da superfície do esmalte por 30 segundos, sendo duas sequencias de 15 segundos. Antes de cada irradiação, foi preparada uma pasta a base de carvão vegetal diluído em partes iguais de água deionizada e etanol a 99% ³¹ e aplicada na AE com um microbrush.

Os parâmetros do laser variaram de acordo com o subgrupo de intervenção. Utilizou-se uma frequência de 10Hz e potências de 0,5W, 0,75W e 1W (*short pulse*) sendo entregues energias de 15, 22,5 e 30J na superfície exposta de 10mm² que resultou em densidades de energia de 150, 225 e 300J/cm².

Distribuição dos grupos e tratamento de superfície

Na Tabela 1, as amostras foram distribuídas entre grupos de acordo com o tratamento ou ausência deste e foram descritos os protocolos de tratamentos utilizados.

Tabela 1. Descrição dos protocolos de tratamento realizados.

GRUPOS	SUBGRUPOS	PROTOCOLO DE TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE
1. Controle	-	-
2. Flúor	-	<i>Protocolo de tratamento com o flúor</i>
3. Laser Nd:YAG	L0,5W	<i>Protocolo de irradiação com Laser Nd:YAG</i>
	L0,75W	
	L1W	
4. Flúor/Laser	FL0,5W	<i>1. Protocolo de tratamento com o flúor</i>
	FL0,75W	<i>2. Protocolo de Irradiação com Laser</i>
	FL1W	<i>Nd:YAG</i>
5. Laser/Flúor	LF0,5W	<i>1. Protocolo de Irradiação com Laser</i>
	LF0,75W	<i>Nd:YAG</i>
	LF1W	<i>2. Protocolo de tratamento com o flúor</i>

Indução de Desmineralização

Para indução desmineralização foi adotado o método descrito por Manesh *et al*³². As amostras foram separadas em caixas de acordo como grupo a que pertencia, e imersos na solução de desmineralização (2mmol/L de Cálcio, 2mmol/L de fosfato, 0,075mol/L de acetato, em ph de 4,5 ajustado com o auxílio do tampão TRIS a 20%) em estufa a 37° C durante 48hs, com troca da solução após 24hs. Após este período, a cera e o esmalte cosmético foram removidos e as amostras lavadas em água destilada e acondicionada em meio úmido até o início das análises.

MicroCT- Microtomografia Computadorizada

As amostras foram escaneadas pelo microtomógrafo NIKON, modelo XTEK XT-H 225 ST *microfocos*, no Laboratório de Tomografia Computadorizada (LTC) do Núcleo em Ensaios Não Destrutivos de Aplicações de Raios X (NENDARX) do Departamento de Energia Nuclear da UFPE. Para o escaneamento foram adotados parâmetros como: 80KV de tensão, 222mA de corrente, sem filtro, o tamanho do pixel de 11µm e tempo de aquisição de aproximadamente 25 minutos cada amostra, sendo geradas 3017 projeções axiais.

Reconstrução e Processamento das Imagens

As imagens obtidas foram reconstruídas utilizando o software XTEK-CT PRO 3D, desenvolvido pela própria NIKON (Reino Unido). A partir da imagem reconstruída foi

selecionado um volume de interesse a ser estudado, que corresponde ao fragmento de dente bovino previamente incluído em bloco de resina acrílica. Em seguida, as imagens do volume selecionado foram importadas pelo software VGStudioMax 2.2 (Volume Graphics GmbH, Heidelberg, Alemanha) onde foram atribuídos valores limites da escala cinza na unidade de Hounsfield (HU)³³ e aplicado o filtro Gaussiano (3x3x3), que tem o objetivo de suavizar a presença de artefatos e ruídos comuns nas imagens digitais.

Para o processamento das imagens obtidas foi utilizado o programa livre ImageJ (livre, aberto), desenvolvido pelo *National Institutes of Health* (NIH). Esse software dispõe de plugins e ferramentas que possibilitam o uso de filtros, parâmetros de segmentação e avaliação quantitativa de cada região de interesse (ROI). A partir da imagem processada foram avaliadas as perdas minerais entre AE e ANE e a densidade mineral do esmalte dental, para esta finalidade foram selecionadas ROI na AE e ANE de 100x100 pixels de área. Cada ROI apresenta em média 300 fatias axiais, cada fatia tem a espessura de 11 μm (um voxel) e uma área de 10.000 pixels, sendo a fatia número 1 correspondente à área mais interna da amostra e a de número 300, a área mais superficial.

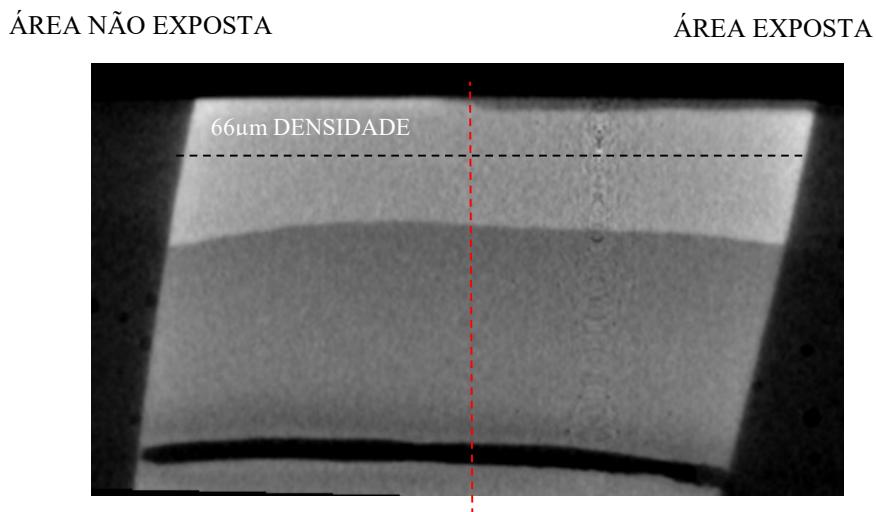
Perda Mineral

O cálculo das perdas minerais entre AE e ANE foi realizado através do processamento das imagens, com o objetivo de calcular o desgaste da AE em relação a ANE e ambos relacionados à margem superior do processamento. Para esse processamento foram utilizadas ferramentas do ImageJ para segmentação das imagens com o intuito de calcular a altura correspondente ao fragmento dentário dentro do ROI de AE e ANE e calcular a diferença entre os dois em micrômetros.

Densidade mineral do esmalte

Para o cálculo da densidade mineral do esmalte dentário remanescente nos diferentes grupos avaliados foi utilizada a ferramenta Plot Z-axis profile do ImageJ, que permitiu uma análise volumétrica dos voxels selecionados considerando todas as fatias das ROI de AE e ANE. Foram analisados 6 voxels de cada ROI, que corresponde a uma profundidade de 66 μm , para cada voxel foi gerado um valor médio da densidade desde a superfície até o interior da amostra (Figura 1).

Figura 1. Corte coronal de uma amostra do grupo controle com representação da área exposta e não exposta, profundidade de análise da densidade e perda mineral entre AE e ANE.



Para o cálculo dos percentuais de proteção conferidos pelos tratamentos para as variáveis perda mineral e densidade mineral foi utilizada a fórmula descrita no Quadro 1.

Quadro 1. Descrição da fórmula utilizada para calcular o percentual de proteção conferido à superfície do esmalte dentário pelos tratamentos de superfícies em relação ao grupo sem tratamento.

$$\% \text{ proteção} = [1 - \frac{\text{Média (Grupo Tratamento)}}{\text{Média Grupo Controle}}] \times 100$$

Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) para verificar a distribuição dos dados e definir o teste estatístico a ser utilizado, se paramétrico ou não paramétrico. Os dados apresentaram distribuição normal e então foi aplicado o teste ANOVA de um fator para as variáveis perda mineral e densidade, e o teste de Tukey para as comparações múltiplas entre os grupos. Os valores foram expressos como média \pm desvio-padrão, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS para Windows na versão 20.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

1.3 RESULTADOS

O grupo controle (sem tratamento) foi o referencial de maior perda mineral, com uma diferença de altura entre as superfícies das áreas expostas e não expostas de $89,8 \pm 24,6\mu\text{m}$. Ao

comparar os grupos quanto à perda mineral pelo teste de Tukey, observou-se a proteção efetiva dos métodos testados, ineficiente apenas para o grupo FL0.5, com $p>0,05$ (Tabela -2).

Tabela 2 – Valores médios de perda mineral (μm), desvio-padrão dos grupos avaliados, $n=10$.

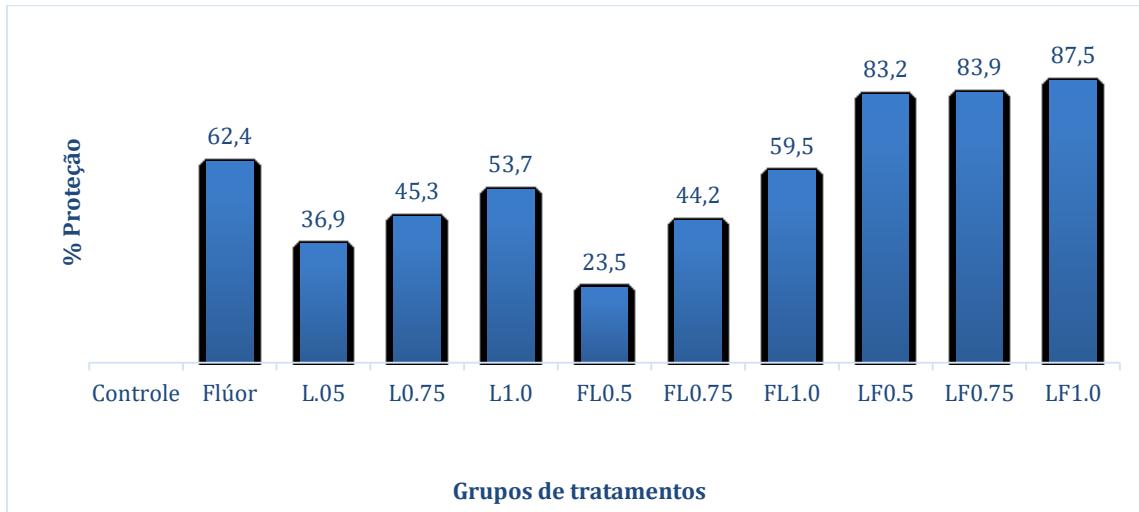
	Tratamentos	Média de perda mineral (μm)
1	Controle	89,8 \pm 24,6 ^a
2	Flúor	33,8 \pm 23,9 ^{bc}
3	L0.5	56,7 \pm 19,0 ^b
	L0.75	49,1 \pm 25,0 ^b
	L1.0	41,6 \pm 19,4 ^{bc}
4	FL0.5	68,8 \pm 15,9 ^a
	FL 0.75	50,1 \pm 17,9 ^b
	FL1.0	36,4 \pm 14,4 ^{bc}
5	LF0.5	15,1 \pm 11,0 ^c
	LF0.75	14,5 \pm 10,9 ^c
	LF1.0	11,2 \pm 12,4 ^c
	Valor de p	<0,001

Nota: No Teste ANOVA foram encontradas diferenças entre os grupos ($p=0,001$).

No pós-teste de Tukey as médias da perda mineral seguido por letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. Significância estatística = $p<0,05$.

A associação do laser seguido do flúor em qualquer potência apresentou as menores médias de perda mineral, com eficiência similar ($p>0,05$) aos grupos Flúor, laser 1W isolado (L1.0) e associado previamente ao flúor (FL1.0).

Figura 2 –Distribuição do percentual de proteção de perda mineral dos grupos que receberam tratamento de superfície em relação ao grupo controle.



O percentual de proteção dos tratamentos em relação ao grupo controle demonstrou que os grupos que utilizaram o laser prévio ao flúor apresentaram proteção acima de 80%, sugerindo sinergismo na sequência Laser/Flúor, visto que o laser isolado e associado na sequencia Flúor/Laser demonstraram proteção inferior a 60%. (Figura-2).

Na comparação da diferença de densidade entre a superfície da área exposta e a subsuperfície da área não exposta foram encontradas as menores variações na média e maiores percentuais de proteção para os grupos flúor e laser/flúor (Tabela-3).

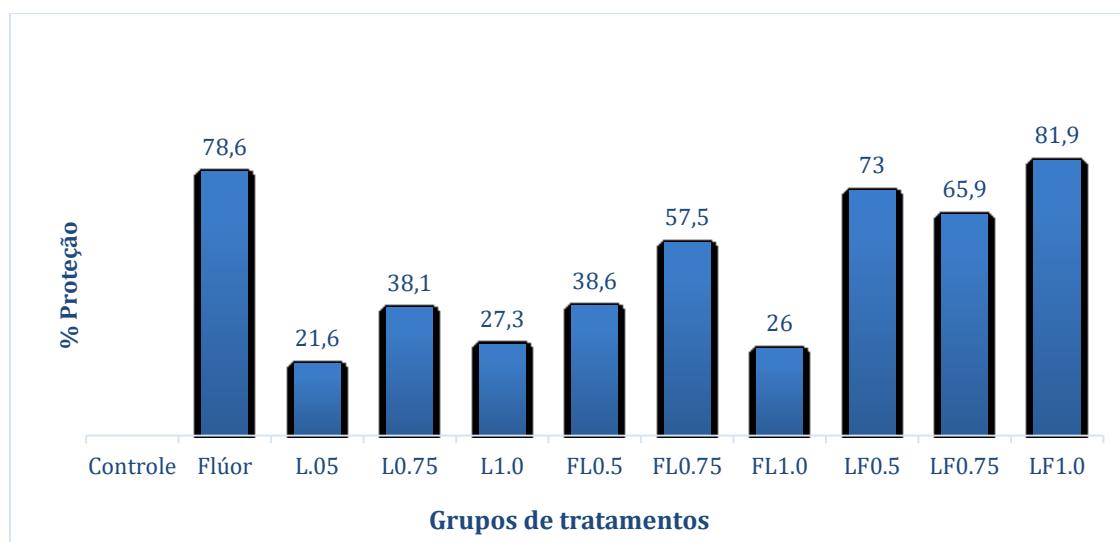
Tabela 3 – Diferença de densidade mineral (HU) e desvio padrão entre as áreas expostas e não expostas de acordo com o protocolo de tratamento, n=10.

	Tratamentos	Média da diferença de densidade (HU) \pm Dp	
1	Controle	1.756	\pm 746 ^a
2	Flúor	376	\pm 292 ^c
3	L0.5	1.376	\pm 590 ^{ab}
	L0.75	1.087	\pm 624 ^{ab}
	L1.0	1.276	\pm 614 ^{ab}
4	FL0.5	1.078	\pm 815 ^{ab}
	FL 0.75	746	\pm 574 ^{bc}
	FL1.0	1.299	\pm 528 ^{ab}
5	LF0.5	474	\pm 531 ^{bc}
	LF0.75	598	\pm 333 ^{bc}
	LF1.0	317	\pm 401 ^c
	Valor de p	<0,001	

Nota: No Teste ANOVA foram encontradas diferenças entre os grupos ($p<0,001$).

No pós-teste de Tukey as médias da perda mineral seguido por letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. Significância estatística = $p<0,05$.

Figura 3 – Distribuição do percentual de proteção de densidade mineral dos grupos que receberam tratamento de superfície em relação ao grupo controle.



1.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Recentes linhas de evidência tem apontado que o laser Nd:YAG é um método efetivo na prevenção da desmineralização do esmalte pela cárie dentária^{10,18,19}. O presente estudo investigou a potência do laser e a sequência operatória mais adequada na associação do laser com flúor através de análises quantitativas de perda mineral e densidade do esmalte dentário. Com base nos resultados foi observado que o uso do laser previamente ao flúor aumenta a resistência do esmalte à desmineralização de modo semelhante ao uso exclusivo do flúor.

Os efeitos do laser sobre o esmalte para prevenção de desmineralização têm sido pesquisados com diferentes tipos de lasers e parâmetros de irradiação. O uso dos lasers de CO₂ e Nd:YAG tem sido investigado com maior frequência, uma vez que ambos são de fácil manipulação e eficazes na capacidade de aumentar a resistência do esmalte à descalcificação ácida tanto na superfície lisa^{10,32,33} quanto em regiões de sulcos e fissuras^{20,22,34}. Assim, o laser Nd:YAG não é eficazmente absorvido pelos tecidos dentários, e portanto necessita do uso de um corante escuro que atua como fotoabsorvente^{9,19,35}. Dessa forma, promove-se uma absorção indireta, visto que o corante depositado na superfície do esmalte absorve a energia luminosa, fazendo com que o calor produzido se mantenha restrito à porção superficial do esmalte, sem causar danos à polpa dental. O aumento da temperatura nas superfícies irradiadas causa a decomposição da matriz orgânica e esta é responsável pela diminuição da permeabilidade e redução da solubilidade do esmalte, os produtos dessa decomposição podem obstruir os poros do esmalte impedindo a penetração de íons ácidos³⁶.

A utilização de menores níveis de potências do laser tem sido sugerida por Bedini *et al.*¹⁰, que demonstraram que o uso do laser Nd:YAG nas potências entre 0,6 e 1,2 W preserva a integridade da superfície do esmalte e diminui a desmineralização. Estes dados também são observados no tratamento de cicatrículas e fissuras, onde o laser de Nd:YAG usado na potência de 1W aumentou a resistência do esmalte^{20,21}. Em virtude dessa variação relatada na literatura, nesse estudo foram testadas as potências de 0,5W, 0,75W e 1W as quais conferiram proteção à superfície do esmalte de 36,9%, 45,3% e 53,7%, respectivamente, apontando que o aumento da potência até 1W promove maior resistência ao desafio cariogênico. Este efeito protetor pode ser atribuído a fatores como a redução da permeabilidade, modificações na composição química e/ou na morfologia superficial da estrutura do esmalte^{37,38,39}.

Com base nos resultados clínicos e laboratoriais satisfatórios apresentados pelo flúor e pelo laser isoladamente, alguns estudos buscaram associar o laser e o flúor para prevenção de cárie dentária, bem como da erosão ácida^{6,40,41}. Contudo, ainda não há um protocolo bem estabelecido para os parâmetros do laser nem para a sequência de aplicação do agente fluoretado

(antes ou após a irradiação). Muito embora alguns estudos tenham analisado esta associação^{22,35}, a maioria das metodologias não fazem essa comparação, bem como não há um destaque para a importância dessa sequência nos resultados dos trabalhos. No presente estudo, o uso do flúor previamente à irradiação com laser objetivou a incorporação do fluoreto à estrutura do esmalte durante o *melting*. Contudo, os grupos que receberam o fluoreto previamente à irradiação apresentaram perdas minerais acentuadas e significativas, sendo o grupo FL0.5 semelhante ao grupo sem tratamento. Este achado sugere que possivelmente grande parte da energia do laser tenha sido absorvida pelo verniz e carvão, sendo transferida ao esmalte uma energia incapaz de gerar alterações superficiais. O fato de o aumento da energia levar à diminuição das perdas minerais (grupos FL0.75 e FL1.0) parece reforçar esta hipótese. Consequentemente, é possível que o efeito protetor da associação flúor/laser deva-se mais à alteração superficial promovida pelo laser do que ao resíduo de flúor superficial.

Por outro lado, o presente estudo evidenciou que a irradiação laser previamente à aplicação do flúor promoveu redução da perda mineral e aumento densidade mineral, independente da potência utilizada. Foram encontrados percentuais de proteção de 83,2, 83,9 e 87,5% para as potências de 0,5, 0,75 e 1 W respectivamente, indicando que há sinergismo na técnica quando a sequência Laser/Flúor é estabelecida. O efeito térmico promovido pelos lasers pode levar a alterações morfológicas que torna a superfície do esmalte mais reativa ao íon flúor e formação de fluoreto de cálcio^{2,3}, como ocorre nas superfícies de lesão de mancha branca que apresentam maior deposição de fluoreto de cálcio que as superfícies hígidas, devido a sua maior porosidade⁴². Além disso, cabe ressaltar que tanto o grupo flúor quanto os grupos laser/flúor demonstraram as menores variações de densidade e os maiores percentuais de proteção, o que pode ser justificado pela permanência do verniz de flúor na estrutura remanescente do esmalte dentário após a desmineralização.

Estudos que avaliaram a associação do laser Nd: YAG com flúor concordaram em relatar um aumento da resistência à desmineralização em relação ao grupo controle^{21,41}. No estudo clínico de Raucci-Neto et al.²¹, foram avaliados os efeitos do laser Nd:YAG 0,5W e flúor isolados e associados, aplicando o flúor previamente à irradiação e concluíram que o laser independente da associação com fluoretos promoveu um efeito preventivo para cárie oclusal de até 12 meses na dentição decídua e nove meses na permanente após a irradiação. A sequência laser/flúor na potência de 0,5W foi avaliada por Azevedo et al.²² que verificou que a associação com o flúor não aumentou a eficácia do laser na prevenção da desmineralização do esmalte. Estes resultados assemelham-se aos observados no presente estudo, em que se verificou maior proteção em relação ao grupo controle, mas semelhante ao uso isolado do flúor.

Em resumo, foi observado que o tratamento com laser e suas associações aumentaram a resistência do esmalte à desmineralização, de modo semelhante ao aumento promovido pelo uso isolado do flúor. Contudo, o uso do flúor previamente ao laser em baixa potência anula parcialmente o efeito deste.

REFERÊNCIAS

1. Cochrane, N.J., Cai, F., Huq, N.L., Burrow, M.F., Reynolds, E.C. (2010). New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. Dent Res J. 89, 1187-97.
2. Saxeagaard, E., Rolla, G. (1988). Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application *in vitro*. Scand J Dent Res. 96, 523-35.
3. Ten Cate, J.M., Featherstone, J.D. (1991). Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2, 283-96.
4. Cury, J.A., Tenuta, L.M. (2008). How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. Adv. Dent. Res. 20, 13-6.
5. Cury, J.A., Tenuta, L.M., Ribeiro, C.C., Paes Leme, A.F. (2004). The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. Braz. Dent. J. 15, 167-74.
6. Magalhães, A.C., Rios, D., Machado, M.A.A.M., Silva, S.M.B., Lizarelli, R.F.Z., Bagnato, V.S., et al. (2008). Effect of Nd:YAG irradiation and fluoride application on dentine resistance to erosion *in vitro*. Photomed. Laser Surg. 26, 559-63.
7. Antunes, A., de Rossi, W., Zezell, D.M. (2006). Spectroscopic alterations on enamel and dentin after nanosecond Nd:YAG laser irradiation. Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc. 64, 1142-6.
8. Karandish, M. (2014) The Efficiency of laser application on the enamel surface: A systematic review. J. Lasers Med. Sci. 5,108-14.
9. Zezell, D.M., Boari, H.G., Ana, P.A., Eduardo, C.P., Powell, G.L. (2009). Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. Lasers Surg. Med. 41, 31-35.
10. Bedini, R., Manzon, L., Fratto, G., Pecci, R. (2010). Microhardness and morphological changes induced by Nd:YAG laser on dental enamel: an *in vitro* study. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. 46, 168-72.
11. Hossain, M., Nakamura, Y., Kimura, Y., Yamada, Y., Kawanaka, T. (2001). Matsumoto K. Effect of pulsed Nd:YAG laser irradiation on acid demineralization of enamel and dentine. J Clin Laser Med Surg. 19:105-8.
12. Tagomori, S., Morioka, T. (1989). Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. Caries Res. 23, 225-31.
13. Anderson, J.R., Ellis, R.W., Blankenau, R.J., Beiraghi, S.M., Westerman, G.H. (2000). Caries resistance in enamel by laser irradiation and topical fluoride treatment. J Clin Laser Med Surg. 18, 33-6.
14. Vlacic, J., Meyers, I.A., Kim, J., Walsh, L.J. (2007). Laser-activated fluoride treatment of enamel against an artificial caries challenge: comparison of five wavelengths. Aust Dent J. 52, 101-5.
15. Bahar, A., Tagomori, S. (1994) The effect of normal pulsed Nd:YAG laser irradiation on pits and fissures in human teeth. Caries Res. 28, 460–467.
16. Pelino, J.E., Mello, J.B., Eduardo, C.P., Jorge, A.O. (1999). In vitro study of the Nd:YAG laser effect on human dental enamel: optical and scanning electron microscope analysis. J Clin Laser Med Surg. 17,171-7.
17. Korytnicki, D., Mayer, M.P., Daronch, M., Singer, J.D.A.M., Grande, R.H. (2006). Effects of Nd:YAG laser on enamel microhardness and dental plaque composition: an *in situ* study. Photomed.Laser Surg. 24, 59–63.
18. Castellan, C.S., Luiz, A.C., Bezinelli, L.M., Lopes, R.M.,Mendes, F.M., Eduardo, C.P., and De Freitas, P.M. (2007). In vitro evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. Photomed.Laser Surg. 25, 85–90.

19. Tavares, J.G., Eduardo, C.P., Burnett Jr, L.H., Boff, T.R., Freitas, P.M. (2012). Argon and Nd:YAG Lasers for Caries Prevention in Enamel. Photomed Laser Surg. 30, 433–437.
20. Correa-Afonso, A.M., Ciconne-Nogueira, J.C., Pecora, J.D., Palma-Dibb, R.G. (2012). In vitro assessment of laser efficiency for caries prevention in pits and fissures. Microsc Res Techniq. 75, 245–252.
21. Raucci-Neto, W., de Castro-Raucci, L.M., Lepri, C.P., Faraoni-Romano, J.J., Gomes da Silva, J.M., Palma-Dibb, R.G. (2015). Nd:YAG laser in occlusal caries prevention of primary teeth: a randomized clinical trial. Lasers Med Sci. 2015 Feb 30, 761-8. Epub 2013 Aug 17.
22. Azevedo, D.T., Faraoni-Romano, J.J., Derceli Jdos R., Palma-Dibb, R.G. (2012). Effect of Nd:YAG laser combined with fluoride on the prevention of primary tooth enamel demineralization. Braz Dent J. 23, 104-9.
23. Clementino-Luedemann, T.N., Kunzelmann, K.H. (2006). Mineral concentration of natural human teeth by a commercial micro-CT. Dent Mater J. 25, 113-9.
24. Paulus, M.J., Gleason, S.S., Kennel, S.J., Hunsicker, P.R., Johnson, D.K. (2000). High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. Neoplasia. 2, 62–70.
25. Bentley, M.D., Ortiz, M.C., Ritman, E.L., Romero, J.C. (2002). The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 282, 1267–1279.
26. Holdsworth, D.W., Thornton, M.M. (2002). Micro-CT in small animal and specimen imaging. Trends in Biotechnol., 20, 34–39.
27. Swain, M.V., Xue, J. (2009). State of the Art of Micro-CT Applications in Dental Research. Int J Oral Sci. 1, 177–188.
28. Watanabe, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Ochiai, Y., Watanabe, S. (2012). Longitudinal evaluation of mineral loss at the earliest stage of enamel demineralization using micro-computed tomography. Health. 4, 334-340.
29. Asaizumi, M., Karlinsey, R.L., Mackey, A.C., Kato, T., Kuga, T. (2013). In vitro assessments of white-spot lesions treated with NaF plus tricalcium phosphate (TCP) toothpastes using microtomography (micro-CT). J. Dent. Oral Hyg. 5, 68-76.
30. Carvalho, T.S., Peters, B.G., Rios, D., Magalhães, A.C., Sampaio, F.C., Buzalaf, M.A., et al. (2015). Fluoride varnishes with calcium glycerophosphate: fluoride release and effect on in vitro enamel demineralization. Braz Oral Res. 29, 1-6.
31. Boari, H.G.D., Ana, P.A., Eduardo, C.P., Powell, G.L., Zezell, D.M. (2009). Absorption and thermal study of dental enamel when irradiated with Nd:YAG laser with the aim of caries prevention. Laser Physics. 19, 1463-69.
32. Manesh, S.K., Darling, C.L., Fried, D. (2009) Polarization-sensitive optical coherence tomography for the nondestructive assessment of the remineralization of dentin. J. Biomed Opt. 14, 044002.
33. Hounsfield, G.N. (1973). Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. Br J Radiol. 46, 1016–1022.
34. Valério, R.A., Rocha, C.T., Galo, R., Borsatto, M.C., Saraiva, M.C.P., Corona, S.A.M. (2015). CO₂ Laser and Topical Fluoride Therapy in the Control of Caries Lesions on Demineralized Primary Enamel. Scientific World Journal. 2015;2015:547569.
35. Araújo JJ. Efeito da irradiação laser associada à aplicação tópica de fluoreto sobre o esmalte submetido à erosão e/ou abrasão. [Tese]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2012.
36. Liu, Y., Hsu, C.Y.S. (2007). Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study. J. Dent., 35, 226–230.

37. Chen, C.C., Huang, S.T. (2009). The effects of lasers and fluoride on the acid resistance of decalcified human enamel. Photomed Laser Surg. 27, 447-52.
38. Yamamoto, H., Ooya, K. (1974). Potential of yttrium-aluminum-garnet laser in caries prevention. J Oral Pathol. 3, 7-15.
39. Featherstone, J.D.B., Fried, D. (2001). Fundamental interactions of lasers with dental hard tissues. Med Laser Appl. 16,181-94.
40. Rios, D., Magalhães, A.C., Machado, M.A.A.M., Da Silva, S.M.B., Lizarelli, R.F.Z., Bagnato, V.S et al. (2009). *In Vitro* evaluation of enamel erosion after Nd:YAG irradiation and fluoride application. Photomed Laser Surg. 27, 743-747.
41. Sobral, M.A., Lachowsli, K.M., de Rossi, W., Braga, S.R., Ramalho, K.M. (2009). Effect of Nd:YAG laser and acidulated phosphate fluoride on bovine and human enamel submitted to erosion/abrasion or erosion only: an in vitro preliminary study. Photomed Laser Surg. 27, 709-13.
42. Hicks, J., Garcia-Godoy, F., Donly, K., Flaitz, C. (2003). Fluoride-releasing restorative materials and secondary caries. Calif. Dent. Assoc. 31, 229-45.

APÊNDICE A

DESCRIÇÃO DA SEQUENCIA DE AQUISIÇÃO, RECONSTRUÇÃO E PROCESSAMENTO DAS IMAGENS.

1. MicroCT- Micro tomografia Computadorizada

A aquisição das projeções e a reconstrução das amostras foram realizadas pelo microtomógrafo de raios-X (modelo XTEK XT-H 225 ST *microfocos*, NIKON, Reino Unido) situado no Laboratório de Tomografia Computadorizada (LTC) / Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (figura 1). Foram adotados os seguintes parâmetros para o escaneamento microtomográfico: 80 kV de tensão, 222mA de corrente, sem filtro.



Fonte: Imagem do pesquisador.

Figura 1. Vista geral do microtomógrafo do DEN/UFPE.

1.1 Análise por Microtomografia de raios-X

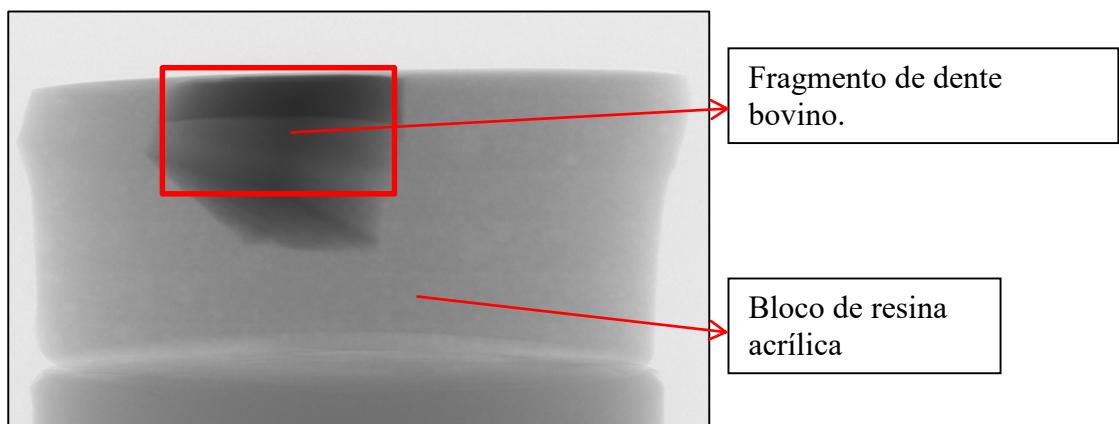
A análise dos blocos de esmalte pelo microCT pode ser resumida em três etapas descritas abaixo, aquisição das imagens no microtomógrafo, reconstrução e processamento das imagens e dados.

✓ Aquisição das imagens no microCT

Para a aquisição, a amostra era fixada no suporte para que não se movesse durante o escaneamento pelo microCT. O protocolo adotou o tamanho do voxel de $11\mu\text{m}$, o tempo de aquisição era de aproximadamente 25 minutos por amostra, sendo geradas 3017 fatias de imagens em 2D.

✓ Reconstrução das seções de micro-CT.

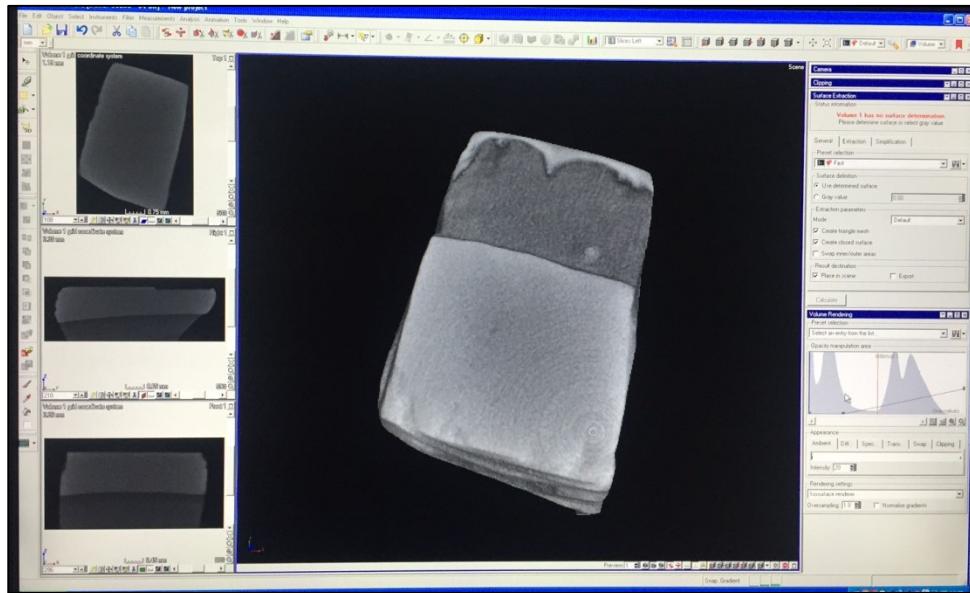
As imagens obtidas foram reconstruídas em 3D utilizando o software XTEK-CT PRO 3D, desenvolvido pela própria NIKON. A partir da imagem reconstruída foi selecionado um volume de interesse (VOI) a ser estudado, que corresponde ao fragmento de dente bovino previamente incluído em bloco de resina acrílica, conforme figura 2.



Fonte: Imagem do pesquisador.

Figura 2. Imagem do bloco de resina acrílica com o fragmento dental incluído, reconstruído pelo software XTEK-CT PRO 3D.

O volume do fragmento dentário selecionado, que corresponde a uma pilha de 300 fatias em média, foi importado pelo software VGStudioMax 2.2 (Volume Graphics GmbH, Heidelberg, Alemanha) onde foram atribuídos valores limites da escala cinza na unidade de Hounsfield (HU) para a área de geociências ($\text{Ar}=0$ e água= 1000). Após a geração das imagens, foi aplicado o filtro gaussiano ($3\times 3\times 3$) e as imagens exportadas no formato *tiff* e arquivadas (Imagestak) - (Figura 3).



Fonte: Imagem do pesquisador.

Figura 3. Visualização das amostras em 3D no VGStudioMax 2.2.

✓ Processamento das imagens e dados

A análise visual da imagem digital é insuficiente para estabelecer uma comparação quanto ao efeito protetor dos métodos de tratamento testados. Dessa forma, o processamento quantitativo das imagens tridimensionais torna-se indispensável. Para o processamento das imagens foi utilizado o programa livre ImageJ (livre, aberto), desenvolvido pelo *National Institutes of Health* (NIH), que dispõe de plugins e ferramentas que possibilitam o uso de filtros, parâmetros de segmentação e avaliação quantitativa de cada região de interesse (ROI).

O processamento das imagens digitais compreendeu 3 etapas básicas:

- 1) Pré-processamento – consiste no alinhamento das imagens, aplicação de filtros, e eliminação de ruídos;
- 2) Segmentação em fases – onde são identificadas as fases de interesse da amostra, como esmalte e dentina, por exemplo;
- 3) Quantificação das características da amostra – etapa que fornece as informações pesquisadas, como exemplo, perda mineral e densidade mineral das amostras.

As seguintes etapas de processamento digital foram realizadas através do software Image J (Versão 1.49u) sendo utilizada uma amostra do grupo sem tratamento como exemplo.

PRÉ-PROCESSAMENTO

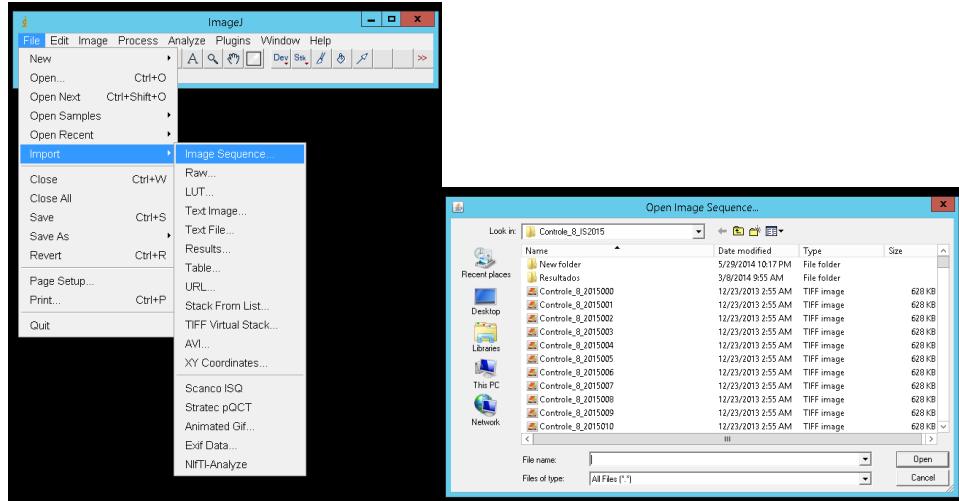


Figura 4. Procedimento de importar a imagem no formato tiff pelo Image J para iniciar o pré-processamento.

Etapa 1. Abrir o programa Image J, em seguida selecionar a opção: File – Import – Image Sequence- importar o conjunto de 300 fatias de imagens da amostra Controle_8 arquivadas no formato *tiff*.

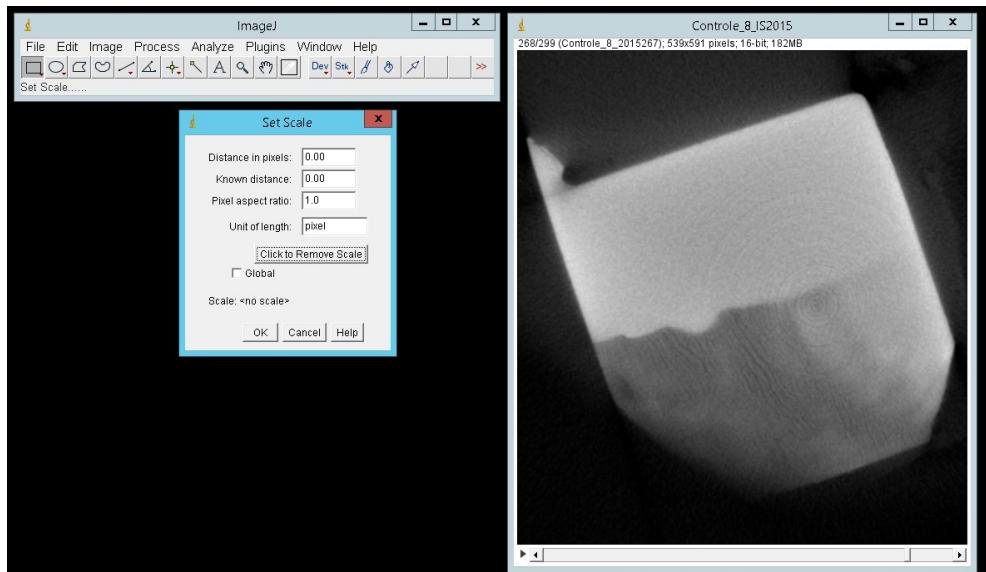


Figura 5. Imagem importada em 16bits e a unidade de medida em polegadas (inches).

Etapa 2. Transformar a unidade de medida de polegadas (inches) para pixel através da opção: Ananlyze – Set scale – Clic to remove scale.

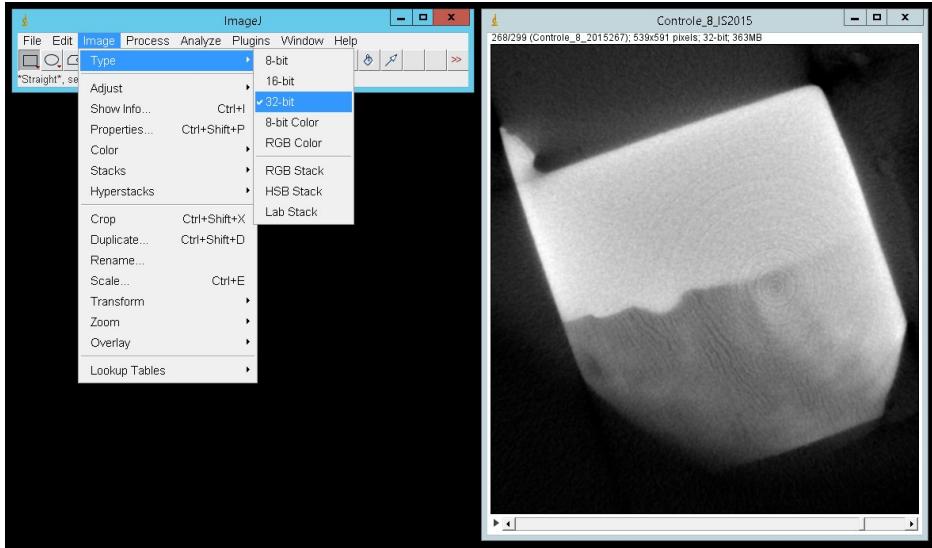


Figura 6. Procedimento de alterar a imagem de 16 para 32 bits.

Etapa 3. Transformar a imagem de 16 para 32 bits, através da opção: Image – Type – 32 bits.

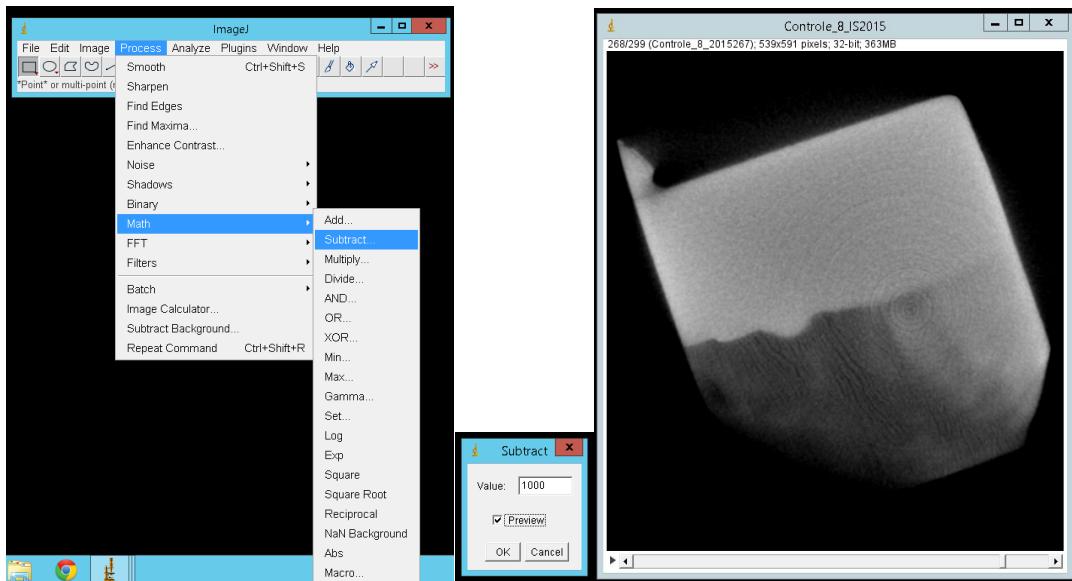


Figura 7. Procedimento de subtração de 1000 unidades de HU.

Etapa 4. Subtrair o valor de 1.000 unidades de HU do conjunto de imagens com o objetivo de adaptá-las a escala de Hounsfield para a área de saúde ($\text{Ar} = -1.000$ e $\text{Água} = 0$), usando a opção: Process – Math – Subtract - 1000.

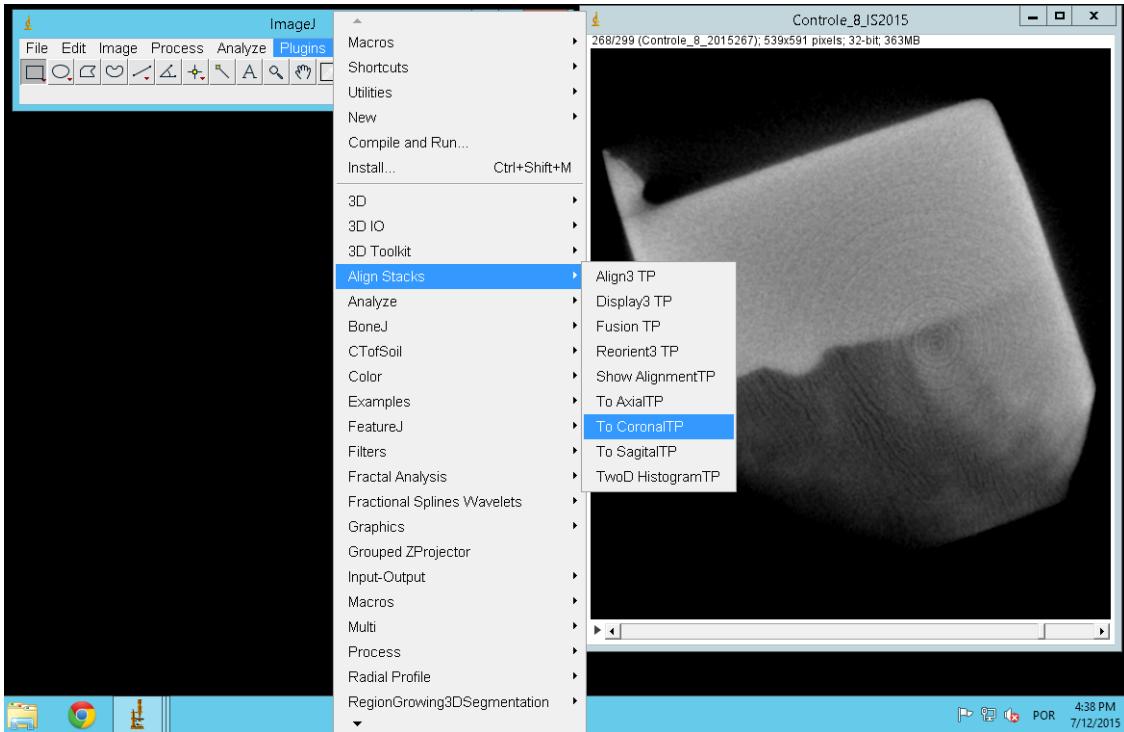


Figura 8. Procedimento de reconstrução da amostra no corte coronal.

Etapa 5. Gerar imagens nos cortes coronal, sagital e axial, usando a opção Plugins- Align stacks –To Coronal/To Sagital/ To Axial.

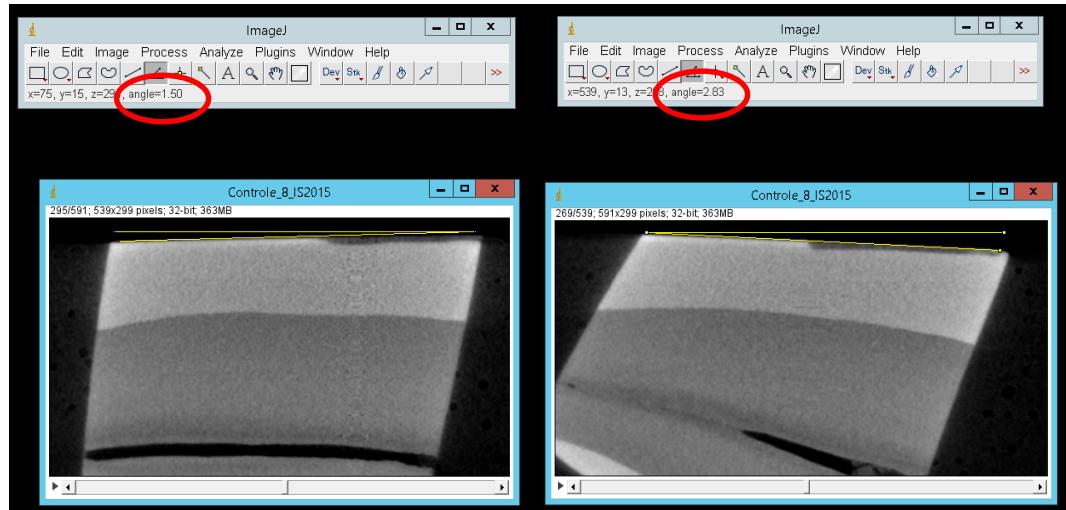


Figura 9. Procedimento de mensurar os ângulos das imagens nos cortes coronal e sagital.

Etapa 6. Mensurar os ângulos entre a área não exposta e a margem superior da janela com o auxílio da ferramenta *Angle tool*. Os ângulos calculados para o corte coronal (à esquerda) e corte sagital (à direita) estão destacados na imagem.

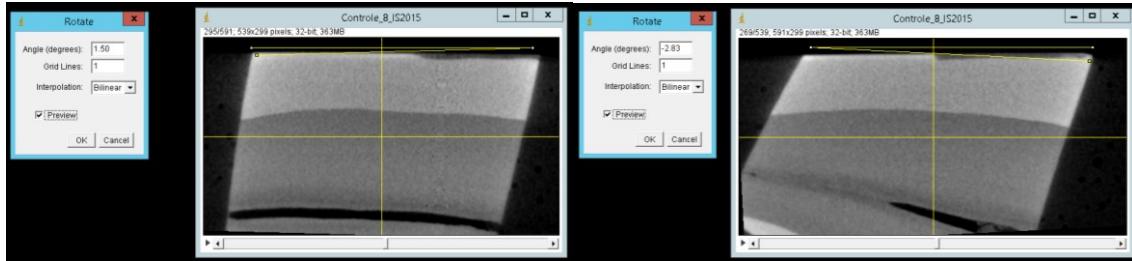


Figura 10. Procedimento de ajustar os ângulos e planificar as imagens nos cortes coronal (à esquerda) e sagital (à direita).

Etapa 7. Ajustar os ângulos para alinhar as imagens nos cortes coronal (à esquerda) e sagital (à direita), utilizando a opção: Image- Transform- Rotate.

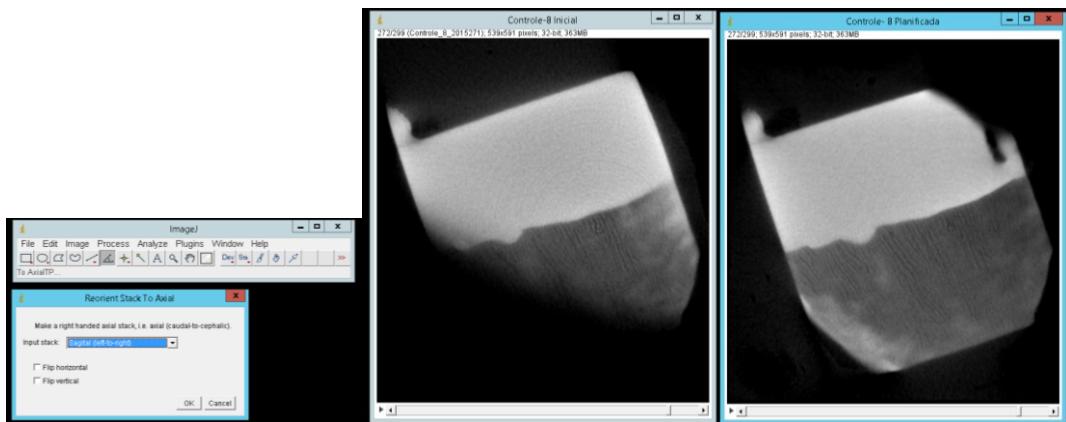


Figura 11. Procedimento de gerar conjunto de imagens planas no corte axial após ajustar os ângulos.

Etapa 8. Gerar imagem 2D alinhada no corte axial, usando a opção: Plugins- Align - To Axial.
Observar diferença entre imagens Controle 8 Inicial e Controle 8 Planificada.

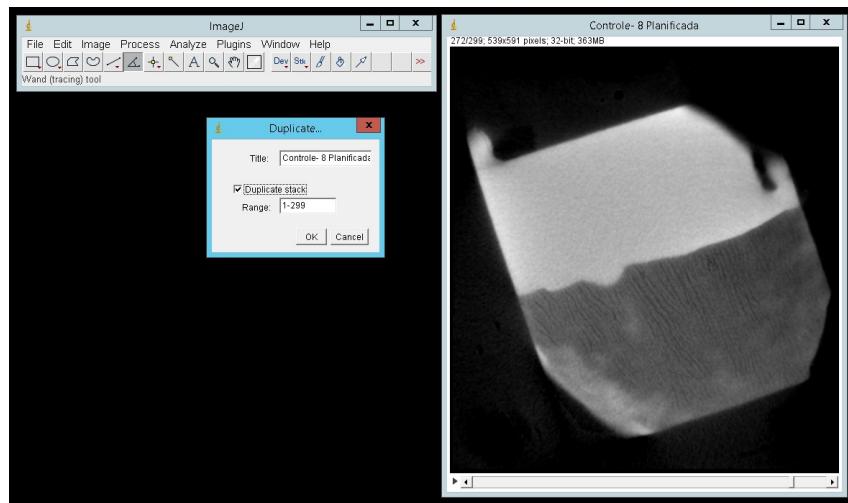


Figura 12. Procedimento para duplicar a imagem Controle 8 Planificada.

Etapa 9. Duplicar a imagem Controle 8 alinhada no corte axial, usando a opção: Image-Duplicate- Clicar na opção Duplicate stacks. O objetivo de duplicar a imagem preservar uma cópia da imagem (Controle 8 Planificada) para ser usada posteriormente.

- ✓ As imagens têm valores de HU tanto na área externa quanto na área que corresponde ao fragmento dentário;
- ✓ As próximas etapas do processamento têm o objetivo de segmentar as imagens de forma a isolar os valores de HU no fragmento dentário, para que durante a posterior análise das variáveis perda mineral e densidade os valores da área externa ao fragmento dentário não sejam contabilizados.

SEGMENTAÇÃO DAS FASES

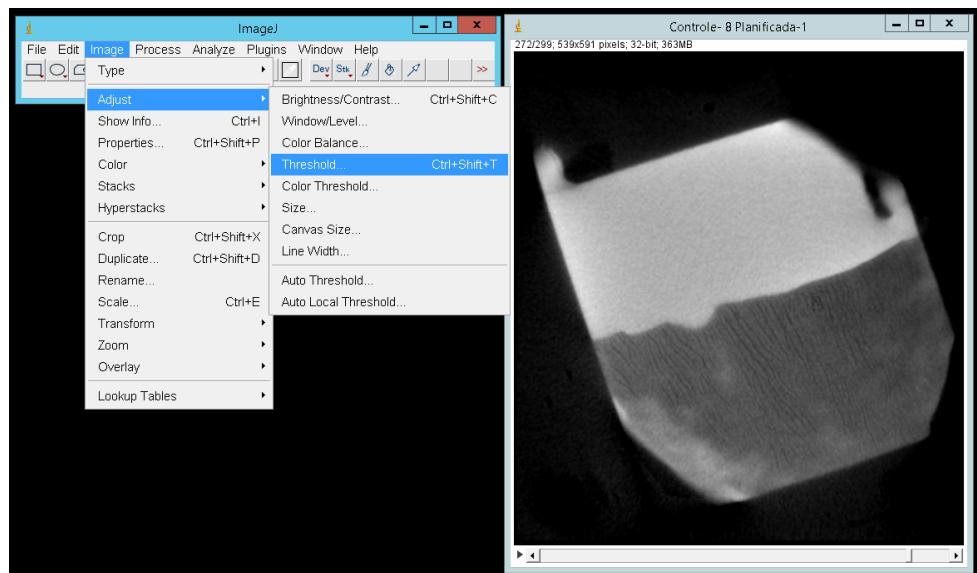


Figura 13. Procedimento para segmentação das fases das imagens - Binarização.

Etapa 10.Binarização - Selecionar a imagem e aplicar a máscara Threshold, usando a opção: Image- Adjust – Threshold.

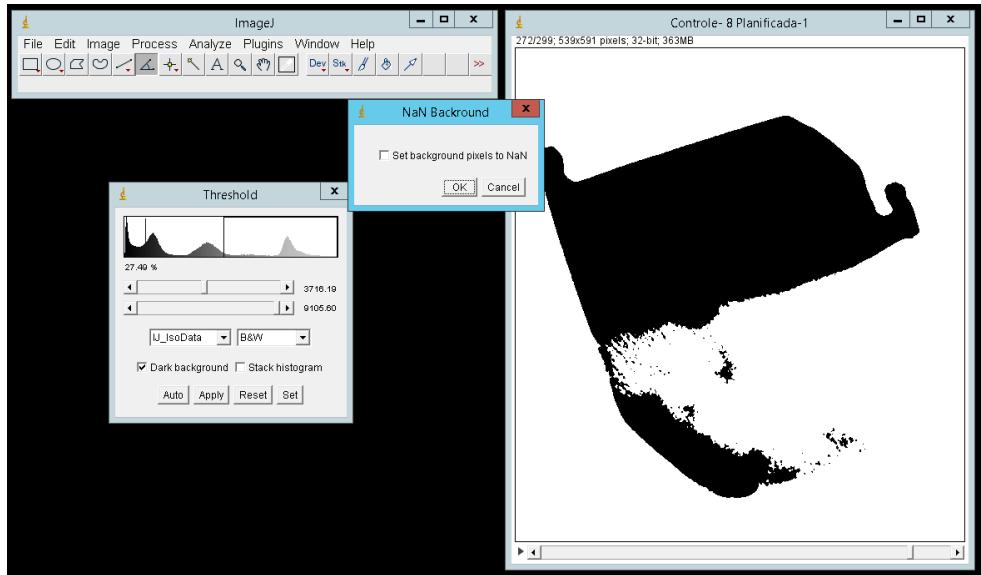


Figura 14. Continuando o procedimento para segmentação das imagens.

Etapa 11. Selecionar no histograma a opção “*threshold- IJ Isodata*”- clicar na opção *Dark background* – *Apply*, em seguida foi gerada uma imagem binária com valores de vazio na área externa e 255 na amostra. Observar no histograma Threshold que foram selecionados os valores mais baixos, com o intuito de isolar os valores externos à amostra.

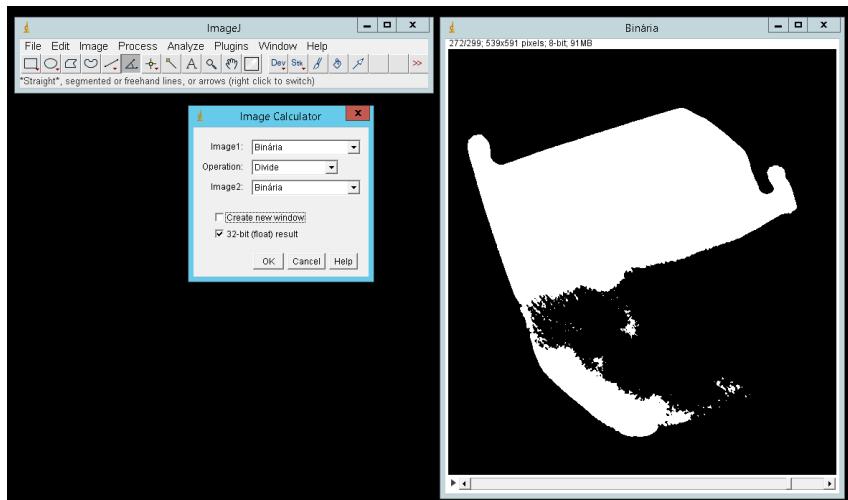


Figura 15. Procedimento para criar a máscara NAN (not a number).

Etapa 12. Dividir a imagem binária por ela mesma com o objetivo de criar um conjunto de imagens denominado máscara NAN onde os valores externos a amostra tem valor de NAN (vazio /vazio) e na amostra tem valor 1 ($255/255=1$). Utilizando a opção: Process- Image calculator- Binária/Binária- clicar em 32 bits result.

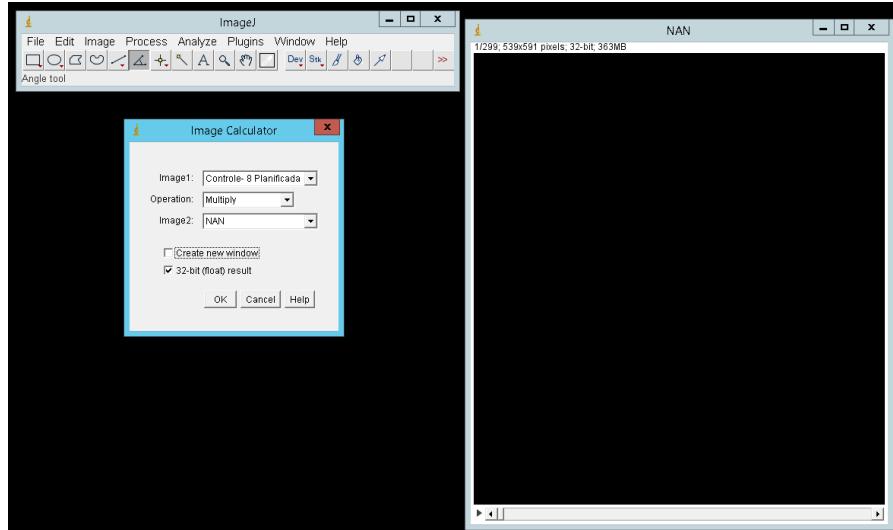


Figura 16. Procedimento para isolar os valores externos à amostra.

Etapa 12. Multiplicar a imagem NAN à imagem inicial Controle 8 Planificada com o objetivo de atribuir valores de HU ao fragmento dentário e valores de NAN à área externa. Utilizando a opção: Process- Image calculator- Controle 8 Planificada x NAN- clicar em 32 bits result.

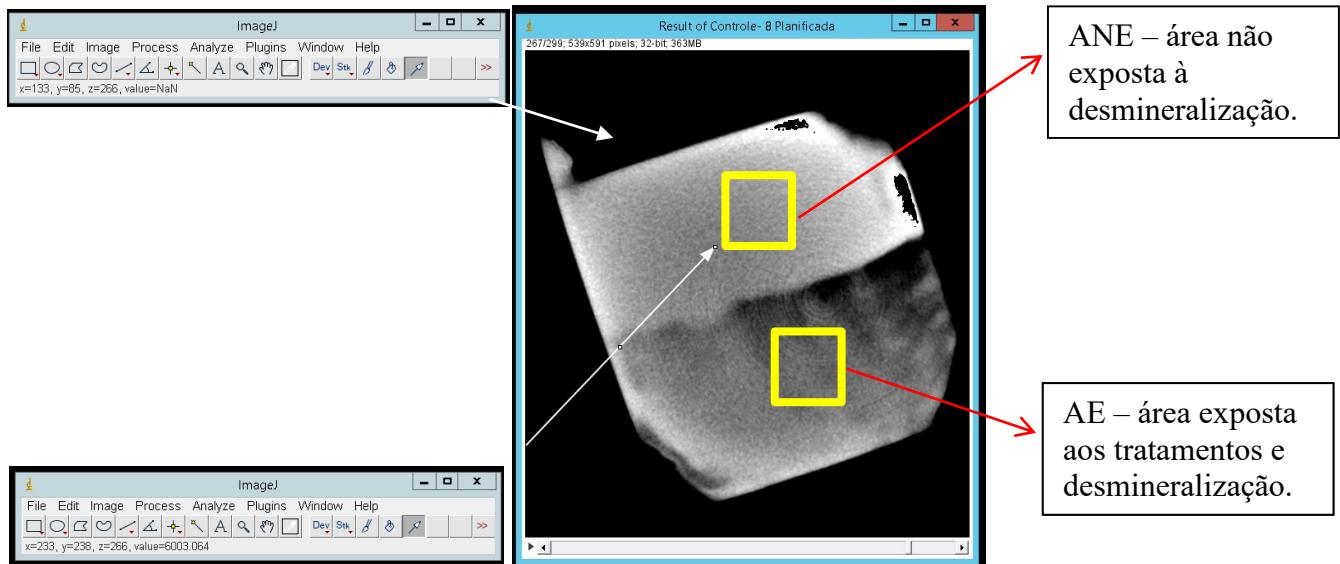


Figura 17. Imagem resultante do processamento referente à amostra Controle 8.

Imagen resultante do processamento realizado para a amostra Controle 8, na qual o fragmento dentário tem os valores de HU e a área externa os valores NaN. A partir dessa imagem resultante foram avaliadas a perda mineral do esmalte dentário (diferença de altura entre a área exposta AE e não exposta– ANE) que significa quanto o tratamento protegeu a AE da desmineralização em relação ao controle ANE dentro da mesma amostra. Para esta finalidade foram selecionadas ROI (região de interesse) na AE e ANE de 100x100 pixels de área no corte axial. Cada ROI apresenta em média 300 fatias, sendo a fatia número 1 correspondente a área mais interna da amostra e a de número 300, a área mais superficial – Figura 18.

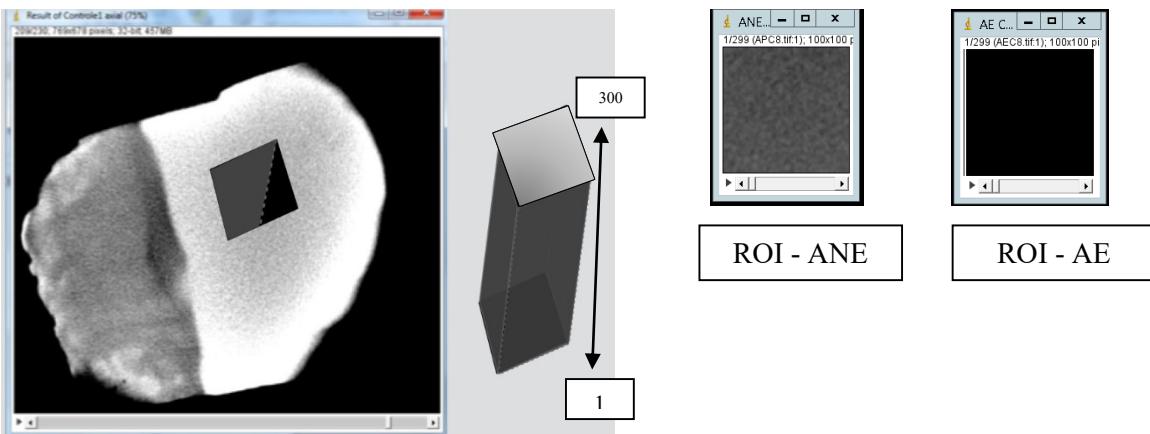


Figura 18. Representação esquemática da exportação dos ROI em volume das AE e ANE. A área mais interna do ROI corresponde a fatia número 1 e a mais externa corresponde a fatia 300.

QUANTIFICAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Cálculo da Perda Mineral – Diferença de altura entre AE e ANE

Para calcular a diferença de altura entre AE e ANE foi realizado um processamento nas imagens dos ROI obtidos no ImageJ com o objetivo de calcular o desgaste da AE em relação a ANE, e ambos relacionados à margem superior do processamento. O processamento para obtenção da perda mineral têm o objetivo de calcular a altura correspondente ao fragmento dentário dentro do ROI de AE e ANE e calcular a diferença entre os dois em voxels, e foi detalhado em etapas, a saber:

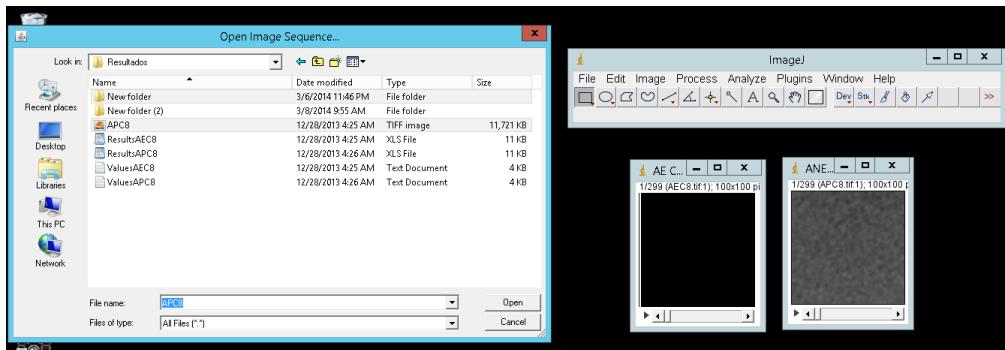


Figura19. Procedimento de importar a imagem no formato tiff pelo Image J para iniciar o processamento para o cálculo da perda mineral.

Etapa 1. Abrir o programa Image J, selecionar a opção: File – Import – Image Sequence-importar os ROI AE e ANE, previamente salvos no formato *tiff*, obtidos de uma amostra do grupo sem tratamento.

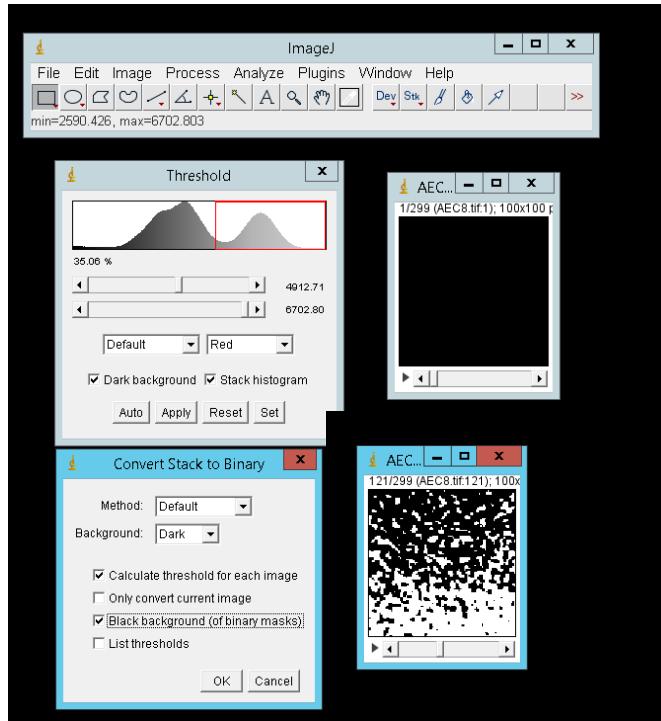


Figura 20. Procedimento para segmentação das fases da amostra nos ROI avaliados.

Etapa 2. Segmentação- As imagens dos ROI de AE e ANE foram segmentadas sendo aplicado o filtro “*Threshold- Default*” individualmente, gerando imagens binárias, onde a amostra corresponde à cor branca, com valor de 255, e a área externa apresenta a cor preta, com valor de zero. Para realizar essa segmentação, selecionar a opção: Image- Adjust- Threshold/ - selecionar no histograma a opção “*threshold- IJ Isodata*”- clicar na opção *Dark background – Apply*.

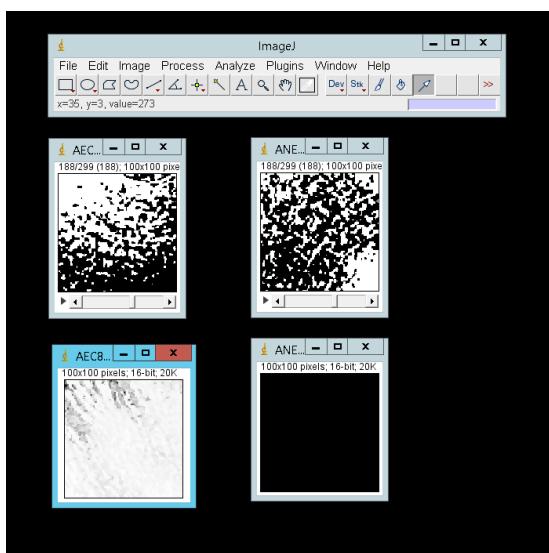


Figura 21. Uso da ferramenta Collapse Z.

Etapa 3. Para finalizar, foi utilizada a ferramenta Plugin- CTSoil - Collapse Z, sendo gerados novos ROI de AE e ANE expondo as irregularidades da superfície.

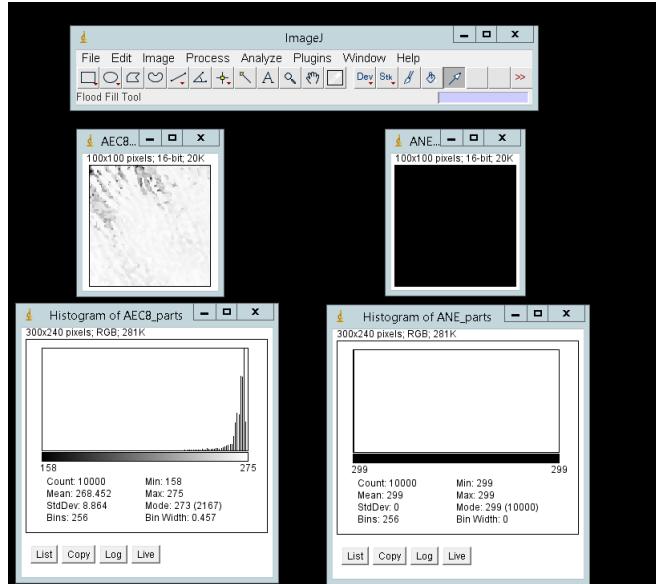


Figura 22. Procedimento de avaliação das superfícies por histogramas referentes a AE e ANE.

Etapa 4. A partir dos ROI que expõem as irregularidades da superfície foram gerados histogramas (Analyze-Histogram) com dados da altura média de cada região de AE e ANE com referência à distância da base até a superfície da amostra.

O valor da diferença entre as alturas médias de AE e ANE foi multiplicada pelo valor do voxel ($11\mu\text{m}$), gerando uma medida que corresponde ao batente de perda mineral sofrido pela AE em micrômetros. Esse cálculo foi possível visto que tudo que tinha valor diferente da área da amostra foi previamente denominado NaN.

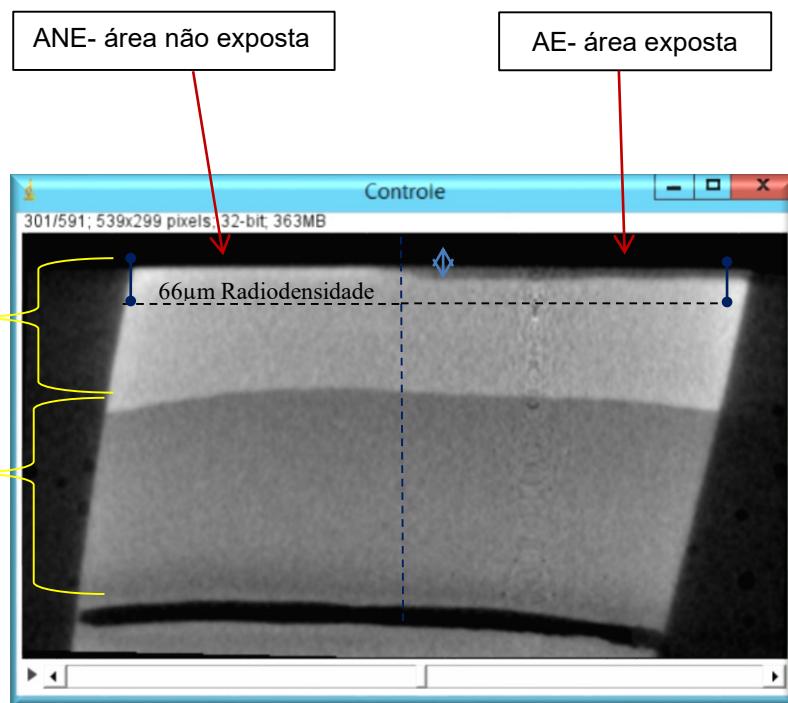


Figura 23. Representação esquemática da área exposta e não exposta e isolada, profundidade de análise da radiodensidade e perda mineral entre AE e ANE de uma amostra do grupo sem tratamento (corte coronal).

Cálculo da Densidade

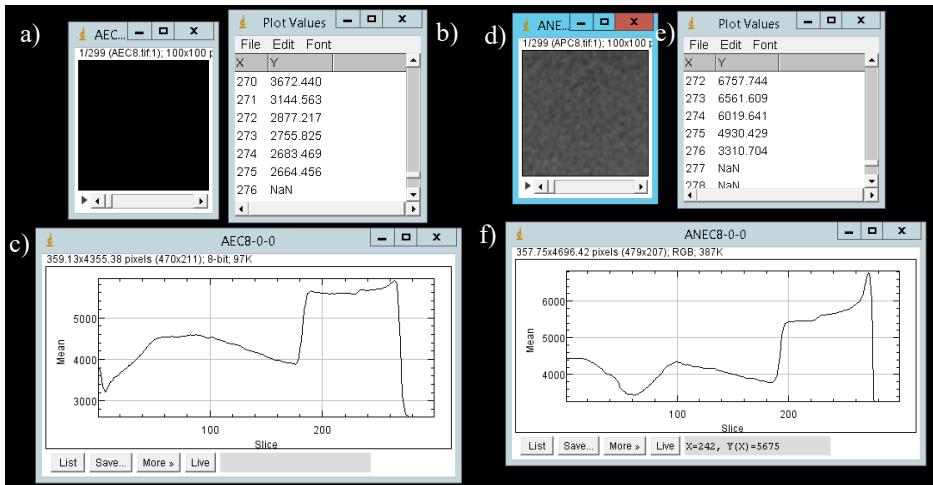


Figura 24. Representação dos ROI AE (a) e ANE (d), lista de valores de densidade referente a cada fatia da amostra e representação gráfica da distribuição da densidade na amostra em AE (b,c) e ANE (e,f).

Etapa 1. Para o cálculo da densidade foram utilizados os ROI da AE e ANE e aplicada a ferramenta Image- stacks- Plot Z-axis profile que permite uma análise dos voxels selecionados considerando todas as fatias da região. Para cada fatia foi gerado um valor de densidade na escala de Hounsfield (HU) desde a superfície até o interior da amostra.

Obs. Nos gráficos correspondentes a AE e ANE foi possível verificar a diferença de densidade entre o esmalte e a dentina observando o degrau gerado no gráfico que ocorre quando há a mudança de material. Para a análise da pesquisa, em ambas as áreas AE e ANE foram selecionadas 6 fatias a partir da superfície, ou seja, foi avaliada a profundidade de 66 μ m abaixo da superfície.

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 25 de fevereiro de 2013.

Ofício nº 546/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. Anderson Stevens Leonidas Gomes
 Departamento de Física
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.045898/2012-17

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “**Caracterização da erosão em esmalte dentário bovino e avaliação de métodos preventivos**”.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Material: dentes bovinos; Origem: os elementos dentários foram doados pelo matadouro de Paulista – Frigorífico Bandeira.

Atenciosamente,

Dani Sly

 Prof. Maria Teresa Janssen
Presidente do CEEA
UFPE