

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA
SAÚDE

SÉRGIO HENRIQUE COSTA DE JESUS

DETECÇÃO DE LESÕES CARIOSAS INICIAS
UTILIZANDO APRIMORAMENTO DE
CONTRASTE POR ESPALHAMENTO DE LUZ
COERENTE *SPECKLE*

São Paulo, SP

2013

SÉRGIO HENRIQUE COSTA DE JESUS

**DETECÇÃO DE LESÕES CARIOSAS INICIAS
UTILIZANDO APRIMORAMENTO DE
CONTRASTE POR ESPALHAMENTO DE LUZ
COERENTE *SPECKLE***

Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho, para
obtenção do título de Mestre em
Biofotônica Aplicada às Ciências da
Saúde

Orientador: Prof. Dr. Alessandro M.
de Ana

Co-orientador: Marcelo T. de
Oliveira

São Paulo, SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Jesus, Sérgio Henrique Costa de.

Detecções de lesões cariosas iniciais utilizando aprimoramento de contraste por espalhamento de luz coerente *speckle*./ Sérgio Henrique Costa de Jesus, 2013.

44 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2013.

Orientador (a): Prof. Dr. Alessandro M. de Ana.

1. Speckle. 2. Laser. 3. Diagnóstico.

I. Oliveira, T. Marcelo.

II. Título

CDU 615.831

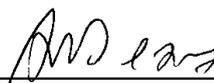
São Paulo, 19 de dezembro de 2013.

TERMO DE APROVAÇÃO

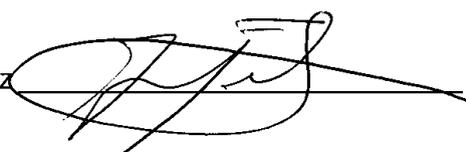
Aluno(a): SERGIO HENRIQUE COSTA DE JESUS

Título da Dissertação: "Detecção de lesões cáries iniciais utilizando aprimoramento de contraste por espalhamento de luz coerente (SPECKLE)".

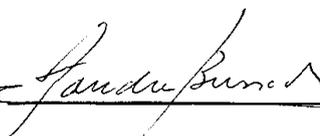
Presidente: PROF. DR. ALESSANDRO MELO DEANA



Membro: PROF. DR. ANDRÉ FELIPE HENRIQUES LIBRANTZ



Membro: PROFA. DRA. SANDRA KALIL BUSSADORI



AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer imensamente ao **Prof. Dr. Alessandro M. Deana**, pois reconheço que, além de orientar este trabalho durante os últimos dois anos, teve uma importantíssima, presencial e intelectual participação não só no processo experimental, como também na elaboração e escrita desta dissertação.

Agradeço também ao **Prof. Dr. Marcelo T. de Oliveira**, co-orientador deste trabalho, e cujas valiosas interjeições e discussões foram cruciais para a finalização deste projeto.

À **Profa. Dra. Sandra K. Bussadori**, ofereço meus agradecimentos por sua imprescindível contribuição na elaboração do artigo científico oriundo deste projeto bem como suas sugestões para esta dissertação.

Ao **Prof. Dr. André H. F. Librantz**, meus agradecimentos por oferecer toda a infraestrutura de seu laboratório, sem o qual este trabalho não seria realizado.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu orientador, o **Prof. Dr. Alessandro M. Deana**, pois reconheço que este é o grande mentor intelectual por este trabalho.

RESUMO

A saúde oral é definida como um padrão de saúde relacionada à cavidade bucal que permite ao indivíduo falar e sociabilizar-se sem desconforto, presença de doenças ou constrangimento. A detecção precoce de lesões de cárie, antes que exista a necessidade de procedimentos restauradores, é de fundamental importância e contribui para o bem-estar geral da população. Neste projeto foi desenvolvido um sistema para imageamento de padrão de espalhamento de luz coerente (speckle) em tecidos dentários objetivando qualificar e quantificar eventuais lesões no esmalte/dentina através dos diferentes padrões estatísticos do granulado óptico oriundo de tecidos dentários saudáveis e lesionados, buscando uma abordagem com tecnologia totalmente nacional, o menos invasiva possível, com baixo custo e que supere os obstáculos encontrados pela tecnologia atual.

Os resultados obtidos demonstram que, a iluminação com luz coerente evidencia o contraste entre a região saudável e a região acometida de lesão do esmalte dental, demonstrando assim a viabilidade da técnica proposta.

Palavras chave: Speckle; Laser; Diagnóstico; Cárie; Saúde Oral.

ABSTRACT

Oral health may be defined as a standard of health related to the oral cavity that allows the individual to speak and socialize without discomfort or embarrassment due to diseases. Early detection of caries lesions, before there is a need for restorative procedures, is of fundamental importance and contributes to the general welfare of the population. In this project, a novel system for imaging the coherent light scattering pattern (speckle) in dental tissues was developed, aiming to qualify and quantify any damage to the enamel / dentin using the different statistical patterns of the speckle generated by healthy and injured dental tissues, seeking the less invasive approach possible, with low cost, Brazilian technology and overcoming the obstacles encountered by current technology.

The results demonstrate that coherent illumination enhance the contrast between the health and decay tissue in the enamel, demonstrating the viability of the technique.

Key words: Speckle; Laser; Diagnostics; Carious; Oral Health.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	1
TERMO DE APROVAÇÃO.....	2
AGRADECIMENTOS.....	3
DEDICATÓRIA.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
SUMÁRIO.....	7
LISTA DE TABELAS E QUATROS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. Introdução.....	13
2. Objetivo.....	19
2.2. Objetivo específico	19
3. Materiais e Métodos	20
3.1. Dentes	20
3.2. Metodologia para obtenção e análise do padrão estatístico do granulado óptico.....	20
3.2.2. Análise estatística	22
4. Resultados.....	24
4.1. Tamanho amostral e discussões.....	24
4.2. Artigo publicado.....	34
5. Conclusões.....	41
6. REFERÊNCIAS:	42

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Principais métodos de diagnóstico baseado em propriedades ópticas de biotécidos duros (KARLSSON 2010).....	14
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Diagrama esquemático do DIAGNOdent ® (Kavo), mostrando diferenças numéricas entre a fluorescência de uma área sadia(a) e desmineralizada (b). Disponível em: <http://www.d-p-s.uk.com/odiagno.htm>, acessado em 28/05/2012 16
- Figura 2: Aplicação (a) e processamento de dados (b) para determinação da presença da lesão cariiosa no tecido dentário Karlsson (2010) 16
- Figura 3: Diagrama esquemático do aparato experimental a ser construído neste projeto. (a) fonte de iluminação coerente. (b) lente para expansão do feixe (c) câmera para aquisição do padrão de speckle subjetivo (d) espécimen iluminado e padrão de granulado óptico 21
- Figura 4: Imagem, obtida, com iluminação proveniente de uma fonte extensa, de um dente extraído com lesão de cárie..... 25
- Figura 5: Imagem, obtida, com iluminação proveniente de uma fonte laser, de um dente extraído com lesão de cárie..... 26
- Figura 6: Imagem, obtida, com iluminação proveniente de uma fonte de luz coerente, de um dente extraído com lesão de cárie, após a utilização de um algoritmo para aplicar falsas cores. 27
- Figura 7: Média de $N = 2 \times 2$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores..... 28
- Figura 8: Gráfico da média da porção central de $N = 2 \times 2$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão. 28

- Figura 9 : Média de $N = 3 \times 3$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores..... 29
- Figura 10 - Gráfico da Média da porção central de $N = 3 \times 3$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão..... 29
- Figura 11: Média de $N = 4 \times 4$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores..... 30
- Figura 12: Gráfico da Média da porção central de $N = 4 \times 4$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão. 30
- Figura 13: Média de $N = 5 \times 5$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores..... 31
- Figura 14: Gráfico da Média da porção central de $N = 5 \times 5$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão. 31
- Figura 15: Média de $N = 6 \times 6$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores..... 32
- Figura 16: Gráfico da Média da porção central de $N = 6 \times 6$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão. 32
- Figura 17: Média de $N = 7 \times 7$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores..... 33

Figura 18: Gráfico da Média da porção central de $N = 7 \times 7$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão. 33

LISTA DE ABREVIATURAS

• Optical Coherence Tomography	OCT
• Polarized Raman Spectroscopy	PRS
• Polarization Sensitive Optical Coherence Tomography	PS-OCT
• Fiber Optic Transillumination	FOTI and DiFOTI
• Quantitative Light-Induced Fluorescence	QLF
• Laser-Induced Fluorescence	LF
• Transillumination with Near-Infrared light	TI-NIR
• Infrared fluorescence	IR fluorescence
• Near-Infrared reflectance imaging	NIR reflectance imaging
• Terahertz Pulse Imaging Multiphoton imaging	TPI
• Time-Correlated Single-Photon Counting Fluorescence Lifetime Imaging	TCSPC FLIM

1. Introdução

A saúde oral é definida como um padrão de saúde relacionada à cavidade bucal que permite ao indivíduo falar e sociabilizar-se sem desconforto, presença de doenças ou constrangimento e que contribui para o bem-estar geral (WILSON *et al*, 1995). Algumas condições afetam a percepção de saúde oral, como a perda de dentes, ocorrência de dores nas estruturas do sistema estomatognático, halitose e presença de lesões cáries e não cáries (MALIK, HANANIA e NITZANY, 1990; KOMERIK 2003; CHAN e LAI . 2003; MORAES, 2012).

Idealmente, o tratamento de lesões cáries deve ser feito em seus primeiros estágios, portanto há uma grande necessidade por técnicas não invasivas, não destrutivas e em tempo real que permitam a detecção desta doença em seus estágios iniciais.

O diagnóstico precoce das lesões iniciais de cárie é de primordial importância para que a realização de terapias conservadoras, buscando um melhor prognóstico e tratamento da doença (NYVAD e FEJERSKOV, 1997; NYVAD 2004, BRAGA, *et al* 2010)

A lesão de cárie tem sido alvo de vários estudos, e pesquisadores mimetizam a sua formação para visualizar o completo desenvolvimento e instalação da doença. A doença se instala abaixo de um biofilme maduro e após uma semana, nenhuma alteração pode ser clinicamente observada. No entanto, ao nível ultraestrutural, existem sinais de dissolução da camada mais externa do esmalte dental. Esta dissolução pode ser vista como um aumento do espaço interprismático devido à dissolução parcial da periferia dos prismas de esmalte. Ao final de duas semanas da ação do biofilme, as mudanças passam a ser visíveis clinicamente quando é realizada a secagem do esmalte, onde é possível observar uma região de mancha branca, rugosa e opaca. Após três ou quatro semanas as lesões passam a ser visíveis antes da secagem. Ultraestruturalmente é possível observar a completa dissolução das periquimáceas e de irregularidades de superfície geradas no desenvolvimento

dentário, além de contínuo aumento do espaço interprismático (KIDD e FEJERSKOV, 2010).

1.1. Estado da arte

A interação da luz com o tecido dentário, seja através de absorção, espalhamento ou fluorescência está intrinsecamente relacionada à constituição do mesmo, portanto o estudo das propriedades ópticas deste tecido pode resultar no desenvolvimento de novas técnicas e metodologias não invasivas e não destrutivas de diagnóstico de lesões e fenômenos biológicos comuns a este tecido (KISHEN 2008). O entendimento destas propriedades ópticas é importante para, além da escolha do equipamento laser mais adequado para ser utilizado em determinado tecido, com certa finalidade, a pesquisa e desenvolvimento de novas modalidades de diagnóstico óptico, com a correta quantificação e interpretação dos dados coletados durante as análises (KOMERIK *et al*, 2003; BASHKATOV *et al* 2005; .ZEZELL *et al* 2010)

Como a lesão ocasiona uma perda mineral no tecido afetado, resultando em alterações nas propriedades ópticas e na rugosidade do mesmo, a comunidade científica tem desenvolvido várias técnicas baseadas em mudanças nas propriedades ópticas do tecido dentário doente e saudável, objetivando a detecção precoce de lesões de cárie, antes que exista a necessidade de procedimentos restauradores. Karlsson enumerou as várias técnicas baseadas nestas propriedades, conforme pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1 - Principais métodos de diagnóstico baseado em propriedades ópticas de biotécidos duros (KARLSSON 2010)-

Técnica	Sigla
Optical Coherence Tomography	OCT
Polarized Raman Spectroscopy	PRS
Polarization Sensitive Optical Coherence Tomography	PS-OCT

Fiber Optic Transillumination	FOTI and DiFOTI
Quantitative Light-Induced Fluorescence	QLF
Laser-Induced Fluorescence	LF
Transillumination with Near-Infrared light	TI-NIR
Infrared fluorescence	IR fluorescence
Near-Infrared reflectance imaging	NIR reflectance imaging
Terahertz Pulse Imaging Multiphoton imaging	TPI
Time-Correlated Single-Photon Counting Fluorescence Lifetime Imaging	TCSPC FLIM

Como a maioria das metodologias apresentadas na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** ainda esta em algum estágio de desenvolvimento, nos parágrafos que se seguem serão discutidas as técnicas mais usuais para diagnóstico de cárie com disponibilidade comercial.

Na técnica Laser Induced Fluorescence (fluorescência induzida por Laser), a superfície dentária é irradiada por um laser emitindo na região entre 488 nm e 650 nm, e sua fluorescência é medida. Superfícies desmineralizadas e com biofilme apresentam maior fluorescência, quando comparado aos tecidos sadios, possibilitando a detecção da lesão. Apesar de este processo permitir boa precisão no diagnóstico de lesões com perda mineral, o mesmo não foi eficiente para quantificá-la (RODRIGUES 2005). É consenso na literatura que tal técnica, apesar de apresentar grande sensibilidade, pode resultar em falsos positivos na presença de manchas e cálculos (KOZLOWSKI *et al* 2001)

O aparelho comercialmente disponível que utiliza tal técnica baseia-se na fluorescência de subprodutos fabricados pelas bactérias, pois não é possível detectar desmineralizações artificiais, provocadas por ácidos de origem não bacteriana *in vitro* (KARLSSON 2010). A Figura 1 representa um diagrama esquemático de um equipamento comercial que utiliza tal técnica.

A técnica DiFOTI ilumina os tecidos dentários com uma luz branca de alto brilho na região do infravermelho próximo porém, assim com nas metodologias QLF e LF, devido ao alto espalhamento a profundidade de penetração é limitada a aproximadamente 2 mm (PRETTY 2006).

Na transiluminação por infravermelho próximo, uma fonte de luz na faixa do infravermelho próximo (entre 780 – 1550 nm) é utilizada para retro-iluminar o tecido dentário. Nesta região o espectro, a luz sofre um menor espalhamento pelo tecido, portanto apresentam maior profundidade de penetração^[Erro! Indicador não definido.]. Devido ao seu maior espalhamento, a região lesionada aparece como uma área escura na imagem do dente retroiluminado. As pigmentações do tecido dentário, que são oriundas de moléculas orgânicas, não são detectadas por esta metodologia pois tais manchas não absorvem os comprimentos de onda nesta região, favorecendo a identificação de regiões de desmineralização, algo que não ocorre quando é utilizada a técnica de LF (CHUNG *et al* 2011).

Apesar de várias técnicas estarem suficientemente desenvolvidas para serem empregadas no dia-a-dia dos consultórios dentários, segundo AMAECHI (2005) não há até o presente momento nenhuma técnica comercialmente disponível que atenda a todos os requisitos para o diagnóstico e o acompanhamento das lesões de tecido dentário, permitindo um controle qualitativo e quantitativo das lesões adequado para uso intra-oral. Limitações em relação aos tecidos que se consegue estudar, dificuldades em relação ao uso *in vivo* e adequação ao uso na cavidade oral são obstáculos que ainda precisam ser superados (KOMERIK 2003).

A inspeção visual é o método mais comumente utilizado para diagnóstico da lesão de cárie, sendo também utilizada em diversos índices desenvolvidos para padronização desse diagnóstico como o ICDAS, ALA ,e NYVAD. Porém trata-se de um exame subjetivo, e a utilização de métodos objetivos e quantitativos deve ser indicada para um melhor diagnóstico e monitoramento dessas lesões (BRAGA 2010) .

1.2. *Speckle*

Ao iluminar com um laser o tecido dentário, cuja superfície é rugosa quando comparada com o comprimento de onda da fonte de luz coerente, cada ponto do mesmo reflete a luz incidente, de maneira independente e com a fase alterada aleatoriamente, porém com um mesmo padrão estatístico. Os caminhos ópticos percorridos por cada frente de onda refletida são distintos entre si, o que resulta em padrões de interferência destrutivos e construtivos. Nos pontos onde ocorre interferência construtiva é gerado um granulado claro e nos pontos onde ocorre interferência destrutiva, é gerado um granulado escuro (SILVA 2007)

Neste fenômeno, conhecido como *speckle*, o padrão de espalhamento óptico é dito “completamente desenvolvido”, portanto possui um caráter que pode ser descrito no contexto da Teoria Estatística (GOODMAN 1984; SILVA 2007). Em tecido dentário, como será demonstrado na seção 4, este padrão assume diferentes propriedades em regiões sadias e doentes.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é estudar o padrão de espalhamento de luz coerente em biotécidos duros, de modo a qualificar e quantificar eventuais lesões no tecido dentário através dos diferentes padrões estatísticos de granulado óptico (*speckle*), gerado por tecidos dentários saudáveis e lesionados.

2.2. Objetivo específico

Com foco na detecção precoce de lesões de cárie, antes que exista a necessidade de procedimentos restauradores, buscamos demonstrar a viabilidade da utilização da técnica de *speckle* em lesões de mancha branca.

3. Materiais e Métodos

As seções seguintes detalham as metodologias utilizadas e desenvolvidas neste trabalho.

3.1. Dentes

Neste projeto, foram utilizados dentes humanos extraídos por razões ortodônticas ou periodontais. Após a exodontia, o tecido mole remanescente foi removido mecanicamente e nenhum outro tratamento foi aplicado. As amostras foram mantidas em água até a realização das imagens.

3.2. Metodologia para obtenção e análise do padrão estatístico do granulado óptico

Devida à natureza altamente espalhadora do tecido dentário, neste trabalho foi utilizada a técnica conhecida como *speckle* subjetivo, no qual é feita uma imagem do padrão de espalhamento de uma fonte de luz coerente refletida pelo tecido dentário, em um dispositivo de aquisição de imagens digital, conforme pode ser observado na Figura 3.

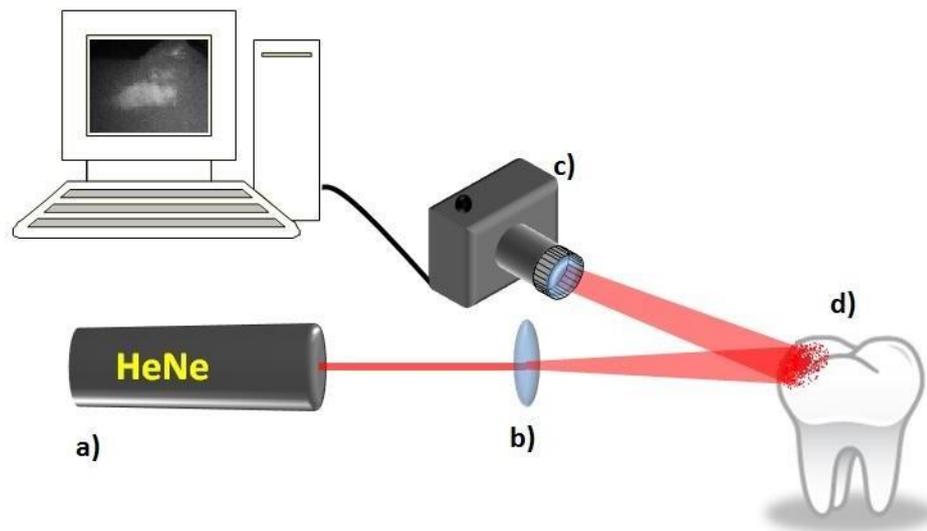


Figura 3: Diagrama esquemático do aparato experimental a ser construído neste projeto. (a) fonte de iluminação coerente. (b) lente para expansão do feixe (c) câmera para aquisição do padrão de speckle subjetivo (d) espécimem iluminado e padrão de granulado óptico.

A utilização do *speckle* na qualificação de lesões em tecidos dentários é uma técnica recente, que carece de uma descrição metodológica na literatura científica, portanto determinar o padrão estatístico do granulado óptico gerado pelo espalhamento da luz em tecidos dentários foi investigado, pela primeira vez, neste trabalho.

Em sua maioria, as publicações na área de *biospeckle* focam no domínio temporal do padrão de espalhamento, pois este permite a obtenção informações detalhadas sobre a movimentação de partículas, células e fluidos em geral, possibilitando um profundo estudo de temas importantes da biologia atual como, por exemplo, vascularização de tecidos biológicos e transporte de seiva e linfa em tecidos vegetais (SILVA 2007).

Porém, como o esmalte dental não apresenta uma rede vascularizada, para o desenvolvimento deste trabalho, o maior interesse é no domínio espacial do padrão de espalhamento óptico (NANCI 2008). Apesar de haver referências básicas ligadas à estatística espacial do padrão de *speckle*, este ainda carece de literatura relacionada a tecidos biológicos (ANIZIMOV *et*

al 1969; GOLDFISCHER 1965). Em tecidos dentários, apenas algumas poucas referências relacionadas a medidas de rugosidade e tensão utilizando a técnica *speckle* já foram reportadas em 1998 e 2004, respectivamente (O'DRISCOLL *et al* 1998; UCHINO *et al* 2004).

Até onde sabemos, nenhum estudo profundo comparativo entre os padrões de granulado óptico em tecidos dentários lesionados e sadios foi feito na literatura, portanto o desenvolvimento de uma metodologia de análise estatística e/ou a aplicação de análises consolidadas objetivando evidenciar o contraste entre tecidos dentários sadios e doentes também foi objeto de estudo, pela primeira vez, no decorrer deste projeto de pesquisa.

3.2.1. Imagens

Uma imagem digital é a representação de uma imagem bidimensional usando números binários codificados de modo a permitir seu armazenamento, transferência, impressão ou reprodução, e seu processamento por meios eletrônicos. Uma imagem digital do tipo *raster*, ou *bitmap*, ou ainda matricial, nada mais é do que uma matriz bidimensional onde cada elemento da matriz representa um determinado valor de intensidade luminosa, localizado em um determinado ponto.

Neste trabalho as imagens foram convertidas para 8 bits, ou seja, a menor intensidade luminosa armazenada (preto) recebe o valor "0" na matriz, e a maior intensidade luminosa (branco) recebe o valor "255".

3.2.2. Análise estatística

Na teoria estatística clássica sumarizada por Goodman (1984) a amplitude dos campos espalhados são aleatoriamente distribuídas e as intensidades seguem uma distribuição exponencial negativa, de acordo com a equação (1)

—

(1)

Onde $\langle I \rangle$ representa a intensidade média. O desvio padrão do espalhamento é obtido da seguinte maneira:

$$\frac{\sigma}{\langle I \rangle} = \sqrt{\frac{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2}} \quad (2)$$

Alta resolução espacial é desejada quando analisamos tecido lesionado, portanto a análise da variância deve ser feita em amostras pequenas. Porém a escolha do tamanho amostral tem de levar em consideração um compromisso entre alta resolução espacial e precisão estatística.

Neste trabalho foram estudadas amostras de $n = 2 \times 2 = 4$ até $n = 7 \times 7 = 49$ pixels. A estatística obtida nas regiões sadias e doentes foi então comparada de modo a determinar a diferença no granulado óptico das duas regiões.

4. Resultados

Este capítulo foi dividido em duas partes. Na primeira parte (4.1. Tamanho amostral e discussões) serão mostrados resultados e análises obtidos no decorrer deste trabalho que serviram de base. O principal trabalho, de Deana *et al* (2013), encontra-se no capítulo 4.2 deste trabalho.

4.1. Tamanho amostral e discussões

Nesta parte do trabalho, uma imagem representativa será utilizada para demonstrar a análise estatística do método desenvolvido. A Figura 4 mostra uma imagem de um dente com uma lesão inicial iluminada com uma fonte extensa de luz.

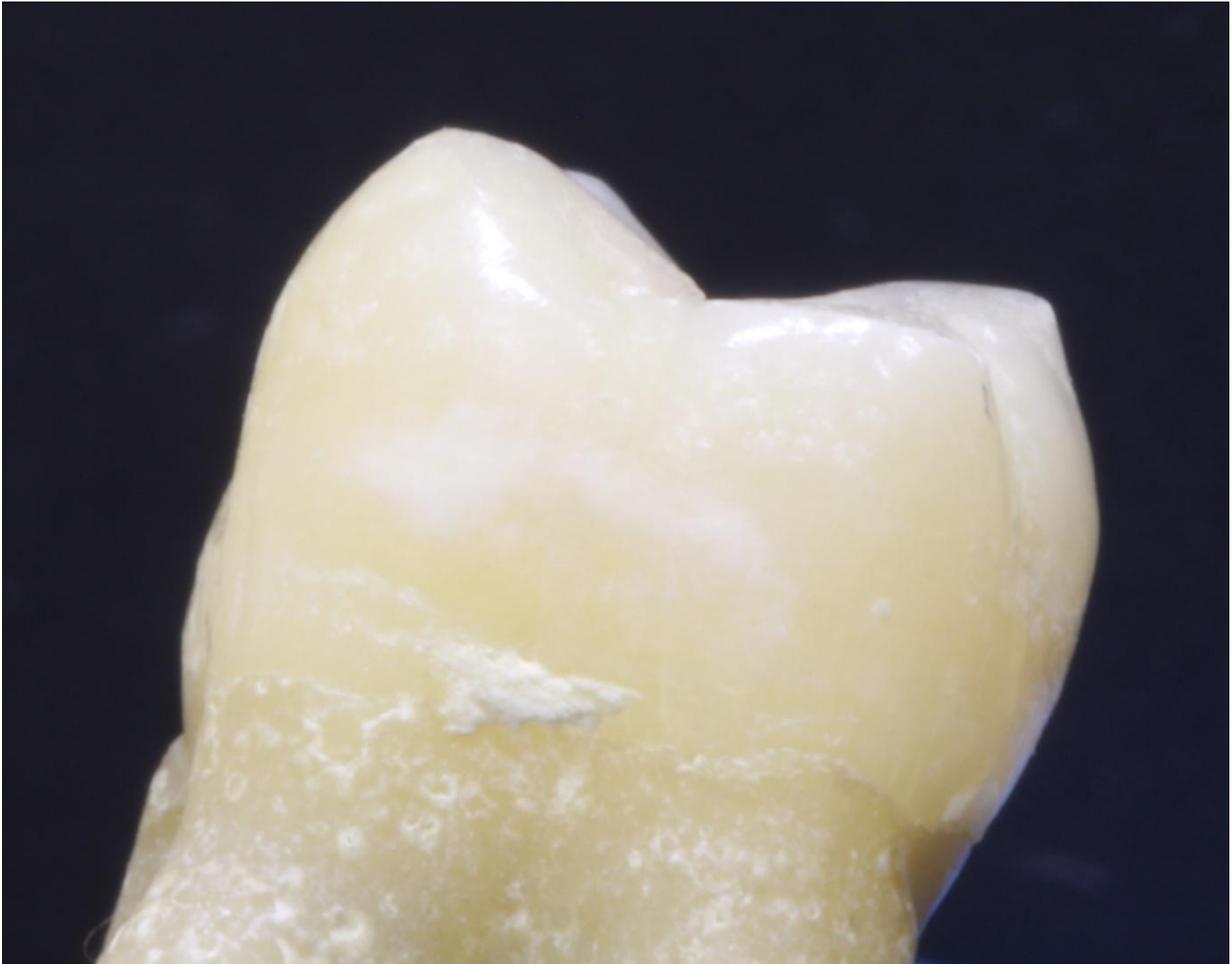


Figura 4: Imagem obtida com iluminação proveniente de uma fonte extensa, de um dente extraído com lesão de cárie

Na Figura 4 observa-se uma suave mancha branca no centro do dente, indicando a presença de uma lesão inicial de *cárie*, que para um olho destreinado passaria despercebida.

A Figura 5 representa o mesmo dente iluminado com uma fonte de luz coerente.

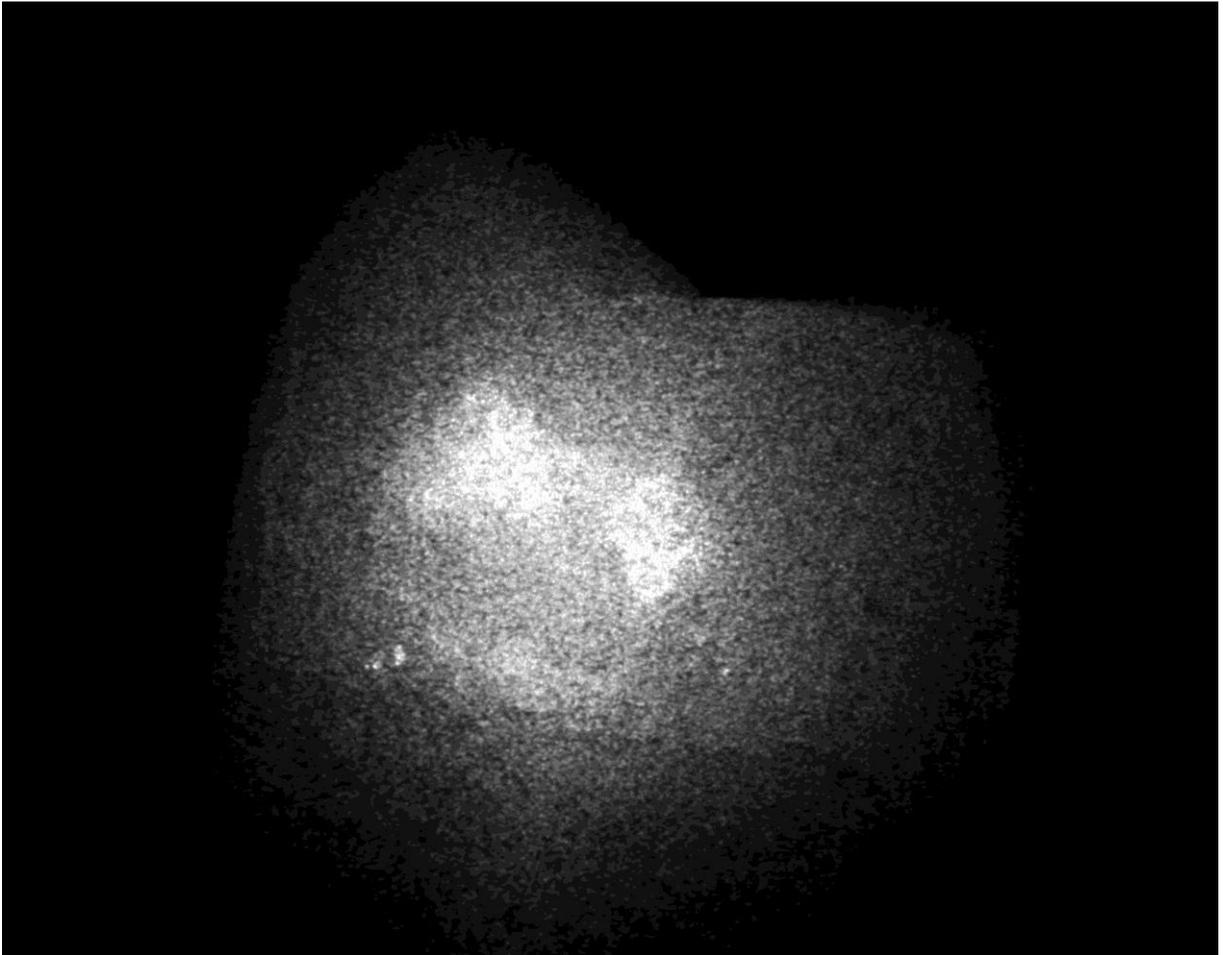


Figura 5: Imagem obtida com iluminação proveniente de uma fonte laser, de um dente extraído com lesão de cárie

Mesmo a um examinador destreinado, a Figura 5 mostra um aprimoramento do contraste entre a lesão e a região sadia do tecido dentário. Na região lesionada, observa-se uma imagem branca, evidenciando um maior retro-espalhamento da luz coerente nesta região. Para evidenciar ainda mais a presença da lesão, foi aplicado um mapa de falsas cores à imagem apresentada na Figura 5, conforme pode ser observado na Figura 6.

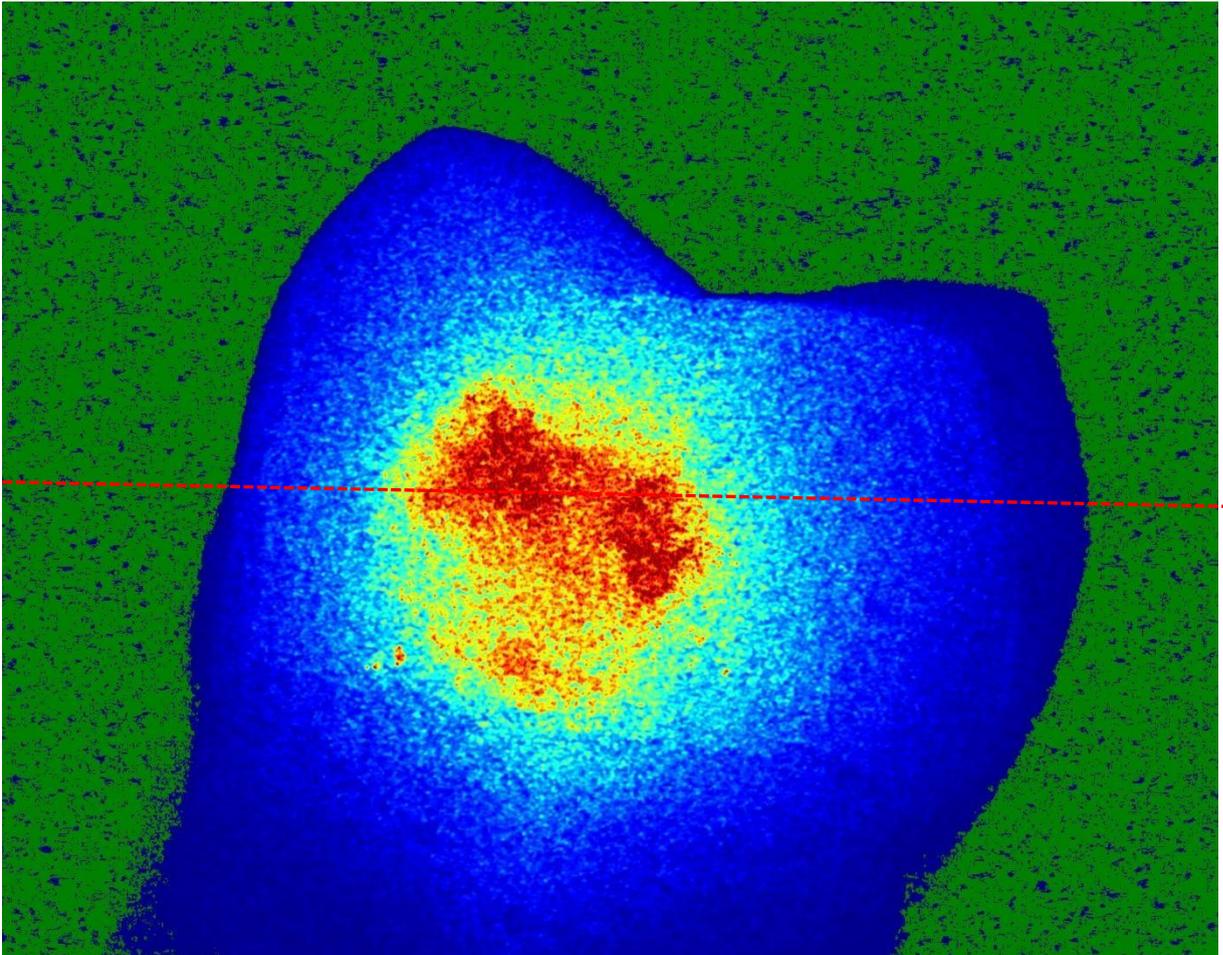


Figura 6: Imagem, obtida, com iluminação proveniente de uma fonte de luz coerente, de um dente extraído com lesão de cárie, após a utilização de um algoritmo para aplicar falsas cores.

Após a utilização do mapa de falsas cores à imagem speckle, apresentada fica clara a presença da lesão, bem como sua extensão, conforme pode ser observada na Figura 6 em vermelho.

Conforme descrito no capítulo 3.2, para determinar uma boa relação entre precisão estatística e definição espacial, foi obtida a estatística de primeira ordem para imagens de tamanho $N = 2 \times 2 = 4$ até $N = 7 \times 7 = 49$ pixels, conforme pode ser observado nas páginas subsequentes.

Traçando-se uma linha imaginária horizontal sobre a porção central da imagem representada na Figura 6, fez-se também um gráfico da média e do desvio padrão das regiões sadia e doente do dente.

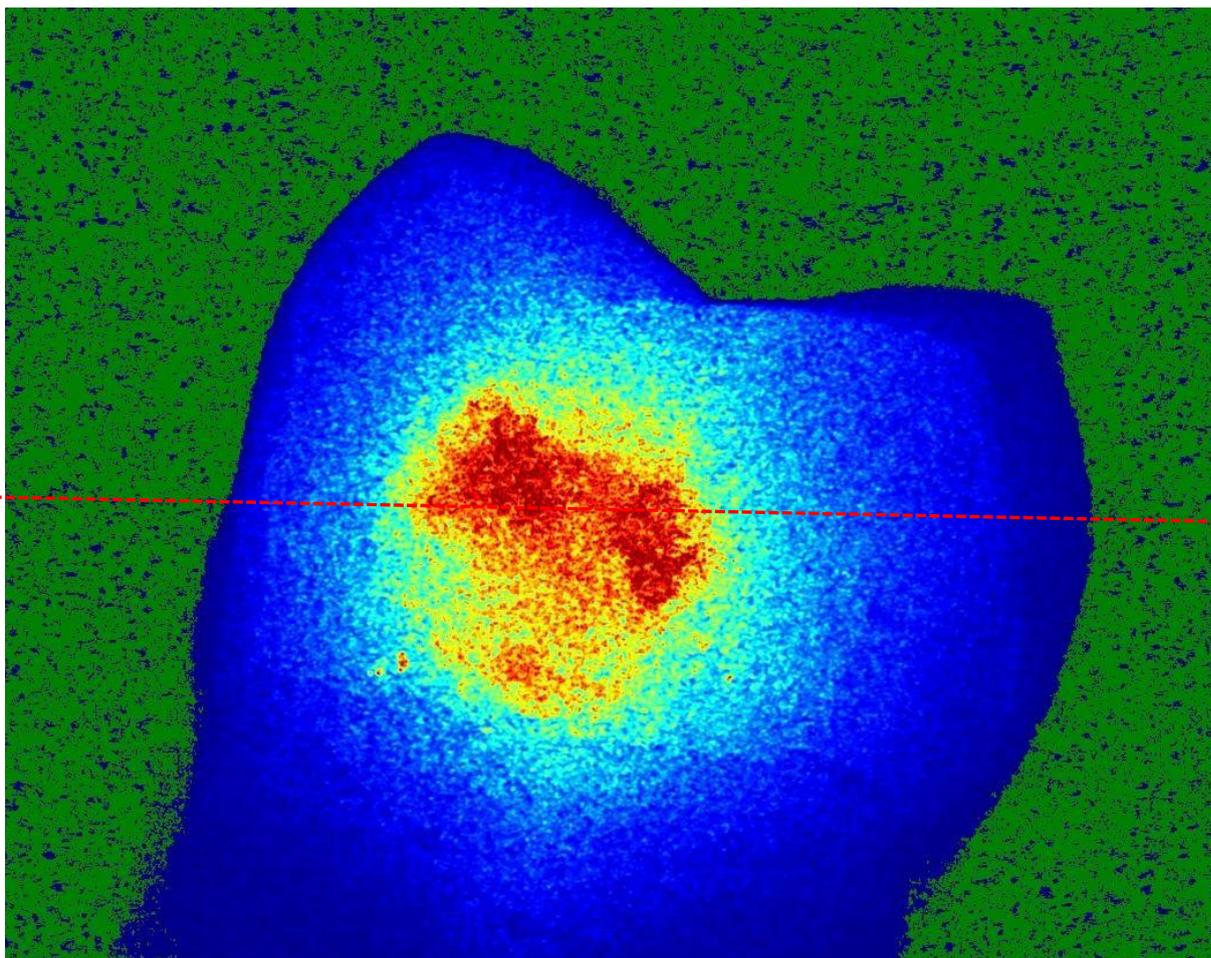


Figura 7: Média de $N = 2 \times 2$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores.

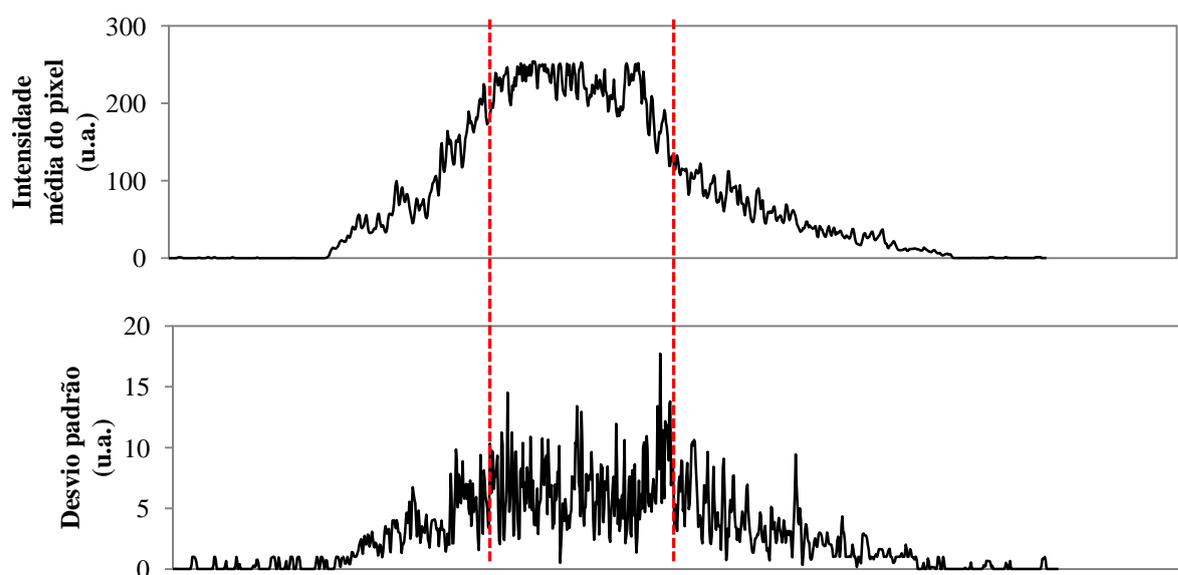


Figura 8: Gráfico da média da porção central de $N = 2 \times 2$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão.

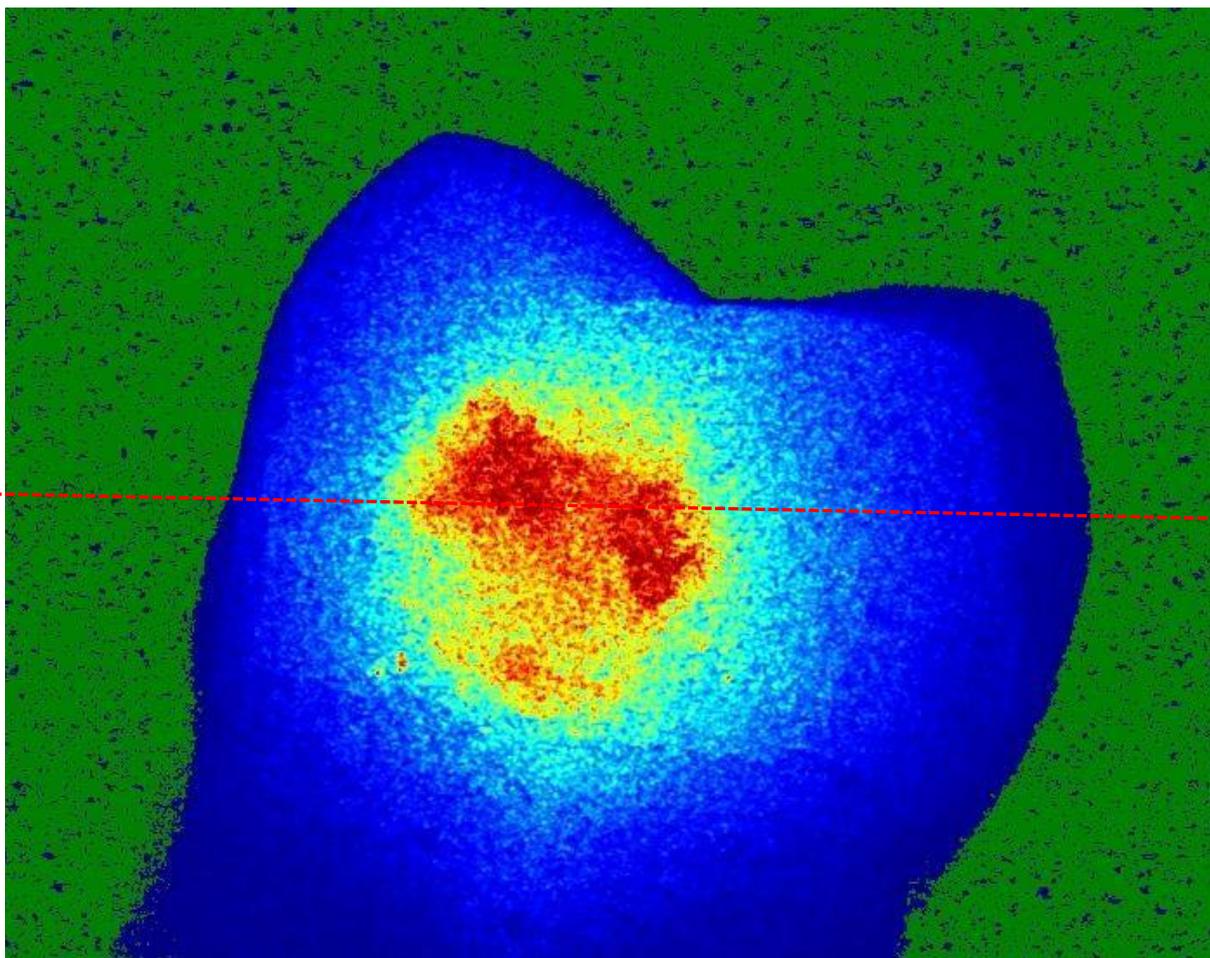


Figura 9 : Média de $N = 3 \times 3$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores.

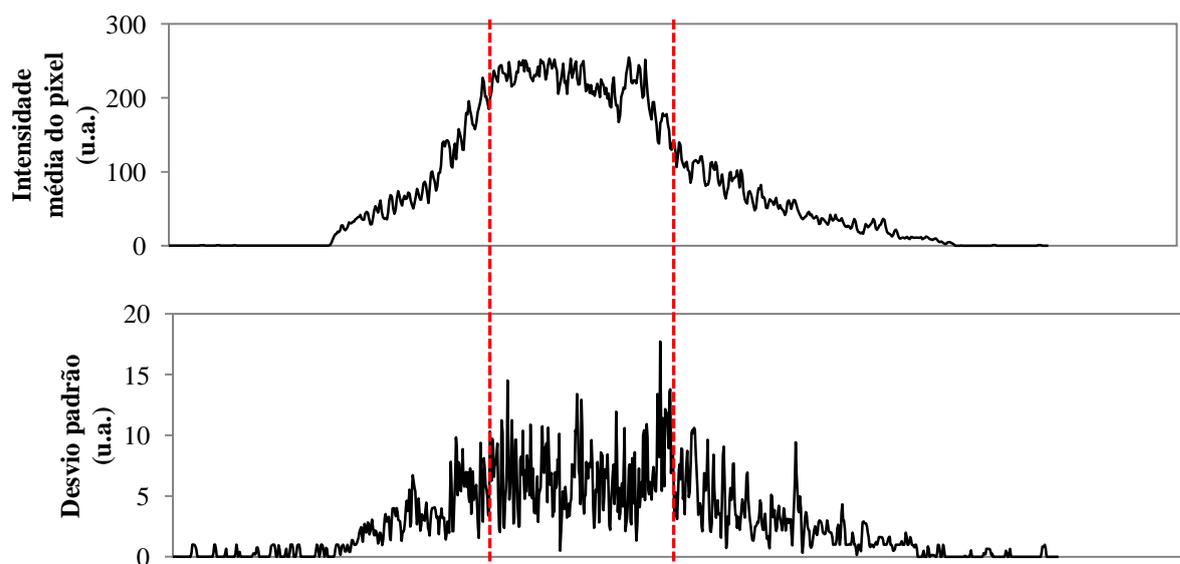


Figura 10 - Gráfico da Média da porção central de $N = 3 \times 3$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão.

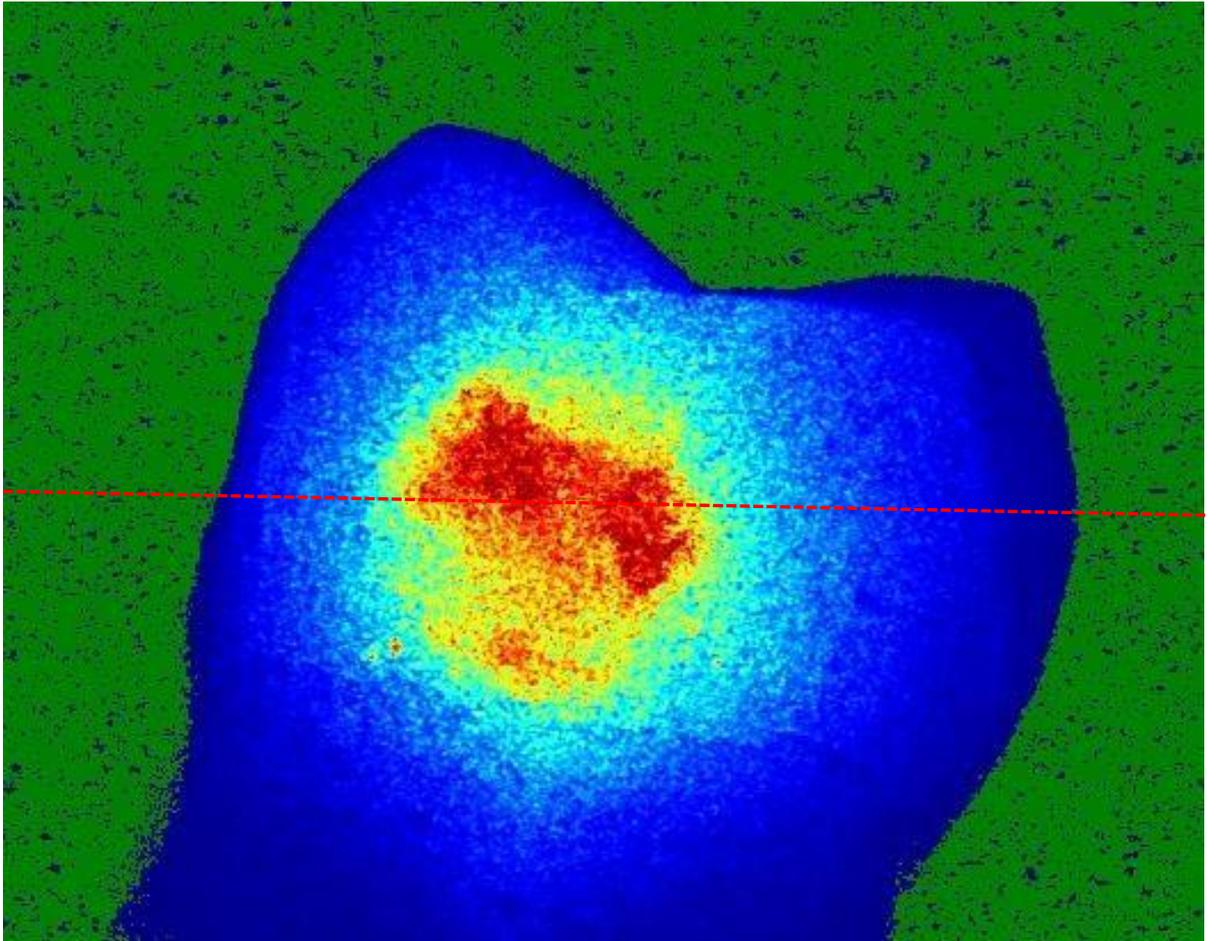


Figura 11: Média de $N = 4 \times 4$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores.

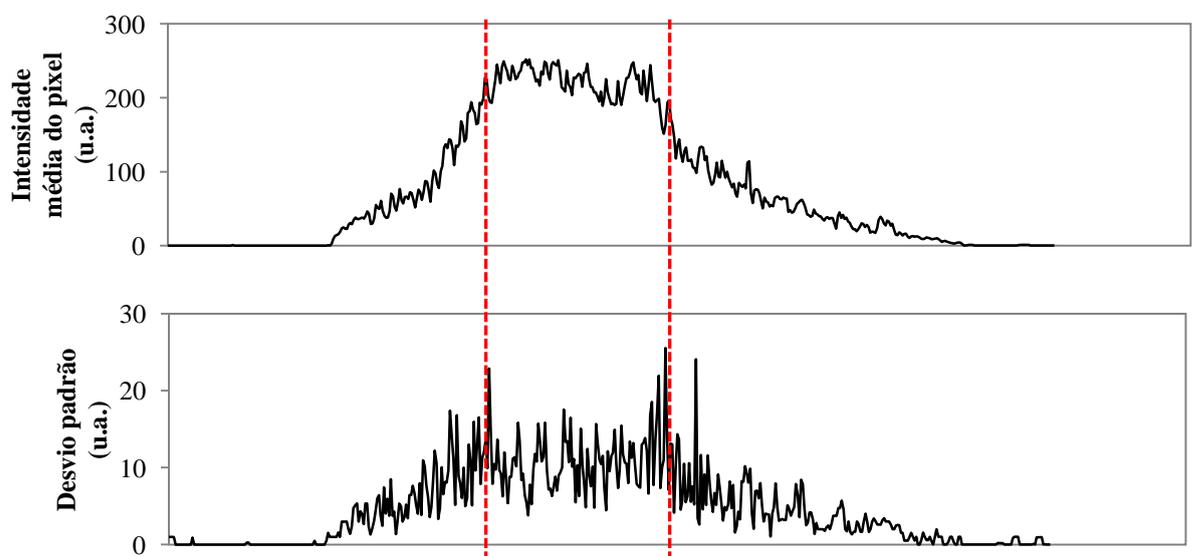


Figura 12: Gráfico da Média da porção central de $N = 4 \times 4$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão.

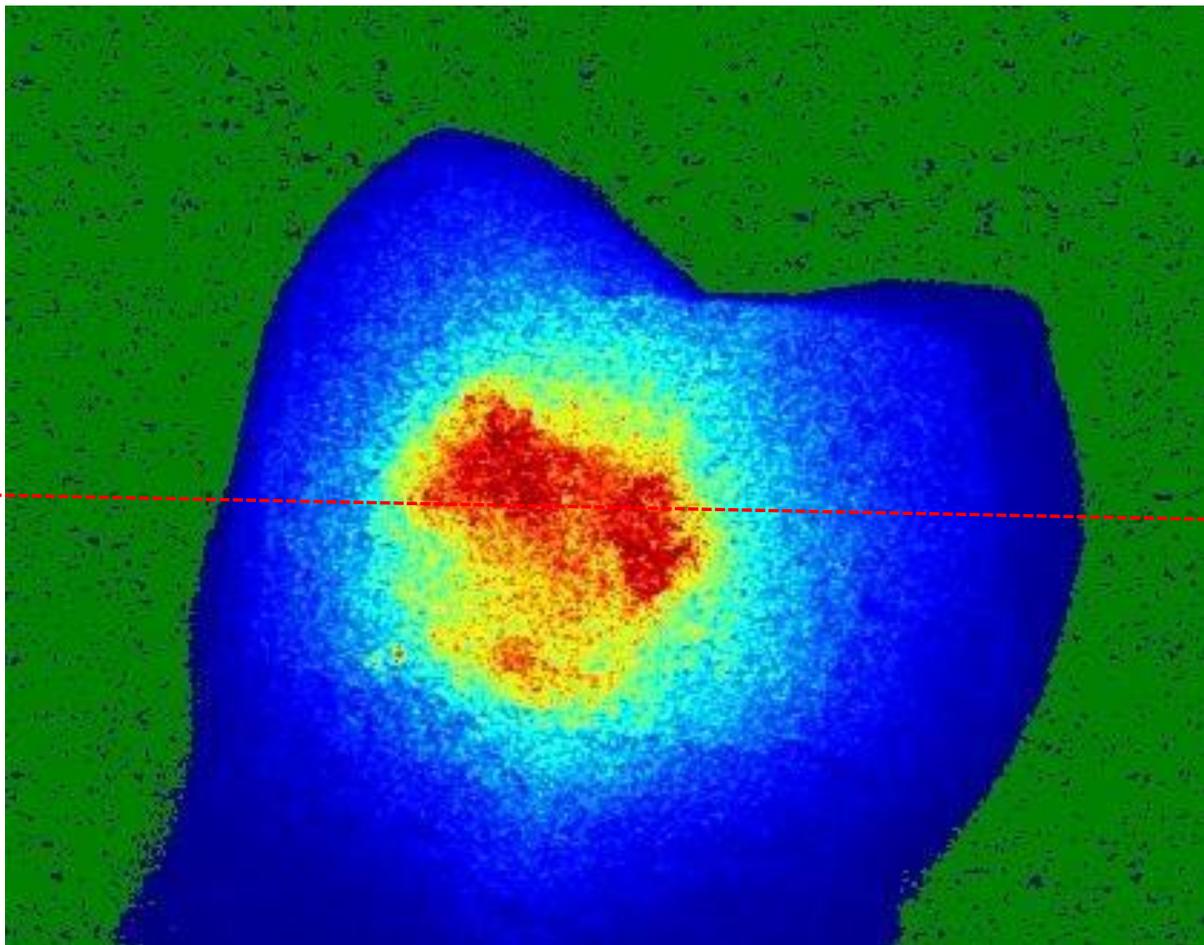


Figura 13: Média de $N = 5 \times 5$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores.

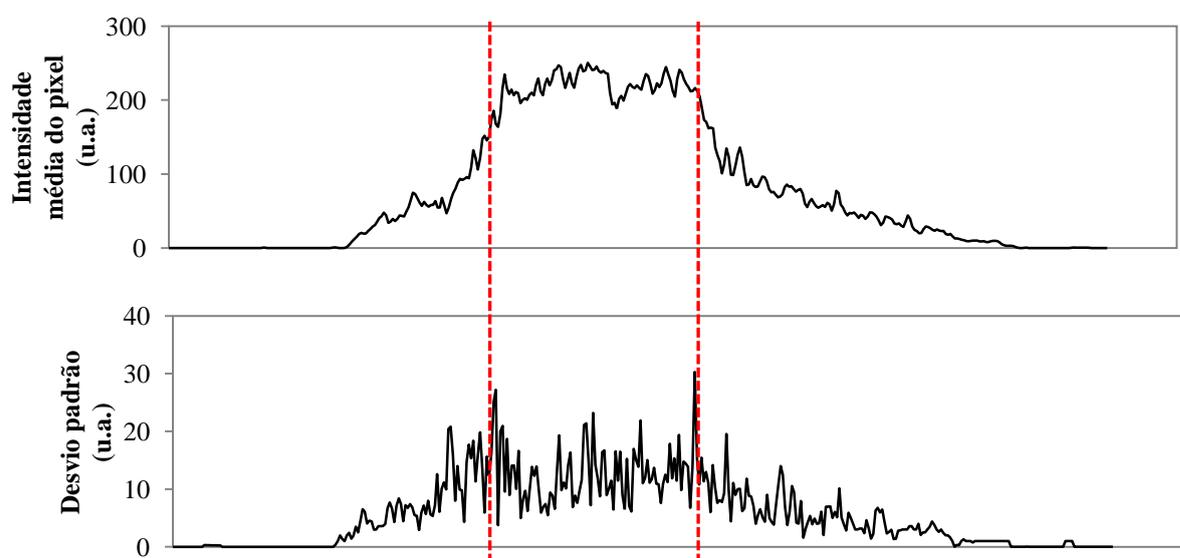


Figura 14: Gráfico da Média da porção central de $N = 5 \times 5$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão.

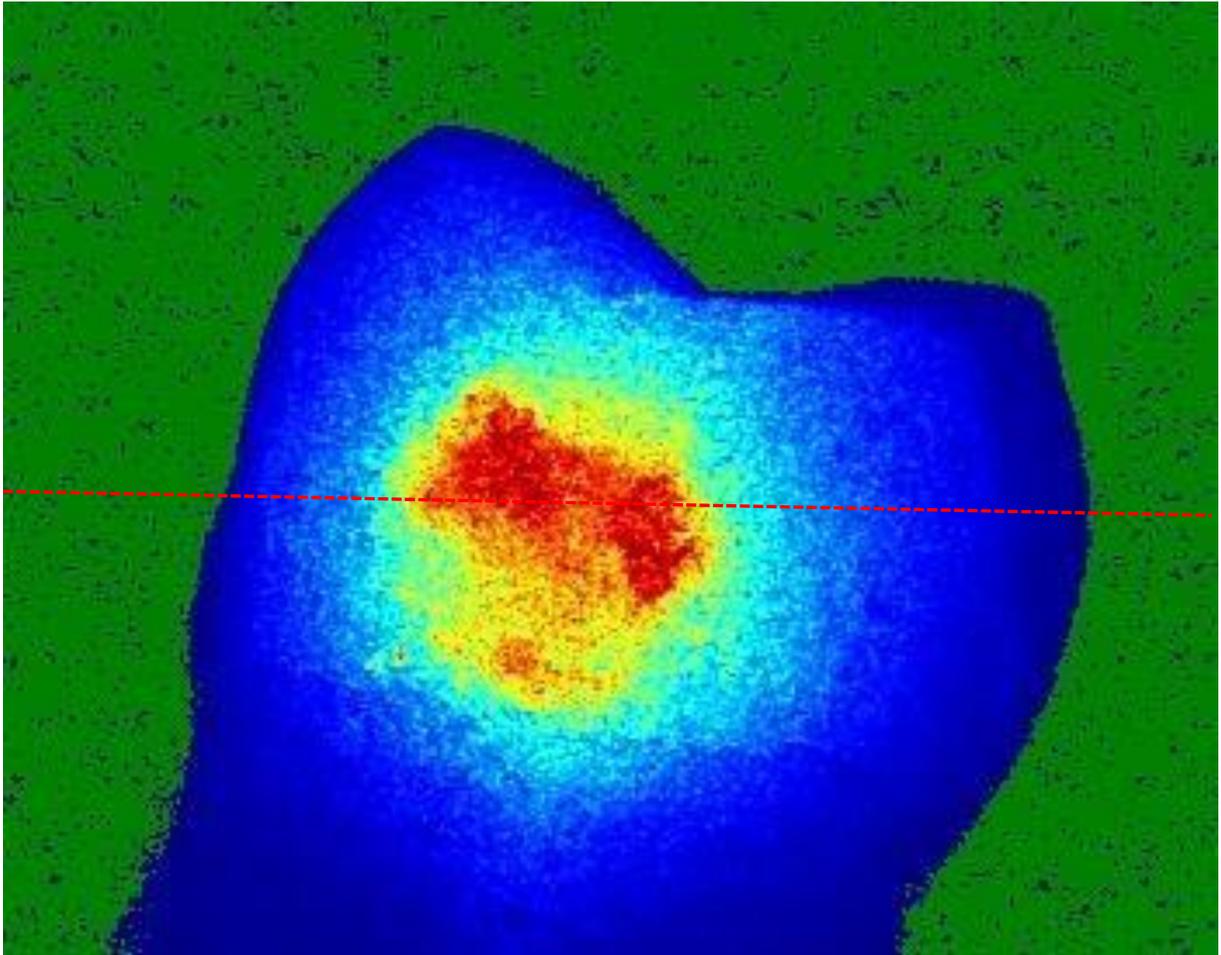


Figura 15: Média de $N = 6 \times 6$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores.

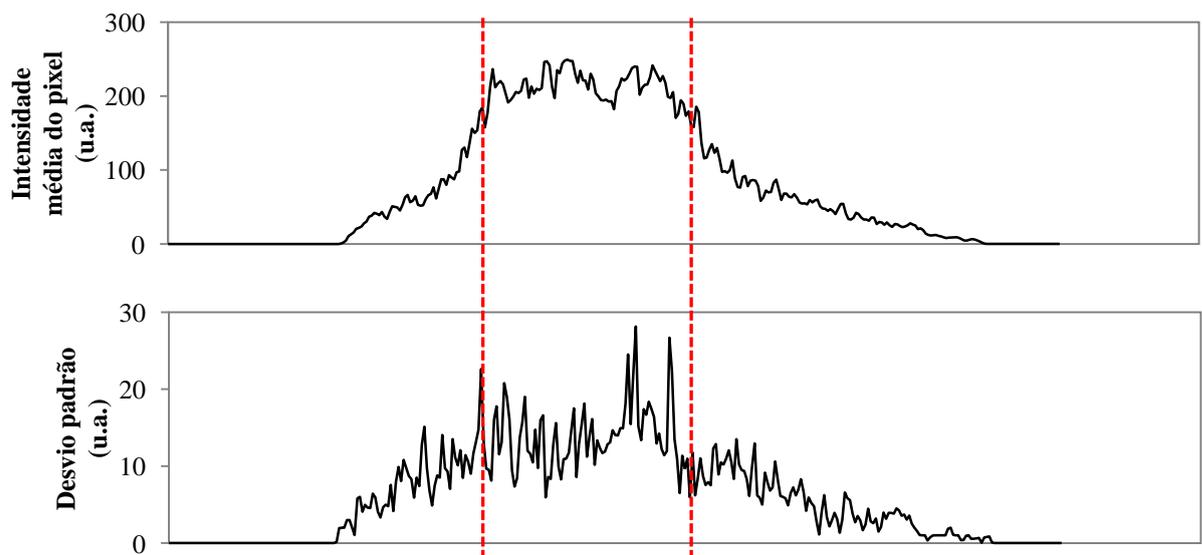


Figura 16: Gráfico da Média da porção central de $N = 6 \times 6$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão.

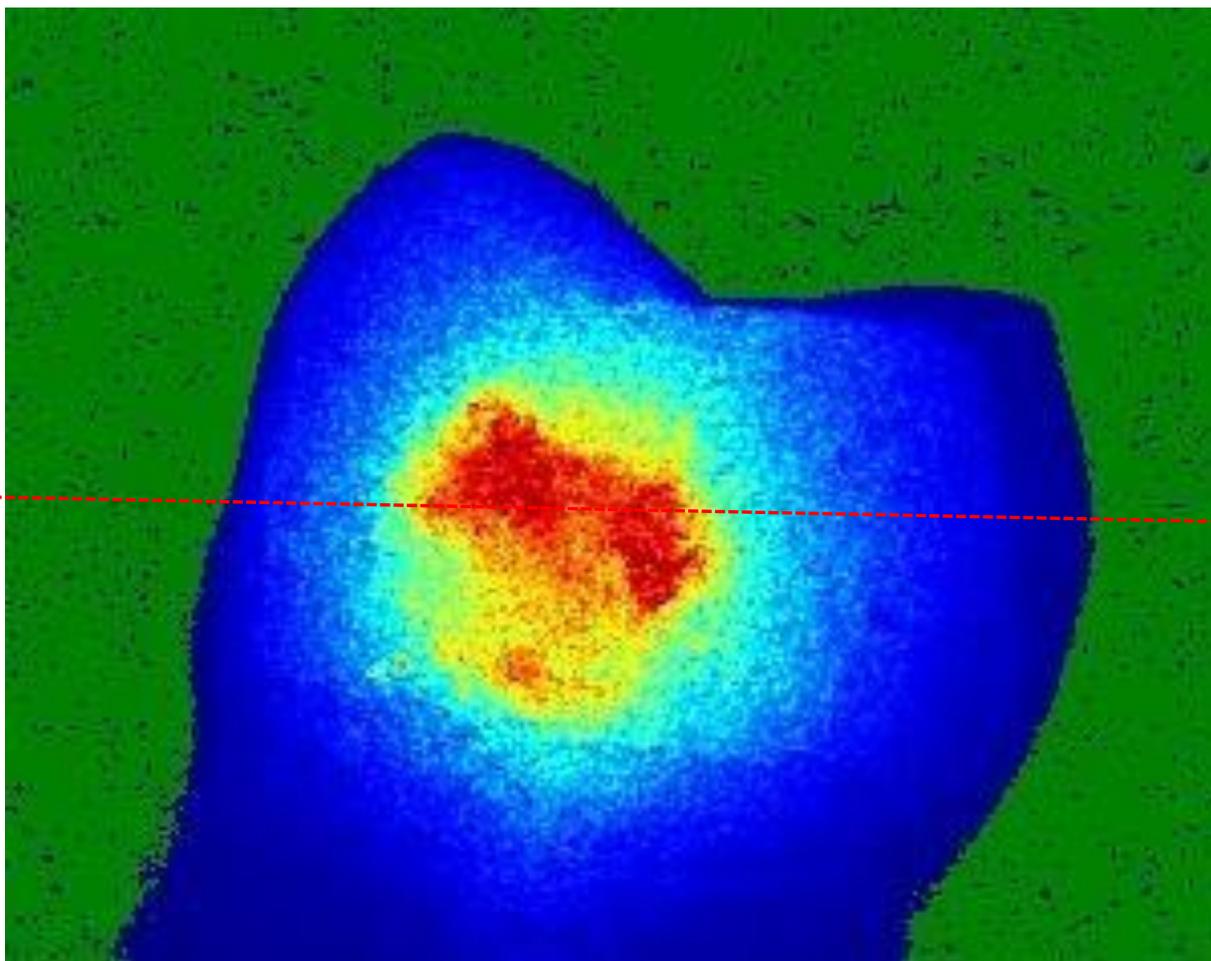


Figura 17: Média de $N = 7 \times 7$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5, aPara auxiliar na visualização foi utilizado de um algoritmo para aplicar falsas cores.

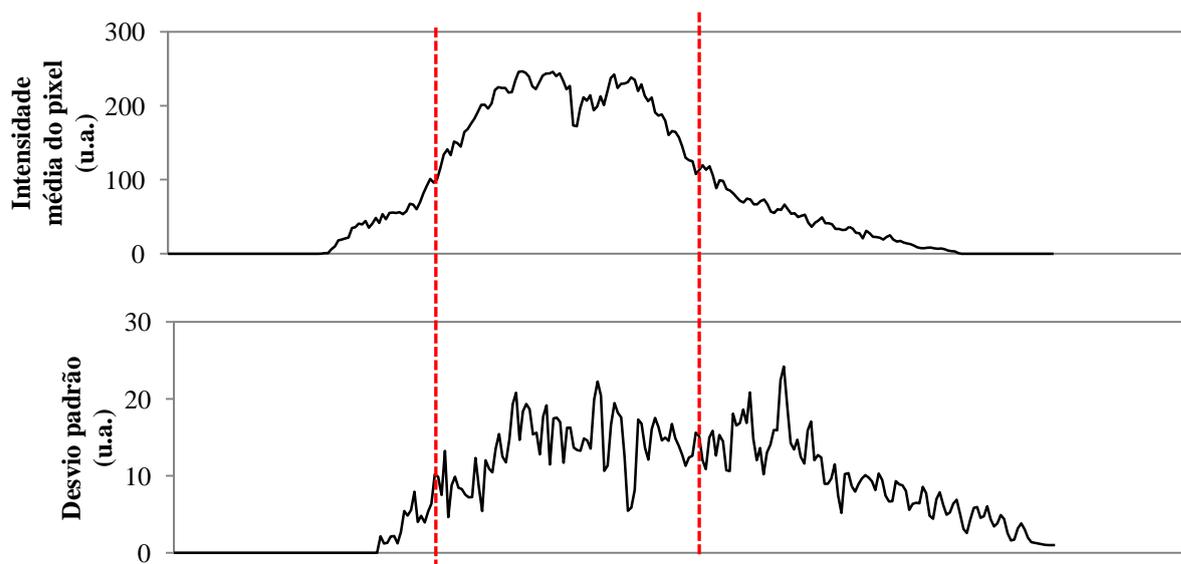


Figura 18: Gráfico da Média da porção central de $N = 7 \times 7$ pixels adjacentes da imagem demonstrada na Figura 5 (acima), e de seu desvio padrão (abaixo). A parte entre as linhas pontilhadas representa a lesão.

As figuras Figura 7 a Figura 18 mostram que, com o aumento do tamanho amostral utilizado para calcular a estatística de cada imagem, esta apresenta uma maior precisão, porém a definição espacial da imagem diminui proporcionalmente.

Conforme discutido por DEANA *et al* (2013), $N = 4 \times 4 = 16$ apresenta uma boa relação entre a definição espacial da imagem e precisão estatística.

4.2. Artigo publicado

Até onde sabemos, DEANA *et al* (2013), publicou a única referência na literatura à técnica proposta, onde os resultados preliminares descritos mostram o grande potencial de sua aplicação.

DEANA, A. M., JESUS, S. H. C., KOSHOJI, N. H., BUSSADORI, S. K., OLIVEIRA, M. T., Detection of early carious lesions using contrast enhancement with coherent light scattering (speckle imaging). *Laser Physics*, 23, p. 075607, 2013.

Os resultados descritos neste artigo demonstram a viabilidade da técnica aqui desenvolvida. Técnica esta que é capaz de aprimorar o contraste em regiões lesionadas e sadias do esmalte dental mesmo em estados iniciais.

Detection of early carious lesions using contrast enhancement with coherent light scattering
(speckle imaging)

This article has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text article.

2013 Laser Phys. 23 075607

(<http://iopscience.iop.org/1555-6611/23/7/075607>)

View [the table of contents for this issue](#), or go to the [journal homepage](#) for more

Download details:

IP Address: 186.193.158.160

The article was downloaded on 02/06/2013 at 03:10

Please note that [terms and conditions apply](#).

Detection of early carious lesions using contrast enhancement with coherent light scattering (speckle imaging)

A M Deana, S H C Jesus, N H Koshoji, S K Bussadori and M T Oliveira

Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Human Health, Universidade Nove de Julho—UNINOVE, Rua Vergueiro 235, São Paulo, Brazil

E-mail: amdeana@gmail.com and amdeana@uninove.br

Received 10 April 2013

Accepted for publication 14 April 2013

Published 31 May 2013

Online at stacks.iop.org/LP/23/075607

Abstract

Currently, dental caries still represent one of the chronic diseases with the highest prevalence and present in most countries. The interaction between light and teeth (absorption, scattering and fluorescence) is intrinsically connected to the constitution of the dental tissue. Decay induced mineral loss introduces a shift in the optical properties of the affected tissue; therefore, study of these properties may produce novel techniques aimed at the early diagnosis of carious lesions. Based on the optical properties of the enamel, we demonstrate the application of first-order spatial statistics in laser speckle imaging, allowing the detection of carious lesions in their early stages. A highlight of this noninvasive, non-destructive, real time and cost effective approach is that it allows a dentist to detect a lesion even in the absence of biofilm or moisture.

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

Oral health may be defined as a standard of health related to the oral cavity that allows an individual to speak and socialize without discomfort or embarrassment due to disease [1]. A number of conditions may affect the perception of oral health, such as tooth loss, chronic pain in the stomatognathic system, halitosis and tooth decay [2–5].

Dental caries (tooth decay) still represent one of the most prevalent diseases, affecting nearly 100% of the general population in most countries and are a major concern in the dental community [6]. Thus, early detection prior to the need for restorative care is of fundamental importance and contributes to the general welfare of the population. Dentists can use less aggressive techniques on carious lesions detected in the early stages. Antimicrobial agents, fluoride and sealant can be administered to promote dental re-mineralization and impede the progression of tooth decay. Thus, there is a need for noninvasive, non-destructive, cost effective, real-time

techniques that allow the detection of carious lesions in the early stages.

The academic community has conducted a number of studies to gain a better understanding of the development of tooth decay. As caries develops underneath a biofilm, there are no clinically visible changes in the first week. On the ultrastructural level, however, there are signs of the dissolution of the outermost layer of the enamel [7]. This dissolution may be seen as an increase in interprismatic space due to the partial dissolution of the periphery of the enamel prisms. At the end of two weeks of biofilm action, changes become visible when the enamel is dried, and a rough, opaque white spot is seen. At three to four weeks, the lesion is visible before drying the enamel. Ultrastructurally, it is possible to see the complete dissolution of the perikymata and surface irregularities generated in dental development as well as the continued increase in interprismatic space [8,9].

The most commonly employed methods for the detection of tooth decay are probing with a dental explorer, visual detection and radiographic examination. However, none of

these techniques are sensitive to early carious lesions. Visual methods are based on subjective criteria and are usually only sensitive to lesions in advanced stages. Radiographs require about 30–40% mineral loss before tooth decay is detected [10]. The lack of specificity and sensitivity makes these conventional methods ineffective for the early detection of dental caries [11].

The interaction between light and teeth (absorption, scattering and fluorescence) is intrinsically connected to the constitution of the dental tissue [7]. Tooth decay induces mineral loss and changes in the optical properties of the affected tissue. Thus, the study of these properties may produce novel, noninvasive, non-destructive methods for the early diagnosis of carious lesions and biological phenomena related to this biomaterial [12,13].

A number of diagnostic techniques based on the optical properties of dental tissue have been developed for this purpose, such as quantitative light-induced fluorescence (QLF), laser-induced fluorescence (LF), fiber optic transillumination and optical coherence tomography (OCT) [13]. Since the autofluorescence of dental tissue is proportional to its mineral content, its natural fluorescence is decreased in the presence of decayed tissue, allowing detection and quantification of the lesion. However, the presence of saliva and biofilm impedes the application of QLF to the inter-proximal surface [14, 15]. LF is based on the assessment of fluorescence emitted by porphyrin derived from bacteria. However, this method does not allow evaluation of the severity of the lesion and can often lead to false-positive results [15,16]. With fiber optic transillumination, the dental tissue is illuminated by a bright white light and the transmitted light is imaged using a camera. Due to the high scattering of light, the area of the carious lesion appears as a dark spot in the image. However, since this method does not allow quantification of the scattered light, its analysis is subjective [16]. While the near infrared region has also been used for transillumination, a recent study reports that it is possible to detect early caries using LEDs in the ultraviolet spectral range [17,18]. OCT produces a high-resolution cross-sectional image of the dental tissue. By applying an interpolation algorithm, this method produces three-dimensional images, allowing both qualitative and quantitative assessments of dental tissue. The resolution depth of this technique is mainly limited by the absorption and scattering properties of biological tissues, but can be improved by applying optical clearing [19,20]. However, OCT remains unavailable for clinical practice and the high cost is a major issue for dentists [21,22].

This paper presents a novel, noninvasive, non-destructive, real time, cost effective method for the early detection of *ex vivo* tooth decay by imaging the enhanced contrast between carious and sound dental tissue when illuminated with a coherent light source.

2. Materials and methods

2.1. Speckle analysis

In the health sciences, laser speckle imaging (LSI) as a diagnostic tool is based on ‘dynamic speckle’ analysis, in

which the movement and speed of small particles can be accurately obtained by applying statistical techniques in the time domain [21]. In the absence of movement in the tissue, no fluctuation is observed in the granular interference pattern. Therefore, the majority of dynamic speckle techniques are not applicable to carious lesions.

It is well established that the key feature in the demineralization of dental tissue is the carbohydrate-induced enrichment of bacterial plaque formed by microorganisms, such as *mutans streptococci* and *lactobacilli*, which lowers the pH of the plaque and enhances the cariogenic potential. The mineral content in the enamel changes in the presence of an imbalance between the demineralization and remineralization processes. Sugar is converted into acids as a result of the bacterial metabolism, leading to under-saturated biofilm. Due to the differences in optical properties between sound and carious tissue, light is scattered more by the latter [23]. First-order spatial statistics are applied to determine the scatter patterns of both tissues.

In the classic theory summarized by Goodman in [24], the scattered amplitude fields are randomly distributed and the intensity values follow a negative exponential distribution,

$$P(I) = e^{-\frac{I}{\langle I \rangle}}, \quad (1)$$

in which $\langle I \rangle$ is the mean intensity. The standard deviation is as follows:

$$\sigma = \frac{\sqrt{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2}}{N-1}. \quad (2)$$

High spatial resolution is desirable when analyzing decayed tissue. Therefore, analysis of variance should be performed on small samples. The choice of the sample size is a compromise between spatial resolution and statistical accuracy. In this study, sample sizes from $n = 2$ to $n = 49$ pixels were analyzed. The statistics obtained from sound and decayed tissue were then compared to determine differences in the LSI.

2.2. Tooth samples

Human teeth extracted for periodontal or orthodontic reasons were collected for this experiment. Following extraction, the remaining soft tissue was mechanically removed and no further treatment was performed. The teeth were preserved in water until imaging.

2.3. Speckle system and image acquisition

The laser source for the speckle system consisted of a 10mW HeNe laser emitting at 633 nm. The diffraction-limited beam was expanded using an $f=40$ cm lens and the tooth sample was positioned 1 m from the laser head. The beam was at a normal angle of incidence with respect to the sample. Figure 1 displays a schematic diagram of the experimental setup.

The subjective speckle patterns were acquired by a 24-bit color CMOS camera (Canon T1) fitted with a 100 mm Canon lens. The images were resized to 8 bit and analyzed using first-order spatial statistics.

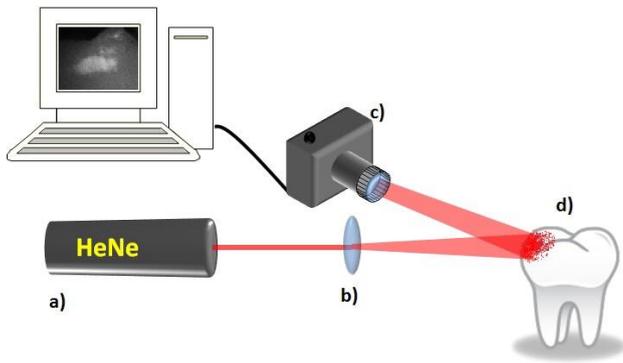


Figure 1. Schematic diagram of the experimental setup: (a) HeNe laser emitting at 633 nm; (b) $f = 40$ cm focus lens; (c) Canon T1 camera fitted with a Canon macro 100 mm lens; (d) tooth sample.

3. Results and discussion

Figure 2 shows the imaging of the tooth samples (columns A, B and C) illuminated by a non-coherent light source (row 1) and LSI (row 2). Row 3 shows a pseudo-color image of

of the LSI. As the carious lesions are in the early stages, the samples have not undergone enough demineralization to be detectable by x-ray imaging. By conducting a careful visual inspection of the entire oral cavity with bright illumination, a trained dentist should be able to detect the small graduation between the lighter decayed tissue and the darker sound tissue (contrast).

When the tooth sample is illuminated with a coherent light source (figure 2, row 2) the contrast between the decayed and sound tissue is significantly enhanced. This occurs because the early stages of caries are characterized by the dissolution of hydroxyapatite, which leads to non-uniform mineral loss and an increase in enamel porosity, with a larger portion of the enamel surface exposed [23]. This larger exposed surface leads to greater backscattering when the lesion is illuminated with coherent light, resulting in more intense constructive interference and greater radiance in this particular direction in comparison to sound enamel tissue.

By applying a pseudo-color algorithm to the LSI (figure 2 row 3), visualization of the carious lesion is significantly easier than under white illumination. Figure 3 displays the plot of mean intensity (I) of the central row (yellow line) of each

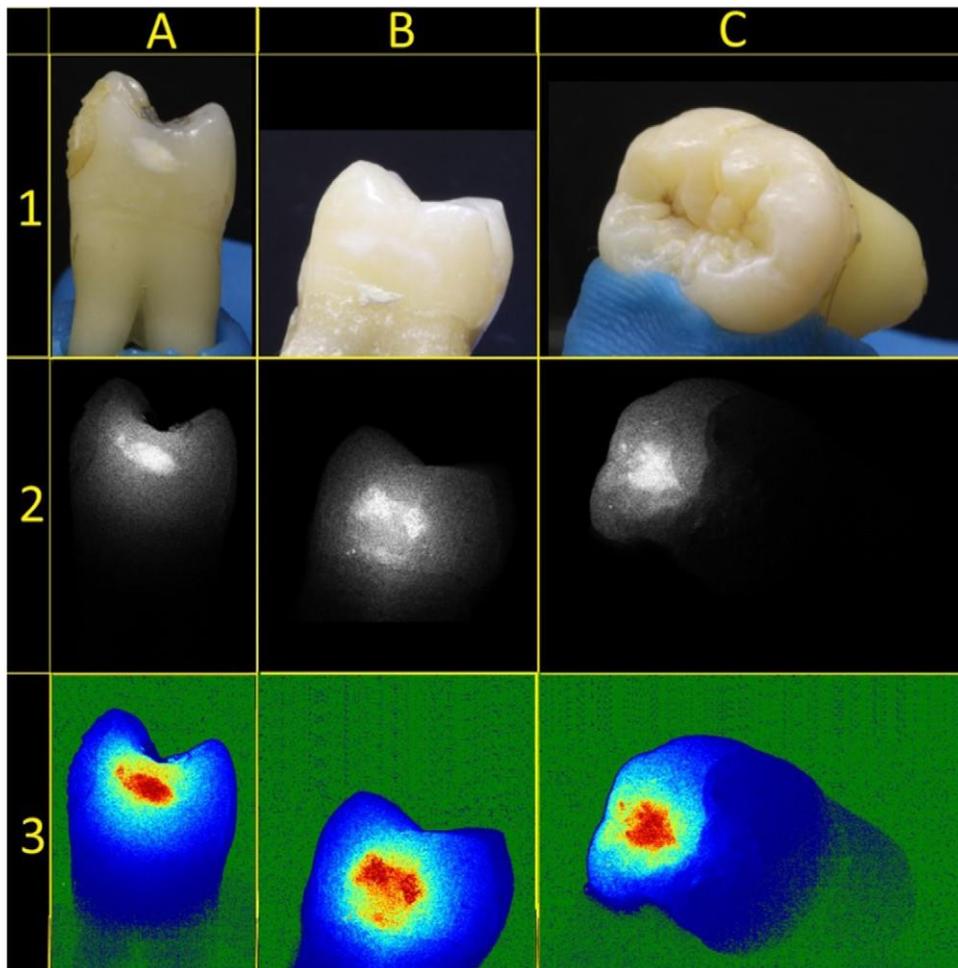


Figure 2. Tooth samples imaged with a non-coherent continuous light source (row 1), LSI (row 2) and pseudo-color visualization of LSI (row 3).

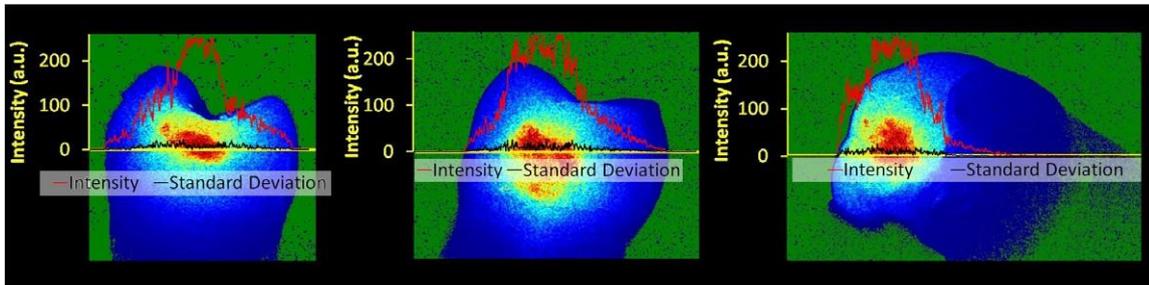


Figure 3. Mean intensity $\langle I \rangle$ (red line) and standard deviation (black line) of the central row of figure 2 under laser illumination; sample size: $n = 4 \times 4 = 16$ pixels. All images are 8 bit; thus, the intensity I (represented on the y-axis) is a dimensionless number ranging from 0 to 255.

Table 1. First-order spatial statistics of the samples under both illumination conditions.

Illumination	Tissue	Intensity ($\langle I \rangle$)	Standard deviation	Contrast C
Non-coherent light imaging	Sound	184	10	1.09 ± 0.07
	Decayed	198	8	
Laser speckle imaging	Sound	94	36	2.44 ± 0.23
	Decayed	227	26	

tooth sample under laser illumination, allowing quantification of the difference in backscattered intensity between decayed and sound tissue (contrast).

Sample sizes ranging from $n = 2 \times 2 = 4$ pixels to $n = 7 \times 7 = 49$ pixels were examined, among which $n = 4 = 4 \times 4 = 16$ pixels had both high spatial resolution and good statistical accuracy. Figure 3 shows the averaged image of $n = 4 \times 4 = 16$ pixels. An overlapped plot of I of a representative row shows that, under laser illumination, the backscattered I of decayed tissue is significantly greater in comparison to sound tissue. However, the standard deviation (figure 3, black line) over the entire LSI does not undergo any significant shift from sound to decayed tissue, demonstrating no significant changes in the scattering pattern of the speckle imaging.

Table 1 shows the $\langle I \rangle$ values of all the samples, the standard deviation σ and the contrast $C = (\langle I_{\text{decay}} \rangle / \langle I_{\text{health}} \rangle)$ between decayed and sound tissue.

On average, all the samples show a significant, consistent, reproducible contrast enhancement of decayed tissue under laser illumination table 1. In comparison with regular illumination, the contrast ratio between decayed and sound tissue increases by an average of 125% when LSI is applied. This contrast is easily detectable by applying a thresholding algorithm to the laser speckle image, allowing the detection of carious lesions in a much more consistent way than conventional visual inspection.

4. Conclusions

This study demonstrates a noninvasive, non-destructive, real time, cost effective technique capable of enhancing the contrast between sound dental tissue and a carious lesion in the early stage. The application of first-order spatial statistics to laser speckle imaging permits the detection of early carious lesions based on the optical properties of the

enamel. This approach allows dentists to detect lesions even in the absence of biofilm or moisture. While further studies are needed, this method has the potential to become an innovative, fundamental tool in the early diagnosis and treatment of dental caries, which is the most prevalent disease in human oral health.

References

- [1] Wilson M, Burns T, Pratten J and Pearson G J 1995 *J. Appl. Bacteriol.* **78** 569–74
- [2] Malik Z, Hanania J and Nitzan Y 1990 *J. Photochem. Photobiol. B* **5** 281–93
- [3] Komerik N, Nakanish H, MacRobert A J, Henderson B, Speight P and Wilson M 1993 *Antimicrob. Agents Chemother.* **47** 932–40
- [4] Chan Y and Lai C H 2003 *Lasers Med. Sci.* **18** 51–5
- [5] Neuhaus K W, Schlafer S, Lussi A and Nyvad B 2013 *Caries Res.* **47** 203–10
- [6] Petersen P E, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S and Ndiaye C 2005 *Bull. World Health Organ.* **83** 661–9 (www.who.int/bulletin/volumes/83/9/661.pdf)
- [7] Bakhmutov D, Gonshukov S, Khaarchenko O, Nickforova O and Vdovin Y 2004 *Laser Phys. Lett.* **11** 565–96
- [8] Kidd E A and Fejerskov O 2004 *J. Dent. Res.* **83** C35–8
- [9] Smith T M, Olejniczak A J, Reid D J, Ferrell R J and Hublin J J 2009 *Arch. Oral Biol.* **51** 974–95
- [10] White S C and Pharoah M J 2004 *Dental caries Oral Radiology: Principles and Interpretation* (Toronto: Mosby) pp 297–313
- [11] Bader J D, Shugars D A and Bonito A J 2001 *J. Dent. Educ.* **65** 960–8 (www.jdentaled.org/content/65/10/960.full.pdf+html)
- [12] Kishen A, Shrestha A and Rafique A 2008 *J. Conserv. Dent.* **11** 63–70
- [13] Karlsson L 2010 *Int. J. Dent.* **27** 0729
- [14] Pretty I A 2006 *J. Dent.* **34** 727–34

- [15] Ko A, Choo-Smith L P, Hewko M, Leonardi L, Sowa M G, Dong C C S, Williams P and Cheghorn B 2005 *J. Biomed. Opt.* **10** 031118
- [16] Bader J D and Shugars D A 2004 *J. Am. Dent. Assoc.* **135** 1413–26 (<http://jada.ada.org/content/135/10/1413.full.pdf+html>)
- [17] Jones R, Huynh G, Jones G and Fried D 2003 *Opt. Express* **11** 2259–65
- [18] Bakhmutov D, Gonchukov S, Kharchenko O, Voytenok O and Zubov B 2008 *Laser Phys. Lett.* **5** 375–8
- [19] Larina I V, Carbajal E F, Tuchin V V, Dickinson M E and Larin K V 2008 *Laser Phys. Lett.* **5** 476–9
- [20] Proskurin S G and Meglinski I V 2007 *Laser Phys. Lett.* **4** 824–6
- [21] Freitas A Z, Zezell D M, Vieira N D Jr, Ribeiro A C and Gomes A S L 2006 *J. Appl. Phys.* **99** 024906
- [22] Freitas A Z, Zezell D M, Mayer M P A, Ribeiro A C, Gomes A S L and Vieira N D Jr 2009 *Laser Phys. Lett.* **6** 896–900
- [23] Zakian C M, Taylor A M, Ellwood R P and Pretty I A 2010 *J. Dent.* **38** 788–95
- [24] Goodman J W 1984 *Statistical Properties of Laser Speckle Patterns* (Berlin: Springer)

5. Conclusões

Aplicando a estatística espacial de primeira ordem, é possível detectar as lesões cariosas baseado nas diferentes propriedades ópticas do tecido sadio e lesionado.

A abordagem apresentada neste trabalho permite a dentistas detectar lesões iniciais mesmo na ausência de biofilme ou umidade, solucionando alguns dos problemas do estado da arte.

Apesar de futuros estudos serem necessários, esta metodologia tem o potencial de se tornar uma ferramenta fundamental no diagnóstico de lesões iniciais de cárie, a doença de maior prevalência na saúde oral humana.

6. REFERÊNCIAS:

AMAECHE BT, HIGHAM SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. **Journal of Dentistry**. 33:243-252, 2005

ANISIMOV, V. V., KOZEL, S. M., LOKSHIN, G. R. Space-time statistical properties of coherent radiation scattered by a moving diffuse reflector. **Opt. Spec.** 26., p. 258, 1969

BASHKATOV AN, GENINA EA, KOCHUBEY VI, TUCHIN VV. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000. **J Phys D Appl. Phys.** 38: 2543-2555.n 2000

BRAGA, M. M., EKSTRAND, K. R., MARTIGNON, S., IMPARATO, J. C. P., RICKETTS, D. N. J., MENDES, F. M. . Clinical performance of two visual scoring systems in detecting and assessing activity status of occlusal caries in primary teeth.. **Caries Research**, 44, p. 300-308, 2010

CHAN Y, LAI CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med Sci** 18: 51-55, 2003.

CHUNG S, FRIED D, STANINEE M, DARLING CL. Multispectral near-IR reflectance and transillumination imaging of teeth. **Biomed Opt Exp.** Sep; 2(10), 2011

DEANA, A. M., JESUS, S. H. C., KOSHOJI, N. H., BUSSADORI, S. K., OLIVEIRA, M. T., Detection of early carious lesions using contrast enhancement with coherent light scattering (speckle imaging). **Laser Physics**, 23, p. 075607, 2013

GOLDFISCHER, L.I. Autocorrelation function and power spectral density of laser produced speckle patters. **J. Opt. Soc. Am.** 55, p. 247. 1965

GOODMAN, J. M. Statistical Properties of Laser Speckle Patterns. In: Dainty, J. C. (ed) **Laser Speckle and related phenomena**. Berlin: Springer-Verlag,. p. 9-75., 1984

KARLSSON L. Caries detection methods based on changes in optical properties between healthy and carious tissue. **Int J Dent**. 2010:270729, 2010

KIDD EA, FEJERSKOV O. 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, 2004

KISHEN A, SHRESTHA A, RAFIQUE A. Fiber optic backscatter spectroscopy sensor to monitor enamel demineralization and remineralization in vitro. **J Conserv Dent**. apr/jun; 11(2):63-70, 2008.

KOMERIK N, NAKANISH H, MACROBERT AJ, HENDERSON B, SPEIGHT P, WILSON M. In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother** 47: 932-940, 2003

KOZLOWSKI FC, KOZLOWSKI JR VA. Laser Fluorescente (DIAGNOdent) como diagnóstico da cárie dentária. **Biol Healthy Scie.** 7(1):47-51, 2010.

MALIK Z, HANANIA J, NITZANY. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. **J Photochem Photobiol B** 5: 281-93, 1990

MORAES, MCD. Análise in vitro da progressão de lesões de erosão em dentina após irradiação com laser de Nd:YAG e flúor através de Tomografia por Coerência Óptica (OCT). **Dissertação. Mestrado Profissionalizantes Lasers em Odontologia, USP - IPEN** 2012

NANCI, A. **TenCate – Histologia Oral**. Ed Elsevier. 7ed. 432p, 2008

NYVAD, B. Diagnosis versus Detection of Caries. **Caries Res**, 38, 192-198, 2004

NYVAD, B; FEJERSKOV, O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. **Community Dent Oral Epidemiol**, 25, 69-75, 1997

O'DRISCOLL, P. MITCHEL, J. SHELTON, J. KNOWLESS, JC . and GULABIYALA, K. Laser speckle photography in measurement of tooth strain. **In: International Endodontic Journal**. p. 376 – 376, 1998

PRETTY IA. Caries detection and diagnosis: novel Technologies. **Journal of Dentistry**. 34:727-739, 2006

RODRIGUES JA. Novas tecnologias para detecção de lesões de cárie oclusal. **Dissertação (Mestrado) faculdade de Odontologia da Universidade Paulista. Araraquara. SP.** 2005.

SCHLUTER N, HARA A, SHELLIS RP, GANSS C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. **Caries Res**. 45(Suppl 1):13-23, 2011

SILVA, RE. Estudo das propriedades do biospeckle e suas aplicações. **Dissertação. Instituto de Física da Universidade de São Paulo.** 2007

UCHINO, M., FUJISAKI, W. KURIHARA, E. MATSUDA, K, KOSEKI, T., Characteristics of Laser Speckle Measurement of Tooth Roughness, **Key Engineering Materials** 1581, 261-263, 2004

WILSON M, BURNS T, PRATTEN J, PEARSON GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J Appl Bacteriol** 78:569-74, 1995

ZEZELL DM, DE ROSSI W, BACHMANN L. Fundamentos da Física do Laser e Interação da Radiação Laser com tecido Biológico. In: **Eduardo Fundamentos de Odontologia - Lasers em odontologia**. Ed. Guanabara Koogan. RJ. 2010. (1):13-17, 2010