



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Carolina Lima de Carvalho

Orientador(a): Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Ano de Conclusão do Curso: 2008

TCC 451

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marinês Nobre dos Santos Uchôa".

Assinatura do(a) Orientador(a)

Carolina Lima de Carvalho

PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO MICROBIOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE DENTINÁRIA IN VITRO

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia
da Faculdade de Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgiã-
Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa
Colaboradora: Carolina Steiner Oliveira

PIRACICABA

2008

Faculdade FOP/UNICAMP N. Chamada Vol. Ex. Tombo BC/

C.T. 782024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
 Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

C253p	Carvalho, Carolina Lima de. Padronização de um modelo microbiológico para produção de lesões de cárie dentinária <i>in vitro</i>. / Carolina Lima de Carvalho. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2008. 21f. Orientadores: Marinês Nobre dos Santos, Carolina Steiner Oliveira. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Cárie dentária. 2. Placa dentária. I. Nobre dos Santos, Marinês. II. Oliveira, Carolina Steiner. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título. (mg/fop)
-------	--

Dedico este trabalho aos meus pais,
Almir e Zaira, que sempre me
amaram incondicionalmente e
seguraram a minha mão em todos
os momentos da minha vida....

AGRADECIMENTOS

À minha co-orientadora Carolina Steiner Oliveira pela orientação, atenção e paciência dedicadas durante a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa pela colaboração e atenção;

Ao meu namorado Edson, pelo carinho, dedicação e apoio. Foi quem me deu força e esteve comigo nos momentos mais difíceis;

Aos meus amigos, Letícia Clain, Tatiany Araújo, Aline Vicentin, Nanna Trindade, Roberta Galetti, Victor Feitosa, Leonardo Tribis, Leandro Augusto e Rafael Furuse, por todos os momentos alegres vividos;

As minhas companheiras de casa: Gisele Ramos, Bruna Piovesana e Fernanda Kobaiashi, por todo companheirismo e aprendizado;

Aos colegas de “quadrado de clínica”: Namie Kim, Carolina Santos e Carlos Eduardo Bertoldo, pela amizade e valiosa ajuda.

Muito obrigada a todos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	pág. 6
RESUMO.....	pág. 7
ABSTRACT.....	pág. 8
1-INTRODUÇÃO.....	pág. 9
2-OBJETIVO.....	pág. 10
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	pág. 11
4-RESULTADOS.....	pág. 15
5-DISCUSSÃO.....	pág. 17
6-CONCLUSÃO.....	pág. 19
REFERÊNCIAS.....	pág. 20

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BHI	Brain heart infusion
DP	Desvio padrão
ΔZ	Perda mineral
Kv	Quilovolt
mA	Miliampere
PL	Profundidade de lesão
S. mutans	<i>Streptococcus mutans</i>
TMR	Transverse microradiography
UFC	Unidade formadora de colônia
UFC mg ⁻¹	Unidade formadora de colônia por miligrama

RESUMO

A complexidade do meio bucal e problemas éticos associados a estudos de doenças bucais em humanos direcionou a atenção para o desenvolvimento de modelos laboratoriais que simulem, *in vitro*, o ambiente bucal. Dessa forma, esse trabalho desenvolveu a padronização de um modelo microbiológico de produção de lesão de cárie em dentina, semelhante às condições que ocorrem na cavidade bucal. Para isso, após esterilização, sessenta blocos de dentina coronária foram aleatoriamente divididos em quatro grupos, em triplicata: controle (C), SM (*Streptococcus mutans*), S3 (3 imersões em sacarose) and S6 (6 imersões em sacarose). Os grupos foram imersos em um meio de saliva artificial e, com exceção do grupo controle, foram inoculados com *Streptococcus mutans* e banhados em sacarose, de acordo com o regime designado. Após o desafio cariogênico microbiológico, a dentina desmineralizada e a profundidade das lesões foram avaliadas por microrradiografia transversal e a contagem de microorganismos da dentina cariada foi realizada. Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância com o nível de significância de 5%. O modelo microbiológico foi eficaz no desenvolvimento de lesões em dentina, mesmo sem qualquer adição de sacarose. A presença de sacarose mostrou uma maior perda mineral para em ambos os grupos experimentais ($p < 0,05$), mas que não foi influenciada pelo regime de sacarose, de 3 ou 6 imersões diárias. A contagem microbiológica não diferiu significativamente ($p > 0,05$). O modelo microbiológico utilizando *Streptococcus mutans*, saliva artificial como meio de cultura e banhos de sacarose foi eficaz na produção de lesões de cárie dentinárias.

ABSTRACT

The complexity of the oral environment and the ethical issues associated with *in vivo* studies of the dental diseases in humans have prompted the development of laboratory models which can simulate, *in vitro*, the oral environment. Thus, this study aimed at developing a microbial model to produce dentin caries, mimicking the conditions that closer resemble the ones that occur in the mouth. Sixty dentine slabs were randomly divided into four groups in triplicate, after sterilization: control (C), SM (*Streptococcus mutans*), S3 (3 sucrose baths) and S6 (6 sucrose baths). The groups were immersed in an artificial saliva media and, except for the control group, were inoculated with *Streptococcus mutans* and bathed in sucrose, accordingly to the designated regime. After the microbial cariogenic challenge, dentin demineralization and lesion depth were assessed by transverse microradiography, as well as the count of microorganisms in the carious dentin. The data were statistically analyzed by variance test with 5% of significance level. The microbial model utilized in this study has proven to be effective in developing dentin lesions, even without any sucrose addition. The presence of sucrose has shown a greater mineral loss for both of the experimental groups ($p < 0.05$), but was not influenced by the sucrose regime of 3 or 6 baths per day. The microorganisms counts have not significantly differed ($p > 0.05$). The microbial model using *Streptococcus mutans*, artificial saliva as culture media and sucrose baths was effective in producing dentine caries lesions.

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença crônica caracterizada pela destruição localizada e progressiva dos tecidos duros do dente e está intimamente associada com a microbiota residente do biofilme dental (Marsh, 2003). Por ser uma doença que acomete grande parte da população mundial, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver novas técnicas de tratamento da cárie. Após a desmineralização do esmalte, a lesão de cárie pode progredir lentamente em direção à dentina, sendo inicialmente caracterizada por uma área de dentina amplamente desmineralizada localizada sob uma zona parcialmente desmineralizada e infectada com bactérias (Kidd *et al.*, 1993).

Clinicamente, para que os tratamentos restauradores sejam mais conservadores, é ideal que a remoção apenas da dentina contaminada seja realizada. No entanto, a diferenciação entre essas zonas é extremamente crítica, de maneira que grande quantidade de tecido sadio desmineralizado pode ser removida durante o preparo cavitário. A remoção adequada da dentina contaminada depende do conhecimento da dinâmica do processo de cárie que deve considerar a maior susceptibilidade desse substrato quando comparado ao esmalte dental (Featherstone, 1994). Dessa forma, o emprego de modelos *in vitro* de produção de cárie representa uma boa alternativa de entender-se a dinâmica da cárie dentinária.

Dentre os modelos de produção de cárie *in vitro*, os modelos químicos têm sido os mais empregados. Embora a produção de lesões de cárie iniciais possa ser obtida por modelos muito simples como os modelos químicos propostos por Silverstone *et al.* (1988) e Ten Cate (1982) sua aplicação limita-se a fatores que influenciam diretamente o processo de des-remineralização. Estudos *in vitro* mais relevantes sobre cárie inicial como também secundária resultante de adaptação marginal insuficiente de restaurações, podem ser melhor conduzidos com o emprego de modelos microbiológicos Zanin *et al.* (2006) associados à saliva artificial pH 7,0 (Pratten *et al.*, 1998) na presença de sacarose. No entanto, a maioria dos modelos existentes utiliza imersão em caldo de cultura inoculados com microrganismos o que apenas possibilita a obtenção da fase de desmineralização do processo de cárie. Modelos que simulam os dois processos são chamados de “boca artificial” e se

utilizam de aparatos que provêem um contínuo suprimento de nutrientes para o biofilme bacteriano o que os torna mais caros e mais difícil aquisição.

A complexidade do meio bucal e os problemas éticos associados com os estudos *in vivo* das doenças bucais como cárie e doença periodontal em humanos têm inevitavelmente propiciado o desenvolvimento de modelos laboratoriais, que simulam *in vitro* o meio ambiente bucal.

2. OBJETIVO

Determinar e padronizar um modelo de produção de cárie dentinária similar ao que acontece na cavidade oral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Como a realização desta pesquisa incluiu experimentos com dentes humanos, o estudo foi conduzido após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP- UNICAMP (79/2008).

Delineamento Experimental

Um delineamento experimental inteiramente casualizado foi utilizado com 4 grupos de 5 repetições. As 5 repetições foram feitas em triplicata e em momentos diferentes para minimizar os erros inerentes aos procedimentos microbiológicos. Para tanto, os espécimes de dentina foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos:

Grupo C (Controle) – Sem inoculação de *S. mutans* e sem sacarose.

Grupo SM (Controle) – Com inoculação de *S. mutans* e sem sacarose

Grupo S3 – Com inoculação de *S. mutans* e 3 exposições diárias à sacarose a 40%, (9h-9h05; 13h-13h05; 17h-17h05).

Grupo S6 – Com inoculação de *S. mutans* e 6 exposições diárias à sacarose a 40%, (9h-9h05; 11h-11h05; 13h-13h05; 15h-15h05; 17h-17h05)

Preparo dos espécimes de dentina

Foram utilizados 30 terceiros molares extraídos por razões que não as desta pesquisa e armazenados em solução de timol a 0,01% a temperatura de 4° C durante 30 dias (Gilmour *et al.*, 1997). A partir destes dentes, foram preparados 60 blocos de dentina coronária medindo 4 mm x 4 mm x 2 mm. Para preparação dos espécimes, todo o esmalte oclusal de todos os dentes foi removido através de desgaste perpendicular ao longo eixo do dente, empregando-se uma politriz com um disco de lixa de carbureto de silício de granulação 320, sob abundante refrigeração (Figura 1A). Para certificar-se da remoção completa do esmalte, a superfície plana obtida foi analisada através de microscópio óptico com aumento de 30x. Na eventual existência de áreas remanescentes de esmalte, um novo desgaste foi feito.

Após o desgaste, foi obtido um fragmento dental da porção central da coroa (terço médio) com 2 mm de espessura. Este fragmento foi novamente fixado à peça

acrílica e cortado no sentido transversal para obtenção de blocos dentais de dentina medindo 4 x 4 x 2 mm (Figura 1B). Os cortes foram feitos sob refrigeração (água deionizada) para evitar aquecimento da estrutura dentária. Apenas a face de dentina dos blocos mais próxima da superfície oclusal foi utilizada, as demais superfícies do bloco foram protegidas com verniz ácido resistente (Colorama-CEIL, Brazil) (Figura 1D). Os espécimes de dentina foram fixados em tampas de recipiente de vidro com um fio ortodôntico (Figura 1E), armazenados e mergulhados em água destilada estéril, e então foram esterilizados por radiação gama numa dose de 14,5 kGy (Gammacell 220 Excel, GC-220E; MDS Nordion, Ottawa, Canada).

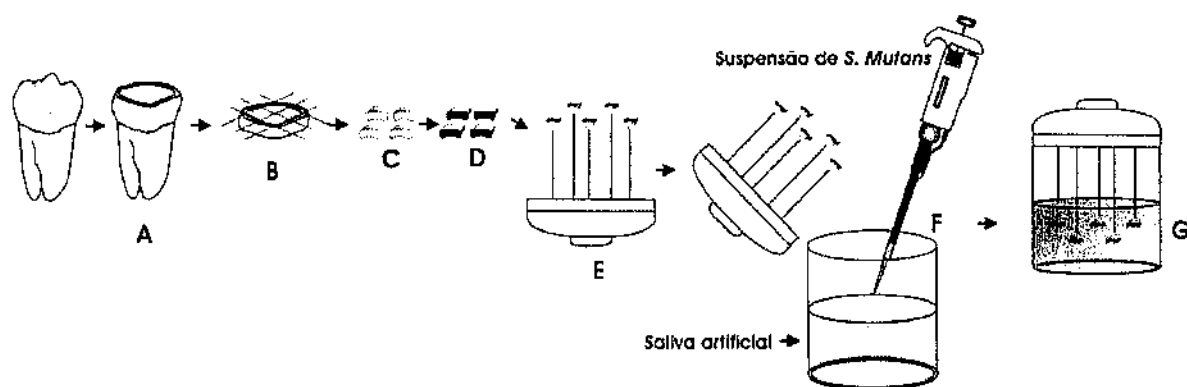


Figura 1- Esquema de preparo dos espécimes de dentina e modelo microbiológico. A – Desgaste oclusal dos dentes. B – Corte do fragmento dentário. C – Obtenção dos blocos. D – Isolamento da área de dentina. E – Fixação dos blocos no dispositivo. F – Inoculação da suspensão de *S. mutans* no caldo de cultura. G – Representação dos dispositivos usados para o modelo de produção de lesões de cárie *in vitro*.

Padronização da produção de lesão de cárie em dentina

Para produção de lesões de cárie em dentina, foi utilizado o modelo microbiológico anteriormente descrito por (Zanin *et al.*, 2006) com algumas modificações. Após a esterilização, os espécimes dentários foram removidos da água destilada e mergulhados em saliva artificial (1g/l Lab-lemco (Oxoid), 2 g/l extrato de levedura, 5 g/l protease peptona, 2,5 g/l Mucina gastrica de porco, 0,35 g/l de cloreto de sódio, 0,2 g/l cloreto de cálcio, 0,2 g/l cloreto de potássio, 1,25 ml de uréia a 40%), pH 7,0 (Pratten *et al.*, 1998). Todos os recipientes contendo 50 mL de saliva artificial foram inoculados com 0,2 ml de cultura de *S. mutans* ATCC 25175

crescidas *overnight* ajustadas para $1-2 \times 10^8$ UFC/ml em espectrofotômetro. Nos grupos experimentais, a inoculação em cada recipiente foi executada somente uma vez, no primeiro dia de experimento, e os espécimes de dentina foram transferidos para saliva artificial esterilizada após cada imersão em solução de sacarose 40%. A cada transferência, a fim de se verificar a pureza, alíquotas da saliva artificial, foram semeadas em placas de BHI (Brain-heart-infusion) Agar e incubadas a 37° C em atmosfera parcial de 10% de CO₂ por 48 horas. Nos grupos S3 e S6, as exposições à sacarose foram realizadas 3 e 6 vezes ao dia, respectivamente, a fim de simular as refeições de um indivíduo adulto saudável. Após 7 dias, a profundidade e severidade das lesões de cárie produzidas foram avaliadas por teste de microrradiografia transversal.

Análise microbiológica da dentina cariada

Após a remoção do biofilme, uma amostra de dentina cariada de cada espécime foi coletada com auxílio de lâmina de bisturi número 12 esterilizada. Para a obtenção de quantidades reprodutíveis de dentina o operador foi previamente calibrado e a quantidade de dentina variou entre 0,5 e 1,5 mg. As amostras foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1,0 mL de solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada e a suspensão obtida foi dispersa usando-se pérolas de vidro por 15 segundos. Foi feita diluição em série decimal de 10^{-1} a 10^{-6} em solução salina (NaCl 0,9%) e inoculação, em triplicata, em meios de cultura BHI Agar. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com uma pressão parcial de 10% de CO₂ durante 48 horas. Após o tempo de incubação, os microrganismos viáveis foram contados em um contador de colônias e a relação de unidades formadoras de colônia por miligrama de dentina cariada foi estabelecida (UFC/mg).

Análise por microrradiografia quantitativa

Os espécimes foram seccionados com micrótomo de alta rotação Silverstone-Taylor (series 1000 Deluxe, Sci Fab, Littleton, CO, USA) para se obter uma secção de dentina de 180 µm de espessura (± 20 µm). Em seguida, as seções foram submetidas à análise por microrradiografia transversal quantitativa, segundo a técnica preconizada por (Groeneveld *et al.*, 1978).

Esta análise é realizada em estudos de des e remineralização tanto do esmalte quanto da dentina e consiste de tomadas radiográficas de finas secções dentárias para se avaliar o conteúdo mineral evidenciado por transmissão óptica através de um microrradiograma. Inicialmente, foi feita montagem das secções dentárias em lâmina de vidro e parafilme; em seguida, esse conjunto foi levado a uma câmara escura para inserção do filme radiográfico acoplado a um porta-filme para que ocorresse a tomada radiográfica a 20 Kv e 30 mA (Inspektor TMR, Inspektor Research Systems BV, Amsterdam). O filme foi então revelado para se obter um microrradiograma, que foi tratado para evidenciar qualidade e durabilidade. Foi feita leitura desse microrradiograma com auxílio de um software de computador (TMR, transverse microradiography version 1.26; Inspektor Reserach Systems BV, The Netherlands) e comparadas aos valores medidos na amostra com uma escala padrão de alumínio de valores conhecidos, plotados numa curva de correlação que apresentou valores acima de 0,99 para serem utilizados com segurança.

A análise microrradiográfica é capaz de evidenciar a distribuição mineral do dente por meio do cálculo da perda mineral (ΔZ) e da profundidade de lesão e corpo da lesão (PL) na camada subsuperficial e no corpo da lesão. Dessa forma, após realização das microrradiografia e obtenção dos traçados microdensitométricos, a porcentagem de volume mineral foi obtida pela fórmula de (Angmar *et al.*, 1963).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software SAS (SAS Institute Inc., versão 8.01, Cary, NC, EUA.), com o nível de significância fixado em $p < 0,05$. Os dados foram avaliados para verificar a igualdade das variâncias e a distribuição normal dos erros. Após a transformação de dados (raiz-quadrado para ΔZ , PL and contagem de UFC), a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a significância e a interação entre os fatores em estudo - contagem de microrganismos viáveis (UFC mg^{-1}), perda mineral (ΔZ) e profundidade de lesão (PL) e sua relação com a presença de sacarose. A diferença entre os tratamentos foi avaliado pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS

O modelo microbiológico utilizado neste estudo revelou-se eficaz para o desenvolvimento de lesões em dentina, mesmo sem qualquer adição de sacarose, pois houve diferença estatisticamente significativa entre os valores para o controle negativo (C) comparados aos do controle positivo (SM) ($p < 0,05$).

A adição de sacarose mostrou que ocorreu uma perda mineral das lesões estatisticamente maior ($p < 0,05$) para em ambos os grupos experimentais (Tabela 1). No entanto, a quantidade de perda mineral não foi significativamente influenciada pelo regime de sacarose, com imersões de 3 ou 6 vezes por dia (Tabela 1). Corroborando esses achados, resultados semelhantes foram encontrados para a profundidade da lesão (Tabela 2).

Por outro lado, as unidades formadoras de colônia não diferiram significativamente ($p > 0,05$), embora numericamente os valores para o grupo 6S foram maiores.

Tabela 1. Médias originais e desvios-padrão (DP) das perdas minerais (ΔZ)

Grupo	ΔZ	DP	Tukey
Controle Negativo (C)	185,6	139,6	a
Controle Positivo (SM)	1008,1	550,4	b
3S	5148,6	2046,2	c
6S	5796,2	3097,9	c

Tabela 2. Médias originais e desvios-padrão da profundidade da lesão (PL)

Grupo	PL	DP	Tukey
Controle Negativo (C)	12,5	9,2	a
Controle Positivo (SM)	47,6	27,5	b
3S	163,6	41,7	c
6S	161,6	69,8	c

Tabela 3. Médias originais desvios-padrão das contagens de UFC.

Grupo	UFC	DP	Tukey
Controle positivo(SM)	1,12E+07	2,39E+07	a
3S	1,42E+06	3,04E+06	a
6S	4,50E+06	5,87E+06	a

5. DISCUSSÃO

O modelo microbiológico do presente estudo, utilizando *Streptococcus mutans*, banhos de sacarose e saliva artificial como meio de cultura, pareceu ser apropriado para o estudo da cárie dentária em dentina. O modelo microbiológico permitiu a investigação da etiologia assim como fatores associados ao desenvolvimento de cárie em dentina. As principais fontes de nutrientes do meio de cultura - saliva artificial - foram capazes de fornecer a principal fonte de carbono para as bactérias em um meio de cultura similar àquele disponível *in vivo* (Beighton & Hayday, 1986). Outro estudo utilizando biofilme formado *in vitro* também mostrou a formação de lesões típicas na subsuperfície (Deng & ten Cate, 2004), como observado nas fotomicroradiografias (Figura 1), perda mineral (Tabela 1) e valores de profundidade de lesão deste estudo (Tabela 2).

A influência da presença de sacarose na severidade da lesão de cárie também foi evidenciada (Tabelas 1 e 2) e comparável aos resultados encontrados *in vitro* por (Deng & Ten Cate, 2004) e *in vivo* por (Ogaard *et al.*, 1988). A sacarose é responsável por importantes alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o processo de formação de biofilme, inclusive aumentando suas propriedades indutoras de cárie (Paes Leme *et al.*, 2006). A estrutura do biofilme foi influenciada pelos banhos de sacarose a 40%, que produziu um ambiente mais cariogênico do que para o grupo controle (Tabelas 1 e 2). Isto está de acordo com resultados encontrados para o esmalte utilizando modelos em animal (Hefti & Schmid, 1979) e *in situ* (Aires *et al.*, 2006), que investigaram a influência de dietas contendo altas concentrações de sacarose no biofilme e no desenvolvimento de cárie. Além disso, a cariogenicidade de sacarose mostrou ser dependente da concentração e de sua frequência de exposição (Hefti & Schmid, 1979; Cury *et al.*, 1997; Paes Leme *et al.*, 2006; Aires *et al.*, 2006).

No entanto, o presente estudo foi incapaz de distinguir estatisticamente os efeitos entre 3 ou 6 banhos de sacarose no cariogenicidade do desafio (Tabelas 1 e 2), embora os valores numéricos sugiram que com maior frequência de banhos, maior a cariogenicidade. Isto poderia ser explicado pela grande variabilidade encontrada nos resultados, mas também indica que, 3 banhos em sacarose à 40% pode ser utilizado em estudos *in vitro* para mimetizar uma condição cariogênica para produzir lesões em dentina com êxito.

As contagens de unidades formadoras de colônia também não foram estatisticamente diferentes entre os regimes de sacarose (Tabela 3), concordando com (Deng & Ten Cate 2004) que também não encontraram diferenças significativas nas contagens de UFC entre 5 e 12 dias de desafio cariogênico na dentina utilizando um fermentador de filme de profundidade constante (constant depth film fermentor), *S. mutans* e 4 ou 8 tratamentos de sacarose por dia. No entanto, houve uma grande diferença numérica em nosso estudo entre os regimes de 3 e 6 banhos de sacarose, o que sugere que a cariogenicidade pode ser aumentada com mais banhos de sacarose ocorrerem (Tabela 3).

6. CONCLUSÃO

O modelo microbiológico *in vitro* utilizando *Streptococcus mutans*, saliva artificial como meio de cultura e banhos de sacarose foi eficaz na produção de lesões cárie dentinária.

REFERÊNCIAS ¹

1. Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. **Caries Res.** 2006; 40(1):28-32.
2. Angmar B, Carlström D, Glas JE. The mineralization of normal human enamel. **J Ultrastruct Res.** 1963; 8:12-23.
3. Beighton D, Hayday H. The influence of diet on the growth of streptococcal bacteria on the molar teeth of monkeys. **Arch Oral Biol.** 1986; 31(7):449-454.
4. Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res.** 1997; 31:356-360.
5. Deng DM, Ten Cate JM. Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. **Caries Res.** 2004; 38(1):54-61.
6. Featherstone JDB. Fluoride, remineralization and root caries. **Am J Dent.** 1994; 7:271-274.
7. Gilmour ASM, Edmunds DH, Newcombe RG. Prevalence and depth of artificial caries-like lesions adjacent to cavities prepared in roots and restored with a glass ionomer or a dentin-bonded composite material. **J Dent Res** 1997; 76:1854-1861.
8. Groeneveld A, Theuns HM, Kalter PG. Microradiography of developing artificial dental caries-like lesions in man. **Arch Oral Biol.** 1978; 23(2):75-83.
9. Hefti A, Schmid R. Effect on caries incidence in rats of increasing dietary sucrose levels. **Caries Res.** 1979; 13(5):298-300.
10. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. **Caries Res.** 1993; 27(5):402-8.
11. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology.** 2003; 149:279-294.
12. Øgaard B, Rølla G, Arends J. In vivo progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. **Caries Res.** 1988; 22(5):302-305.
13. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. **J Dent Res.** 2006; 85(10):878-

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

887.

14. Pratten J, Smith AW, Wilson M. Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. **J Antimicrob Chemother**. 1998; 42(4):453-459.
15. Silverstone LM, Hicks MJ, Featherstone MJ. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries. **Quintessence Int**. 1988; 19(10):683-711.
16. ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res**. 1982; 16(3):201-210.
17. Zanin IC, Lobo MM., Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF., Goncalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **Eur J Oral Sci**. 2006; 114(1):64-69.