UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

BRUNA MANGIALARDO MORON

**Comparação entre diferentes métodos para produção e análise de
lesão de cárie artificial em esmalte e dentina**

BAURU
2011

BRUNA MANGIALARDO MORON

**Comparação entre diferentes métodos para produção e análise de
lesão de cárie artificial em esmalte e dentina**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Magalhães

Versão Corrigida

BAURU
2011

M828c Moron, Bruna Mangialardo
Comparação entre diferentes métodos para
produção e análise de lesão de cárie artificial em
esmalte e dentina / Bruna Mangialardo Moron. –
Bauru, 2011.
180 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina
Magalhães

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 057/2009
Data: 15/05/2009

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, César e Marilda,
Por todo amor, dedicação e apoio.
Sem vocês não teria chegado até aqui.*

*À minha irmã, Flávia,
Minha eterna amiga e "companheira".*

MEU RECONHECIMENTO E ADMIRAÇÃO

À amiga e orientadora **Profª. Drª. Ana Carolina Magalhães**, obrigada pela oportunidade de estarmos juntas neste trabalho, pela confiança em mim depositada, pela paciência e dedicação. Obrigada por ser sempre tão solícita e atenciosa. Você foi um dos “anjos” que Deus colocou em meu caminho. Guardo em meu coração o seu exemplo de amor, dedicação e determinação em tudo que faz. Sou muito feliz por ter sido sua orientada.

Meu sincero respeito e gratidão!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me dado forças nos momentos difíceis, coragem nos momentos de insegurança e alegria em cada conquista, sempre colocando “anjos” em minha caminhada, iluminando as escolhas ao trilhar este caminho.

“Tudo concorre para o bem daquele que serve ao Senhor.”

Paulo de Tarso

Aos meus pais e minha irmã, **César, Marilda e Flávia**, que são minhas maiores alegrias. Por tudo que aprendi com vocês, por estarem sempre ao meu lado me incentivando a crescer cada vez mais e por estarem por perto sempre me apoiando em todas as minhas decisões. A vocês dedico esse trabalho, pois sem o apoio que me deram, em todos os sentidos, não chegaria até aqui. Agradeço a Deus todos os dias pela família maravilhosa que me deu. Obrigada por tudo que fazem por mim. Amo vocês incondicionalmente!

Aos meus avós, **Udine e Primo, Helena e Adriano**, simplesmente por existir e estarem sempre comigo na torcida.

As amigas, **Elaine Cristina Consolmagno, Mírian Galvão Bueno e Raquel Miden**a pela amizade que construímos durante o tempo do Mestrado, onde formávamos um quarteto quase inseparável. Obrigada por dividirem comigo todos os momentos vividos nesse período. Foi um presente viver estes momentos com vocês. Obrigada pelos conselhos, pelos puxões de orelha, pelas conversas e risadas.

À amiga e companheira de trabalho **Lívia** por cada minuto que dividimos juntas, seja no lazer ou no trabalho. Pela amizade durante esses anos, pela cumplicidade, companhia, por me ouvir todas as vezes que lamentei ou todas que gargalhei. Por todas as noites de festa ou mesmo pelas madrugadas em que ficamos fazendo os aparelhos no laboratório. Obrigada pela amizade, por ser colaboradora desta pesquisa, e por dividir comigo momentos tão especiais da minha vida.

As amigas **Prizinha, Luciana, Fabíola, Flavinha, Marina, Clarissa, Karen, Luana, Camila, Natália, Yule**, por todos os momentos em que dividimos alegrias, tristezas, preocupações, lazer, trabalho, conversas, saídas, ou até mesmo um momento de silêncio, raros por sinal. Cada uma de vocês estará para sempre guardada num lugar especial do meu coração.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica, **Ângela, Thiemi, Heloisa, Kellen, Senda, Cíntia, Cristiane, Maria Cecília, Alessandra, Camila, Juliano, Claudinha, Flávia Levy, Flávia Iano, Aline, Mileni, Larissa, Luiz, Melina, Taísa, Priscila, Cláudia, Janete, Bruno, Lucas, Vinícius, Joyce, Adriana, Flávia, Suzana, Naiana, Bianca, Beatriz e Luana**, pela companhia e amizade durante todo esse tempo. Pelas conversas fora de hora, pelas risadas, pela ajuda nos trabalhos realizados e pelo convívio diário. Sem dúvida, a presença e companhia de vocês deixaram o ambiente de trabalho do laboratório muito mais agradável.

Aos professores da disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Profª. Drª. Marília Afonso Rabelo Buzalaf** e **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, pela convivência durante o curso de Mestrado, pelos ensinamentos repassados e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À **PD Annette Wiegand**, pela disponibilidade em fazer todas as análises de microrradiografia para este trabalho. Sempre tão atenciosa e disposta a fazer o seu melhor. Pela paciência em repetir as análises quando foi necessário. *Thank you very much!*

Aos voluntários que participaram desta pesquisa, **Rafael, Luiz, Vanessa, Izabella, Naiana, Layla, Luciana, Alessandra, Thiemi e Livia**, que participaram por livre e espontânea vontade. Obrigada por se dedicarem ao experimento, por seguirem às nossas instruções e por sempre estarem prontos a ajudar. Sem dúvida, se não fosse por vocês, este trabalho não teria acontecido.

Aos amigos do Centrinho, **Ana Cristina, Bruno, Camila, Eduardo, Fernanda, Gustavo, Guilherme M., Guilherme O, Mariana, Patrick e Stefania**, agradeço a convivência, compreensão, e amizade.

Aos professores do centrinho, **Sueli Lobo Devides, Luis Augusto Esper, Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida** e **Caio Figueiredo** pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do departamento de Ciências Biológicas, **Thelma, Ovídio, Vera e Dalva**, obrigada pela atenção e pelo esforço em ajudar.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris** pela ajuda com as análises estatísticas.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho! É para vocês, que ofereço estas páginas.

Muito obrigada a todos!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do senhor diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, e do senhor presidente da Comissão de Pós-Graduação **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

À Universidade de Zurich - Suíça, representada pelo **PD. Wolfgang Buchalla** e pela **PD. Annette Wiegand**, pela parceria estabelecida e por disponibilizarem seus equipamentos laboratoriais para a realização de parte da análise deste trabalho.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP/Processo 2009/03581-9), pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo de Mestrado.

*"É melhor tentar e falhar,
Que preocupar-se e ver a vida passar;
É melhor tentar, ainda que em vão,
Que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
Que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
Que em conformidade viver..."*

Martin Luther King

RESUMO

Este trabalho comparou diferentes protocolos para a produção de lesão de cárie artificial em esmalte e dentina bovinos entre si e com lesões cariosas naturais (para o esmalte), utilizando análises de dureza superficial e longitudinal e microradiografia transversal, as quais foram relacionadas. Para o estudo *in vitro*, 40 espécimes de esmalte foram desmineralizados com: GEL MC (gel de metilcelulose 8% e ácido láctico 0,1M, pH 4,6, 37°C, 14 dias); GEL PA (solução de ácido poliacrílico - carbopol 0,2% e ácido láctico 0,1M saturado com hidroxiapatita, pH 4,8, 37°C, 16h); MDHP (solução de ácido láctico 0,05M com cálcio, fosfato e tetraetil metilenodifosfanato, pH 5,0, 37°C, 6 dias); e TAMPÃO (solução de ácido acético 0,05M com cálcio, fosfato e fluoreto, pH 5,0, 37°C, 16h). Já os 60 espécimes de dentina foram desmineralizados com: GEL MC II (gel de carboximetilcelulose 6% e ácido láctico 0,1M, pH 5,0, 37°C, 14 dias); TAMPÃO II (solução de ácido acético 0,05M com cálcio, fosfato e fluoreto, pH 4,5, 37°C, 7 dias); TAMPÃO III (solução de ácido acético 0,05M com cálcio e fosfato, pH 5,0, 37°C, 7 dias) e MDHP II (solução de ácido láctico 0,05M com cálcio, fosfato e tetraetil metilenodifosfanato, pH 5,0, 37°C, 7 dias). No estudo *in situ* participaram 11 voluntários os quais utilizaram dispositivos palatinos de resina acrílica contendo dois espécimes de esmalte e dois de dentina bovinos, protegidos com uma tela plástica, por 14 dias. Durante este período, os voluntários gotejaram uma solução de sacarose a 20% 8x/dia sobre o esmalte e 4x/dia sobre a dentina, para o desenvolvimento do biofilme. A desmineralização foi avaliada por dureza superficial-SH e longitudinal-CSH (KgF/mm²) e microradiografia transversal-TMR (%vol min). Foram ainda comparadas as lesões produzidas artificialmente em esmalte com as lesões naturais (mancha branca) de dentes extraídos. Os dados de CSH e TMR foram relacionados a cada distância e também submetidos individualmente à análise de variância para comparação entre os protocolos ($p < 0,05$). Verificou-se que os diversos protocolos produziram diferentes tipos de lesões cariosas artificiais em esmalte e dentina. O grupo IN SITU, para ambos os substratos, produziu uma lesão profunda, com grande perda mineral integrada, porém com a menor camada superficial “pseudo intacta”. Já os grupos GEL MC I e II produziram lesões mais rasas e com menor perda mineral integrada. Os grupos MDHP I e II assim como TAMPÃO I, II e III produziram lesões subsuperficiais em esmalte e dentina. No geral, as lesões

produzidas em dentina foram mais profundas e mais desmineralizadas quando comparadas ao esmalte. As lesões de mancha branca apresentaram-se com grande variabilidade em relação à profundidade e presença de camada superficial. Quanto ao método de avaliação, não houve uma relação linear entre CSH e TMR. Com base nos resultados, pode-se concluir que os métodos para produção de lesão cáries diferem significativamente em relação às características de dureza e conteúdo mineral, podendo ter um impacto em uma subsequente des-remineralização e os métodos de análise não apresentam relação linear, sendo que a dureza deve ser interpretada criteriosamente em relação à perda mineral.

Palavras-chave: Cárie dentária. Dentina. Desmineralização. Dureza. Esmalte dentário.

ABSTRACT

Comparison of different methods to produce and to analyze artificial enamel and dentin caries lesion

This study compared different methods to produce artificial dental caries in bovine enamel and dentin among them and with natural carious lesions (white spot lesion for enamel only) using surface and cross section hardness and transversal microradiography tests, which were submitted to relation analyses. For the *in vitro* study, 40 bovine enamel specimens were demineralized with: MC GEL (8% methylcellulose gel and 0.1M lactic acid, pH 4.6, 37°C, 14 days), PA GEL (0,2% poli acrylic acid - carbopol and 0.1M lactic acid saturated with hydroxyapatite, pH 4.8, 37°C, 16h); MDHP (0,05M lactic acid solution with calcium, phosphate and tetraethyl methyl diphosphonate, pH 5.0, 37°C, 6 days) and BUFFER (0.05M acetic acid solution with calcium, phosphate and fluoride, pH 5.0, 37°C, 16h). Sixty dentin specimens were demineralized with: MC GEL (6% carboximetilcelulose gel and 0.1M lactic acid, pH 5.0, 37°C, 14 days); BUFFER II (0.05M acetic acid solution with calcium, phosphate and fluoride, pH 4.5, 37°C, 7 days); BUFFER III (0.05M acetic acid solution with calcium and phosphate, pH 5.0, 37°C, 7 days) and MDHP II (0.05M lactic acid with calcium, phosphate and tetraethyl methyl diphosphonate, pH 5.0, 37°C, 7 days). For the *in situ* study, 11 volunteers wore acrylic resin palatal appliances containing two bovine enamel and dentin specimens, protected with plastic mesh, for 14 days. During this period, the volunteers dripped a 20% sucrose solution 8 times/day on enamel and 4 times/day on dentin, for the development of biofilm. Demineralization was assessed by surface (SH), cross-sectional (CSH) hardness and transversal microradiography (TMR). In addition, comparisons were made between artificially enamel caries lesions and natural lesions. The CSH and TMR data were correlated to each distance and also individually subjected to analysis of variance for comparison between protocols ($p < 0.05$). It was found that the different protocols produced different types of artificial caries lesions in both enamel and dentin. The IN SITU protocol, for both substrates, produced a deep lesion with high integrated mineral loss, but with a thin surface layer. MC GEL I and II produced shallow lesions with low integrated mineral loss. MDHP I and II as well as BUFFER I, II and III protocols produced subsurface lesions in enamel and dentin. In general, the lesions produced in dentin were deeper and more demineralized when compared to

enamel. The white spot lesions presented a high variability regarding lesion depth and surface layer. It was not found a linear relationship between CSH and TMR. Based on the results, it can be concluded that the protocols to produce artificial caries lesion significantly differ regarding hardness and mineral content, which in turn can influence further de-remineralization processes. The response variables do not present a linear relationship. Thus, hardness analysis should be carefully interpreted in respect to mineral loss.

Key-words: Demineralization. Dental caries. Dentin. Enamel. Hardness.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 – **a.** Aparelho de corte de precisão ISOMET, vista frontal; **b.** Secção dupla no sentido cérvico-incisal da coroa bovina; **c.** Espécime de esmalte bovino de 4 x 4 mm obtido da porção mais plana da coroa, depois da secção dupla no sentido méso-distal.. 76
- Figura 2 – **a.** Aparelho de corte de precisão ISOMET; **b.** Fatia da porção cervical da raiz através de um corte na direção méso-distal; **c.** Dois espécimes 4 x 4 mm foram obtidos de cada fatia da porção cervical da raiz através de uma secção no sentido vestibulo-lingual e um corte final no sentido méso-distal 76
- Figura 3 – **a.** Planificação da dentina interna; **b.** Politriz metalográfica; **c.** Espécimes de esmalte após a planificação e polimento final 77
- Figura 4 – **a.** Microdurômetro utilizado para seleção e distribuição dos espécimes; **b.** Visão da ponta KNOOP; **c.** Endentação que foi realizada com carga de 25g por 10s para o esmalte; **d.** Endentação com carga de 10g por 10s para a dentina 78
- Figura 5 – Espécime protegido com esmalte cosmético de unha vermelho..... 79
- Figura 6 – Espécime colado em um J10 protegido com esmalte de unha vermelho na presença do gel..... 81
- Figura 7 – Espécime protegido com esmalte de unha vermelho sendo imerso em solução desmineralizante dentro do pote de filme fotográfico..... 82
- Figura 8 – **a.** Modelo em gesso e aparelho intra-bucal palatino confeccionado em resina acrílica; **b.** Aparelho intra-bucal com 4 nichos; **c.** Aparelho após a fixação dos espécimes de esmalte (cor verde) e de dentina (cor vermelha)..... 87
- Figura 9 – **a.** Material utilizado para a colocação da tela plástica; **b.** Tela plástica fixada com resina acrílica; **c.** Aparelho finalizado após a colocação da cera de incrustação sobre a resina acrílica..... 88
- Figura 10 – **a.** Aparelho intra-bucal palatino confeccionado esquematizando os locais de esmalte (cor verde) e dentina (cor vermelha); **b.** Modo como foi feito o gotejamento da solução de sacarose sobre os espécimes; **c.** Kit entregue aos voluntários, onde continha a caixa plástica com o aparelho, gaze, o pote com a solução de sacarose, uma garrafa com água deionizada e uma escova dentária..... 89
- Figura 11 – Lesões de mancha branca opacas, definidas, não cavitadas e sem pigmentos. A maioria dos dentes também apresentava fluorose dentária, de forma que somente as áreas com lesões de mancha branca do tipo cariosa foram avaliadas..... 90
- Figura 12 – **a.** Pré-molar posicionado com godiva para o corte; **b.** Aparelho de corte de precisão ISOMET com o dente pré-molar em posição; **c.** Lesão de mancha branca presente no centro do espécime 90
- Figura 13 – **a.** Visão da ponta KNOOP do microdurômetro; **b.** Cinco endentações realizadas no início e ao final do experimento 91
-

Figura 14 – Espécimes de esmalte e dentina incluídos em resina acrílica e polidos para a análise de dureza longitudinal.....	92
Figura 15 – Análise da dureza longitudinal mostrando as endentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 µm da superfície externa do esmalte	92
Figura 16 – Análise da dureza longitudinal mostrando as endentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 µm da superfície externa da dentina	93
Figura 17 – Paquímetro digital utilizado para checar a espessura dos espécimes para a análise com o TMR	94
Figura 18 – a. Espécime pronto para análise; b. Equipamento utilizado para análise; c. Posicionamento do espécime com as 14 fatias de alumínio na cabine do raio-X; d. Painel de controle.....	95
Figura 19 – a. Microscópio estéreo; b. Filmes fotográficos sendo analisados pelo microscópio estéreo; c. Software utilizado para as análises.....	95
Figura 20 – Imagens de dureza longitudinal de um espécime representativo por protocolo de produção de cárie em esmalte; a. GEL MC; b. GEL PA; c. MDHP; d. TAMPÃO; e. IN SITU	104
Figura 21 – Perfis de dureza longitudinal (média) ao longo da profundidade para as lesões produzidas pelos diferentes protocolos em esmalte <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	105
Figura 22 – Exemplos de imagem microradiográfica de um espécime e os perfis de conteúdo mineral nos diferentes tipos de lesão de esmalte. a. GEL MC; b. GEL PA; c. MDHP; d. TAMPÃO; e. IN SITU.....	107
Figura 23 – Perfis de conteúdo mineral (média) ao longo da profundidade para as lesões produzidas pelos diferentes protocolos em esmalte <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	108
Figura 24 – Imagem microradiográfica de diferentes lesões de mancha branca natural; a. Lesão mais superficial sem grande desmineralização; b. Lesão rasa, localizada, apresentando uma fina camada superficial “pseudo-intacta”; c. Lesão rasa e restrita a uma pequena área, sem camada superficial “pseudo-intacta” visível; d. Lesão de profundidade média e com uma espessa camada superficial “pseudo-intacta”; e. Lesão profunda e com uma pequena área com microcavitação; e f. Lesão já se estendendo à dentina e com uma espessa camada superficial “pseudo intacta”	112
Figura 25 – a. lesão profunda e com perda de estrutura superficial; b. lesão atingindo dentina com perda de estrutura superficial; c. espécime apresentando fratura na área da lesão; d. espécime sem lesão microscópica aparente, apesar de aspectos de mancha branca clinicamente	113
Figura 26 – Perfis de dureza longitudinal (média) ao longo da profundidade para as lesões produzidas pelos diferentes protocolos em dentina <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	115
Figura 27 – Imagens de dureza longitudinal de um espécime representativo por protocolo para a produção de cárie em dentina; a. TAMPÃO II; b. GEL MC II; c. TAMPÃO III; d. MDHP II; e e. IN SITU.....	116
Figura 28 – Perfis de conteúdo mineral (média) ao longo da profundidade para as lesões produzidas pelos diferentes protocolos em dentina <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	119
Figura 29 – Exemplos de imagem microradiográfica e os perfis de conteúdo mineral nos diferentes tipos de lesão em dentina. a. GEL MC II; b. TAMPÃO II; c. TAMPÃO III; d. MDHP II; e. IN SITU.....	120

Figura 30 – <i>Plots</i> de conteúdo mineral versus raiz quadrada da dureza longitudinal para o grupo GEL MC (regressão linear, $p < 0,05$). Nota-se que os pontos estão dispersos para conteúdo mineral abaixo de 85%.....	125
Figura 31 – <i>Plots</i> de conteúdo mineral versus a raiz quadrada da dureza longitudinal para o grupo TAMPÃO (regressão linear, $p < 0,05$). Nota-se que os pontos estão muito dispersos para conteúdo mineral abaixo de 85%	125
Figura 32 – Relação entre %SHC e profundidade da camada superficial para o grupo GEL MC, mostrando uma moderada correlação inversa, apesar de os pontos apresentarem-se dispersos	126
Figura 33 – Relação entre $\sqrt{\text{SH}}$ final e profundidade da camada superficial para o grupo GEL MC, mostrando uma correlação média, apesar de os pontos apresentarem-se dispersos.....	127
Figura 34 – Relação entre SH final e valor de R para o grupo TAMPÃO II, mostrando uma forte correlação com pontos dispersos ($r=0,80$, $p=0,000$)	129
Figura 35 – Relação entre SH final e Z max para o grupo TAMPÃO II, mostrando uma forte correlação inversa com pontos dispersos ($r = - 0,78$; $p=0,005$)	130
Figura 36 – Relação entre ΔKHN e profundidade da lesão para o grupo GEL MC II, mostrando uma forte correlação positiva com pontos dispersos ($r=0,76$, $p=0,017$).....	130
Figura 37 – Relação entre SH final e ΔZ para o grupo MDHP II, mostrando uma média correlação inversa com pontos dispersos ($r=-0,70$, $p = 0,004$)	131

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadros

Quadro 1- Tipos de soluções e géis utilizados na pesquisa do esmalte	80
Quadro 2- Tipos de soluções e géis utilizados na pesquisa da dentina	84

- Tabelas

Tabela 1 - Valores iniciais de saturação para cada protocolo de desmineralização do esmalte <i>in vitro</i> , a 37°C com $P_{CO_2} = 0$ atm	82
Tabela 2 - Valores iniciais de saturação para cada protocolo de desmineralização da dentina <i>in vitro</i> , a 37°C com $P_{CO_2} = 0$ atm	86
Tabela 3 - Número amostral para o estudo do esmalte e dentina	102
Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores de SH inicial, SH final (KgF/mm^2), %SHC e ΔKHN ($KgF/mm^2.\mu m$) para cada protocolo para a desmineralização do esmalte	103
Tabela 5 - Média e desvio padrão dos valores de dureza longitudinal (KgF/mm^2) para o esmalte desmineralizado pelos diferentes protocolos para cada profundidade	106
Tabela 6 - Média e desvio padrão da profundidade da camada superficial “pseudo-intacta” (μm), Z Max (% vol min), profundidade da lesão (μm), ΔZ (%vol min. μm) e valor de R (% vol min) para o esmalte desmineralizado pelos diferentes protocolos	109
Tabela 7 - Média e desvio padrão dos valores de % conteúdo mineral do esmalte desmineralizado pelos diferentes protocolos ao longo da profundidade	111
Tabela 8 - Média e desvio padrão do SH inicial, SH final (KgF/mm^2), %SHC e ΔKHN ($KgF/mm^2.\mu m$) da dentina desmineralizada pelos diferentes protocolos	114
Tabela 9 - Média e desvio padrão dos valores de dureza longitudinal (KgF/mm^2) para a dentina desmineralizada pelos diferentes protocolos para cada profundidade	118
Tabela 10 - Média e desvio padrão da profundidade da camada superficial “pseudo intacta” (μm), Z Max (%vol min), profundidade da lesão (μm), ΔZ (%vol min. μm) e valor de R (% vol min) para a dentina desmineralizada pelos diferentes protocolos	121

Tabela 11 - Média e desvio padrão dos valores de % conteúdo mineral para a dentina desmineralizada pelos diferentes protocolos para cada profundidade.....	123
Tabela 12 - Regressão quadrática e linear de $\sqrt{\text{CSH}}$ e o conteúdo mineral para os diferentes tipos de lesões em esmalte ($p < 0,05$)	124
Tabela 13 - Regressão quadrática e linear de CSH ou $\sqrt{\text{CSH}}$ e o conteúdo mineral para os diferentes tipos de lesões em dentina ($p < 0,05$).....	128
Tabela 14 – Correlação entre os parâmetros da dureza com os da microradiografia para os grupos que apresentaram diferenças significativas.....	129

LISTA DE ABREVIATURA

%SHC	Porcentagem de perda de dureza superficial
CAV	Procedimento de videodensidade assistido por computador
CPP-ACP	Fosfopeptídeo de caseína e fosfato de cálcio amorfo
CSH	Dureza longitudinal
DES	Desmineralização
FAP	Fluorapatita
HAP	Hidroxiapatita
MB	Mancha Branca
MDHP	Tetraetil Metilenodifosfanato
MMP	Metaloproteinases da matriz
pH	Potencial hidrogeniônico
QLF	Quantificação da fluorescência induzida pela luz
RE	Remineralização
SH	Dureza superficial
SL	Profundidade da zona superficial “pseudo-intacta”
TMR	Microradiografia Transversal
vs	versus
Z max	Conteúdo Mineral máximo da zona superficial “pseudo-intacta”
Δ KHN	Perda dureza integrada
Δ Z	Perda mineral integrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 PRODUÇÃO DE LESÃO CARIOSA EM ESMALTE <i>IN VITRO</i>	31
2.2 PRODUÇÃO DE LESÃO CARIOSA EM DENTINA <i>IN VITRO</i>	45
2.3 PRODUÇÃO DE LESÃO CARIOSA <i>IN SITU</i>	53
2.4 LESÃO DE CÁRIE INICIAL <i>IN VIVO</i>	61
2.5 MICRODUREZA X MICRORADIOGRAFIA	64
3 PROPOSIÇÃO	69
4 MATERIAIS E MÉTODOS	73
4.1 OBTENÇÃO DOS DENTES E PREPARO DOS ESPÉCIMES DE ESMALTE E DENTINA (ETAPAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN SITU</i>)	75
4.2 AMOSTRA	79
4.3 INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL EM ESMALTE <i>IN VITRO</i>	79
4.4 INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL EM DENTINA <i>IN VITRO</i>	83
4.5 INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL EM ESMALTE E DENTINA <i>IN SITU</i>	86
4.6 OBTENÇÃO DOS DENTES COM LESÕES CARIOSAS NATURAIS EM ESMALTE E PREPARO DOS ESPÉCIMES (<i>IN VIVO</i>).....	89
4.7 AVALIAÇÃO DA DUREZA DE SUPERFÍCIE E LONGITUDINAL.....	91
4.8 MICRORADIOGRAFIA TRANSVERSAL – TMR	93
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	96
4.9.1 Geral	96
4.9.2 Esmalte	96
4.9.3 Dentina.....	97
4.9.4 Relação entre Dureza superficial e longitudinal e TMR.....	97

5 RESULTADOS	99
5.1 ESMALTE	102
5.1.1 Dureza superficial e longitudinal	102
5.1.2 Microradiografia transversal (TMR)	106
5.1.3 Lesão natural de cárie inicial em esmalte	111
5.2 DENTINA	113
5.2.1 Dureza superficial e longitudinal	113
5.2.2 Microradiografia transversal (TMR)	118
5.3 CORRELAÇÃO CSH X TMR.....	124
5.3.1 Esmalte	124
5.3.2 Dentina.....	127
6 DISCUSSÃO	133
7 CONCLUSÕES	155
REFERÊNCIAS	159
ANEXOS	171

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Devido aos avanços na prevenção da cárie dentária nas últimas décadas, foi constatada uma redução na incidência de lesões cariosas em populações provenientes de países desenvolvidos ou em desenvolvimento como o Brasil (PETERSSON; BRATHALL, 1996; MEDEIROS; WEYNE, 2001; NARVAI et al., 2006; PERES et al., 2006; FRIAS et al., 2007). No entanto, apesar desta melhora na condição de saúde bucal, o Brasil ainda apresenta pequenas populações com alta prevalência de lesões cariosas (NARVAI et al., 2006), o que denomina-se a polarização da doença. Adicionalmente, com o aumento da expectativa de vida é comum que pacientes idosos apresentem maior número de dentes naturais associado a uma grande prevalência de lesões cariosas radiculares, devido à recessão gengival e a problemas periodontais (COLUSSI; FREITAS, 2002; MOREIRA et al., 2005). Portanto, esta doença ainda é de grande relevância clínica em todo o mundo, assim como no Brasil.

A lesão cariosa é causada por desmineralização dos tecidos dentários por ácidos de origem microbiana em pacientes que apresentam biofilme dentário e dieta rica em carboidratos (FEJERSKOV; KIDD, 2011). O principal ácido envolvido na cárie dentária é o ácido láctico, que reduz o pH do biofilme para valores em torno de 5,0, o qual associado à dinâmica do biofilme em termos de concentração de fluoreto, cálcio e fosfato, pode gerar uma desmineralização clássica inicial do tipo subsuperficial (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005). Dependendo do grau de desmineralização, a lesão pode se tornar visualmente detectável como mancha branca em esmalte, a qual representa o primeiro sinal clínico da cárie dentária (ZERO, 1999). Clinicamente, a lesão pode estar ativa, quando a superfície do esmalte se apresenta áspera e opaca, ou inativa, quando a superfície do esmalte se apresenta lisa e brilhante (ZERO, 1999). Devido à porosidade, esta lesão inicial pode se tornar cavitada diante a desafios ácidos constantes.

Apesar da significativa prevalência das lesões iniciais de cárie e de seu significado para a Odontologia (NARVAI et al., 2006; FRIAS et al., 2007), sua estrutura e densidade mineral ainda não são amplamente compreendidas. Fenômenos dinâmicos como a desmineralização e a remineralização são constantes em lesões cariosas iniciais. Portanto, quantificar e entender esses processos

promoverá uma melhor base para se avaliar o processo de reparo dessas lesões cariosas iniciais e estratégias preventivas (HUANG et al., 2007; LIPPERT et al., 2011).

Para tal, lesões cariosas artificiais são comumente criadas para simular o desenvolvimento de cárie *in vivo*. Modelos *in vitro* para a produção de lesões cariosas em esmalte e dentina são hábeis em simular a dinâmica da perda e ganho mineral, com vantagens como a padronização, rapidez e facilidade. Estes modelos permitem o melhor entendimento da interação entre a desmineralização e remineralização e sobre os fatores que afetam estes processos, como por exemplo, o fluoreto (WHITE, 1995).

Espécimes de esmalte e dentina são geralmente expostos a soluções ou géis desmineralizantes compostos por ácido acético ou láctico (pH entre 4,5-5,0) subsaturados em relação à apatita, simulando as condições do fluído do biofilme dentário e consequentemente, permitindo a formação de lesão de cárie inicial (não cavitada) (TEN CATE; DUIJSTERS, 1982; EDGAR, 1983; BUSKES; CHRISTOFFERSEN; ARENDS, 1985; WHITE, 1987; TEN CATE et al., 1996; KIELBASSA et al., 2005; LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007; QUEIROZ et al., 2008). Adicionalmente, existem estudos que têm utilizado biofilmes artificiais para produção de lesão de cárie inicial *in vitro*, simulando o meio ambiente bucal, com a presença de bactérias acidogênicas, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* (SISSONS, 1997; SISSONS et al., 2007; MARQUEZAN et al., 2009; HAVATI et al., 2011).

Em relação às soluções e géis desmineralizantes, diferenças no grau inicial de saturação de minerais, concentração de fluoreto, tipo de ácido e viscosidade podem resultar em diferenças consideráveis nas características físicas e mecânicas do tecido dentário desmineralizado, como a distribuição mineral (ARENDS; DIJKMAN; CHRISTOFFERSEN, 1987), composição química (LYNCH; TEN CATE, 2006) e dureza (MAGALHÃES et al., 2009).

Apesar dos processos de desmineralização e remineralização terem sido estudados extensivamente nas últimas 2-3 décadas, poucos trabalhos têm relatado o conteúdo mineral, profundidade de lesão e propriedades mecânicas de lesões artificiais produzidas por diferentes protocolos. Como o que se espera é que os protocolos induzam a uma lesão inicial do tipo cariosa (microscopicamente: lesão

subsuperficial) e não do tipo erosiva (lesão de superfície atacada), comparação entre diferentes géis e soluções desmineralizantes parece necessária.

É importante considerar que o tipo de lesão cariosa pode ter influência sobre os efeitos de uma subsequente des-remineralização, já que a camada superficial, a porosidade e a profundidade de lesão têm um papel importante na difusão mineral (LYNCH; TEN CATE, 2006; LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007; LIPPERT et al., 2011).

Apesar das vantagens do modelo *in vitro*, este ainda apresenta limitações significantes pela sua inabilidade em simular o processo biológico complexo que envolve a formação de lesão cariosa como ocorre *in vivo*. Por outro lado com o modelo *in situ* é possível estudar aspectos fundamentais do processo de desmineralização assim como testar o efeito de diferentes alimentos, como por exemplo, o potencial cariogênico de diferentes tipos de açúcares (AIRES et al., 2006; AIRES et al., 2008). A grande vantagem deste modelo é que simula melhor a condição *in vivo* que os modelos *in vitro*, pela presença de saliva e o desenvolvimento da película adquirida e do biofilme dentário; e ainda não danifica os dentes dos voluntários, uma vez que os desafios cariogênicos são realizados em amostras de dente (TEN CATE, 1994; ZERO, 1995; CLASEN; OGAARD, 1999). Com base no exposto acima, estudos devem comparar se as lesões formadas *in vitro* e *in situ* são similares às lesões de cariosas iniciais (não cavitadas) vistas clinicamente; sendo isto um dos objetivos deste projeto.

Por outro lado, propriedades relacionadas à profundidade das lesões cariosas podem ser descritas pelo conteúdo mineral e dureza. Para comparar as propriedades de lesões cariosas artificiais, uma combinação entre dureza longitudinal (teste mecânico) e microradiografia transversal (conteúdo mineral) do mesmo espécime deveria ser realizada. Dados comparativos entre dureza e microradiografia são escassos, alguns mostram alguma relação (FEATHERSTONE et al., 1983 KIELBASSA et al., 1999) enquanto em outros a relação não é linear (BUCHALLA et al., 2008) ou claramente apontam que esta relação depende do tipo de lesão cariosa (MAGALHÃES et al., 2009). Entretanto, as equações para a conversão de dureza em conteúdo mineral diferem consideravelmente. Isto indica que o cálculo do conteúdo mineral a partir de valores de dureza pode não ser viável. A comparação entre os diferentes métodos de análise também é necessária, já que

a relação entre eles pode ser diferente dependendo do tipo de lesão formada, sendo este também, um dos objetivos do presente estudo.

Com base no descrito acima, o objetivo deste trabalho foi comparar os dados de dureza superficial e longitudinal e do conteúdo mineral (microradiografia transversal) de lesões de cárie artificial em esmalte e dentina produzidas *in vitro* (por diferentes soluções e géis preconizados na literatura), *in situ* e *in vivo* (somente esmalte). Estes resultados serão de suma importância para o delineamento de protocolos laboratoriais e modelos clínicos mais apropriados para o estudo da cárie e conseqüentemente para o desenvolvimento de estratégias preventivas que reduzam a prevalência desta lesão, visto que recentemente, foi demonstrado que lesões muito profundas, estendendo-se pelo esmalte e para a dentina, ainda podem ser remineralizadas quando em contato com uma solução remineralizadora (TEN CATE et al., 2008). Dessa forma, este conhecimento pode possibilitar uma abordagem não invasiva de lesões cariosas mais profundas (FEJERSKOV; KIDD, 2011).

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE LESÃO CARIOSAS EM ESMALTE *IN VITRO*

Ten Cate e Duijsters (1983) avaliaram o efeito do fluoreto em lesões cáries artificiais em esmalte, com objetivo de tentar aumentar a quantidade de informação disponível sobre a inibição da cárie pelo fluoreto e verificar a influência do pH e concentração do fluoreto na solução desmineralizante subsaturada de cálcio e fosfato para produção de lesão de mancha branca. A solução desmineralizante continha Ca^{+2} a 2,2 mM, PO_4^{-3} a 2,2 mM e ácido acético a 50 mM. O pH foi ajustado entre 4,0 e 5,0 utilizando KOH. O fluoreto foi adicionado à solução preparada de modo a obter uma concentração final entre 0 e 10 ppm. Os espécimes permaneceram imersos nas soluções a 37°C por 21 dias. No pH 4,0, as concentrações de fluoreto foram 0; 0,5; 1 e 5 ppm. Os espécimes e a solução foram avaliados no segundo, sexto e décimo segundo dia de experimento. Para os pH 4,3, 4,5 e 5,0, as concentrações de fluoreto testadas foram de 0; 0,05; 0,1; 0,5; 2,0; 5,0 e 10 ppm. Após esse período, os espécimes foram removidos e a solução analisada quanto às mudanças nas concentrações de Ca^{+2} , PO_4^{-3} e F^- . Os dados combinados da dissolução do esmalte mostraram um padrão de dissolução semelhante à estequiometria da hidroxiapatita ($\text{Ca/P}=1,72$). Entretanto, no início do processo houve uma preferência para a dissolução do cálcio. A taxa de desmineralização pareceu ser diminuída quando a solução foi supersaturada com CaF_2 . Isso pode ser atribuído à diferença morfológica dos depósitos do fluoreto de cálcio, que formam uma camada globular, a qual bloqueia a difusão do ácido, protegendo o esmalte da dissolução. A perda de cálcio mostrou-se dependente do pH e da concentração de fluoreto da solução, sendo a maior perda de cálcio encontrada em pH baixo (4,0 a 4,5) e com baixas concentrações de fluoreto (dependendo do pH, em concentrações de F^- menores que 2 ppm). Em contrapartida, a efetividade da incorporação do fluoreto ao esmalte aumentou com a perda de cálcio durante a desmineralização. Assim, a perda de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} do esmalte submetido à solução desmineralizadora é dependente do pH e da concentração de fluoreto. Solução desmineralizante supersaturada de CaF_2 pareceu ser mais efetiva em retardar a taxa de desmineralização quando comparada àquela supersaturada de FAP.

Buskes, Christoffersen e Arends (1985) apresentaram um método de composição constante e adequado para desmineralização e remineralização do esmalte *in vitro*. Para tal, um estudo de desmineralização e um exemplo de remineralização *in vitro* foram apresentados, de modo a verificar o método. O desenvolvimento do método experimental foi guiado por quatro requisitos: (1) as soluções desmineralizantes e remineralizantes devem apresentar atividade iônica constante; (2) o método deve ser simples e barato; (3) o líquido deve escorrer sobre a superfície do esmalte em um ritmo controlado; e (4) os espécimes podem ser removidos durante o experimento para análise do progresso da lesão. Para a desmineralização e remineralização foram utilizados dentes bovinos, além disso, na desmineralização com 2 μ M de metilhidroxidifosfato também foram utilizados pré-molares humanos. A solução desmineralizante continha CaCl₂.2H₂O a 3 mM, KH₂PO₄ a 3 mM, metilhidroxidifosfato e CH₃COOH (ácido acético) a 50 mM ajustada ao pH 5. Os espécimes foram expostos a esta solução durante 115h. Nesse estudo também foi avaliado o efeito da concentração de metilhidroxidifosfato a 2, 6 ou 50 μ M (visto que a adição deste reagente leva à formação de lesões de subsuperfície e inibe a desmineralização *in vitro*). Os espécimes desmineralizados (solução desmineralizante com MDHP 6 μ M por 120h) foram expostos a uma solução remineralizante durante 360h. Esta solução remineralizante continha CaCl₂.2H₂O a 1,5 mM, KH₂PO₄ a 0,9 mM e Hepes a 20 mM ajustada ao pH 7. Para a avaliação do experimento utilizou-se microdureza de superfície (comprimento da endentação) e conteúdo mineral em profundidade (microradiografia transversal). O protocolo não produziu erosão. A camada superficial foi claramente visível embora muito pequena (1-2 μ m). A maior concentração de metilhidroxidifosfato na solução reduziu significativamente a profundidade da lesão quando comparada às demais concentrações (145 $\pm$ 12, 118 $\pm$ 7 e 52 $\pm$ 11 μ m para soluções com 2, 6 e 50 μ M de MHDP, respectivamente). Neste estudo pode-se notar diferenças acentuadas entre o esmalte humano e o bovino, sendo que o esmalte bovino apresentou maior desmineralização, provavelmente causada por diferenças de porosidade. A remineralização aumentou a dureza em três vezes e reduziu a profundidade da lesão em 51%. O experimento de desmineralização mostrou que o método descrito produz lesões que podem ser reproduzíveis.

White (1987) avaliou o uso de um gel fluído de polímero sintético na produção de lesão cariosa artificial em esmalte dentário humano. O objetivo do trabalho foi encontrar um sistema para produção de desmineralização em esmalte, livre de impurezas externas (como por exemplo, o fluoreto), que pudesse ser reproduzido igualmente em todos os laboratórios. Foram utilizados espécimes de esmalte humano sem polimento e bovinos com polimento. Para a produção do gel desmineralizante foi utilizado Carbopol (ácido poliacrílico) dissolvido em água juntamente ao ácido láctico a 0,1 M, sendo a solução Carbopol a 1% não saturada em relação à hidroxiapatita (HAP), e as soluções com Carbopol a 0,1 e 0,2 %, 25, 50 ou 100% saturadas com relação à hidroxiapatita. Todas as soluções foram ajustadas ao pH 5,0 pela adição de NaOH 1M. Os espécimes de esmalte (4 mm x 1,5 mm) foram imersos individualmente em 25 mL deste gel fluído a 37°C, sem agitação, por períodos específicos (2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 e 96h). Como controle foi utilizado uma solução com metilhidroxidifosfato e ácido láctico. Após a desmineralização, os espécimes foram lavados com água e armazenados em atmosfera úmida para posterior análise. Alguns espécimes foram selecionados e remineralizados em 25 ml (sob agitação) de solução que continha cálcio a 1 mmol/l, fosfato a 0,6 mmol/l e 1 ppm de fluoreto (NaF) e NaCl a 0,15 mmol/L, por 16h, 72h ou 14 dias. As técnicas utilizadas para avaliar a progressão da lesão após a desmineralização e/ou remineralização incluíram dureza superficial (3 endentações por superfície), microradiografia transversal e microscopia de luz polarizada. A adição de hidroxiapatita solúvel ao sistema gel carbopol/lactato significativamente diminuiu a taxa de amolecimento da superfície dos espécimes de esmalte, devido à redução da insaturação da solução em relação aos minerais do dente, em especial aquelas com 50% de HAP e mais de 0,1 ppm de fluoreto. O uso de carbopol apresentou comportamento similar sobre a formação da camada superficial, em comparação às soluções com metilhidroxidifosfato. Além de disso, as lesões desmineralizadas no gel com 50% de saturação exibiram diferentes gradientes de perda mineral, em comparação com aquelas sem hidroxiapatita, quando analisadas pela microradiografia. Apesar de o carbopol ter apresentado efeito significativo na desmineralização superficial, o mesmo apresentou pouco efeito quanto à profundidade da lesão. Em espécimes não polidos o processo de desmineralização foi mais lento e menos reproduzível quando comparados aos espécimes polidos. Em

relação à remineralização, as lesões criadas pelo sistema carbopol/hidroxiapatita quase se remineralizaram completamente durante o período de duas semanas, apresentando valores de densidade mineral, em todo o corpo da lesão, similares ao esmalte hígido. Assim, o estudo demonstrou que o gel de polímero sintético é um agente efetivo na produção de lesões de cárie artificial em esmalte, visto que induz uma saturação superficial e permite a penetração do ácido em profundidade, produzindo lesões subsuperficiais. As lesões de cárie artificial produzidas com o gel carbopol podem ser facilmente controladas pelo ajuste do grau de saturação em relação à HAP.

Para testar a reprodutibilidade da produção de lesão cáriosa artificial *in vitro* e comparar as análises entre vários laboratórios, ten Cate et al. (1996) desenvolveram um estudo no qual lesões de esmalte incipientes foram produzidas por quatro grupos de pesquisadores usando um protocolo padrão (n=25) e um protocolo local de preferência (n=25). O protocolo padrão era composto por um sistema de gel ácido. Os espécimes de dentes bovinos (2mm X 4mm) foram cobertos por uma camada de 1,5 cm de gel metilcelulose a 8% e 1,5 cm de solução de ácido láctico a 0,1M ajustado a um pH de 4,6, durante 7 dias a 37°C (todos os espécimes juntos). O protocolo escolhido pelo do laboratório A foi realizado em dentes bovinos, os quais foram expostos individualmente a uma solução com metilhidroxidifosfato a 0,2 µM, ácido láctico a 0,1 M (10 cm³ solução/dente), ajustada a um pH de 4,5, durante 1 semana a 37°C. Já o laboratório B utilizou dentes humanos com a superfície vestibular não polida, os quais foram desmineralizados (5 dentes por vez) em uma solução CaCl₂ a 3mM, NaH₂PO₄ a 3 mM, ácido acético a 50 mM (50 cm³ solução/dente) ajustada a um pH de 4,5, a 37°C durante 5 dias. O laboratório C desmineralizou 15 dentes bovinos juntos em uma solução CaCl₂ a 2,2 mM, KH₂PO₄ a 2,2 mM e ácido acético a 50 mM (50 cm³ solução/dente) ajustada a um pH de 4,3, a 37°C durante 4 dias. E por fim, o laboratório D desmineralizou os 25 dentes humanos juntos utilizando gel de metilcelulose a 8% e ácido láctico a 0,1 M ajustado a um pH 4,6, durante 15 dias, a 37°C. As lesões produzidas foram distribuídas de modo que os laboratórios analisassem todos os espécimes produzidos em todos os laboratórios. Cada laboratório determinou o conteúdo mineral, expresso em perda mineral integrada (ΔZ - % vol.µm) e profundidade de lesão (µm), utilizando sua própria técnica radiográfica para determinar esses

parâmetros. Os resultados mostraram que as lesões produzidas com o protocolo padrão apresentam uma perda mineral integrada entre 2.000 a 3.000 %vol.µm e uma profundidade entre 65 a 116µm. Já a faixa de perda mineral integrada para os protocolos locais variam entre 1.800 a 6.300 %vol.µm com profundidade variando de 75 a 181µm. A grande variabilidade nesses valores pode ser atribuída tanto à variação biológica entre as lesões, como também variações nos parâmetros utilizados para as medições (como tempo e calibração do equipamento) e cálculo da perda mineral integrada. Portanto, recomenda-se padronizar o método de cálculo da perda mineral integrada e profundidade da lesão e incluir uma lesão referência para produção de lesão cáriosa artificial.

Amaechi, Higham e Edgar (1998) determinaram o efeito da temperatura, tempo de exposição, local de aquisição do espécime de esmalte (superfície incisal, média ou cervical) e o tipo de protocolo desmineralizante na produção de lesões cárias artificiais em esmalte bovino. Para isso, utilizaram um sistema gel acidificado e uma solução ácida tampão parcialmente saturada à temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) e/ou a 37°C . Lesões de cárie foram produzidas em janelas (3X2mm) das regiões incisal, média e cervical da superfície vestibular de dentes bovinos. Utilizaram dois tipos de soluções desmineralizantes, (A) sistema gel acidificado segundo Edgar (1983), no qual hidroxietilcelulose a 6% p/v foi adicionado continuamente e devagar a uma solução de ácido láctico a 0,1M sob agitação e ajustada a um pH de 4,5; e (B) solução ácida parcialmente saturada descrita por Ten Cate et al. (1983) que continha KH_2PO_4 a 2,2 mM, ácido acético a 50 mM, CaCl_2 a 2,2 mM e fluoreto a 0,5 ppm, e o pH ajustado a 4,5. Quatro grupos de comparação foram formados de acordo com a temperatura e o tipo de protocolo aos quais os espécimes foram expostos: (1) gel vs. solução, ambos a 20°C ; (2) gel vs. solução, ambos a 37°C ; (3) solução a 20°C vs. solução a 37°C ; e (4) gel a 20°C vs. gel a 37°C . Os espécimes ($n=180/\text{grupo de comparação}$) foram imersos em 20 ml de gel/solução, durante 3, 4 ou 5 dias, sendo que quando em solução, os mesmos permaneceram sob agitação constante. Os espécimes foram analisados por microradiografia transversal. Através do microscópio óptico pôde-se observar 3 classes de lesões formadas (lesão de subsuperfície com camada superficial regular, erodida e tecido amolecido). Uma lesão de subsuperfície regular foi produzida em todos os espécimes da solução tampão independentemente da temperatura. Já para

o gel a 37°C, 62% dos espécimes apresentaram lesão de subsuperfície, 27% esmalte erodido e 11% esmalte amolecido. Para o gel a 20°C, 49% dos espécimes apresentaram lesão de subsuperfície, 37% esmalte erodido e 14% esmalte amolecido. Comparando os dois protocolos desmineralizantes e os tempos de exposição, observou-se que a perda mineral e a profundidade da lesão para a solução tampão para todos os tempos (3, 4 e 5 dias) foi significativamente maior que o sistema gel. Comparando o efeito da temperatura na desmineralização, para a solução tampão, não houve diferença significativa entre 20°C e 37°C, embora a 37°C a perda mineral e a profundidade da lesão apresentaram-se maior. Já para o gel, houve uma maior perda mineral e profundidade da lesão para a temperatura de 37°C, porém somente foi significativo para o quarto e quinto dias. Comparando o efeito da desmineralização em relação aos dias de exposição, observou-se um aumento na perda mineral e profundidade da lesão com o aumento dos dias de exposição independentemente do protocolo ou temperatura. Já quando se comparou a posição em que o esmalte foi adquirido (porção incisal, média ou cervical), não se encontraram diferenças significativas. Assim, lesões cáries artificiais podem ser produzidas em esmalte bovino com uma solução tampão parcialmente saturada a 20°C ou 37°C a partir de 3 dias.

Iijima et al. (2004) realizaram um estudo para investigar o potencial remineralizante de gomas de mascar sem açúcar contendo fosfopeptídeo de caseína e fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) sobre lesões de cárie artificial em esmalte. Para tal, foram utilizados espécimes de esmalte oriundos de terceiros molares humanos que, após polimento e proteção com esmalte de unha (9 X 1mm), foram desmineralizados na solução preconizada por White (1987) modificada, contendo 20g/L de Carbopol 907, 500mg/L de hidroxiapatita e ácido láctico a 0,1 mol/L, a um pH de 4,8, por 16 horas, a 37°C. Um terço dos espécimes foi ainda cortado para servir de controle da desmineralização. Os dois terços restantes foram incluídos numa placa intra-oral para remineralização *in situ*. Dez voluntários adultos (5 homens e 5 mulheres, 21-45 anos de idade) participaram desta etapa, composta por 2 fases (uma fase utilizando a goma de mascar com 18,8 mg CPP-ACP e a outra com a goma de mascar sem o agente). O tratamento consistiu em mascar a goma por 20 minutos, 4 vezes ao dia, durante 14 dias, nos seguintes horários: 10h, 11h30min, 14h e 15h30min. Após a remineralização *in situ*, os espécimes foram

cortados ao meio e metade de cada janela foi protegida com esmalte de unha. Os espécimes foram imersos mais uma vez na solução desmineralizante (pH 4,8) por 8 e 16 horas, a 37°C. Os espécimes foram analisadas por microradiografia transversal. A lesão produzida pela solução desmineralizante apresentou $87 \pm 11,5 \mu\text{m}$ de profundidade e um ΔZ de $3363 \pm 557 \text{ \% vol.}\mu\text{m}$. O consumo de goma contendo CPP-ACP produziu uma remineralização da lesão de cárie artificial em esmalte de $17,9 \pm 1,0\%$ sendo significativamente diferente da goma de mascar controle que remineralizou $9,0 \pm 0,7\%$. A microradiografia mostrou também que lesões remineralizadas foram mais resistentes a posteriores desafios ácidos. Assim, concluiu-se que a goma sem açúcar e com CPP-ACP é superior a goma equivalente que não contém CPP-ACP na remineralização de lesão de subsuperfície em esmalte *in situ* e no aumento da resistência a posteriores desafios ácido *in vitro*.

Yamazaki, Litman e Margolis (2007) realizaram um estudo para determinar *in vitro* o efeito do fluoreto (1) na desmineralização do esmalte hígido humano e (2) na progressão de lesões artificiais cariosas, sob condições bucais relevantes. Para tal, foram preparadas finas secções de esmalte humano hígido ($130\text{-}160 \mu\text{m}$), com todas as superfícies protegidas, exceto uma janela de 1mm de comprimento. Para a primeira parte do estudo, oito espécimes foram expostos a quatro soluções desmineralizantes que, variavam entre si, quanto à concentração de fluoreto (sem fluoreto, 0,08, 0,19 e 0,38 ppm). A solução desmineralizante continha 3 mmol/l de cálcio, 7 mmol/l de fosfato e 65 mmol/l de ácido láctico, ajustada a um pH de 5,0. Os espécimes foram expostos à solução, a 25°C, por até 98 dias, sendo estas soluções subsaturadas em relação ao esmalte, similarmente à condição encontrada no fluido do biofilme após a exposição à sacarose *in vivo*. Em seguida, na segunda parte do estudo, para avaliar o efeito das diferentes concentrações de fluoreto na progressão de lesões cariosas artificiais, espécimes hígidos foram submetidos a uma solução desmineralizante que continha 100 mmol/l ácido láctico, 18 mmol/l de cálcio, 7,8 mmol/l de fosfato, ajustado a um pH 4,3 e 25°C, durante 1-2 semanas, com a finalidade de se obter uma lesão cariiosa de subsuperfície. Na sequência, essas lesões cariosas de subsuperfície criadas foram expostas a cinco soluções desmineralizantes (n=3) contendo 3mmol/l de cálcio, 15 mmol/l de fosfato e 50 mmol/l de ácido láctico ajustado a um pH de 4,8, a 25°C, por até 760 horas, variando entre si somente pela concentração de fluoreto (1,0; 2,1; 5,1; 10,1 e 25

ppm). Após o período experimental, os espécimes foram avaliados por microradiografia transversal e as soluções foram avaliadas quanto à concentração de cálcio, fosfato e fluoreto. Concentrações de fluoreto maiores que 0,19 ppm foram capazes de prevenir a desmineralização do esmalte hígido *in vitro* (1º estudo). Contudo, para prevenir a progressão de lesões de cárie artificiais foi necessária uma concentração de fluoreto significativamente maior (25 ppm). Soluções desmineralizantes com concentrações de fluoreto intermediárias (de 2,1 a 10,1 ppm) aumentaram a lesão de subsuperfície. Os resultados mostraram que o efeito do fluoreto nas lesões de cárie em esmalte não é apenas em função das propriedades da solução, mas também é dependente do tipo de lesão cariosa inicial. Assim, embora as concentrações de fluoreto normalmente encontradas no fluido da placa possam ser eficazes na prevenção do desenvolvimento de cárie em superfície hígida do esmalte utilizando este protocolo experimental; para a redução da progressão das lesões iniciais, uma concentração de fluoreto significativamente maior é necessária.

Queiroz et al. (2008) desenvolveram e testaram dois modelos, um para avaliar o efeito do fluoreto na inibição da desmineralização em esmalte (denominado modelo de ciclagem de pH desmineralizante) e outro para avaliar o efeito do fluoreto no aumento da remineralização (denominado modelo de ciclagem remineralizante). Espécimes de esmalte bovinos foram submetidos aos modelos e tratados com soluções com concentrações crescentes de fluoreto (água destilada, 70, 140 e 280 µg F/ml) para validar os modelos em termo de dose-resposta. A solução desmineralizante (DES) continha $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 1,28 mmol/L, KH_2PO_4 a 0,74 mmol/L, NaF a 0,03 µg F/ml e ácido acético a 0,05 mol/L ajustada a pH 5,0. A solução remineralizante (RE) continha $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 1,5 mmol/L, KH_2PO_4 a 0,9 mmol/L, KCL a 150 mmol/L, 0,05 µg F/ml e Tris a 0,1 mol/L ajustada a pH 7,0. Essas soluções foram utilizadas para ambos os modelos de ciclagem de pH. O modelo de ciclagem desmineralizante teve duração de 8 dias, na qual os espécimes permaneceram 4h na DES e 20h na RE, e o tratamentos nas concentrações crescentes de fluoreto foram realizados 2 vezes ao dia (antes e após a imersão dos espécimes na solução DES) por 5 minutos sob agitação. Após o oitavo dia de ciclagem, os espécimes permaneceram por 24h na RE. Para o modelo de ciclagem de pH remineralizante, foram produzidas lesões de cárie artificial inicial, pela imersão

dos espécimes de esmalte na DES por 32h individualmente (2 mL/mm² de área de esmalte). Os espécimes previamente desmineralizados foram submetidos à ciclagem de pH (2h na DES e 22h na RE) e ao tratamento 3 vezes ao dia por 1 minuto, durante 8 dias. O tratamento foi realizado nas mesmas concentrações crescentes de fluoreto. Na sequência, realizou-se outro experimento, no qual se avaliou o potencial anti-cárie dos dentifrícios Colgate Baby (500 µg F/g), Tandy (1100 µg F/g) e Crest (1100 µg F/g, como controle positivo) a partir dos modelos validados anteriormente. Foi utilizado dentifrício não fluoretado como controle negativo. Perda e ganho mineral foram avaliados indiretamente por microdureza superficial e longitudinal e profundidade da lesão de cárie foi avaliada por microscopia de luz polarizada. Os modelos de ciclagem de pH desenvolvidos mostraram efeito dose-resposta do fluoreto quer seja na redução da desmineralização, como no aumento da remineralização do esmalte. O dentifrício com baixa concentração de fluoreto mostrou ter potencial anti-cárie, porém não tão efetivo como os dentifrícios contendo 1100 µg F/g. Os resultados sugerem que os modelos desenvolvidos são capazes de avaliar o potencial anti-cárie de dentifrício de concentração reduzida, quer seja na sua capacidade de aumentar a resistência do esmalte a desmineralização como no aumento da remineralização.

De uma forma geral, cada trabalho tem utilizado um protocolo específico, por conveniência, sendo que não há uma preocupação em relação ao impacto do tipo de lesão produzida no efeito do agente preventivo testado. Dessa forma é de suma importância que estes protocolos sejam comparados para um melhor embasamento na escolha do modelo experimental adequado, visando simular o que acontece *in vivo*, uma vez que o tipo de lesão produzida pode ter influência na subsequente desmineralização e remineralização (LYNCH; TEN CATE, 2006; YAMAZAKI; MARGOLIS, 2008; LIPPERT et al., 2011).

Damato, Strang e Stephen (1988) utilizaram um regime de ciclagem de pH para comparar o comportamento na desmineralização e remineralização de lesões artificiais em esmalte, produzidos por dois diferentes protocolos *in vitro*. Além disso, o efeito cariostático do fluoreto nessas lesões foi investigado pela adição de 2 ppm de fluoreto à solução remineralizadora. Para tal, utilizaram pré-molares humanos obtidos de regiões com baixa concentração de fluoreto (F <0,03 ppm). As lesões foram preparadas por dois métodos: sistema gelatinoso acidificado e sistema

de solução ácida tamponada (12 dentes/grupo). O sistema gelatinoso acidificado foi composto por gelatina a 10%, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a 1mmol/L, ácido láctico a 80mmol/L, fluoreto a 0,15 ppm, ajustado a um pH 4,0, durante 10 a 12 semanas. Já o sistema de solução ácida tamponada foi composto por CaCl_2 a 8,3mmol/L, NaH_2PO_4 a 8,3mmol/L, ácido acético a 50mmol/L e 0,03 ppm de fluoreto, ajustado a um pH de 4,0, durante 5 dias. Os grupos A & B foram imersos no sistema gel, enquanto que os grupos C & D foram imersos no sistema de solução. Foram feitas secções no esmalte (120 μm), e estas submetidas a uma ciclagem de pH na qual ficavam imersas 16 horas na solução de desmineralização e 8 horas na solução de remineralização durante 6 semanas. A solução desmineralizadora para ambos os grupos foi composta por Ca^{+2} a 2mmol/L, PO_4^{-3} a 2mmol/L, ácido acético a 50 mM ajustada a um pH de 4,8. A solução remineralizadora para ambos os grupos foi composta por Ca^{+2} a 2mmol/L, PO_4^{-3} a 2mmol/L, ajustada a um pH de 6,85. Na solução remineralizadora dos grupos B & D, foram adicionados 2 ppm de fluoreto. Nos grupos A & C, a quantidade de fluoreto na solução remineralizadora foi menor que 0,03 ppm. O conteúdo mineral foi avaliado por microradiografia, com intervalos de dois dias na primeira semana e uma vez por semana nos períodos subsequentes. Todos os grupos exibiram desmineralização, porém a desmineralização total pelo sistema de solução foi significativamente maior que a produzida pelo sistema gelatinoso. Somente o grupo com lesão criada pela solução ácida exposto a des-mineralização com 2 ppm de fluoreto (grupo D) apresentou um aumento significativo na quantidade mineral. Concluiu-se com este estudo que os métodos de preparação de lesão afetam o comportamento dessas lesões quando expostas a protocolos de desmineralização e remineralização.

Lynch e ten Cate (2006) avaliaram o comportamento de lesões cáries artificiais em esmalte humano e bovino submetidas à desmineralização e à remineralização, com objetivo de provar duas hipóteses: a. Lesões rasas são mais vulneráveis à desmineralização e b. Lesões profundas são mais difíceis de remineralizar. Para tal, foram utilizados espécimes de dentes humanos (pré-molares) e bovinos, ambos com tamanho de 4 mm x 2mm. As lesões de subsuperfície foram criadas pela exposição do esmalte ao sistema de gel acidificado composto por gel de metilcelulose a 8% coberto com o mesmo conteúdo de ácido láctico a 0,1 mol/L com pH ajustado para 4,6 com KOH, a 37° C, durante 5, 8, 14 e 16 dias, para

produzir lesões com vários intervalos de ΔZ_{base} . Uma fina secção foi cortada para posterior análise. Uma parte desses espécimes já desmineralizados, foram ainda mais desmineralizados pela imersão em uma solução contendo ácido acético a 50mmol/L, cloreto de cálcio dihidratado a 2,25 mmol/L, ortofosfato de potássio dihidrogenado a 1,35 mmol/L e cloreto de potássio a 130mmol/L em pH ajustado a 5,0, por 24 horas. Enquanto a outra porção dos espécimes foram remineralizados em solução neutra contendo Hepes a 20mmol/L, cloreto de cálcio dihidratado a 1,50mmol/L, ortofosfato de potássio dihidrogenado a 0,9mmol/L e cloreto de potássio a 130mmol/L (pH 7,0), por 190 horas. Uma segunda secção foi feita adjacente à primeira, e analisada. Mudanças no conteúdo mineral foram quantificadas utilizando microradiografia transversal comparando-as com a lesão base. Os resultados mostraram que para todos os valores ΔZ_{base} e tanto para o esmalte humano e bovino, lesões de subsuperfície foram criadas formando zonas de superfície bem definidas. Após a subsequente desmineralização, as lesões mantiveram as características de subsuperfície. Além disso, houve uma significativa relação inversa entre o aumento do ΔZ_{base} e a subsequente desmineralização. Já para a remineralização, o ganho mineral foi proporcional ao ΔZ_{base} , ou seja, quanto maior é o ΔZ_{base} , maior foi a remineralização subsequente. Assim, lesões iniciais rasas sofreram uma maior perda mineral quando submetidas à subsequente desmineralização, e lesões profundas apresentaram uma maior remineralização que lesões rasas.

No ano seguinte, Lynch; Mony e ten Cate (2007) avaliaram os efeitos de duas soluções remineralizantes com diferentes proporções de cálcio:fosfato, sendo que uma foi representante de estequiometria da hidroxiapatita (St) e outra da concentração de minerais no fluido de placa (PF), em lesões artificiais *in vitro*. Dois tipos de lesões artificiais de cárie em esmalte foram testadas, ambas com perdas minerais similares, porém um grupo com valor de R alto e outro com baixo valor de R. Para tal, foram preparados espécimes de esmalte de incisivos bovinos (4 X 2 mm), que foram desmineralizados por dois métodos. No primeiro, os espécimes foram imersos em gel polímero fluído de Carbopol C907 a 0,2%, ácido láctico a 0,1M, 50% saturado com hidroxiapatita, com pH ajustado a 5,0, a 37° C, durante 14 dias. No segundo método, os espécimes de esmalte foram cobertos com 2,5 cm de gel de metilcelulose 8%, *overnight*, a 4° C. Na sequência, foram cobertos com conteúdo

similar de ácido láctico a 0,1M com pH ajustado a 4,5 a 37°C, durante 5 ou 6 dias. A partir do grupo do Carbopol, foram selecionadas lesões com valores de distribuição mineral similares aos das lesões de mancha branca (o valor foi definido através de microradiografias feitas de pré-molares humanos com mancha branca, extraídos por razões ortodônticas). Do grupo com sistema do gel ácido foram selecionadas lesões de cárie que tivessem valores de perda mineral mais altos que os valores obtidos pelo sistema carbopol, porém com similar ΔZ . Duas soluções remineralizantes foram preparadas, uma representando St e outra representando PF. A solução St foi composta por Hepes a 20mM, cloreto de cálcio dihidratado a 1,5mM, dihidrogênio de potássio ortofosfato a 0,9mM e cloreto de potássio a 130mM, em pH 7,0. Já a solução PF continha Hepes a 20mM, cloreto de cálcio dihidratado a 1,0mM, dihidrogênio de potássio ortofosfatado a 12,7mM e cloreto de potássio a 130mM, em pH 6,58. Em cada uma dessas soluções foi inserida a metade dos espécimes desmineralizados de cada grupo, por 192 horas a 37° C. Na seqüência, avaliou-se a perda mineral por microradiografia transversal. As lesões com baixo valor de R ($14 \pm 1,56$ % vol - sistema carbopol) apresentaram ΔZ de 1240 ± 272 %vol.µm, profundidade de $88,3 \pm 13,9$ µm e Z_{max} $76,1 \pm 4,21$ %vol. Já as lesões produzidas com alto valor de R ($34,8 \pm 5,14$ %vol – sistema gel ácido) apresentaram ΔZ de 1220 ± 182 %vol.µm, profundidade de $35,8 \pm 7,45$ µm e Z_{max} de $52,7 \pm 7,78$ %vol. As lesões naturais de mancha branca apresentaram ΔZ de 5660 ± 5110 %vol.µm, profundidade de 307 ± 107 µm, Z_{max} de $79,4 \pm 7,54$ %vol e valor de R de $16,3 \pm 6,63$ %vol. Todas as lesões com baixo R remineralizaram com um significativo aumento do Z_{max} e redução da profundidade da lesão. Em alguns espécimes do PF e em todos os do St a característica de subsuperfície foi mantida, com maior remineralização na superfície do que no corpo da lesão. Similarmente ao baixo R, as lesões com alto valor de R também remineralizaram, apresentando redução significativa da profundidade e aumento do Z_{max} . A remineralização com a solução PF foi estendida por todo o corpo da lesão, permitindo quase a completa perda da característica de subsuperfície. Já para a remineralização com a solução St, alguns espécimes apresentaram extensa remineralização ao longo da subsuperfície enquanto outros não. Assim, encontrou-se que o uso da solução remineralizadora PF aumentou significativamente a velocidade e proporção de remineralização em comparação à solução tradicional St para lesões cariosas mais desmineralizadas.

Concluiu-se com este estudo que tanto o tipo de lesão cariosa inicial como o tipo de solução remineralizante tem influência na remineralização do esmalte.

Yamazaki e Margolis (2008) avaliaram a hipótese de que soluções remineralizantes ácidas poderiam solucionar o problema da remineralização preferencial da superfície do esmalte e aumentar a taxa e a profundidade da remineralização da subsuperfície. Tais soluções foram subsaturadas em relação à hidroxiapatita do esmalte, para manter a porosidade da camada mais externa da superfície, e supersaturada em relação à fluorapatita, para promover a remineralização das camadas mais profundas da lesão. Como a camada superficial da lesão pode ter um importante papel na difusão dos íons minerais, foram utilizados dois tipos de lesões relevantes com diferentes características da camada superficial: lesões de superfície amolecida e lesões de subsuperfície. Para tal, foram utilizadas secções de dentes humanos hígidos (130-160 μm) para a produção de lesões de subsuperfície e de superfície amolecida. Os dois tipos de lesões foram produzidas de acordo com Yamazaki, Litman e Margolis (2007). Duas soluções remineralizantes foram utilizadas: uma solução ácida e uma solução neutra. A solução ácida era composta por cálcio a 4mmol/L, fosfato a 15 mmol/L, ácido láctico a 50mmol/L e 20 ppm de fluoreto ajustada a pH 4,8; já a solução neutra continha cálcio a 1,5 mmol/L, fosfato a 0,9mmol/L, ácido láctico a 50mmol/L e 9,6 ppm de fluoreto, ajustada à pH 7,0. Oito secções de esmalte com lesão de cárie superficial ou de subsuperfície foram expostas individualmente a 20 mL de solução remineralizante ácida ou neutra, a 25°C. Em tempos seleccionados (22, 47, 69, 133, 180, 346, 490 e 701 horas) as secções foram removidas e analisadas por microradiografia transversal. A percentagem de conteúdo mineral foi avaliada de acordo com a profundidade da lesão e o tempo. Foram avaliados o tamanho da lesão inicial (μm x % mineral) e a percentagem de recuperação mineral após a remineralização. A análise estatística foi realizada através de comparações de mudanças no valor do conteúdo mineral na camada mais externa (0-100 μm), média (100-200 μm) e mais profunda (200-300 μm) da superfície do esmalte. Para lesões de superfície amolecida, a remineralização preferencial da camada mais externa da lesão foi observada com a solução neutra, mas não com a solução ácida. Melhor deposição mineral na camada mais externa da lesão exposta à solução neutra foi observada após 69, 181 e 346 h, em comparação à porção média da lesão. Em adição, após 69, 181 e 346 h de

exposição, mais mineral foi depositado na porção média da lesão exposta à solução ácida, em comparação à neutra. A taxa de remineralização de toda a lesão foi melhor com a solução ácida até 180 horas; após esse tempo não houve diferença significativa entre as duas soluções. Para as lesões de subsuperfície, a remineralização preferencial da camada mais externa da lesão não foi observada em nenhuma das duas soluções remineralizantes. Entretanto, a taxa e extensão de remineralização da lesão de subsuperfície induzida pela solução ácida foram melhores que a observada pela solução neutra. Ao final do experimento, a solução ácida induziu 57% mais remineralização que a neutra. Houve uma melhora de 50% na profundidade da remineralização da lesão de subsuperfície, induzida pela solução ácida, em comparação à lesão de superfície amolecida. Assim, concluiu-se que a solução remineralizante ácida possui melhor capacidade de aumentar a penetração de íons minerais em comparação à solução neutra, e que a profundidade do processo de remineralização é dependente do tipo de lesão (subsuperfície ou de superfície amolecida).

Segundo Lippert et al. (2011), os estudos sobre o efeito da distribuição mineral de lesões cariosas iniciais na subsequente remineralização *in situ* têm recebido uma atenção limitada por parte dos pesquisadores. Portanto, o objetivo do estudo foi investigar a resposta de lesões com baixo e alto valor R (média da % perda de conteúdo mineral) a uma aplicação de fluoreto duas vezes ao dia, utilizando um modelo de remineralização de cárie *in situ* já estabelecido. Para criar lesões com baixo valor R, foi utilizada uma solução contendo ácido láctico a 0,1M, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 4,1 mM, KH_2PO_4 a 8 mM e 0,2% p/v de Carbopol, ajustado a um pH 5,0 a 37°C durante 11 dias (modificação de WHITE, 1987). Para criar as lesões com alto valor R, os espécimes foram desmineralizados em gel de metilcelulose a 8%, coberto por um mesmo conteúdo de ácido láctico 0,1 M a um pH 4,6, a 37°C, durante 7 dias (modificação de TEN CATE et al., 1996). Dezesseis voluntários utilizaram um dispositivo intraoral mandibular com 8 espécimes de dentes humanos com lesões apresentando diferentes graus de distribuição mineral (4 com baixo valor R e 4 com alto valor R) mas com a mesma perda mineral integrada (ΔZ_{base}) durante 3 e 4 semanas. Os espécimes foram fixados de modo a permitir o acúmulo de biofilme. Os voluntários foram orientados a escovar seus dentes com o dispositivo em posição, tomando cuidado para não escovar os espécimes, duas vezes ao dia durante 1

minuto com dentifrício fluoretado. Após a escovação, foram instruídos a expectorar o *slurry* de dentifrício formado e lavar a boca com 15ml de água durante 10s, visto que esta aplicação se assemelha a um regime típico de higiene bucal. Ao final das 3 e 4 semanas, os espécimes (2 espécimes/período) foram removidos e mudanças no conteúdo mineral foram analisadas por microradiografia transversal (TMR) e quantificação da fluorescência induzida pela luz (QLF). Este estudo revelou que lesões com baixo e alto valor de R mostraram comportamentos opostos, visto que lesões com alto valor de R tende a remineralizar enquanto que lesões com baixo valor R tendem a desmineralizar. Em comparação, a profundidade da lesão aumentou em lesões com baixo valor R, mas manteve-se inalterada em lesões com alto valor de R. Já o conteúdo mineral na camada superficial “pseudo-intacta” da lesão manteve-se inalterada em lesões com baixo valor R e aumentou naquelas com alto valor R. Assim, concluiu-se que a lesões com severidade similares, mas com diferentes graus de distribuição mineral apresentaram diferentes respostas à remineralização *in situ*.

2.2 PRODUÇÃO DE LESÃO CARIOSA EM DENTINA *IN VITRO*

A dentina é composta de 45-50% em conteúdo mineral na forma de hidroxiapatita carbonatada; 30-35% de matriz orgânica, na sua maioria de colágeno tipo I; e o restante por água. O desenvolvimento da cárie dentária ocorre a partir do metabolismo bacteriano, gerando ácidos que se difundem para dentro do esmalte e em sequência para a dentina no caso da coroa; e do cemento para a dentina radicular, no caso da raiz, dissolvendo o mineral e eventualmente destruindo a estrutura da matriz orgânica. A apatita da dentina apresenta-se organizada em cristalitos menores, com maior quantidade de carbonato e é mais susceptível à dissolução quando comparada à apatita do esmalte. Por isso, uma vez que o processo carioso atinge a dentina, a desmineralização pode se processar mais rapidamente pela característica mineral e pela estrutura de organização da dentina, a qual apresenta túbulos dentinários que possibilitam maior difusão do ácido (BERTASSONI et al., 2010; FEJERSKOV; KIDD, 2011). Por outro lado, a exposição da camada de fibrilas de colágeno desmineralizadas pode atuar reduzindo a

progressão da desmineralização (KLETER et al., 1994), e tornar a remineralização um processo mais complexo quando comparado ao esmalte. Além dos eventos químicos inorgânicos, esta camada orgânica desmineralizada pode ser degradada por atividade proteolítica de enzimas, as metaloproteinases da matriz - MMPs são uma família de enzimas capazes de degradar o colágeno. Estudos indicam que esta enzima pode participar da degradação da matriz orgânica da dentina após a dissolução dos minerais (TJADERHANE et al., 1998; VAN STRIJP et al., 2003; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; HANNAS et al., 2007).

Chaussain-Miller et al. (2006) realizaram uma revisão com o objetivo de resumir e destacar o que é conhecido sobre o papel metaloproteinases da matriz (MMPs) no processo carioso em dentina. As MMPs hidrolisam componentes da matriz extracelular e desempenham um papel central em vários processos biológicos e patológicos. Tem-se sugerido que as MMPs desempenham um importante papel na destruição da matriz orgânica da dentina após a desmineralização da mesma pelos ácidos produzidos pelas bactérias, contribuindo para a progressão da lesão cariosa. Após a dissolução da hidroxiapatita, a parte orgânica da dentina, ou seja, a rede de fibrilas de colágeno, juntamente às macromoléculas associadas, tornam-se exposta à degradação enzimática. Tem-se pensado que as collagenases bacterianas são as responsáveis pela destruição da matriz orgânica, visto que as mesmas, em pH neutro, são capazes de digerir o colágeno da dentina cariada. Contudo, estas enzimas bacterianas não resistem ao pH ácido presente na fase de desmineralização e portanto, outros estudos têm sugerido que a contribuição dessas enzimas bacterianas pode ser menos importante do que se pensava inicialmente (DUNG et al., 1995; KAWASAKI; FEATHERSTONE, 1997). Isso implica que as enzimas proteolíticas derivadas do hospedeiro, como as MMPs localizadas na saliva e na própria dentina, podem ter um papel mais importante na degradação da matriz orgânica da dentina. Aceita-se que essas enzimas derivadas do hospedeiro podem ser ativadas pelo pH baixo promovido pelos ácidos liberados pela bactérias cariogênicas, e uma vez ativadas, essas enzimas são capazes de digerir o colágeno exposto na matriz de dentina desmineralizada, após a neutralização do pH pela propriedade tampão salivar.

Entretanto, apesar dessas diferenças entre o processo carioso em esmalte e dentina, devido às diferenças na composição e estrutura destes tecidos,

os eventos químicos básicos que ocorrem durante a dissolução dos minerais durante a formação da lesão cariosa inicial em ambos os substratos parecem ser similares (FEJERSKOV; KIDD, 2011).

Para testar o nível de erro e a reprodutibilidade de um novo procedimento de videodensidade assistido por computador (CAV) para mensurar conteúdo mineral, Inaba, Takagi e Arends (1997) criaram lesões artificiais cariosas em espécimes de dentina humana (n=10), utilizando gel desmineralizante de carboximetilcelulose a 6% que continha ácido láctico a 0,1M (pH 5,0) a 37°C por 2 semanas. Alguns dos espécimes desmineralizados foram, na sequência, remineralizados em uma solução HEPES 20 mM (pH 7,0) contendo 10 ppm de fluoreto (1,1 mM), CaCl_2 a 1,5 mM e KH_2PO_4 a 0,9 mM a 37°C, por 8 dias. Já as lesões cariosas *in vivo* foram obtidas de pré-molares permanentes com lesão cariosa de raiz visível clinicamente, os quais foram extraídos por razões ortodônticas. Foram avaliados parâmetros de distribuição mineral, profundidade de lesão, hipermineralização na camada superficial e perda mineral de subsuperfície. A profundidade da desmineralização para a lesão criada foi de $70 \pm 3 \mu\text{m}$, com perda mineral integrada de $2018 \pm 52 \text{ \% vol.}\mu\text{m}$. Concluiu-se que o uso do método CAV apresenta a vantagem pela visualização da distribuição mineral das lesões (% vol) em figuras que proporcionam uma efetiva comparação com dispositivo em cores, visto que o olho humano é mais sensível a mudanças de cores do que contrastes monocromáticos, além de permitir que lesões com distribuição mineral complexas em regiões de interesse sejam avaliadas.

No ano seguinte, Damen, Buijs e ten Cate (1998) investigaram a relação entre ganho de fluoreto em espécimes de dentina bovina, e as propriedades das camadas mineralizadas durante a desmineralização *in vitro*. Além disso, determinaram se o fluoreto incorporado funcionaria como proteção à dentina em futuros desafios cariogênicos, mesmo sem este estar presente na solução. Todos os espécimes (n=9/grupo) foram imersos em uma solução desmineralizante composta de CaCl_2 a 2,2 mM, KH_2PO_4 a 2,2 mM, ácido acético 50 mM ajustada a pH 5,0, a 37°C durante 8 dias. Durante o primeiro, o terceiro ou o sexto dia, alguns espécimes foram retirados da primeira solução e incubados individualmente por 24 horas em uma solução desmineralizante com fluoreto a 0,5, 2 ou 5 ppm F^- na forma de NaF. Após esse período eles retornaram à solução desmineralizante inicial. Após o

segundo, o quinto e oitavo dia, 3 espécimes foram retirados de cada grupo para análise por microradiografia transversal, para avaliar a profundidade da lesão e a camada superficial mineralizada. Ao final das exposições, o pH das soluções foi medido, e a concentração de fluoreto e cálcio na solução foi mensurada. Houve uma relação linear inversa entre os valores de ganho de fluoreto e perda de cálcio para os espécimes desmineralizados na presença de fluoreto no primeiro dia. No entanto, essa relação linear não foi observada para os espécimes expostos ao fluoreto nos últimos dias de desmineralização. Assim, a perda de cálcio dependeu da concentração do fluoreto na solução (quanto maior a concentração de fluoreto menor foi a perda de cálcio) e do período da desmineralização o qual o fluoreto esteve presente. A desmineralização com a presença de fluoreto no primeiro dia de incubação levou à formação de uma camada superficial mineralizada. Durante a subsequente desmineralização na ausência do fluoreto, a densidade da distribuição da camada superficial manteve-se inalterada. A presença de fluoreto somente no último dia de desmineralização resultou na formação de uma camada mineralizada a uma profundidade entre 60 e 150 μm . O conteúdo mineral da camada superficial aumentou linearmente com o aumento da concentração do fluoreto. Este efeito ocorreu como resultado da reprecipitação dos íons minerais dissolvidos formando uma camada de apatita enriquecida com fluoreto. Ao mesmo tempo, a presença dos túbulos dentinários permitiu que o ácido penetrasse no tecido, provocando uma desmineralização em profundidade, enquanto a camada mineralizada enriquecida com fluoreto permaneceu intacta. Portanto, esta camada superficial rica em fluorapatita não ofereceu proteção à dentina em relação à subsequente desmineralização em profundidade.

Com o objetivo de comparar lesões cariosas naturais em raiz com lesões cariosas artificiais produzidas em dentes humanos por diferentes soluções desmineralizantes, McIntyre, Featherstone e Fu (2000) realizaram um estudo utilizando três soluções desmineralizantes que, segundo os autores, são soluções bem caracterizadas para o esmalte. A solução (A) continha ácido acético a 50 mM, Ca^{+2} a 2,2 mmol/L e PO_4^{-3} a 2,2 mmol/L ajustado a pH de 4,3; a solução (L) continha ácido láctico a 0,1 M, metilhidroxidifofanato (MHDP) ajustado a um pH de 5,0; já o protocolo (G) continha um gel a 20%, ácido láctico a 50 mM, hidroxiapatita 1,0 g/L ajustado a um pH 4,3. Os 115 espécimes foram imersos individualmente em 40mL

das soluções ou gel ácidos durante 7, 14, 21, e 28 dias para os grupos (L) e (G), e de 1 a 60 dias para (A). Foram selecionados 30 dentes humanos que exibiam vários graus de cárie de raiz após análise visual. Após este período, os espécimes foram seccionados ao meio e metade foi analisada por microdureza e a outra metade por microscopia de luz polarizada. A partir da dureza, perfis de % conteúdo mineral foram obtidos utilizando a fórmula empírica descrita por Featherstone et al. (1983). Todas as soluções produziram lesões de subsuperfície, porém os espécimes submetidos aos diferentes protocolos apresentaram diferenças em relação à profundidade da lesão na microscopia de luz polarizada, sendo a solução (A) com maior profundidade que a (L) e ambas significativamente mais profundas que (G). A lesão criada pela solução (A) apresentou-se similar às lesões naturais em termo de profundidade. Em geral, o processo de desmineralização, tanto para as lesões naturais quanto para as artificiais, resultou em redução da % de conteúdo mineral de 45 para valores entre 15 e 25%.

Buchalla et al. (2003) avaliaram em um estudo *in vitro* o efeito de diferentes concentrações de óleo de oliva em emulsões com água na progressão da lesão sob condições de desmineralização em dentina. Para tal, 180 espécimes de dentina bovina foram confeccionados e distribuídos em quatro grupos (n=45) de acordo com o pré-tratamento: grupo 1 – emulsão óleo de oliva a 50% em água destilada; grupo 2 - óleo de oliva a 5% em água destilada; grupo 3 – apenas água destilada (pH 6,5); e grupo 4 – 1500 ppm de F^- em solução de fluoreto de sódio diluído em água destilada. Todos os espécimes foram submetidos a 3 ciclos de 5 minutos de pré-tratamento e 8h em uma solução desmineralizante ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 3 mmol/l, KH_2PO_4 a 3 mmol/l, ácido acético 50 mmol/l, metildifosfanato a 6 μ mol/l, traços de timol ajustada a um pH 5) por dia. Os ciclos foram realizados durante 9 dias, e ao final de cada dia, 5 espécimes de cada grupo foram removidos e a profundidade da lesão e perda mineral integrada (ΔZ) foi determinada. A profundidade da lesão aumentou com o tempo para todos os grupos, já a perda mineral integrada (ΔZ) foi maior apenas para os grupos 1, 2 e 3. Uma pequena, porém significativa diminuição na perda mineral integrada foi observada nos espécimes tratados com lipídeos quando comparados aos espécimes do grupo da água, entretanto, o tratamento com fluoreto foi consideravelmente mais efetivo. A média de perda mineral integrada (média $\pm$ DP, %vol. μ m) para todo o período

estudado foi 4.368 ± 1.599 ; 4.536 ± 1.823 ; 4.849 ± 1.798 ; e 789 ± 177 %vol. μm para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. De um modo geral, o efeito protetor observado na emulsão de óleo de oliva embora significativa foi pequeno. Ainda são necessários mais estudos sobre o assunto.

Preston, Smith e Higham (2008) investigaram o processo de remineralização de lesões de subsuperfície em dentina, visto que a remineralização da dentina é influenciada não somente pela área reativa de superfície dos cristais residuais, mas também pela matriz orgânica remanescente e a organização estrutural da lesão. A remineralização das lesões artificiais radiculares foi avaliada de acordo com duas variáveis, a concentração de fluoreto no intervalo de 0 a 5 ppm F^- ; e o conteúdo mineral e morfologia das lesões cáries iniciais. Vinte molares humanos foram distribuídos em dois grupos para desmineralização segundo protocolo de ten Cate e Duijsters (1982), sendo que o grupo A permaneceu na solução (Ca^{+2} a 2,2 mM, PO_4^{-3} a 2,2 mM e ácido acético a 50 mM, ajustado ao pH 5,0 a 37°C) por 5 dias e o grupo B por 2 dias. Os espécimes com lesão cáries artificial foram expostos durante 5 dias à remineralização em saliva artificial na presença de 0; 0,48; 2,49 e 4,91 ppm F^- na forma de NaF. As soluções foram avaliadas em relação ao cálcio, fosfato e fluoreto e os espécimes por microradiografia transversal. A lesão formada pelo grupo A apresentava $1925,4 \pm 299,3$ %vol. μm , profundidade de $100,9 \pm 11$ μm e camada superficial com 28 ± 6 % vol min. Já a lesão formada pelo grupo B apresentava $1376,7 \pm 259,1$ %vol. μm , $57,8 \pm 9,0$ μm de profundidade e camada superficial de $24,9 \pm 5,8$ %vol. O fluoreto em baixas concentrações promoveu um aumento significativo na deposição mineral durante a remineralização das lesões de subsuperfície em dentina, sendo que para ambos os grupos, todas as concentrações de fluoreto diferiram significativamente do controle. O tamanho e a integridade da camada superficial inicial tiveram influência no mecanismo de deposição mineral subsequente. Para as lesões do grupo A, a área superficial teve uma espessura de 50 μm . Durante a remineralização, os cristais cresceram rapidamente dentro da camada superficial, reduzindo assim o potencial de transportar íons minerais em maior profundidade. Já a camada superficial do grupo B apresentou menor espessura; portanto, os minerais foram depositados na subsuperfície em maior profundidade. Assim, a taxa de difusão do fluoreto para dentro da lesão foi fortemente influenciada pela distribuição e quantidade mineral

das lesões iniciais, especialmente em relação à camada superficial “pseudo intacta”. Nenhum comentário foi feito em relação à matriz orgânica e seu efeito na remineralização, visto que estes métodos não permitem distinguir se houve crescimento do mineral residual ou se houve uma nova nucleação mineral. Além do mais, o modelo de desmineralização usado não levava em conta a degradação orgânica que pode ocorrer *in vivo*.

No ano seguinte, Marquezan et al. (2009) realizaram um estudo com o objetivo de comparar lesões cáries artificiais desenvolvidas usando dois métodos químicos e um microbiológico em relação às lesões cáries naturais em dentina. Para tal, 40 dentes humanos decíduos hígidos e 10 segundos molares decíduos cariados foram divididos em 5 grupos. Os grupos experimentais foram definidos de acordo com o método de indução de cárie: (1) dentes hígidos (controle negativo); (2) gel ácido; (3) ciclagem de pH; (4) método microbiológico e (5) dente com lesão cáries natural em dentina (controle positivo). Foram extraídos segundos molares decíduos cariados com lesão oclusal a qual em corte longitudinal apresentava 2 mm de profundidade da junção amelodentinária mensurados com uma sonda periodontal. Já para os dentes hígidos, foram preparadas cavidades de classe I, com dimensões de 2mm X 4mm X 2mm. Todas as superfícies de esmalte foram protegidas de modo se expor somente a dentina. O gel ácido continha ácido láctico, gelatina e timol, ajustado a um pH de 4,5. Os espécimes foram imersos em 10 ml do gel a temperatura ambiente por 14 dias. Para a ciclagem de pH, os espécimes foram imersos em 10 ml de solução desmineralizante (CaCl_2 a 2,2 mM, NaH_2PO_4 a 2,2 mM e ácido acético a 50 mM, ajustado a pH 4,8) por 8h e 10 ml de solução remineralizante (CaCl_2 a 1,5mM, NaH_2PO_4 a 0,9 mM e KCl a 0,15M, ajustado a um pH 7,0) por 16h, durante 14 dias em temperatura ambiente e sem agitação. O modelo microbiológico continha 3,7 g de infusão de cultura de ágar cérebro-coração suplementado com 0,5 g de extrato de levedura, 2,0 g de sacarose, 1,0 g de glicose em 100 ml de água destilada e 100 µl de cultura jovem primária de *Streptococcus mutans* ATCC25175, com a pH em torno de 4,0. Os espécimes foram imersos individualmente em 25 ml da solução a 37°C durante 14 dias. Após este período, todos os espécimes foram seccionados perpendicularmente ao longo eixo, ao centro da cavidade, e duas metades foram obtidas. Uma metade foi incluída em resina e a analisada por microdureza longitudinal a 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400

e 500µm da superfície da dentina em direção à polpa. Dois espécimes de cada grupo foram preparados e analisados pelo SEM. Os valores de microdureza foram registrados em KgF/mm². O grupo gel ácido apresentou valores de dureza significativamente mais altos quando comparado à lesão de cárie natural, com exceção à profundidade de 10µm. A partir da profundidade de 100µm, o gel ácido apresentou valores de dureza similares ao da dentina sadia. O método de ciclagem de pH apresentou valores de dureza similares aos de cárie natural em dentina até a profundidade de 40µm, e valores menores que a dentina hígida até a profundidade de 200µm. Não foi possível medir a dureza da lesão produzida pelo método microbiológico até a profundidade de 50µm, provavelmente pela possível degradação da camada orgânica desmineralizada, ou talvez pelo alto desafio cariogênico (pH 4,0). A partir deste estudo, verificou-se que os métodos químicos de produção de cárie produziram uma desmineralização superficial e a ciclagem de pH apresentou-se mais efetiva que o gel ácido em relação à similaridade com a lesão natural. Já o método microbiológico apresentou excessivo amolecimento na dentina primária, mas com padrões morfológicos similares de degradação do colágeno ao das lesões naturais em dentina.

Recentemente, Bertassoni et al. (2010) realizaram um estudo com o objetivo de definir as condições que facilitem e melhorem a deposição de minerais na matriz de dentina desmineralizada. Espécimes de dentina humana (3,5 X 2 mm) foram expostos a uma solução desmineralizante que continha ácido acético 50 mM, cálcio e fostato a 2,2mM e timol a 0,1%, ajustado a um pH 5, a 37°C durante 8h para criar uma lesão de aproximadamente 30µm de profundidade a qual foi aferida pelo microscópio de luz polarizada. Compararam-se dois tipos de remineralização, uma com contínuo reabastecimento de íons cálcio e fosfato, e outra estática, onde a formação mineral ocorreu somente até a solução atingir o equilíbrio de saturação em relação à apatita, sendo que as composições iniciais das soluções remineralizadoras foram similares (CaCl₂ a 1,5 mM, KH₂PO₄ a 0,9 mM, KCl a 147 mM e KOH a 1 mM, ajustado ao pH 7,4). As lesões foram remineralizadas por 5 dias e avaliadas diariamente (n=3 por período de tempo) por nanoindentação e por microscópio eletrônico de varredura. Os resultados deste estudo confirmaram a hipótese de que formação de minerais controlada e contínua pelo 1º método de remineralização facilita o restabelecimento das propriedades mecânicas da dentina. A

remineralização pelo 1º método possibilitou a recuperação das propriedades mecânicas da dentina desmineralizada em 60% quando comparadas à da dentina normal, enquanto a remineralização estática recuperou apenas 10%. A análise das imagens revelou que a remineralização estática formou áreas sugestivas de precipitação de apatita na superfície da matriz da dentina. Em contraste, a remineralização controlada e contínua permitiu a precipitação de minerais dentro da lesão e associação com a matriz colagenosa. Em resumo, a disponibilização contínua de cálcio e fosfato favorece a remineralização e a recuperação das propriedades mecânicas por permitir a associação entre os minerais e a matriz orgânica. Por outro lado, a remineralização estática parece favorecer a precipitação na superfície, possivelmente devido à pobre associação dos minerais com as camadas orgânicas.

Da mesma forma que para o esmalte, cada trabalho tem utilizado um protocolo específico, sendo que não há uma preocupação em relação ao impacto do tipo de lesão produzida no efeito do agente preventivo testado. Dessa forma é de suma importância que estes protocolos sejam comparados para um melhor embasamento na escolha do protocolo experimental adequado, uma vez que o tipo de lesão produzida pode ter influência sobre a remineralização (TEN CATE, 1994; PRESTON et al., 2008; BERTASSONI et al., 2010).

2.3 PRODUÇÃO DE LESÃO CARIOSA *IN SITU*

Com o objetivo de responder se há um consenso no mecanismo de desmineralização e remineralização *in situ*, ten Cate (1994) revisou dados quantitativos nos processos de desmineralização e remineralização *in situ*, avaliando os aspectos físico-químicos. Segundo o autor, modelos *in situ* são utilizados com dois propósitos. O primeiro objetivo é a obtenção de conhecimento sobre os processos físicos e etiológicos que dão origem à cárie, com foco na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. Adicionalmente, os modelos *in situ* foram desenvolvidos com o objetivo de se testar agentes para prevenção da cárie dentária. Para os estudos *in situ* diversos tipos de aparelhos têm sido desenvolvidos, de modo a expor os espécimes ao ambiente intra-bucal. Os

espécimes podem ser confeccionados no formato retangular ou como secções únicas, podendo ambos ter uma área controle protegida com esmalte de unha ou resina acrílica. Além disso, há variabilidade na posição dos espécimes (face livre ou interproximais), sendo que na maioria dos casos, os espécimes são posicionados de modo que o acúmulo de biofilme seja possibilitado. Dependendo da quantidade de biofilme retido e do acesso da saliva e nutrientes, pode-se conduzir ao ganho ou perda mineral. É importante ressaltar, que essas diferenças no delineamento dificultam a comparação de dados entre os estudos. Dados de experimentos em modelos de desmineralização *in situ* mostraram que as lesões em esmalte são formadas em média com uma taxa de perda mineral de 29%vol.µm/dia, enquanto que para a dentina este valor é de 89%vol.µm/dia. Nesses estudos, foi encontrada uma proporção linear entre perda mineral e profundidade da lesão. É importante ressaltar que, para a dentina vital a formação de lesão cariiosa é retardada pela esclerose dos túbulos dentinários, o que não acontece *in situ*. É importante ainda considerar as várias etapas do desenvolvimento da cárie *in situ* que podem ser descritas como (1) a dissolução e transporte de carboidratos fermentáveis através da cavidade e sua difusão no biofilme dentário; (2) a degradação do açúcar pelas bactérias, resultando na produção de ácido; (3) difusão do ácido pela superfície do esmalte/dentina e corpo da lesão; (4) dissolução dos minerais; e (5) difusão dos minerais dissolvidos para o ambiente externo. Já a avaliação das etapas de remineralização *in situ* é mais difícil que para a desmineralização, que começa com o tecido hígido. Na remineralização encontra-se uma relação entre a quantidade de deposição mineral e a severidade da lesão inicial. A taxa de deposição parece ser correlacionada com a profundidade da lesão pré-formada e com a presença de uma camada “pseudo-intacta”. Isso sugere que o número de sítios disponíveis para a precipitação do cálcio e fosfato é um importante parâmetro. Contudo a taxa de íons minerais fornecidos pela saliva pode ser um fator limitante. Concluiu-se assim, que um consenso em relação aos modelos de desmineralização e remineralização *in situ* não foi alcançado.

Clasen e Ogaard (1999) apresentaram alguns modelos experimentais intra-orais utilizados em pesquisas com fluoreto e discutiram algumas implementações, assim como, o método de avaliação mais utilizado. Nos modelos experimentais *in situ*, tecidos dentários de diferentes origens são submetidos à

microbiota, nutrição cariogênica e saliva; como resultado, lesões cariosas iniciais são desenvolvidas. Para tal, desenvolveram-se dispositivos que podem ser posicionados no palato, nas faces livres ou nas faces linguais dos dentes, ou até nas faces interproximais, de modo que se permita o acúmulo de biofilme dentário necessário para a desmineralização ocorrer. Deve-se avaliar ainda o método de esterilização do substrato, pois este pode danificar o substrato e alterar os subseqüentes resultados. Segundo os autores, por manter os espécimes úmidos durante o procedimento e por não submetê-los a altas temperaturas, a esterilização pela irradiação gama é o método de escolha. Como substrato, o esmalte bovino é considerado com boa reprodutibilidade, especialmente quando 200 µm da superfície externa são removidos. A composição química do esmalte bovino varia menos quando comparada a do esmalte humano e apresenta menor concentração de fluoreto. Devido a sua alta porosidade, a lesão se desenvolve mais rapidamente em esmalte bovino em relação ao esmalte humano. Em relação à dentina, cuidados são necessários na preparação e avaliação para evitar ressecamento dos espécimes. O desenvolvimento da lesão cariosa *in vivo* é um processo intermitente. Quando o equilíbrio mineral é alterado pela desmineralização e remineralização, o resultado é a formação de lesão ou reparo. A remineralização *in situ* de lesões produzidas em laboratório tem sido utilizada em diversos estudos, e é dependente do tamanho da lesão inicial. Além disso, a severidade do desafio cariogênico pode influenciar a reatividade do tecido e conseqüentemente o desenvolvimento e progressão da lesão. Os modelos de remineralização *in situ* na maioria das vezes testam os agentes anti-cárie em desafios cariogênicos moderados a baixos. Nos modelos intra-orais, somente lesões em seu estado inicial são estudadas, e para avaliar as mudanças na quantidade mineral são necessárias técnicas de análise avançadas. Nas últimas duas décadas, dois métodos quantitativos foram frequentemente utilizados para avaliação da desmineralização e remineralização: a microradiografia transversal (TMR) e a microdureza longitudinal (CSH). Entre eles, o TMR é considerado a melhor técnica quantitativa para medir conteúdo, mudanças e distribuição mineral. Portanto, os protocolos *in situ* apresentam vantagens e desvantagens, sendo que os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela para situações clínicas.

Com o propósito de avaliar se a alta cariogenicidade da sacarose é atribuída exclusivamente à produção da matriz do biofilme dentário rico em polissacarídeos insolúveis e de se correlacionar a concentração inorgânica do Ca^{+2} , PO_4^{-3} e F^- no biofilme dentário formado na presença de sacarose ou glicose e frutose, Cury et al. (2000) realizaram um estudo *in situ*, no qual 12 voluntários utilizaram dispositivos palatinos intraorais de acrílico por três fases de 28 dias. Esses aparelhos intraorais foram confeccionados com 4 sítios, e em cada sítio foi posicionado um espécime de esmalte humano (3x3x3 mm) com cera. Para permitir o acúmulo de biofilme e protegê-lo contra distúrbios mecânicos, uma tela plástica foi fixada, deixando um espaço de 1mm da superfície do espécime de esmalte. Os voluntários realizaram tratamentos com solução de sacarose a 20% e solução de glicose 10% e frutose 10%, 8x/dia, de acordo com a fase experimental. Após 5 minutos da exposição ao açúcar, os dispositivos eram recolocados na boca. No grupo controle, nenhuma solução foi gotejada sobre o esmalte. Durante toda a fase experimental e entre as fases, os voluntários escovaram seus dentes com dentífrico não fluoretado. Depois de cada fase, o biofilme dentário foi utilizado para análise da quantidade de cálcio, fósforo e fluoreto e de polissacarídeos extracelulares. Os espécimes de dente foram avaliados por exame visual em relação à presença ou não de lesão de mancha branca. Os resultados da microdureza superficial e longitudinal mostraram que o biofilme dentário formado na presença de sacarose foi mais cariogênico que o formado na presença de glicose e frutose. No grupo glicose mais frutose a variação de %PDS foi de $-44,2 \pm 7,2$ e o ΔKHN (definido neste artigo como perda de área integrada pela profundidade) foi de $20.159,5 \pm 2.213 \text{ KgF/mm}^2.\mu\text{m}$. Já o grupo sacarose a variação de %PDS foi de $-73,4 \pm 6,9$ e o ΔKHN foi de $12.414,4 \pm 2.419 \text{ KgF/mm}^2.\mu\text{m}$. A avaliação clínica da cárie dentária mostrou que 90% dos espécimes de esmalte tratados com sacarose exibiram lesão de mancha branca, enquanto apenas 56% dos espécimes tratados com glicose e frutose apresentaram lesão visível e nenhum espécime do grupo controle exibiu lesão de mancha branca. A análise da matriz extracelular mostrou que a concentração de carboidratos no biofilme dentário foi maior no grupo de sacarose que nos grupos controle e glicose mais frutose. Embora a concentração de cálcio, fósforo e fluoreto seja menor no biofilme formado na presença de sacarose que na presença de frutose mais glicose e no grupo controle, apenas foi observada

diferença significativa em relação ao grupo controle. Assim, o presente estudo sugere que a composição do biofilme dentário tem influência sobre a cariogenicidade e que, embora a matriz de polissacarídeo extracelular (glicano) seja o principal fator para a alta cariogenicidade do biofilme formado em presença de sacarose, os padrões distintos dos polissacarídeos extracelulares e a baixa concentração de cálcio, fósforo e fluoreto devem ser considerados.

Hara et al. (2003) testaram se dentina bovina radicular apresenta comportamento similar à dentina humana em experimentos *in situ* na progressão e inibição de cárie de raiz, e se o biofilme formado sobre os tipos de dentina é similar em termos de *Streptococcus mutans*. O estudo boca dividida com delineamento de indução da cárie através do acúmulo de biofilme e uso de sacarose foi realizado em uma fase de 14 dias, com 11 voluntários, e com duas variáveis sob análise: o substrato (dentina humana e bovina) e o tratamento (dentrífcio fluoretado e não fluoretado). Para tal, o experimento foi dividido em grupo 1 (dentina humana e dentrífcio não fluoretado), grupo 2 (dentina humana e dentrífcio fluoretado), grupo 3 (dentina bovina e dentrífcio não fluoretado) e grupo 4 (dentina bovina e dentrífcio fluoretado). Aparelhos palatinos intraorais de acrílico foram confeccionados com 4 sítios, e em cada sítio foi posicionado um espécime com cera. Para permitir o acúmulo de biofilme e protegê-lo contra distúrbios mecânicos, uma tela plástica foi fixada, deixando um espaço de 1mm da superfície do espécime. Os grupos 1 e 3 foram fixados no mesmo lado do acrílico e conseqüentemente os grupos 2 e 4 foram fixados no lado oposto. Uma semana antes do início do experimento e durante toda a fase experimental os voluntários utilizaram dentrífcio não fluoretado para a higiene bucal. Para promover o desafio cariogênico, os voluntários foram instruídos a remover os aparelhos e gotejar solução de sacarose a 20% em todos os espécimes 4x/dia. O tratamento com o dentrífcio foi realizado após as principais refeições, 3x/dia, durante o período habitual de higiene bucal dos voluntários, no qual foram gotejados *slurries* (1:3) do dentrífcio não-fluoretado e fluoretado nos espécimes dos grupos 1/3 e 2/4, respectivamente. Após 14 dias, as seguintes variáveis de resposta foram avaliadas: variação da perda mineral integrada (ΔZ) e profundidade de lesão (μm) determinada pela microdureza longitudinal e microscopia de luz polarizada; e contagem da população de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus* totais no biofilme formado sobre a dentina. A análise microbiológica mostrou não haver

diferença significativa na quantidade total de bactérias no biofilme formado tanto em dentina bovina quanto sobre a humana, e para os tratamentos com dentifrício fluoretado ou não. Os valores da perda mineral integrada (ΔZ) e a profundidade de lesão na dentina tratada com dentifrício fluoretado foi significativamente menor que os valores na dentina tratada com dentifrício não fluoretado, independente da origem da dentina. Os valores de ΔZ e profundidade da lesão entre dentina humana e bovina não foram estatisticamente diferentes (humano/não-fluoretado – $243,4 \pm 173,3$ %vol. μm e $35,8 \pm 23,5$ μm de profundidade; humano/fluoretado – $55,6 \pm 77,2$ %vol. μm e $7,7 \pm 10,5$ μm ; bovino/não-fluoretado – $211,7 \pm 113$ %vol. μm e $31,1 \pm 17,6$ μm ; e bovino/fluoretado – $2,8 \pm 107,6$ %vol. μm e $8,3 \pm 8,0$ μm). Assim, concluiu-se que a dentina bovina pode ser usada como substituta para a dentina humana em estudos *in situ*.

Aires et al. (2006) avaliaram, em um estudo *in situ* cego e cruzado, o efeito da concentração de sacarose na acidogenicidade e composição química do biofilme e a relação com a desmineralização do esmalte. O estudo foi realizado em três fases experimentais de 14 dias, nas quais 12 adultos saudáveis, de 19 a 28 anos, utilizaram dispositivos palatinos intraorais de acrílico, com 4 espécimes de esmalte dentário bovino que foram submetidos aos seguintes tratamentos extra-bucais: soluções com água destilada e deionizada e sacarose a 1, 5, 10, 20 e 40%, 8x/dia. Em cada fase experimental, os tratamentos foram realizados aos pares: solução placebo e sacarose a 1%; sacarose a 10 e 20%; e sacarose a 5 e 40%. O uso de dois tratamentos (boca dividida) na mesma fase é suportado por estudos prévios e pelos resultados de um estudo piloto. Durante 7 dias antes do início do experimento, no período de descanso entre as fases e durante as fases experimentais, os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado para a higiene bucal. No final de cada fase experimental, a acidogenicidade, composição inorgânica e quantidade de polissacarídeos insolúveis no biofilme formado sobre os espécimes de esmalte, além da dureza dos espécimes, foram analisados. Foi calculada a % perda de dureza de superfície e a partir da dureza longitudinal os valores foram convertidos em conteúdo mineral (%vol min) pela fórmula de Featherstone et al. (1983) e a perda mineral integrada foi calculada segundo White e Featherstone (1987). O grupo controle apresentou 253 ± 129 %vol. μm . Os espécimes tratados com sacarose a 1% apresentaram uma perda mineral integrada de 382 ± 224 %

vol.µm, diferindo dos grupos com sacarose a 5, 10 e 20% (796 ± 600 ; 1050 ± 1240 ; e 1580 ± 1540 %vol.µm, respectivamente). Os resultados mostraram que a solução de sacarose a 1% foi menos cariogênica que as outras concentrações maiores e os espécimes tratados com solução de sacarose a 5, 10 e 20% não diferiram significativamente entre si em termos de perda mineral. O grupo tratado com solução de sacarose a 40% (1600 ± 862 % vol.µm) apresentou maior perda mineral comparado aos grupos tratados com solução de sacarose a 5 e 10% ($p < 0,05$). Além disso, solução de sacarose a 40% ainda foi capaz de aumentar a concentração de polissacarídeos insolúveis no biofilme formado. Os resultados sugerem que o limiar da concentração de sacarose para a formação de um biofilme cariogênico é 5%, o qual tem o mesmo potencial cariogênico que o observado para as soluções de sacarose a 10 ou 20%.

Mais recentemente, Cury et al. (2010) investigaram o efeito de dentifrícios convencionais e de baixa concentração de fluoreto no esmalte de dentes decíduos expostos a desafios cariogênicos com o aumento na frequência da exposição à sacarose e acúmulo de biofilme. Além disso, a capacidade desses dentifrícios em aumentar e reter fluoreto no fluido do biofilme foi avaliado para apoiar as constatações. Os fatores avaliados foram os dentifrícios com 500 e 1100 ppm F⁻ (convencional) e a frequência de aplicação da solução de sacarose a 20% (duas, quatro, seis ou oito vezes ao dia). Espécimes de esmalte humano decíduos (3 mm x 3 mm x 3 mm) foram obtidos e fixados em um dispositivo intra-oral palatino, onde 8 cavidades foram criadas, sendo 4 de cada lado. Uma tela plástica foi fixada sobre cada cavidade para proteger contra atritos mecânicos, deixando 1 mm de espaço para o acúmulo do biofilme dentário. Os voluntários foram divididos aleatoriamente em 4 fases de 14 dias, nas quais a solução de sacarose foi aplicada extra-oralmente, por 5 minutos, em uma das duas situações seguintes: duas e oito vezes ao dia, ou quatro e seis vezes ao dia. Segundo os autores, este delineamento de estudo boca dividido é suportado por estudos prévios. Durante duas fases os voluntários utilizaram dentifrícios com 500 ppm F⁻ e durante as outras duas, dentifrícios com 1100 ppm F⁻ (delineamento cruzado). No último dia do experimento, o biofilme formado foi coletado de dois espécimes de cada lado, antes e após a escovação com o dentifrício utilizado. Ao final do experimento, todos os espécimes de esmalte foram removidos e submetidos à avaliação da desmineralização

superficial, para o cálculo da porcentagem de perda de dureza superficial. Além disso, um dos espécimes de esmalte de cada tratamento foi submetido à análise da dureza longitudinal e os dados expressos em número de dureza knoop (Kg/mm^2). A perda de dureza integrada (ΔKHN) também foi calculada. A concentração total de fluoreto incorporada ao esmalte também foi determinada em dois espécimes de cada tratamento. Os dados do presente estudo sugerem que dependendo do desafio cariogênico induzido, o dentifrício com baixa concentração de fluoreto pode não apresentar o mesmo efeito anti-cárie que os dentifrícios com 1100 ppm F^- . O fluoreto incorporado ao fluído e a porção sólida do biofilme foi estatisticamente maior quando o dentifrício convencional foi utilizado. Tanto a desmineralização do esmalte, como a concentração de fluoreto no esmalte, mostraram-se significativamente maiores quanto maior a frequência de exposições à sacarose. Somente o dentifrício convencional reduziu significativamente à progressão da lesão cariosa conforme aumentou-se a frequência de exposições à sacarose. Assim, a alta disponibilidade de fluoreto no biofilme, resultado do uso de dentifrícios convencionais, pode ser importante para reduzir a progressão da cárie quando o esmalte é submetido a freqüentes exposições à sacarose.

No mesmo ano, com o objetivo de avaliar a interação entre erosão e o processo carioso, Honório et al. (2010) compararam através de um estudo *in situ* / *ex vivo* o efeito de desafios erosivos, cariogênicos e combinados (erosivos mais cariosos) na desmineralização de subsuperfície do esmalte humano. Oito voluntários realizaram o estudo com um total de 2 fases de 14 dias, e um período de descanso de 7 dias entre elas. Na primeira fase, os espécimes foram submetidos à erosão somente e à erosão com acúmulo de biofilme. Já na segunda fase, os espécimes foram submetidos à erosão mais desafios cariogênicos e somente a desafios cariogênicos, ambos com acúmulo de biofilme. A variável de resposta foi dureza longitudinal, convertida em perda integrada de dureza (ΔKHN). Para tal, espécimes de esmalte humano (4 mm X 4 mm X 3 mm) com dureza superficial entre $348 \pm 18 \text{ kPa.mm}^2$ foram selecionados. Foram confeccionados dispositivos intra-orais palatinos com 4 cavidades, sendo 2 de cada lado do aparelho. Para o grupo somente erosão, os espécimes foram fixados de modo que a sua superfície estivesse no mesmo nível do acrílico. Já para os demais grupos, os espécimes foram fixados com sua superfície 1mm abaixo do acrílico e com uma tela plástica, de

modo a permitir o acúmulo de biofilme. Na primeira fase, o aparelho com os grupos somente erosão e erosão mais biofilme foi removido e imerso em 150 ml de refrigerante à base de cola, por 5 minutos, 3 vezes ao dia. Já na segunda fase, somente a metade do aparelho correspondente ao grupo erosão e cárie com placa foi imerso no refrigerante, durante 5 minutos, 3 vezes ao dia. Contudo, em todos os espécimes da segunda fase foi gotejada solução de sacarose a 20%, oito vezes ao dia. Após os 14 dias, os espécimes foram removidos e submetidos às análises. Além da dureza longitudinal, os espécimes foram examinados através do microscópio de luz polarizada. Os grupos somente erosão e erosão mais biofilme apresentaram uma superfície amolecida de 10µm de profundidade e não diferiram significativamente quanto à profundidade da lesão. Os grupos somente cárie e erosão mais cárie, ambos com acúmulo de biofilme, produziram lesões subsuperficiais com profundidades similares até 220µm, sendo que o grupo com o desafio cariogênico somente ($188.174 \pm 9.581 \text{ kPa/mm}^2 \cdot \mu\text{m}$, $206,3 \pm 38,9 \mu\text{m}$) apresentou maior perda de dureza integrada que o grupo erosão mais cárie, indicando que os desafios combinados não promovem um efeito aditivo na desmineralização de subsuperfície.

Com base nesta revisão de literatura, os modelos de estudo *in situ* têm sido utilizados para avaliar as propriedades cariogênicas e anti-cariogênicas de produtos odontológicos contendo fluoreto (TEN CATE, 1994). Este tipo de experimento é considerado como um estágio intermediário entre estudos *in vitro* e *in vivo*, permitindo o controle das condições clínicas relacionadas ao desenvolvimento da cárie dentária (ZERO, 1995; CLASEN; OGAARD, 1999). Contudo, não há relatos na literatura que comparem as lesões formadas em estudos *in situ* com as do estudo *in vitro* ou mesmo às lesões cariosas naturais.

2.4 LESÃO DE CÁRIE INICIAL *IN VIVO*

Iijima et al. (1999) compararam a remineralização *in vitro* de lesões de mancha branca natural (MB) e lesões artificiais produzidas *in vitro* (VL). Para tal, 40 pré-molares humanos extraídos por razões ortodônticas foram utilizados, sendo que destes 20 apresentavam lesões de mancha branca natural na superfície proximal e o restante eram dentes hígidos. Para formar a lesão cariosa artificial, os espécimes de

esmalte hígido foram submetidos à desmineralização em 10 ml gel de carboximetilcelulose a 6%, ácido láctico 0,1M ajustado a um pH de 5,0 a 37°C durante 3 semanas. Em seguida, os espécimes foram seccionados de modo a obter em média 90 µm de espessura. Para as lesões naturais foram obtidas três secções, que foram avaliadas microscopicamente e a secção com o ponto mais profundo de lesão foi selecionada e na dentina foi marcada uma pequena ranhura com um bisturi, para ser utilizada como referência na análise. Posteriormente, um espécime de MB e um de VL foram fixados juntos em um suporte de polimetilmetacrilato, de modo a deixar apenas a superfície da lesão exposta. Cada suporte com os dois espécimes foi imerso em 50 ml de solução remineralizadora contendo Hepes a 20 mM, cálcio a 1,5 mM, fosfato a 0,9 mM e 1ppm de fluoreto, ajustada ao pH 7,0, a 37°C durante 2 e 4 semanas. Os espécimes foram analisados por microradiografia transversal. Os resultados mostraram que os valores de profundidade de lesão não variaram significativamente durante 2 e 4 semanas de remineralização. As lesões iniciais de mancha branca apresentaram uma profundidade maior ($486 \pm 242 \mu\text{m}$) que as produzidas *in vitro* ($184 \pm 34 \mu\text{m}$). A perda mineral integrada para os espécimes com lesões artificiais foi de $6.370 \pm 1.738 \text{ \%vol.}\mu\text{m}$ e os espécimes de lesões naturais com $15.706 \pm 12.285 \text{ \%vol.}\mu\text{m}$. As lesões formadas *in vitro* apresentam-se regulares na forma e profundidade, já as lesões naturais apresentam grande variabilidade. Ambas as lesões remineralizaram *in vitro* quando comparadas ao seu valor baseline. Contudo, as lesões cariosas naturais remineralizaram-se duas vezes mais que as lesões artificiais, no mesmo período de tempo. Embora a remineralização *in vitro* de lesões naturais promoveu maior deposição mineral que as lesões artificiais, ambos os espécimes remineralizaram similarmente em relação às respectivas lesões iniciais.

Huang et al. (2007) quantificaram a densidade mineral de lesões naturais de mancha branca em esmalte utilizando uma micro-tomografia de raio X calibrada a partir de diferentes densidades de hidroxiapatita. Foram utilizados quatro pré-molares humanos extraídos que continham um total de sete lesões de mancha branca não cavitadas. Cada dente foi cortado coronal e apicalmente de modo a obter um espécime de 5 mm de altura. Estes espécimes foram envoltos em uma fina camada de parafilme 'M' para manter a umidade do dente. Para calibrar o aparelho foram utilizadas cinco espécimes de hidroxiapatita com diferentes densidades. Os

valores de densidade mineral encontrados foram compatíveis com o encontrado na literatura. Este estudo caracterizou a densidade mineral da lesão de mancha branca através da camada superficial e do valor mais baixo de densidade mineral da lesão, ao invés de utilizar o método convencional de valor médio. A densidade mineral do esmalte hígido varia de 2,65 a 2,89 g/cm³. Neste estudo, o valor da camada superficial foi de 2,23 a 2,58 g/cm³ e o valor mais baixo de densidade mineral da lesão foi de 1,48 a 2,03 g/cm³. Esta abordagem de avaliação foi escolhida devido à dificuldade de categorizar a lesão de mancha branca em subregiões, por elas exibirem grandes variações de tamanho e forma. Assim verificou-se que a microtomografia de raio-x é uma técnica capaz de caracterizar e quantificar a densidade mineral das lesões não cavitadas.

Mais recentemente, Huang et al. (2010) realizaram um estudo com o objetivo de caracterizar em detalhes as propriedades mecânicas da lesão de mancha branca (MB) natural e a associação com as mudanças microestruturais. Para tal, foram utilizados quatro dentes pré-molares humanos extraídos de pacientes com idade entre 12 a 16 anos por razões ortodônticas contendo no total 5 lesões de mancha branca não cavitadas. O módulo de elasticidade e a nanodureza foram avaliados através do mapeamento da área da lesão de mancha branca a intervalos de 25 e 50µm de profundidade. As lesões de mancha branca mostraram uma grande redução nas propriedades mecânicas quando comparadas à parte sadia do esmalte. O módulo de elasticidade foi 83% menor (77,0±2,2 para 13,4±2,1 GPa) e a dureza reduziu-se em 91% (3,39±0,41 para 0,29±0,07 GPa). Segundo os autores, os valores de modulo de elasticidade e nanodureza para o esmalte sadio são compatíveis com o encontrado na literatura, mas para as lesões de mancha branca, os artigos prévios que relatam propriedades mecânicas são referentes a lesões artificiais que geralmente são produzidas *in vitro* utilizando diferentes protocolos de desmineralização. Comparadas às lesões naturais, as lesões de mancha branca artificiais são geralmente mais rasas e com profundidade de 100 - 300µm sem uma camada superficial distinta, que por sua vez apresenta uma menor redução da propriedade mecânica que o corpo da lesão. A base para a produção da camada superficial da lesão não está bem esclarecida, mas pode ocorrer por um processo interno, em que há o transporte dos minerais dissolvidos na subsuperfície do corpo da lesão para a superfície e/ou um processo externo, a partir do biofilme e saliva.

2.5 MICRODUREZA X MICRORADIOGRAFIA

Featherstone et al. (1983) correlacionaram os dados de microdureza realizada em secções transversais e a quantidade mineral determinada por microradiografia transversal de esmalte humano com lesão de cárie artificial. Para tal, utilizaram-se sete coroas de esmalte humano, as quais foram recobertas com esmalte cosmético de unha, deixando uma janela exposta em cada coroa. As coroas foram imersas em 40 mL de solução desmineralizante. As condições químicas desta solução variaram em cada espécime, sendo a solução basicamente composta por ácido láctico a 0,1 mol/L, metilhidroxidifosfanato (MHDP) a 0,1 ou 0,2 mmol/L, em pH 5,0, durante 3 dias para a coroa de número 1 e durante 14 dias para as demais coroas, a 37°C. Após este período, os dentes foram cortados no centro da lesão. Uma metade foi usada para análise por microradiografia e a outra metade foi analisada no microdurômetro. O perfil de dureza foi medido através de 3 posições, localizadas a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, e $\frac{3}{4}$ da largura da lesão, com 12 endentações em profundidade para cada posição. O percentual de conteúdo mineral foi calculado a partir dos valores de dureza utilizando uma fórmula ($\%vol. = 4,3[\sqrt{KHN}] + 11,3$). Na microradiografia, a quantidade mineral foi calculada a intervalos de 1 μ m usando a fórmula de Angmar, Carlstromd e Glas (1963). Os dados de porcentagem de conteúdo mineral obtidos a partir da microdureza e microradiografia foram comparados. A partir desse estudo pôde-se observar que embora a microdureza longitudinal e a microradiografia transversal avaliem diferentes propriedades, os dois métodos são intimamente interligados. Assim, a microdureza longitudinal pode, portanto, ser usada não somente como uma medida comparativa de mudanças de dureza, mas também como uma medida indireta de ganho ou perda mineral como consequência da desmineralização e remineralização.

Arends, Ruben e Inaba (1997) descreveram e discutiram três aspectos relacionados com a microradiografia transversal: (1) a média de perda mineral pela profundidade da lesão em esmalte e dentina (valor de R - %conteúdo); (2) a visualização da distribuição mineral de lesões em esmalte e dentina; e (3) a hipermineralização em dentina. O valor de R é definido como a média da quantidade mineral perdida ou depositada nas lesões por unidade de profundidade e é um parâmetro eficiente para avaliações e comparações entre os mecanismos de

desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. A profundidade da lesão (em μm) é definida com a distância da superfície externa até o ponto em que a quantidade mineral é 95 % do conteúdo mineral do esmalte/dentina hígidos. O ΔZ corresponde à média da perda mineral integrada. Os resultados mostraram que *in vitro*, o valor de R é praticamente constante no período de desmineralização para o esmalte e dentina. Isso foi encontrado mesmo para diferentes cinéticas de dissoluções. Contudo o valor absoluto de R depende do protocolo utilizado na desmineralização. O valor de R é reduzido pela presença de pequenas quantidades de fluoreto no sistema de desmineralização. Já *in situ*, os resultados mostraram que o valor de R depende da condição inicial do esmalte (R é menor se o experimento *in situ* inicia com o esmalte sadio comparado com àqueles em que existe uma desmineralização prévia) e ainda é incerto se o uso de dentifrícios fluoretados reduz o valor de R. O valor da perda mineral integrada (ΔZ) e profundidade da lesão são em geral parâmetros dependentes durante estudos *in vitro* e *in situ* para esmalte e dentina. Além disso, durante a formação de lesão, a perda mineral do corpo da lesão está relacionada à penetração do ácido pelo tecido. Segundo os autores, a hiper-remineralização do esmalte não foi relatada. Já quando a dentina desmineralizada é subsequentemente remineralizada, este tecido pode se tornar hipermineralizado. Depois da hipermineralização, o nível de mineral na dentina hígida (que naturalmente é de 50%) torna-se maior na lesão, onde quantidade mineral de 90% já foi relatada. Assim, concluiu-se que a perda mineral integrada e a profundidade da lesão são em geral parâmetros dependentes durante os estudos *in vitro* e *in situ* para esmalte e dentina.

Com o objetivo de avaliar se a existe correlação entre os dados de microdureza (CSH) e microradiografia transversal (TMR) para lesões de cárie induzidas *in situ* em esmalte humano irradiado e não irradiado, Kielbassa et al. (1999) encontraram uma relação linear, e uma nova equação para converter dureza em conteúdo mineral: $3,66\sqrt{\text{KHN}} + 21,19$. Para este estudo, espécimes de esmalte foram preparados da superfície lingual e vestibular de terceiro molares humanos hígidos ($3 \times 4 \times 1,5 \text{ mm}^3$). Metade dos espécimes foram irradiados com 60Gy, em um total de 4 doses (15Gy/dia, 4 doses/semana). O restante dos espécimes não foi irradiado. Dois espécimes irradiados e dois não irradiados foram inseridos nas faces vestibulares dos aparelhos mandibulares, tanto do lado direito como esquerdo. Os

espécimes foram posicionados na região entre segundo pré-molar a segundo molar, e 1 mm abaixo que a superfície do aparelho removível, para permitir o acúmulo de biofilme. Cinco voluntários utilizaram o dispositivo durante 6 semanas. Foi orientado ao voluntário escovar diariamente com dentifrício não fluoretado o lado esquerdo, e não fazer nada do lado direito, apenas passar na água, sem escovar os espécimes, para permitir acúmulo de biofilme. Durante as refeições, os aparelhos foram armazenados em uma solução de sacarose a 10%. Ao final do período, os espécimes foram preparados para a dureza longitudinal Knoop (CSH) a qual foi medida a 25, 50 e 75µm da superfície externa. Na sequência, o mesmo espécime foi submetido à TMR. A perda mineral (% vol min) foi calculada da área desmineralizada e um total de 120 dados pareados foram submetidos à análise de regressão linear. Tanto a CSH como o TMR não mostraram diferenças significativas entre as lesões de esmalte irradiadas e não irradiadas. Uma relação linear foi encontrada entre a $\sqrt{\text{CSH}}$ e a porcentagem de conteúdo mineral. Portanto, pode-se converter dureza knoop em conteúdo mineral utilizando a fórmula $[3,66\sqrt{\text{KHN}} + 21,19]$. Esta equação apresenta dados com coeficiente de determinação confiável ($r^2 = 0,915$). Assim, segundo os autores, a correlação entre dados de TMR e CSH para lesões cáries induzidas *in situ* em esmalte irradiado e não irradiado não foi documentado na literatura e neste trabalho apresentou uma boa relação linear.

Mais recentemente, Buchalla et al. (2008) avaliaram comparativamente a técnica de nanoendentação e microradiografia transversal para quantificação da perda mineral em lesões artificiais de cárie em esmalte e discutiram a viabilidade do uso de valores de nanodureza para calcular o conteúdo mineral. Para tal, utilizaram 16 incisivos bovinos (espécimes com tamanho de 3 mm de diâmetro) que foram imersos em 1 litro de solução desmineralizante a 37° C por 6 dias para criar a lesão de carie artificial em esmalte. A solução foi composta por $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3mmol/L, KH_2PO_4 3mmol/L, ácido láctico 50mmol/L, metildihidroxifosfanato 6µmol/L, traços de timol e KOH 10 M para ajustar o pH para 5,0 (BUSKES; CHRISTOFFERSEN; ARENDS, 1985). O conteúdo mineral (%vol. mineral) foi calculado a partir da microradiografia transversal. Foi utilizado o software UMIS-2000 para calcular a nanodureza, em função da profundidade de penetração de cada endentação. As médias do conteúdo mineral obtidas pela microradiografia e dos valores de nanodureza dos 16 espécimes mostraram similaridade em relação à quantificação

de lesão de cárie subsuperficial, porém com algumas diferenças significativas. O coeficiente médio de variação da nanodureza (36%) foi mais alto que o da microradiografia (4%) em todos os pontos de análise (10-160 μm de profundidade). O conteúdo mineral obtido pela microradiografia foi 45-91% e o valor de nanodureza variou de 0,2 a 7,3 GPa. Houve uma relação não linear entre quantidade mineral obtida pela microradiografia e os valores de nanodureza. Portanto, concluiu-se que não é recomendado utilizar os valores de nanodureza para calcular o conteúdo mineral do esmalte desmineralizado. O método de escolha para quantificação do conteúdo mineral em lesões cáries artificiais deve ser a microradiografia transversal. Entretanto, os dados de nanodureza são importantes, pois oferecem informações úteis em relação às propriedades mecânicas e de integridade estrutural, que por sua vez, não podem ser determinadas pela microradiografia transversal.

A primeira parte desta dissertação, já publicada (MAGALHÃES et al. 2009), comparou diferentes métodos para a produção de “lesão de cárie artificial” em esmalte *in vitro* correlacionando dureza longitudinal (CSH) com microradiografia transversal (TMR). Os espécimes foram divididos em cinco grupos, MC gel – gel de metilcelulose 8% + ácido láctico 0,1 M (pH 4,6, 37°C, 14 dias); PA gel – gel de ácido poliacrílico 0,2% e ácido láctico 0,1 M saturado com hidroxiapatita (pH 4,8, 37°C, 16h); MHDP – solução de ácido láctico 50 mM, com metilenodifosfanato, cálcio e fosfato (pH 5,0, 37°C, 6 dias); Tampão – solução de ácido acético 50 mM com cálcio, fosfato e fluoreto (pH 5,0, 37°C, 16h); e uma ciclagem de pH (QUEIROZ et al., 2008). Em contraste com estudos prévios (FEATHERSTONE et al., 1983; KIELBASSA et al., 1999), não foi validada a relação linear entre CSH ou sua raiz quadrada e quantidade mineral. Nos grupos MC gel, PA gel e tampão, houve uma boa relação entre $\sqrt{\text{CSH}}$ e conteúdo mineral na análise de regressão quadrática. Este achado está de acordo com Featherstone et al. (1983), que apresentou um r^2 levemente melhor (0,84) para as lesões formadas pelo grupo tampão, enquanto a inclinação e a intercepção mostraram-se diferentes deste presente estudo. Apesar de um alto r^2 para estes grupos, as curvas não parecem ser válidas para estimar a quantidade mineral a partir da dureza já que mostram uma relação não linear. O mesmo é válido para o grupo MHDP, que por sua vez apresentou um baixo coeficiente de determinação entre quantidade mineral e CSH. O baixo valor de r^2 indicou uma alta dispersão dos valores. Portanto, também não se pode validar uma

relação entre CSH e quantidade mineral. Um fato interessante é que quanto maior a perda mineral de subsuperfície, mais fraca foi a relação entre conteúdo mineral e CSH. Estes resultados mostraram, para o esmalte, que a relação entre CSH e quantidade mineral pode ser altamente dependente do tipo de lesão em análise. Além disso, a variabilidade dos dados para dureza foi mais alta quando comparada ao conteúdo mineral. Embora a CSH não possa ser usada para estimar a quantidade mineral com segurança, este método pode ser utilizado para analisar lesões cariosas, uma vez que nos dá uma importante evidência sobre as propriedades mecânicas referentes à resiliência do esmalte desmineralizado em profundidade.

Visto que os dois artigos mais tradicionais utilizaram fórmulas diferentes para a conversão dos valores de dureza em secção transversal para porcentagem de conteúdo mineral e estudos recentes mostram que esta relação não é tão linear, trabalhos mais recentes não têm convertido os valores de dureza para conteúdo mineral, e sim utilizam os valores de dureza knoop em número (KgF/mm^2) (AIRES et al., 2008; MARQUEZAN et al., 2009; CURY et al., 2010; HONÓRIO et al., 2010). Os trabalhos que relacionaram dureza e conteúdo mineral foram desenvolvidos em esmalte, porém nada se sabe sobre a relação entre estas duas variáveis para a dentina desmineralizada.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho comparou diferentes protocolos para a produção de lesão de cárie artificial em esmalte e dentina bovinos entre si e com lesões cariosas naturais (para o esmalte), utilizando análises de dureza superficial (SH) e longitudinal (CSH) e microradiografia transversal (TMR), as quais foram relacionadas.

Com base nisto, as seguintes hipóteses nulas foram testadas:

1. Não há diferença significativa entre lesões de mancha branca naturais em esmalte humano e as lesões cariosas artificiais em esmalte bovino produzidas tanto *in vitro* como *in situ* em relação ao conteúdo mineral, profundidade e dureza superficial e longitudinal.
2. Não há diferença significativa entre as lesões artificiais em dentina radicular bovina produzidas por diferentes métodos *in vitro* e *in situ* em relação ao conteúdo mineral, profundidade e dureza superficial e longitudinal.
3. Não há correlação e relação linear significativa entre os dados obtidos pelos dois métodos de análise da desmineralização dos tecidos dentários (dureza superficial/longitudinal e microradiografia transversal).

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS DENTES E PREPARO DOS ESPÉCIMES DE ESMALTE E DENTINA (ETAPAS *IN VITRO* E *IN SITU*)

Foram utilizados dentes bovinos permanentes extraídos recentemente, livres de cárie, os quais foram armazenados em solução de timol a 0,1% em pH 7,0 sob temperatura ambiente, e submetidos à análise visual, para a averiguação de possíveis manchas e trincas, situação na qual foram excluídos da amostra. A limpeza dos dentes selecionados foi realizada, removendo todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície com o auxílio de uma cureta periodontal (DUFLEX. Ind. Bras.) para preparar os dentes para o corte. Primeiramente foram removidas as raízes, com o auxílio de um torno de polimento odontológico adaptado para corte (Fábrica Nacional de Motores Monofásicos Nevoni/ Série 16223, Tipo: TG1/3, São Paulo, SP) e um disco diamantado Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ), sendo feita uma secção na porção cervical dos dentes.

Na sequência, as coroas dos dentes bovinos foram fixadas com godiva (Kerr) em uma placa de acrílico (40x40x5 mm³). A placa foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA – Figuras 1a e 2a) e com dois discos diamantados de dupla face - XL 12205, “High concentration”, 102 x 0,3 x 12,7 mm³ (Extex Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos, com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, foram obtidos os espécimes de esmalte bovinos de 4 x 4 mm da porção mais plana da coroa, através de uma secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido mésio-distal (Figura 1b e 1c).

Após o corte de todos os espécimes de esmalte bovino, deu-se prosseguimento ao preparo dos espécimes de dentina radicular bovina. Primeiramente, foram obtidas fatias da porção cervical da raiz através de um corte na direção mésio-distal (Figura 2b), com a utilização dos dois discos separados por um espaçador de aço inoxidável de 4 mm. Após a obtenção das fatias de dentina radicular bovina, realizou-se uma secção no sentido vestibulo-lingual, utilizando dois discos separados por um espaçador de aço inoxidável de 4 mm e na sequência, dois

espécimes 4 x 4 mm foram obtidos com uma secção final da direcção méso-distal utilizando um único disco de corte (Figura 2c).

Figuras 1 – **a.** Aparelho de corte de precisão ISOMET, vista frontal; **b.** Secção dupla no sentido cérvico-incisal da coroa bovina; **c.** Espécime de esmalte bovinos de 4 x 4 mm obtido da porção mais plana da coroa, depois da secção dupla no sentido méso-distal.

Figuras 2 – **a.** Aparelho de corte de precisão ISOMET; **b.** Fatia da porção cervical da raiz através de um corte na direcção méso-distal; **c.** Dois espécimes 4 x 4 mm foram obtidos de cada fatia da porção cervical da raiz através de uma secção no sentido vestibulo-lingual e um corte final no sentido méso-distal.

Após a obtenção de todos os espécimes de esmalte e dentina radicular bovina, iniciou-se a planificação e polimento. Os espécimes 4x4mm foram fixados com cera pegajosa Kota com o auxílio de um instrumento de PKT (Duflex Ind. Bras.) e uma lamparina (JON, Ind. Bras.) no centro de um disco de acrílico (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura), com a face de esmalte ou dentina externa/cimento voltada para o disco, com o intuito de realizar primeiramente a planificação da dentina interna (Figura 3a). O conjunto (disco/dente) foi adaptado em

uma Politriz Metalográfica (Figura 3b) para realizar a planificação da dentina, permitindo o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de acrílico no qual foram fixados os espécimes. Para tal, foi utilizada uma lixa de carbeto de silício de granulação 320, sob refrigeração com água deionizada, até que os espécimes ficassem com espessura de aproximadamente 3 mm. Para tanto, a politriz foi acionada em baixa velocidade, entre 30 s e 3 min, até se alcançar a espessura desejada.

Em seguida, os espécimes foram removidos do disco de acrílico, sendo estes limpos com xilol (MERCK, Darmstadt-Germany), para que se retirasse todo o resíduo de cera aderido a eles. Posteriormente, foram novamente fixados com cera pegajosa no centro da placa de acrílico com a face de esmalte ou dentina externa/cimento exposta, para que fossem realizados a planificação e o polimento, objetivando a obtenção de uma superfície absolutamente plana e paralela à base (Figura 3c), indispensável para a realização dos testes. Novamente o conjunto foi adaptado a politriz e o esmalte ou dentina externa foi desgastado inicialmente com uma lixa de carbeto de silício de granulação 600 (Extec Corp.), sob refrigeração com água deionizada (2-3 minutos para o esmalte e 30 s a 1 minuto para a dentina), com 2 pesos, em velocidade baixa. Em seguida, foi feito o polimento com lixa de carbeto de silício de granulação 1200 (Extec Corp.), sob refrigeração (2-3 minutos para o esmalte e 1-2 minutos para a dentina), com 2 pesos, em velocidade alta. Para finalizar o polimento, foi utilizado um feltro (Extec Corp.) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μ m (Buehler), com 2 pesos, em velocidade alta (2-3 minutos para o esmalte e 1-2 minutos para a dentina).

Figuras 3 – **a.** Planificação da dentina interna; **b.** Politriz metalográfica; **c.** Espécimes de esmalte após a planificação e polimento final.

Para impedir que os grãos das primeiras lixas interferissem na qualidade do polimento das seguintes, entre cada etapa de polimento, o conjunto dente/disco foi levado a um aparelho de ultra-som T7 Thornton, com frequência de 40 KHz, durante 2 minutos, com água deionizada. Ao final do polimento dos espécimes, este procedimento foi repetido.

Após esta etapa, os espécimes foram selecionados e distribuídos aleatoriamente nos grupos de acordo com os valores de dureza de superfície aferidos pelo Microdurômetro Shimadzu – HMV-2 (5 endentações a distância de 100 μ m cada, 25g e 10s para o esmalte e 10g e 10s para a dentina – Figuras 4a a 4d).

Figuras 4 – **a.** Microdurômetro utilizado para seleção e distribuição dos espécimes; **b.** Visão da ponta KNOOP; **c.** Endentação que foi realizada com carga de 25g por 10s para o esmalte; **d.** Endentação com carga de 10g por 10s para a dentina.

Foram desprezados os espécimes que apresentassem a média de dureza de superfície 20% acima ou 20% abaixo da média geral, sendo 370 ± 20 KHN para o esmalte e 29 ± 6 KHN para a dentina. Todos os espécimes foram protegidos com esmalte cosmético de unha vermelho, expondo somente a superfície de interesse (1/3 central do esmalte e dentina externa) aos desafios cariogênicos (Figura 5).

Figuras 5 – Espécime protegido com esmalte cosmético de unha vermelho.

4.2 AMOSTRA

Para o estudo *in vitro* foram utilizados 48 corpos de prova confeccionados em esmalte bovino (n=12) e 60 em dentina radicular bovina (n=15), aleatoriamente divididos em 4 grupos cada (tipo de solução/gel), a partir da média de dureza de superfície inicial (SH). Para o estudo *in situ* foram utilizados 32 corpos de prova confeccionados em esmalte bovino e 32 em dentina radicular bovina, aleatoriamente divididos de acordo com o número de voluntários (n=16 voluntários, 2 espécimes de esmalte e 2 de dentina bovinos por voluntário) a partir da média de dureza de superfície inicial (SH). Para a etapa *in vivo*, foram coletados 16 pré-molares humanos com lesão de mancha branca natural opaca visível clinicamente após secagem.

4.3 INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL EM ESMALTE *IN VITRO*

Os 48 espécimes de esmalte bovino (4x4mm) foram submetidos à produção de lesão de cárie artificial a partir dos seguintes grupos de solução/gel (Quadro 1).

		SOLUÇÃO / GEL	pH / Temperatura	TEMPO
PRODUÇÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL EM ESMALTE BOVINO IN VITRO	GEL MC (TEN CATE et. al., 1996; LYNCH; TEN CATE, 2006)	Gel de metilcelulose 8% (1 noite a 4°C, uma camada de 0,5 cm de altura); após 1 noite adicionaram-se 1,5 mL de ácido láctico 0,1M (Sigma) no mesmo conteúdo que o gel (0,5 cm)	pH 4,6 / 37°C	14 dias
	GEL PA (WHITE, 1987; LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007; IJIMA et al., 2004)	Ácido poliacrílico 20 g/L (PM 450.000, Sigma-Aldrich) + ácido láctico 0,1 M (Sigma), hidroxapatita sintética 99,99% 500 mg/L (Sigma-Aldrich). Ajuste de pH com KOH 10 M (25 mL/espécime)	pH 4,8 / 37°C	16 h
	SOLUÇÃO MDHP (BUSKES; CHRISTOFFERSEN; ARENDS, 1985)	CaCl ₂ .2H ₂ O 3 mM (LabSynth); KH ₂ PO ₄ 3 mM (Sigma-Aldrich); ácido láctico 0,05 M (Sigma); tetraetil metilenodifosfanato-MDHP 6 µM (Sigma-Aldrich); Traços de timol. Ajuste do pH com solução de KOH 10 M (30 mL de solução/espécime)	pH 5,0 / 37°C	6 dias
	SOLUÇÃO TAMPÃO (QUEIROZ et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2008)	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O 1,3mM (Merck); Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O 0,78mM (LabSynth); Ácido acético glacial 0,05 M (Merck); 0,0315 ppm F ⁻ (NaF, Orion). Ajuste do pH com solução de NaOH a 1 M (30 mL de solução/espécime)	pH 5,0 / 37°C	16 h

Quadro 1 - Tipos de soluções e géis utilizados na pesquisa do esmalte.

Para o grupo GEL MC, o gel de metilcelulose 8% foi manipulado em farmácia. O espécime foi colado em um pote J10 utilizando esmalte cosmético de unha vermelho e todas as faces, exceto 1/3 central da face de esmalte, foram cobertas com este mesmo esmalte para proteger da desmineralização (Figura 6). O espécime foi coberto com uma camada de gel (0,5 cm de altura), o qual permaneceu sobre o espécime por 12h, na câmara fria, a 4°C. Na sequência, foi adicionado o mesmo conteúdo de ácido láctico a 0,1M, pH 4,6 ajustado com KOH 10 M (0,5 cm=1,5ml), permanecendo sobre o espécime por 14 dias, na estufa, a 37°C.

Figura 6 – Espécime colado em um J10 protegido com esmalte de unha vermelho na presença do gel.

Já para o grupo GEL PA, primeiramente foi adicionado ácido poliacrílico à água deionizada, o qual foi misturado por 2h até a completa dissolução e formação do gel fluído. Na seqüência, a hidroxiapatita foi adicionada e a solução agitada por mais 2h. Além destes reagentes, foi adicionado ácido láctico em uma concentração final de 0,1M e o pH ajustado a 4,8 pela adição de uma solução de KOH a 10 M. Um conteúdo de 25 mL deste gel fluído foi adicionado a potes de filme fotográfico, os quais continham um espécime por pote colado em discos de acrílico (Figura 7). Os espécimes permaneceram por 16h em contato com este gel, na estufa a 37° C. O protocolo original para a preparação deste gel foi proposto por White (1987). No entanto, o gel que foi utilizado no grupo GEL PA foi similar a fórmula original descrita por White (1987), mas com algumas modificações apresentadas por Iijima et al. (2004).

Para a produção da SOLUÇÃO MDHP foi adicionado ácido láctico à água deionizada, seguido pelos sais de cálcio, fosfato, tetraetil metilenodifosfanato e traços de timol nas concentrações descritas no Quadro 1. O pH foi ajustado a 5,0 pela adição de solução de KOH a 10M. Um conteúdo de 30 mL de solução foi adicionado aos potes de filme fotográfico (Figura 7), os quais continham um espécime colado em disco de acrílico por pote. Os espécimes permaneceram por 6 dias imersos nesta solução, na estufa a 37°C.

No grupo SOLUÇÃO TAMPÃO foi adicionado inicialmente à água o sal de cálcio, seguido pelo fosfato, ácido acético glacial e o fluoreto (Quadro 1). O pH foi ajustado a 5,0 pela adição de solução de NaOH a 1M. Um conteúdo de 30 mL de solução foi adicionado aos potes de filme fotográfico (Figura 7), os quais continham

um espécime colado em disco de acrílico por pote. Os espécimes permaneceram por 16 horas imersos nesta solução, dentro de uma estufa, a 37°C.

Figura 7 – Espécime protegido com esmalte de unha vermelho sendo imerso em solução desmineralizante dentro do pote de filme fotográfico.

A Tabela 1 mostra os graus de saturação dos protocolos em relação aos minerais do esmalte. As taxas de saturação foram calculadas utilizando um programa descrito por Shellis (1988).

Tabela 1 – Valores iniciais de saturação para cada protocolo de desmineralização do esmalte *in vitro*, a 37°C com $P_{CO_2} = 0$ atm.

Protocolo	HAP	OCP	DCPD	FAP
GEL MC	-	-	-	-
GEL PA	0,53	0,21	0,20	-
MDHP	0,72	0,27	0,24	-
TAMPÃO	0,35	0,13	0,09	1,11

HAP = Hidroxiapatita; OCP = fosfato octacálcio; DCPD = fosfato dicálcio dihidratado; FAP = fluorapatita. GEL MC é infinitamente subsaturado em relação a todos os sais de fosfato de cálcio. A taxa de saturação do GEL PA foi calculado baseada na quantidade de HAP, não considerando que as concentrações poderiam ser ligeiramente alteradas pelo ácido e pela interface gel-esmalte (valores abaixo de 1 mostram subsaturação e acima de 1, supersaturação).

Para todos os grupos, antes da imersão dos espécimes em cada solução/gel testado, foram feitos testes-pilotos, considerando como desmineralização superficial aceitável de 50 a 90% de perda de dureza. O mesmo foi válido para o estudo em dentina descrito a seguir.

4.4 INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL EM DENTINA *IN VITRO*

Os 60 espécimes de dentina radicular bovina (4x4mm) foram submetidos à produção de lesão de cárie artificial a partir dos seguintes grupos de gel/solução (Quadro 2).

		SOLUÇÃO / GEL	pH / Temperatura	TEMPO
PRODUÇÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL EM DENTINA BOVINA IN VITRO	GEL MC II (INABA et al., 1997)	Gel de carboximetilcelulose 6% (1 noite a 4°C, uma camada de 0,5 cm de altura); após 1 noite adicionaram-se 1,5 mL de ácido láctico 0,1M (Sigma) no mesmo conteúdo que o gel (0,5 cm)	pH 5,0 / 37°C	14 dias
	SOLUÇÃO TAMPÃO II (TEN CATE; DUIJSTERS, 1983; MC INTYRE; FEATHESTONE; FU, 2000)	CaCl ₂ 2,2mM (Merck); KH ₂ PO ₄ 2,2mM (LabSynth); Ácido acético glacial 0,05 M (Merck); 0,5 ppm F ⁻ (NaF, Orion). Ajuste do pH com solução de NaOH a 1 M (30 mL de solução/espécime)	pH 4,5 / 37°C	7 dias
	SOLUÇÃO TAMPÃO III (TEN CATE; DUIJSTERS, 1982; DAMEN, BUIJS, TEN CATE, 1998)	CaCl ₂ 2,2mM (Merck); KH ₂ PO ₄ 2,2mM (LabSynth); Ácido acético glacial 0,05 M (Merck). Ajuste do pH com solução de NaOH a 1 M (30 mL de solução/espécime)	pH 5,0 / 37°C	7 dias
	SOLUÇÃO MDHP II (BUCHALLA et al., 2003)	CaCl ₂ 3mM (Merck); KH ₂ PO ₄ 3mM (LabSynth); Ácido láctico 50mM (Sigma); MDHP 6µM, traços de timol. Ajuste do pH com solução de KOH a 10 M (30 mL de solução/espécime)	pH 5,0 / 37°C	7 dias

Quadro 2 - Tipos de soluções e géis utilizados na pesquisa da dentina.

Para o grupo GEL MC II, o gel de carboximetilcelulose 6% foi manipulado em farmácia. O espécime foi colado em um pote J10 utilizando esmalte cosmético de unha vermelho e todas as faces, exceto 1/3 central da dentina externa, foram cobertas com este mesmo esmalte para proteger da desmineralização (Figura 6). O espécime foi coberto com uma camada de gel (0,5 cm), o qual permaneceu sobre o espécime por 12h, na câmara fria, a 4°C. Na seqüência, foi adicionado o mesmo conteúdo de ácido láctico a 0,1M, pH 5,0 ajustado com NaOH 10 M (0,5 cm=1,5ml),

permanecendo sobre o espécime por 14 dias, na estufa, a 37°C (INABA et al., 1997; THOMAS et al., 2007; ZAURA; BUJIS; TEN CATE, 2007).

Para o grupo SOLUÇÃO TAMPÃO II foi preparada uma solução de acordo com o protocolo de ten Cate e Duijsters (1983). Foi adicionado inicialmente à água o sal de cálcio (CaCl_2 2,2mM), seguido pelo fosfato (KH_2PO_4 2,2 mM), ácido acético glacial 0,05 M e o fluoreto (0,5 ppm F^- , NaF). O pH foi ajustado a 4,5 pela adição de solução de NaOH a 1M. Um conteúdo de 30 mL de solução foi adicionado aos potes de filme fotográfico, os quais continham um espécime colado em um disco de acrílico por pote (Figura 7). Os espécimes permaneceram por 7 dias imersos nesta solução, na estufa a 37°C.

Para o grupo SOLUÇÃO TAMPÃO III foi preparada uma solução de acordo com o protocolo de ten Cate e Duijsters (1983) com modificação de acordo com Damen, Buijs e ten Cate (1998). Foi adicionado inicialmente à água o sal de cálcio (CaCl_2 2,2mM), seguido pelo fosfato (KH_2PO_4 2,2 mM) e ácido acético glacial 0,05 M. O pH foi ajustado a 5,0 pela adição de solução de NaOH a 1M. Um conteúdo de 30 mL de solução foi adicionado aos potes de filme fotográfico, os quais continham um espécime colado em um disco de acrílico por pote (Figura 7). Os espécimes permaneceram por 7 dias imersos nesta solução, na estufa a 37°C.

Para o grupo SOLUÇÃO MDHP II foi adicionado inicialmente à água o sal de cálcio (CaCl_2 3 mM), seguido pelo fosfato (KH_2PO_4 3 mM), ácido láctico 0,05 M e tetraetil metilenodifosfanato 6 μM e traços de timol. O pH foi ajustado a 5,0 pela adição de solução de KOH a 10M. Um conteúdo de 30 mL de solução foi adicionado aos potes de filme fotográfico, os quais continham um espécime colado em um disco de acrílico por pote (Figura 7). Os espécimes permaneceram por 7 dias imersos nesta solução, na estufa a 37°C (BUCHALLA et al., 2003).

Do mesmo modo que para o esmalte, a Tabela 2 mostra os graus de saturação dos protocolos em relação aos minerais da dentina.

Tabela 2 – Valores iniciais de saturação para cada protocolo de desmineralização da dentina *in vitro*, a 37°C com P_{CO_2} – 0 atm.

Protocolo	HAP	OCP	DCPD	FAP
GEL MC II	-	-	-	-
TAMPÃO II	0,30	0,13	0,13	1,51
TAMPÃO III	0,66	0,25	0,27	-
MDHP II	0,72	0,27	0,24	-

HAP = Hidroxiapatita; OCP = fosfato octacálcio; DCPD = fosfato dicálcio dihidratado; FAP = fluorapatita. GEL MC II é infinitamente subsaturado em relação a todos os sais de fosfato de cálcio (valores abaixo de 1 mostram subsaturação e acima de 1, supersaturação). Utilizou-se o software desenvolvido por Shellis (1998)

4.5 INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL EM ESMALTE E DENTINA *IN SITU*

Este trabalho foi conduzido de acordo com a declaração de Helsinki e com guia de boas práticas em estudos clínicos (*Consort guideline*). Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da FOB-USP, do ponto de vista ético (Processo nº 057/2009, Anexo A). Os voluntários apenas participaram da pesquisa após explicação minuciosa de seus objetivos a partir de uma leitura da Carta de Esclarecimento ao Voluntário e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos B).

O número de voluntários de 12 foi previamente estipulado com base nos resultados de um estudo prévio (MAGALHÃES et al., 2007), considerando um α -erro de 5% e um β -erro de 10%, porém devido à possibilidade de perda amostral foram incluídos inicialmente 16 voluntários. Os 16 adultos jovens, na faixa etária de 18 a 30 anos, sendo 2 homens e 14 mulheres, residentes na cidade de Bauru (área fluoretada, 0,8 ppm F⁻), foram selecionados a partir de uma anamnese, avaliação de parâmetros salivares e da condição de saúde bucal, seguindo as diretrizes do *Consort*. Os voluntários foram selecionados utilizando como critérios de inclusão

(fluxo salivar estimulado > 1mL/min, fluxo salivar não estimulado > 0,25 mL/min, pH salivar > 6, boa saúde bucal, ausência de lesões dentárias cavitadas bem como gengivite aguda e doença periodontal), sem violar os critérios de exclusão de saúde geral (gestantes, pacientes com doenças sistêmicas e com uso crônico de qualquer tipo de medicação) e de saúde bucal (baixo fluxo salivar estimulado/ não estimulado e pH, usuários de aparelhos ortodônticos e produtos com fluoreto e agentes anti-placa, cárie ativos e com doença periodontal).

A saliva de cada voluntário foi coletada seguindo padrões estabelecidos para a avaliação de fluxo salivar e pH. A coleta foi realizada no período da manhã, 2h após o desjejum, em ambiente bem iluminado, individual e climatizado. Os voluntários expectoraram a saliva em potes de coleta universal durante 10 minutos, os quais foram pesados antes e após a coleta, para o cálculo do conteúdo de saliva não estimulada produzida por minuto, considerando que a densidade da saliva é de 1g/ml. O mesmo procedimento foi realizado para a saliva estimulada, porém neste caso os voluntários mastigaram um pedaço de borracha por 1 minuto e expectoraram a saliva por 5 minutos. O pH da saliva foi medido utilizando-se um pHmetro (Beckman 360).

Para o estudo *in situ*, os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados com alginato para a confecção do modelo de gesso e do aparelho intrabucal palatino em resina acrílica (Figura 8a). Foi criado no dispositivo de resina um espaço de 4 mm de profundidade em cada um dos 4 nichos, deixando um espaço de 1,0 mm para o acúmulo de biofilme. Os nichos foram dispostos em 2 de cada lado (esquerdo e direito – Figura 8b), para a fixação de 1 espécime de esmalte ou 1 de dentina por nicho com cera pegajosa Kota (Figura 8c).

Figuras 8 – **a.** Modelo em gesso e aparelho intra-bucal palatino confeccionado em resina acrílica; **b.** Aparelho intra-bucal com 4 nichos; **c.** Aparelho após a fixação dos espécimes de esmalte (cor verde) e de dentina (cor vermelha).

Para a desinfecção, os dentes foram armazenados em solução de timol aquosa saturada por 2 semanas e posteriormente, os espécimes foram imersos em solução de etanol a 70% por 30 minutos (GANSS et al., 2004) antes da análise da dureza de superfície inicial e da inserção nos aparelhos. Com o intuito de permitir o acúmulo de biofilme dentário na superfície dos espécimes e de protegê-lo contra distúrbios mecânicos, uma tela plástica (Peneira plástica POLICRON) foi fixada sobre cada espécime com auxílio de resina acrílica e cera de incrustação (MAGALHÃES et al., 2007; HONÓRIO et al., 2010) (Figuras 9a a 9c).

Figuras 9 – **a.** Material utilizado para a colocação da tela plástica; **b.** Tela plástica fixada com resina acrílica; **c.** Aparelho finalizado após a colocação da cera de incrustação sobre a resina acrílica.

Uma semana antes do início da fase *in situ* e durante o experimento, os voluntários utilizaram dentifrício sem flúoreto e escova dentária cedida pelos pesquisadores para a higiene bucal. Esta padronização de higiene bucal foi realizada com o objetivo de eliminar qualquer vestígio de agente fluoretado que pudesse estar presente na cavidade bucal do voluntário e interferir no experimento.

O aparelho foi instalado um dia antes do início da fase experimental, à noite, após a última higiene bucal. Durante os 14 dias da fase *in situ*, os voluntários só removeram o aparelho para a realização de 4 refeições (café da manhã, almoço, lanche e jantar, 1h no máximo cada refeição), ocasião em que o dispositivo ficou envolvido em gaze umedecida por água deionizada. O intervalo entre as refeições foi de pelo menos 2 a 3h. Após as refeições, a higiene bucal foi realizada e o aparelho reposicionado na boca.

O aparelho intra-bucal continha uma fileira com os espécimes de esmalte (cera verde) e outra fileira com os espécimes de dentina (cera vermelha; Figura 10a). Para a fileira do esmalte (verde), foi gotejada uma solução de sacarose a 20%, 8x/dia, por 5 minutos (AIRES et al., 2006; Figura 10b); já para a fileira da dentina

(vermelha) foi gotejada uma solução de sacarose a 20%, 4x/dia, por 5 minutos *ex vivo* (HARA et al., 2003). Após os 5 minutos de espera, o aparelho foi reposicionado na boca. A solução de sacarose foi preparada pelos pesquisadores e trocada diariamente, para evitar crescimento de bactérias e fungos. Adicionalmente, os voluntários foram orientados a agitar o pote com a solução antes do uso. Figura 10c mostra o kit que foi entregue a cada voluntário.

Figuras 10 – **a.** Aparelho intra-bucal palatino confeccionado esquematizando os locais de esmalte (cor verde) e dentina (cor vermelha); **b.** Modo como foi feito o gotejamento da solução de sacarose sobre os espécimes; **c.** Kit entregue aos voluntários, onde continha a caixa plástica com o aparelho, gaze, o pote com a solução de sacarose, uma garrafa com água deionizada e uma escova dentária.

Os voluntários foram orientados a usar o aparelho por todo período experimental, removendo-o somente para os experimentos, refeições e ingestão de água. Além disso, foram proibidos de usar produtos fluoretados ou antimicrobianos, durante a fase *in situ* (ANEXO C) e de higienizar o aparelho do lado das telas plásticas. Ao término do experimento, os espécimes foram cuidadosamente removidos do dispositivo e fixados em seus respectivos discos de acrílico.

4.6 OBTENÇÃO DOS DENTES COM LESÕES CARIOSAS NATURAIS EM ESMALTE E PREPARO DOS ESPÉCIMES (*IN VIVO*)

Para caracterizar a distribuição mineral das lesões cariosas naturais (etapa *in vivo*), foram utilizados pré-molares humanos (n=16) extraídos por razões ortodônticas que apresentaram lesões de mancha branca opacas (não cavitadas,

sem pigmentos) em superfície lisa com um tamanho correspondente a pelo menos 1/3 da superfície dentária, sendo visíveis clinicamente após secagem da superfície (Figura 11). Estes dentes foram coletados através de doações de pacientes após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humano local (Anexo A – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética; ANEXO D – Carta de doação dos dentes).

Figura 11 – Lesões de mancha branca opacas, definidas, não cavitadas e sem pigmentos. A maioria dos dentes também apresentava fluorose dentária, de forma que somente as áreas com lesões de mancha branca do tipo cariosa foram avaliadas.

Estes dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% em pH 7,0 sob temperatura ambiente, durante o preparo dos espécimes. Preparou-se um espécime de esmalte (4x4mm) para cada lesão cariosa (Figuras 12a a 12c).

Figuras 12 – **a.** Pré-molar posicionado com godiva para o corte; **b.** Aparelho de corte de precisão ISOMET com o dente pré-molar em posição; **c.** Lesão de mancha branca presente no centro do espécime.

O preparo dos espécimes de esmalte dentário humano cariado foi realizado conforme descrito anteriormente, com exceção de que não foi realizado o polimento na superfície do esmalte, sendo feito somente o polimento da dentina

interna. Na seqüência, cada espécime foi cortado longitudinalmente, de forma semelhante à descrita nas Seções 4.7 e 4.8, sendo que uma das metades foi usada para a análise de dureza longitudinal e a outra metade para a análise microradiográfica.

4.7 AVALIAÇÃO DA DUREZA DE SUPERFÍCIE E LONGITUDINAL

A dureza de superfície foi avaliada em todos os espécimes pelo Microdurômetro Shimadzu (HVM 2) acoplado em um software, composto por um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP (5 endentações a distância de 100 µm cada, 25g e 10s para o esmalte e 10g e 10 s para a dentina), no início (SH inicial) e ao final do experimento (SH final) (Figuras 13a e 13b). Dessa forma, calculou-se a porcentagem de perda de dureza de superfície ($\%SHC = (SH \text{ final} - SH \text{ inicial}) / SH \text{ inicial}) \times 100$).

Figuras 13 – **a.** Visão da ponta KNOOP do microdurômetro; **b.** Cinco endentações realizadas no início e ao final do experimento.

Após análise da SH final (KgF/mm^2) dos espécimes de esmalte e dentina tanto para o estudo *in vitro*, como para o *in situ*, secções longitudinais foram feitas no centro dos espécimes usando para tal um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Bulher Ltda., Lake Bluff, IL, USA), com um disco diamantado de dupla face – XLI 2205, “high concentration”, 102 mm longitudinalmente X 0,3 mm X 12,7 mm (Extex Corp., Enfield, CT, USA / Ref: 12.205) posicionado

perpendicularmente à superfície e refrigerado com água deionizada. Uma das metades foi incluída em resina acrílica (Figura 14) com a parte interna voltada para a superfície externa da resina, utilizando-se pó de resina acrílica e uma Embutidora (Arotec). Na sequência, o polimento foi realizado com as lixas de granulação 320, 600, 1200 e feltro (Extex. Corp.) em uma politriz metalográfica conforme descrito anteriormente.

Figura 14 – Espécimes de esmalte e dentina incluídos em resina acrílica e polidos para a análise de dureza longitudinal.

A dureza longitudinal (CSH) foi realizada através de três seqüências de sete endentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 μm da superfície externa do esmalte (25 g/10 s, Figura 15) e da dentina (10g/10s, Figura 16). As médias de dureza foram calculadas em cada distância (KgF/mm^2). No caso da dentina, cuidados foram tomados para manter a hidratação do tecido até o momento da análise, de forma a padronizar as leituras.

Figura 15 – Análise da dureza longitudinal mostrando as endentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 μm da superfície externa do esmalte.

Figura 16 – Análise da dureza longitudinal mostrando as endentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 μm da superfície externa da dentina.

As médias de dureza longitudinal foram calculadas em cada distância, por espécime. A partir da média de dureza (KgF/mm^2) por distância, pode-se calcular o ΔKHN (perda de dureza integrada, $\text{KgF/mm}^2 \cdot \mu\text{m}$) (SPIGUEL et al., 2009; HONÓRIO et al., 2010) para os espécimes de esmalte e dentina. O ΔKHN ($\text{KgF/mm}^2 \cdot \mu\text{m}$) é o produto da diferença entre a dureza de um esmalte/dentina sadio e dureza do esmalte/dentina desmineralizado, em relação à profundidade da lesão (μm). Já a profundidade da lesão foi definida pela distância da superfície até a profundidade em que o esmalte apresentasse no mínimo 270 KgF/mm^2 de dureza e a dentina apresentasse no mínimo 25 KgF/mm^2 o que correspondem a uma valor de aproximadamente 95% do valor de dureza da superfície interna do esmalte e dentina hígidos.

4.8 MICRORADIOGRAFIA TRANSVERSAL – TMR

A outra metade dos espécimes seccionados foi adicionalmente seccionada longitudinalmente no centro da superfície cariada (corte perpendicular a superfície), usando um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA) e um disco diamantado de dupla face - XL 12205, “High concentration”, $102 \times 0,3 \times 12,7 \text{ mm}^3$ (Extex Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205),

com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, possibilitando a obtenção de um fragmento com a espessura de aproximadamente 500 μm , espessura esta que era possível realizar na máquina de modo a não fraturar o espécime. Para chegar a espessura apropriada para a análise com o TMR (esmalte: 100 μm e dentina: 120-130 μm), foi realizado o polimento manual desses fragmentos utilizando lixas 600 e 1200 (Extec. Corp.) umedecidas em água deionizada. A espessura final foi checada com paquímetro digital (Figura 17).

Figura 17 – Paquímetro digital utilizado para checar a espessura dos espécimes para a análise com o TMR.

Os espécimes foram preparados e enviados à Universidade de Zurich, sob supervisão do Prof. Dr. Wolfgang Buchalla/ Annette Wiegand, para serem analisados.

As microradiografias foram realizadas de cada fragmento em combinação com uma meia fatia “stepwedge” de alumínio (14 fatias, $\pm 22 \mu\text{m}$ de espessura, 99.9% Al) para calibração, utilizando filmes radiográficos monocromáticos de alta velocidade (SO 253, Kodak AG, Stuttgart, Alemanha) expostos a raio x Cu K α (20 kv e 20 mA) por 15s. O raio X foi direcionado perpendicularmente à direção da progressão da lesão, a 30 cm de distância focal. Após cada exposição, o filme foi revelado, fixado e lavado (Figuras 18a a 18d). A análise do filme foi realizada através de um microscópio estereó (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com camera CCD preta e branca (XC-77 CE, Sony, Toquio, Japão) acoplado a um computador com um software para os cálculos (TMR, 1.25e, Inspector Research BV, Amsterdam, Holanda) (Figuras 19a a 19c). As microradiografias foram salvas como imagens com um tamanho de 640x480 pixels e resolução de 256 valores de cinza através do software (BUCHALLA et al., 2008).

A perda mineral integrada (ΔZ) e profundidade da lesão (μm) foram calculadas a partir de valores de cinza de microradiografias padrão usando a fórmula de Angmar, Carlstromd e Glas (1963). O ΔZ (%vol. μm) é o produto da diferença

entre a porcentagem de conteúdo mineral de um esmalte e dentina sadios e porcentagem de conteúdo mineral do esmalte e dentina desmineralizados (espécime) em relação à profundidade da lesão (μm). Já a profundidade da lesão é definida pela distância da superfície (0% vol min) até a profundidade em que o esmalte e dentina volta a apresentar um conteúdo mineral igual ou maior que 95% do conteúdo mineral do esmalte e dentina hígidos (AREND; TEN BOSCH, 1992). O conteúdo mineral do esmalte e dentina hígidos corresponde a 87 e 50%, respectivamente. A profundidade da zona superficial “pseudo-intacta” ($\text{SL} - \mu\text{m}$), o conteúdo mineral máximo da zona superficial “pseudo-intacta” (Z_{max}) e o valor R ($\Delta Z/\text{profundidade}$), sendo este ultimo representativo da média de perda mineral da lesão, também foram calculados.

Figuras 18 – **a.** Espécime pronto para análise; **b.** Equipamento utilizado para análise; **c.** Posicionamento do espécime com as 14 fatias de alumínio na cabine do raio-X; **d.** Painel de controle.

Figuras 19 – **a.** Microscópio estéreo; **b.** Filmes fotográficos sendo analisados pelo microscópio estéreo; **c.** Software utilizado para as análises.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.9.1 Geral

Os dados foram tabulados em planilhas do Excel. O número de espécimes de esmalte e dentina foram considerados como número amostral e submetidos à análise estatística utilizando programas como GraphPad InStat versão 4.0 para Windows, GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (San Diego, CA, USA) e SPSS v. 13. 0. Inicialmente foram testadas a normalidade (teste de Kolmogorov e Smirnov) e a homogeneidade dos dados (teste de Bartlett) para a seleção do teste estatístico apropriado (paramétrico ou não paramétrico) a ser utilizado para o esmalte e dentina. Apesar de alguns dados não terem passado pelo teste de homogeneidade e terem sido submetidos a análises não paramétricas, estes dados serão expressos em média e desvio-padrão nos resultados.

O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

4.9.2 Esmalte

Os dados de SH final, %SHC, perda de dureza integrada (Δ KHN), média de profundidade da lesão (μ m), SL (μ m), perda mineral integrada (Δ Z) e média de perda mineral por profundidade (valor de R - % conteúdo mineral) passaram pelo teste de normalidade, mas não foram homogêneos. Assim, foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Dunn, para comparações múltiplas entre os diferentes protocolos (*in vitro*, *in situ*). Já as diferenças entre o SH inicial e o Z max (% conteúdo mineral máximo da camada superficial) foram analisadas utilizando-se ANOVA a um critério seguido pelo teste Tukey.

No caso da dureza longitudinal e conteúdo mineral, para a comparação entre as profundidades dentro do mesmo protocolo (soluções, geis ou *in situ*), foi utilizada ANOVA a dois critérios de medidas repetidas seguido pelo teste Bonferroni. Já para avaliar as diferenças entre os protocolos, em cada profundidade separadamente, foram utilizados ANOVA a um critério seguido pelo teste Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn, dependendo da profundidade (para a dureza longitudinal, nas

profundidades de 10, 50 e 70 μm foram utilizados Kruskal-Wallis e Dunn, enquanto que nas profundidades 30, 90, 110 e 220 μm utilizou-se ANOVA a um critério seguido pelo teste Tukey. Já para o conteúdo mineral, em todas as profundidades utilizaram o Kruskal-Wallis e Dunn).

4.9.3 Dentina

Os dados de perda mineral integrada (ΔZ), SL (μm), Z Max (% conteúdo mineral máximo da camada superficial) e média da profundidade da lesão (μm) passaram no teste de normalidade, mas não foram homogêneos. Assim, foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Dunn, para comparações múltiplas entre os diferentes protocolos (*in vitro* e *in situ*). Já as diferenças entre protocolos em relação ao SH inicial, SH final, %SHC, o ΔKHN e a média de perda mineral pela profundidade (valor de R - % conteúdo mineral) foram analisadas utilizando-se ANOVA a um critério seguida pelo teste Tukey.

No caso da dureza longitudinal e conteúdo mineral, para a comparação entre as profundidades dentro do mesmo protocolo (soluções, géis ou *in situ*), utilizou-se ANOVA a dois critérios de medidas repetidas seguida pelo teste Bonferroni. Já para avaliar as diferenças entre os protocolos, em cada profundidade separadamente, foram utilizados Kruskal-Wallis e Dunn.

4.9.4 Relação entre Dureza superficial e longitudinal e TMR

Para analisar a possível relação entre dureza longitudinal (CSH) ou sua raiz quadrada e a % de conteúdo mineral (TMR) para cada profundidade avaliada, os valores obtidos para cada tipo de lesão e para todas as lesões combinadas foram submetidos à regressão quadrática e linear/ r^2 (coeficiente de determinação) considerando como variável independente a porcentagem de conteúdo mineral e a dependente, a dureza longitudinal (ou sua raiz).

As correlações entre outros dados da análise de dureza (SH final ou sua raiz quadrada, %SHC e ΔKHN) e os parametros de TMR (valor de R, profundidade

da lesão, ΔZ , $Z_{\max}$ e SL) também foram realizadas utilizando-se para tal o coeficiente de correlação entre estes valores (Coeficiente de Pearson)

.

5 Resultados

5 RESULTADOS

No estudo *in vitro* com esmalte, dos 48 espécimes iniciais, dois espécimes por grupo foram excluídos e para a dentina todos os 60 espécimes foram utilizados na análise estatística (Tabela 3).

Para o estudo *in situ*, dezesseis voluntários foram selecionados, sendo que destes, cinco desistiram (dois voluntários por dificuldade para a execução do experimento, dois voluntários por motivos pessoais e uma por falta de adaptação ao uso do aparelho). Dessa forma, somente 11 voluntários (2 homens e 9 mulheres, 19 a 29 anos de idade) completaram o estudo. Como critério de seleção dos voluntários, o fluxo e pH salivar foram avaliados. Os voluntários apresentaram um fluxo salivar não estimulado de $0,6 \pm 0,3$ ml/minuto e estimulado de $2,0 \pm 0,8$ ml/minuto. O pH salivar variou entre 6,5 e 7,5. Nenhum dos voluntários apresentou lesões de cárie ativas ou doença periodontal. Contudo, a análise estatística foi realizada por espécime e não por voluntário, uma vez que o estudo não foi cruzado (não se avaliou o efeito de tratamentos) e a variabilidade individual foi grande de forma que se excluíram 7 espécimes de esmalte e 4 de dentina com valores de perda mineral discrepantes da média geral (Tabela 3).

Já para a análise *in vivo*, a variabilidade entre os 16 espécimes que apresentavam lesões cariosas naturais (mancha branca) foi ainda maior, sendo estas em alguns momentos muito rasas e em outras muito profundas. Portanto, não foi possível realizar a avaliação da microradiografia transversal e a análise estatística para as comparações com os demais grupos. Contudo, as imagens das microradiografias foram incluídas nos resultados, para uma avaliação qualitativa (n=8).

Tabela 3 – Número amostral para o estudo do esmalte e dentina.

		Nº Amostral
Esmalte	GEL MC	n = 10
	GEL PA	n = 10
	MDHP	n = 10
	TAMPÃO	n = 10
	<i>IN SITU</i> *	n = 16
	<i>IN VIVO</i>	n = 8
Dentina	TAMPÃO II**/**	n = 15
	GEL MC II**/**	n = 15
	TAMPÃO II MOD.	n = 15
	MDHP	n = 15
	<i>IN SITU</i> ***	n = 18

* O número amostral para a SL e para o Z max do estudo *IN SITU* para o esmalte foi de n=11; ** O número amostral do TAMPÃO II e GEL MC II para Δ KHN foi de n=12 e n=11, respectivamente. *** O número amostral do Z max e SL para os grupos TAMPÃO II, GEL MC II e *IN SITU* foi n= 11, n=6 e n=2, respectivamente.

5.1 ESMALTE

5.1.1 Dureza superficial e longitudinal

Quanto às diferenças entre os tipos de lesões produzidas, os protocolos produziram lesões com diferenças significativas tanto na dureza de superfície como na de subsuperfície (Tabela 4 e Figuras 20 e 21).

Tabela 4 – Média e desvio padrão dos valores de SH inicial, SH final (KgF/mm²), %SHC e ΔKHN (KgF/mm².μm) para cada protocolo para a desmineralização do esmalte.

	GEL MC	GEL PA	MDHP	TAMPÃO	IN SITU
SH inicial	367,5 ±	372,3 ±	363,1 ±	375,7 ±	372,2 ±
	20,7 ^a	16,3 ^a	20,0 ^a	26,7 ^a	19,6 ^a
SH final	113,5 ± 18,2 ^{bc}	63,5 ± 8,6 ^{ab}	165,5 ± 14,2 ^c	37,4 ± 17,2 ^a	46,1 ± 67,7 ^a
% SHC	69,1 ± 4,7 ^{ab}	83,0 ± 1,8 ^{bc}	54,0 ± 4,5 ^a	90,1 ± 4,4 ^c	87,3 ± 19,4 ^c
ΔKHN	6832,7 ±	4819,8 ±	76123,0 ±	30458,8 ±	71492,3 ±
	1476,0 ^{ab}	1532,0 ^a	63171,0 ^b	49312,0 ^{ab}	57627,8 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tipos de lesões criadas. (ANOVA a um critério seguido de Tukey para SH inicial $p=0,684$, e para os demais parâmetros, Kruskal-Wallis e Dunn, $p<0,001$).

O SH inicial não foi significativamente diferente entre os grupos ($p=0,684$). O SH final foi maior para os espécimes do grupo MDHP que diferiram dos demais grupos ($p<0,001$), com exceção do grupo GEL MC. Conseqüentemente, o grupo MDHP obteve a menor %SHC, diferindo significativamente de GEL PA, TAMPÃO e IN SITU ($p<0,001$). Por outro lado, a perda de dureza integrada (ΔKHN) foi maior para o grupo MDHP, seguido pelo grupo IN SITU, sendo estes significativamente diferentes apenas do grupo GEL PA ($p=0,0007$).

A Figura 20 mostra imagens microscópicas da análise de dureza longitudinal do esmalte desmineralizado pelos diferentes protocolos. De um modo geral, os valores de dureza longitudinal variaram de 42 a 310 KgF/mm², como mostra a Figura 21.

Figura 20 – Imagens de dureza longitudinal de um espécime representativo por protocolo de produção de cárie em esmalte; **a.** GEL MC; **b.** GEL PA; **c.** MDHP; **d.** TAMPÃO; **e.** IN SITU.

Figura 21 - Perfis de dureza longitudinal (média) ao longo da profundidade para as lesões produzidas pelos diferentes protocolos em esmalte *in vitro* e *in situ*.

ANOVA a 2 critérios revelou diferenças significativas entre as profundidades e interação entre os fatores ($p < 0,0001$) no caso da dureza longitudinal. Quando as diferentes profundidades para um mesmo protocolo foram comparadas em relação à dureza longitudinal houve diferença significativa entre 10 e 30 μm para todos os grupos; entre 30 e 50 μm para todos os protocolos com exceção do MDHP; entre 50 e 70 μm e 70 e 90 μm somente para o protocolo IN SITU; e entre 90 e 110 μm e 110 e 220 μm não houve diferença significativa para todos os grupos (teste de Bonferroni).

Já quando os valores de dureza foram comparados entre os protocolos na mesma profundidade somente houve diferença significativa entre os protocolos aos 10 μm de profundidade ($p < 0,0001$), sendo que o grupo MDHP apresentou o maior valor de dureza, não diferindo dos grupos GEL MC e GEL PA. Por outro lado, os espécimes desmineralizados com GEL MC e MDHP apresentaram maior valor de dureza que os espécimes do grupo TAMPÃO e IN SITU (Tabela 5).

Tabela 5 – Média e desvio padrão dos valores de dureza longitudinal (KgF/mm²) para o esmalte desmineralizado pelos diferentes protocolos para cada profundidade.

	GEL MC	GEL PA	MDHP	TAMPÃO	IN SITU
10 µm	78,2 ± 17 ^{b*}	66,0 ± 12,0 ^{ab*}	109,5 ± 59,3 ^{b*}	42,2 ± 8,7 ^{a*}	31,7 ± 42,0 ^{a*}
30 µm	129,5 ± 40,5 ^{a*}	163,6 ± 69,1 ^{a*}	172,6 ± 92,0 ^{a*}	118,3 ± 76,0 ^{a*}	89,4 ± 8,04 ^{a*}
50 µm	287,1 ± 60,3 ^{a*}	272,2 ± 39,9 ^{a*}	219,5 ± 103,0 ^a	263,5 ± 44,3 ^{a*}	161,8 ± 126,0 ^{a*}
70 µm	292,0 ± 39,7 ^a	272,9 ± 31,6 ^a	245,6 ± 90,3 ^a	287,1 ± 35,0 ^a	207,2 ± 114,0 ^{a*}
90 µm	309,4 ± 44,3 ^a	280,4 ± 31,0 ^a	271,4 ± 80,5 ^a	289,4 ± 55,5 ^a	257,9 ± 93,0 ^{a*}
110 µm	305,3 ± 41,4 ^a	271,9 ± 33,9 ^a	280,6 ± 82,4 ^a	289,6 ± 31,7 ^a	288,3 ± 72,0 ^a
220 µm	290,4 ± 46,0 ^a	272,9 ± 33,4 ^a	305,0 ± 49,7 ^a	296,1 ± 37,1 ^a	297,4 ± 64,0 ^a

Em relação às linhas, diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tipos de lesões criadas (ANOVA a um critério seguido de Tukey para as profundidades de 30, 90, 110 e 220 µm, e Kruskal-Wallis e Dunn para as profundidades 10, 50 e 70 µm, p<0,05). *mostra as profundidades que apresentaram valores de dureza significativamente crescentes dentro da mesma coluna (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, p<0,001).

5.1.2 Microradiografia transversal (TMR)

De um modo geral, os valores de conteúdo mineral variaram de 42 a 89%, como mostram os perfis de conteúdo mineral na Figura 22 e 23. A camada superficial foi visível nos perfis de TMR (Figura 22), mas não nos perfis de dureza.

Figura 22 – Exemplos de imagem microradiográfica de um espécime e os perfis de conteúdo mineral nos diferentes tipos de lesão de esmalte. **a.** GEL MC; **b.** GEL PA; **c.** MDHP; **d.** TAMPÃO; **e.** IN SITU.

Figura 23 - Perfis de conteúdo mineral (média) ao longo da profundidade para as lesões produzidas pelos diferentes protocolos em esmalte *in vitro* e *in situ*.

Quanto às diferenças entre os tipos de lesões produzidas, os protocolos produziram lesões com diferenças significantes nos parâmetros de microradiografia (Tabela 6 e Figura 22).

Tabela 6 – Média e desvio padrão da SL (μm), Z Max (% vol min), profundidade da lesão (μm), ΔZ (%vol min. μm) e valor de R (% vol min) para o esmalte desmineralizado pelos diferentes protocolos.

	GEL MC	GEL PA	MDHP	TAMPÃO	IN SITU
SL (μm)*	9,4 $\pm$ 3,6 ^b	6,1 $\pm$ 2,8 ^{ab}	10,5 $\pm$ 5,8 ^b	4,2 $\pm$ 1,8 ^a	8,0 $\pm$ 3,0 ^{ab}
Z max (%vol min)*	69,5 $\pm$ 5,3 ^c	57,4 $\pm$ 7,8 ^{bc}	60,9 $\pm$ 11,8 ^c	47,8 $\pm$ 7,5 ^b	33,7 $\pm$ 13,0 ^a
Profundidade (μm)	35,8 $\pm$ 2,5 ^a	49,4 $\pm$ 23,1 ^{ab}	85,6 $\pm$ 49,9 ^{ab}	42,5 $\pm$ 19,2 ^a	80,8 $\pm$ 36,0 ^b
Perda mineral integrada (ΔZ - %vol min.μm)	731,4 $\pm$ 140,9 ^a	989,1 $\pm$ 279,0 ^a	1518,5 $\pm$ 805,5 ^{ab}	1108,1 $\pm$ 406,0 ^a	3243,6 $\pm$ 1689,0 ^b
Valor de R (%vol min)	20,5 $\pm$ 4,1 ^a	21,8 $\pm$ 5,4 ^a	20,5 $\pm$ 3,6 ^a	27,1 $\pm$ 4,4 ^{ab}	39,7 $\pm$ 13,0 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tipos de lesões produzidas (Anova a um critério seguido de Tukey para Zmax e para os demais parâmetros foram aplicados Kruskal Wallis e Dunn, $p < 0,0021$). *Em relação ao Z max e SL, não foi possível o cálculo deste parâmetro para alguns espécimes do grupo IN SITU, dessa forma, o número amostral foi reduzido nesta análise de 16 para 11.

No geral, lesões foram produzidas com uma média de profundidade entre 35 e 52 μm , com exceção das lesões produzidas pelo grupo MDHP (86 μm) e pelo IN SITU (81 μm), porém só houve diferença significativa entre o IN SITU e os grupos GEL MC e TAMPÃO ($p = 0,0007$). A perda mineral integrada (ΔZ) foi significativamente maior para o grupo IN SITU quando comparado aos grupos GEL MC, GEL PA e TAMPÃO ($p < 0,001$), não diferindo significativamente do grupo MDHP. Similarmente ao ΔZ , o maior valor de R foi encontrado nas lesões produzidas IN SITU diferindo significativamente dos grupos GEL MC, GEL PA e MDHP ($p < 0,001$). Por outro lado, as lesões dos grupos GEL MC e MDHP apresentaram uma espessa camada superficial, diferindo somente do grupo TAMPÃO ($p = 0,0021$). O valor de Z max foi maior para o grupo GEL MC, o qual diferiu somente dos grupos TAMPÃO e IN SITU ($p < 0,0001$).

ANOVA a 2 critérios revelou diferenças significativas entre as profundidades, protocolos e interação entre os fatores ($p < 0,0001$) no caso do

conteúdo mineral. Quando as diferentes profundidades para um mesmo protocolo foram comparadas em relação ao conteúdo mineral, houve diferença significativa entre 10 e 30 μm para todos os grupos com exceção do MDHP; entre 30 e 50 μm e 50 e 70 μm somente para o protocolo IN SITU; e entre 70 e 90 μm , 90 e 110 μm não houve diferença significativa para todos os grupos (teste de Bonferroni). Entre as profundidades 110 e 220 μm , somente houve diferença para o protocolo IN SITU.

Em relação ao conteúdo mineral, nas profundidades de 10 e 30 μm os espécimes submetidos à desmineralização *IN SITU* apresentaram menores valores em comparação a todos os grupos, com exceção do TAMPÃO aos 10 μm e do MDHP aos 30 μm ($p < 0,0001$). Aos 50 μm , o GEL MC diferiu do MDHP e IN SITU, sendo este último ainda significativamente diferente do TAMPÃO ($p < 0,0001$). O mesmo resultado foi visto aos 70 e 90 μm , porém neste caso o grupo GEL MC foi similar ao MDHP ($p < 0,0001$). A partir de 110 μm não houve mais diferença entre os grupos ($p > 0,05$). A Tabela 7 mostra os valores médios da porcentagem de conteúdo mineral para os protocolos em cada profundidade.

Tabela 7 – Média e desvio padrão dos valores de % conteúdo mineral do esmalte desmineralizado pelos diferentes protocolos ao longo da profundidade.

	GEL MC	GEL PA	MDHP	TAMPÃO	IN SITU
10 µm	67,2 ± 6,9 ^{b*}	57,2 ± 7,2 ^{b*}	56,2 ± 18,3 ^b	42,6 ± 8,6 ^{ab*}	27,6 ± 18,0 ^{a*}
30 µm	77,1 ± 2,0 ^{b*}	79,1 ± 5,2 ^{b*}	65,1 ± 12,4 ^{ab}	78,3 ± 7,3 ^{b*}	40,8 ± 22,0 ^{a*}
50 µm	85,8 ± 1,0 ^c	82,6 ± 3,0 ^{abc}	77,4 ± 10,2 ^{ab}	84,3 ± 3,0 ^{bc}	61,3 ± 19,0 ^{a*}
70 µm	86,6 ± 0,4 ^b	84,4 ± 2,8 ^{ab}	79,4 ± 8,4 ^{ab}	85,6 ± 2,4 ^b	74,2 ± 12,0 ^{a*}
90 µm	87,0 ± 0,8 ^b	85,1 ± 1,7 ^{ab}	82,1 ± 6,7 ^{ab}	86,6 ± 1,9 ^b	79,4 ± 11,0 ^a
110 µm	86,8 ± 0,6 ^a	87,0 ± 0,8 ^a	83,2 ± 5,5 ^a	87,2 ± 1,6 ^a	81,6 ± 15,0 ^{a*}
220 µm	88,7 ± 1,2 ^a	88,8 ± 1,8 ^a	87,0 ± 1,9 ^a	88,9 ± 2,3 ^a	93,4 ± 17,0 ^{a*}

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tipos de lesões produzidas (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$). * mostra as profundidades que apresentaram valores de conteúdo mineral significativamente crescentes entre as colunas (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni, $p < 0,001$).

5.1.3 Lesão natural de cárie inicial em esmalte

Dos 16 espécimes preparados, 3 apresentaram fratura no momento do polimento para microradiografia (Figura 25c) e 5, apesar de clinicamente apresentarem-se com mancha branca, microscopicamente apresentaram aspecto hígido (Figura 25d). Assim, conseguimos avaliar 8 espécimes (Figuras 24a-f), sendo que destes dois cavitaram durante a análise da microradiografia (25a-b). As lesões de mancha branca apresentaram-se variáveis. Apesar de o aspecto clínico ter sido similar entre as lesões, pôde-se observar que na análise microscópica, obtivemos desde lesões rasas sem camada superficial até lesões profundas em dentina com espessa camada superficial “pseudo-intacta”.

Figura 24 – Imagem microradiográfica de diferentes lesões de mancha branca natural; **a.** Lesão mais superficial sem grande desmineralização; **b.** Lesão rasa, localizada, apresentando uma fina camada superficial “pseudo-intacta”; **c.** Lesão rasa e restrita a uma pequena área, sem camada superficial “pseudo-intacta” visível; **d.** Lesão de profundidade média e com uma espessa camada superficial “pseudo-intacta”; **e.** Lesão profunda e com uma pequena área com microcavitação; e **f.** Lesão já se estendendo à dentina e com uma espessa camada superficial “pseudo-intacta”.

Figura 25 - **a.** lesão profunda e com perda de estrutura superficial; **b.** lesão atingindo dentina com perda de estrutura superficial; **c.** espécime apresentando fratura na área da lesão; **d.** espécime sem lesão microscópica aparente, apesar de aspectos de mancha branca clinicamente.

5.2 DENTINA

5.2.1 Dureza superficial e longitudinal

Quanto às diferenças entre os tipos de lesões produzidas, os protocolos produziram lesões com diferenças significativas somente em relação à dureza de superfície, mas não em relação ao Δ KHN (Tabela 8).

Tabela 8 – Média e desvio padrão do SH inicial, SH final (KgF/mm²), %SHC e ΔKHN (KgF/mm².μm) da dentina desmineralizada pelos diferentes protocolos.

	GEL MC II	TAMPÃO II	TAMPÃO III	MDHP II	IN SITU
SH inicial	33,9 ± 5,7 ^b	23,2 ± 6,5 ^a	22,4 ± 4,3 ^a	23,1 ± 6,9 ^a	41,7 ± 5,2 ^c
SH final	9,2 ± 2,3 ^b	4,6 ± 2,4 ^a	2,6 ± 1,5 ^a	3,3 ± 1,5 ^a	3,7 ± 2,5 ^a
% SHC	72,4 ± 8,1 ^a	80,5 ± 7,1 ^{ab}	87,6 ± 9,0 ^{bc}	83,4 ± 11,5 ^{bc}	91,1 ± 6,4 ^c
ΔKHN*	8169,4 ± 4581,8 ^a	8512,7 ± 4025,3 ^a	11739,4 ± 3287,4 ^a	10785,2 ± 3489,5 ^a	8213,0 ± 4219,4 ^a

Letras diferentes dentro da mesma linha indicam diferenças significativas entre os tipos de lesões criadas (ANOVA a um critério seguido de Tukey, $p < 0,0426$). *Em relação ao ΔKHN, não foi possível o cálculo deste parâmetro para alguns espécimes, dessa forma, o número amostral foi reduzido nesta análise ($n=12$ para TAMPÃO II e $n=11$ para GEL MC II).

O SH inicial foi maior para o grupo IN SITU e GEL MC II, os quais diferiram entre si e dos demais grupos ($p < 0,0001$). O SH final foi maior para os espécimes desmineralizados pelo GEL MC II, diferindo significativamente dos demais grupos ($p < 0,001$), já o grupo TAMPÃO III obteve o menor SH final, não diferindo dos grupos TAMPÃO II, MDHP II e IN SITU ($p > 0,05$). Sendo assim, o grupo GEL MC II obteve a menor %SHC, similarmente ao grupo TAMPÃO II ($p > 0,05$); o grupo IN SITU obteve a maior %SHC, não diferindo significativamente do grupo MDHP II e TAMPÃO III ($p > 0,05$). Já para a perda de dureza integrada (ΔKHN) não houve diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,0426$, teste de Tukey não mostrou diferenças significativas entre os grupos).

De um modo geral, os valores de dureza longitudinal variaram de 1,17 a 26 KgF/mm² (Figura 26).

Figura 26 – Perfis de dureza longitudinal (média) ao longo da profundidade para as lesões produzidas pelos diferentes protocolos em dentina *in vitro* e *in situ*.

A Figura 27 mostra imagens microscópicas da análise de dureza longitudinal da dentina desmineralizada pelos diferentes protocolos.

Figura 27 – Imagens de dureza longitudinal de um espécime representativo por protocolo para a produção de cárie em dentina; **a.** GEL MC II; **b.** TAMPÃO II; **c.** TAMPÃO III; **d.** MDHP II; e **e.** IN SITU.

ANOVA a 2 critérios revelou diferenças significativas entre as profundidades, protocolos e interação entre os fatores ($p < 0,0001$) no caso da dureza longitudinal. Quando as diferentes profundidades para um mesmo protocolo foram comparadas em relação à dureza longitudinal, não houve diferenças significativas entre as profundidades 10 e 30 μm e entre a 70 e 90 μm independentemente do protocolo. As profundidades 30 e 50 μm somente diferiram entre si no grupo GEL MC II; e 50 e 70 μm somente para os grupos GEL MC II e TAMPÃO III. As profundidades 90 e 110 μm apresentaram diferenças significativas entre si somente no grupo IN SITU. Por fim, as profundidades entre 110 e 220 μm diferiram nos grupos TAMPÃO II e IN SITU (teste de Bonferroni).

Já quando os valores de dureza foram comparados entre os protocolos na mesma profundidade houve diferença significativa entre os protocolos em todas as profundidades avaliadas ($p < 0,0001$). Ao longo da profundidade, houve uma tendência para os espécimes desmineralizados com GEL MC II, TAMPÃO II e IN SITU apresentarem menores valores de dureza em comparação aos espécimes do TAMPÃO III e do MDHP II (Tabela 9, $p < 0,0001$).

Tabela 9 – Média e desvio padrão dos valores de dureza longitudinal (KgF/mm²) para a dentina desmineralizada pelos diferentes protocolos para cada profundidade.

	GEL MC II	TAMPÃO II	TAMPÃO III	MDHP II	IN SITU
10 µm	3,6 ± 6,5 ^a	17,7 ± 9,1 ^b	12,8 ± 3,8 ^b	15,7 ± 5,2 ^b	3,8 ± 6,0 ^a
30 µm	4,5 ± 5,9 ^{a*}	15,0 ± 6,6 ^{bc}	14,1 ± 3,3 ^c	14,3 ± 3,2 ^c	5,6 ± 7,5 ^{ab}
50 µm	10,1 ± 8,9 ^{ab*}	13,7 ± 6,3 ^{ab}	16,1 ± 3,3 ^{ab*}	17,0 ± 2,0 ^b	6,8 ± 9,0 ^a
70 µm	16,3 ± 6,3 ^{ab*}	14,3 ± 6,7 ^{ab}	19,9 ± 4,4 ^{b*}	19,8 ± 2,5 ^b	8,0 ± 10,5 ^a
90 µm	17,3 ± 7,0 ^{ab}	15,1 ± 6,8 ^{ab}	22,2 ± 5,2 ^b	22,0 ± 2,9 ^b	11,0 ± 11,0 ^{a*}
110 µm	18,2 ± 7,7 ^{ab}	16,4 ± 5,9 ^{a*}	23,8 ± 5,5 ^b	23,0 ± 3,6 ^b	17,4 ± 6,3 ^{a*}
220 µm	18,8 ± 8,4 ^a	22,0 ± 8,3 ^{a*}	25,4 ± 7,5 ^a	25,3 ± 4,4 ^a	22,3 ± 4,0 ^{a*}

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tipos de lesões produzidas (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$). *mostra as profundidades que apresentaram valores de dureza significativamente crescentes entre as colunas (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni, $p < 0,0001$). **Não foi possível o cálculo deste parâmetro para alguns espécimes, dessa forma, o número amostral foi reduzido nesta análise ($n=12$ para TAMPÃO II e $n=11$ para GEL MC II).

5.2.2 Microradiografia transversal (TMR)

De um modo geral, os valores de conteúdo mineral variaram de 9 a 48% (Figura 28 e 29). A camada superficial foi visível nos perfis de TMR para todos os espécimes apenas nos grupos TAMPÃO III e MDHP II. No grupo IN SITU apenas dois espécimes apresentaram camada superficial (2 de 18 espécimes), já para o grupo GEL MC II apenas seis espécimes e para o grupo TAMPÃO II apenas onze espécimes de um número amostral de 15. A camada superficial foi visível nos perfis de TMR (Figura 29), mas não nos perfis de dureza.

Figura 28 – Perfis de conteúdo mineral (média) ao longo da profundidade para as lesões produzidas pelos diferentes protocolos em dentina *in vitro* e *in situ*.

Figura 29 – Exemplos de imagem microradiográfica e os perfis de conteúdo mineral nos diferentes tipos de lesão em dentina. **a.** GEL MC II; **b.** TAMPÃO II; **c.** TAMPÃO III; **d.** MDHP II; **e.** IN SITU.

Quanto às diferenças entre os tipos de lesões produzidas, os protocolos produziram lesões com diferenças significantes nos parâmetros de microradiografia (Tabela 10 e Figura 29).

Tabela 10 – Média e desvio padrão da profundidade da SL (μm), Z Max (%vol min), profundidade da lesão (μm), ΔZ (%vol min. μm) e valor de R (% vol min) para a dentina desmineralizada pelos diferentes protocolos.

	GEL MC II	TAMPÃO II	TAMPÃO III	MDHP II	IN SITU
SL* (μm)	7,1 $\pm$ 3,1 ^a	19,4 $\pm$ 5,5 ^b	13,5 $\pm$ 7,4 ^{ab}	11,7 $\pm$ 7,8 ^a	10,1 $\pm$ 0,8 ^{ab}
Z max* (%vol)	6,0 $\pm$ 8,9 ^a	23,1 $\pm$ 22,3 ^b	36,9 $\pm$ 7,4 ^{ab}	44,1 $\pm$ 7,1 ^b	13,5 $\pm$ 9,6 ^{ab}
Profundidade (μm)	87,2 $\pm$	261,8 $\pm$	163,4 $\pm$	162,5 $\pm$	137,1 $\pm$
	19,7 ^a	24,8 ^c	29,9 ^b	29,8 ^b	48,6 ^{ab}
Perda mineral integrada (ΔZ - %vol.μm)	1709,5 $\pm$	7069,5 $\pm$	3064,9 $\pm$	2279,2 $\pm$	4406,2 $\pm$
	301,0 ^a	1071,3 ^d	771,5 ^{bc}	591,4 ^{ab}	1972,6 ^{cd}
Valor de R (%vol)	20,0 $\pm$ 3,9 ^b	27,1 $\pm$ 3,7 ^c	18,8 $\pm$ 3,8 ^b	14,1 $\pm$ 3,2 ^a	31,2 $\pm$ 5,4 ^d

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significantes entre os tipos de lesões produzidas. (ANOVA a um critério seguido de Tukey para o valor de R e Kruskal-Wallis e Dunn para os demais, $p < 0,0062$). *Em relação ao Z max e a SL, não foi possível o cálculo destes parâmetros para alguns espécimes. Dessa forma, o número amostral foi reduzido nesta análise ($n=11$ para TAMPÃO II, $n=6$ para GEL MC II).

No geral, as lesões apresentaram uma média de profundidade entre 137 a 261 μm , com exceção das lesões produzidas pelo grupo GEL MC II (87,2 μm). Este último diferiu significantemente dos demais grupos ($p < 0,0001$), com exceção do IN SITU. A maior profundidade foi vista no grupo TAMPÃO II que também diferiu significantemente dos demais grupos ($p < 0,0001$).

A perda mineral integrada (ΔZ) foi significantemente maior para os espécimes do grupo TAMPÃO II quando comparadas aos dos grupos GEL MC II, TAMPÃO III e MDHP II ($p < 0,0001$), não diferindo do grupo IN SITU. O GEL MC II induziu ao menor valor médio de ΔZ , o qual foi significantemente menor que todos

os outros grupos, com exceção do MDHP II. Já o valor R foi maior para o grupo IN SITU, diferindo significativamente dos demais grupos ($p < 0,0001$). O MDHP II induziu a significante menor perda média mineral (valor de R).

Em relação à SL, o grupo TAMPÃO II apresentou o maior valor, seguido pelo grupo TAMPÃO III, sendo que o primeiro grupo diferiu significativamente dos grupos GEL MC II e MDHP II ($p < 0,05$). Os grupos que apresentaram o maior Z max foram MDHP II e TAMPÃO III, sendo que somente o MDHP II diferiu significativamente do GEL MC II ($p < 0,0001$).

ANOVA a 2 critérios revelou diferenças significativas entre as profundidades, protocolos e interação entre os fatores ($p < 0,0001$) no caso do conteúdo mineral. Quando as diferentes profundidades para um mesmo protocolo foram comparadas em relação ao conteúdo mineral, houve diferenças significativas entre 10 e 30 μm para os grupos GEL MC II, TAMPÃO III e MDHP II; entre 30 e 50 μm para o GEL MC II e TAMPÃO II; entre 50 e 70 μm para o TAMPÃO II, GEL MC II e IN SITU; entre 90 e 110 μm para o IN SITU; e entre 110 e 220 μm para todos os grupos com exceção do GEL MC II. Entre as profundidades de 70 e 90 μm não houve diferença independentemente do grupos.

Já quando os valores de % conteúdo mineral foram comparados entre os protocolos na mesma profundidade houve diferença significativa entre os protocolos em todas as profundidades avaliadas ($p < 0,0001$). Nas camadas mais superficiais, o protocolo IN SITU causou a maior perda de conteúdo mineral (menor % conteúdo mineral) especialmente em comparação ao MDHP II e GEL MC II; a partir dos 70 μm de profundidade, a solução TAMPÃO II foi o protocolo que levou a menor % conteúdo mineral especialmente em comparação ao MDHP II, GEL MC II e IN SITU. Por outro lado, ao longo da profundidade, o GEL MC II foi o que causou menor desmineralização (% conteúdo mineral mais elevada). A Tabela 11 mostra as comparações realizadas entre os grupos ($p < 0,0001$).

Tabela 11 – Média e desvio padrão dos valores de % conteúdo mineral para a dentina desmineralizada pelos diferentes protocolos para cada profundidade.

	GEL MC II	TAMPÃO II	TAMPÃO III	MDHP II	IN SITU
10 µm	12,2 ± 7,3 ^{ab*}	24,0 ± 15,8 ^{bc}	32,1 ± 10,6 ^{c*}	37,5 ± 9,7 ^{c*}	5,9 ± 12 ^a
30 µm	24,3 ± 5,1 ^{b*}	29,4 ± 16,9 ^{b*}	21,6 ± 6,12 ^{ab*}	25,9 ± 6,1 ^{b*}	8,7 ± 13,5 ^a
50 µm	34,9 ± 4,9 ^{c*}	18,3 ± 7,8 ^{ab*}	19,6 ± 6,4 ^{ab}	25,5 ± 5,3 ^{bc}	14,0 ± 14,9 ^{a*}
70 µm	41,8 ± 3,3 ^{c*}	11,8 ± 3,2 ^{a*}	23,3 ± 7,4 ^{ab}	30,2 ± 4,9 ^{bc}	20,1 ± 17,5 ^{ab*}
90 µm	44,4 ± 1,8 ^c	9,9 ± 2,5 ^a	28,5 ± 7,3 ^{ab}	35,4 ± 3,9 ^b	25,4 ± 18,5 ^{b**}
110 µm	45,8 ± 1,7 ^c	10,1 ± 2,8 ^{a*}	34,6 ± 6,3 ^{b*}	39,5 ± 3,4 ^{bc*}	31,8 ± 16,3 ^{b**}
220 µm	47,6 ± 0,8 ^b	35,0 ± 6,4 ^{a*}	46,7 ± 1,8 ^{b*}	47,0 ± 0,8 ^{b*}	46,8 ± 1,7 ^{b**}

Em relação às linhas, diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tipos de lesões criadas (Kruskall-Wallis e Dunn, $p < 0,0001$). * ou ** mostra as profundidades, dentro da mesma coluna, que apresentaram valores de dureza significativamente crescentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni, $p < 0,0001$).

Considerando os resultados expostos para a dureza superficial, longitudinal e microradiografia transversal, podemos verificar que os diversos protocolos produziram diferentes tipos de lesões cariosas artificiais, tanto em esmalte como em dentina. O grupo IN SITU, para ambos os substratos, produziu uma lesão profunda, com grande perda mineral integrada, porém com a menor camada superficial “pseudo intacta”. Já o grupo GEL MC provocou a menor desmineralização, produzindo lesões mais rasas e com menor perda mineral integrada, adicionalmente, para o esmalte, este sistema preservou uma espessa camada superficial “pseudo-intacta”. Os grupos MDHP assim como o TAMPÃO produziram lesões subsuperficiais em esmalte e dentina. No geral, as lesões produzidas em dentina foram mais profundas e com maior grau de desmineralização quando comparadas ao esmalte.

5.3 RELAÇÃO CSH X TMR

5.3.1 Esmalte

Ao comparar a existência de relação entre $\sqrt{\text{CSH}}$ e conteúdo mineral, utilizando a regressão quadrática, o coeficiente de determinação médio/forte foi encontrado para cada protocolo de desmineralização do esmalte separadamente, com exceção do grupo MDHP (fraca relação; $r^2 = 0,20$). Já quando a relação entre $\sqrt{\text{CSH}}$ e conteúdo mineral foi analisada pela regressão linear, houve uma redução da relação entre as variáveis, mostrando que as relações não foram lineares (Tabela 12).

Tabela 12 – Regressão quadrática e linear de $\sqrt{\text{CSH}}$ e o conteúdo mineral para os diferentes tipos de lesões em esmalte ($p < 0,05$).

ANÁLISE	PARÂMETROS	GEL MC	GEL PA	MDHP	TAMPÃO	IN SITU	TODOS
Quadrática		$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$
	Intercepção	53,51	1,88	18,42	13,12	0,59	0,78
	Curva Linear	- 1,51	0,037	- 0,26	- 0,36	0,24	0,19
	Curva quadrática	0,013	0,002	0,03	0,005	- 0,00076	- 0,00016
	r^2	0,81	0,65	0,19	0,73	0,49	0,50
Linear		$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$	$\sqrt{\text{CSH}}$
	Intercepção	- 17,75	- 5,36	5,71	- 3,26	2,62	1,29
	Inclinação	0,40	0,25	0,12	0,22	0,15	0,17
	r^2	0,74	0,65	0,20	0,69	0,47	0,50

Os perfis r^2 e linearidade entre $\sqrt{\text{CSH}}$ e conteúdo mineral variaram desde uma fraca relação (MDHP) até média (GEL PA, TAMPÃO e IN SITU) (Tabela 12). As Figuras 30 e 31 mostram a relação entre $\sqrt{\text{CSH}}$ e % conteúdo mineral para o grupo GEL MC e TAMPÃO, respectivamente.

Figura 30 – Plots de conteúdo mineral versus raiz quadrada da dureza longitudinal para o grupo GEL MC (regressão linear, $p < 0,05$). Nota-se que os pontos estão dispersos para conteúdo mineral abaixo de 85%.

Figura 31 – Plots de conteúdo mineral versus a raiz quadrada da dureza longitudinal para o grupo TAMPÃO (regressão linear, $p < 0,05$). Nota-se que os pontos estão muito dispersos para conteúdo mineral abaixo de 85%.

No geral, quando se correlacionou os dados de dureza (SH final, $\sqrt{\text{SH}}$ final, %SHC, ΔKHN) com os dados do TMR (valor de R, profundidade da lesão, ΔZ , Z max e SL) encontrou-se uma correlação baixa a média e não significativa entre a

maioria das variáveis. Considerando cada grupo separadamente, os grupos GEL PA, MDHP, TAMPÃO e IN SITU não apresentaram correlações significativas. As melhores correlações foram vistas entre %SHC e a SL ($r=-0,67$; $p=0,034$; Figura 32) e $\sqrt{\text{SH}}$ final e SL ($r=0,65$; $p=0,04$; Figura 33) para o grupo GEL MC. Quando se correlacionou todos os grupos juntos encontrou-se correlação baixa a média entre o SH final e o valor de R ($r=-0,36$; $p=0,006$), SH final e a SL ($r=0,46$; $p=0,001$), SH final e Zmax ($r=0,58$; $p=0,000$), %SHC e valor de R ($r=0,35$; $p=0,009$), %SHC e Zmax ($r=-0,57$; $p=0,000$), %SHC e SL ($r=-0,46$; $p=0,001$) e ΔKHN e ΔZ ($r=0,30$; $p=0,023$).

Figura 32 – Correlação entre %SHC e SL para o grupo GEL MC, mostrando uma moderada correlação inversa, apesar de os pontos apresentarem-se dispersos ($r^2=0,45$).

Figura 33 – Correlação entre $\sqrt{\text{SH}}$ final e SL para o grupo GEL MC, mostrando uma correlação média, apesar de os pontos apresentarem-se dispersos ($r^2=0,42$).

5.3.2 Dentina

Ao comparar a existência de relação entre CSH ou $\sqrt{\text{CSH}}$ e conteúdo mineral, utilizando a regressão quadrática, uma relação fraca foi encontrada para cada grupo separadamente e para todos juntos, com exceção do grupo IN SITU (coeficiente de determinação médio; $r^2 = 0,46$). Quando a relação entre CSH ou $\sqrt{\text{CSH}}$ e conteúdo mineral foi analisada pela regressão linear, essa relação manteve-se fraca (Tabela 13).

Tabela 13 – Regressão quadrática e linear de CSH ou $\sqrt{\text{CSH}}$ e o conteúdo mineral para os diferentes tipos de lesões em dentina ($p < 0,05$).

ANÁLISE	PARÂMETROS	GEL MC II	TAMPÃO II	TAMPÃO III	MDHP II	IN SITU	TODOS
Quadrática		$\sqrt{\text{CSH}}$	CSH	CSH	CSH	CSH	$\sqrt{\text{CSH}}$
	Intercepção	0,02	20,49	15,63	9,69	2,14	1,16
	Curva Linear	0,08	- 0,55	0,08	0,31	0,63	0,16
	Curva quadrática	0,00014	0,0124	0,0014	- 0,0005	- 0,006	-0,0021
	r^2	0,39	0,054	0,07	0,23	0,46	0,33
Linear		$\sqrt{\text{CSH}}$	CSH	CSH	CSH	CSH	$\sqrt{\text{CSH}}$
	Intercepção	- 0,07	15,00	14,51	10,22	3,09	2,05
	Inclinação	0,09	0,06	0,16	0,27	0,35	0,055
	r^2	0,39	0,01	0,07	0,23	0,45	0,26

No geral, similarmente ao esmalte, quando se correlacionou os dados de dureza (SH final, %SHC, ΔKHN) aos dados do TMR (valor de R, profundidade da lesão, ΔZ , Z max e SL) encontrou uma correlação baixa a média e não significativa para a maioria das correlações.

Entretanto, considerando cada grupo separadamente, o único protocolo que não apresentou correlação significativa entre os parâmetros avaliados foi o IN SITU; neste grupo não foi possível fazer as correlações com os dados de Z max e SL, visto que estes apresentaram somente 2 espécimes, o que impossibilitou a análise estatística. Optou-se por não expressão a correlação entre raiz quadrada de SH final e as variáveis do TMR, uma vez que o resultado foi semelhante ao uso do SH final. As correlações significativas estão expressas na Tabela 14 e Figuras 34 a 37.

Tabela 14 – Correlação entre os parâmetros da dureza com os da microradiografia para os grupos que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$)

Parâmetros de CSH/TMR	ΔZ	Z max	Profundidade	R
SH Final	TAMPÃO II ($r=0,61$)	TAMPÃO II ($r=-0,78$) TAMPÃO III ($r=0,57$)		TAMPÃO II ($r=0,80$)
%SHC				TAMPÃO II ($r=-0,53$)
ΔKHN	TAMPÃO III ($r=0,57$)		GEL MC ($r=0,76$)

Figura 34 – Correlação entre SH final e valor de R para o grupo TAMPÃO II, mostrando uma forte correlação com pontos dispersos ($r=0,80$, $r^2=0,64$, $p=0,000$).

Figura 35 – Correlação entre SH final e Z max para o grupo TAMPÃO II, mostrando uma forte correlação inversa com pontos dispersos ($r = -0,78$; $r^2=0,61$, $p=0,005$).

Figura 36 – Correlação entre ΔKHN e profundidade da lesão para o grupo GEL MC II, mostrando uma forte correlação positiva com pontos dispersos ($r=0,76$, $r^2=0,58$, $p=0,017$).

Figura 37 – Correlação entre SH final e ΔZ para o grupo MDHP II, mostrando uma média correlação inversa com pontos dispersos ($r=-0,70$, $r^2=0,49$, $p = 0,004$)

Quanto ao método de avaliação, não houve uma relação linear entre dureza longitudinal e conteúdo mineral, sendo que os dados de dureza apresentaram maior variabilidade quando comparados ao TMR ao longo da profundidade. Houve poucas correlações entre os parâmetros de dureza e TMR para o esmalte, e algumas correlações entre os parâmetros para a dentina, as quais foram dependentes do protocolo.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A cárie dentária é resultado de ciclos consecutivos de desmineralização e remineralização, em que a desmineralização se sobrepõe aos efeitos da remineralização, isto é, a perda de mineral predomina em relação ao ganho mineral. Isto ocorre em função da produção frequente de ácidos por microorganismos organizados na forma de biofilme, após o consumo de carboidratos (BUZALAF et al., 2011; FEJERSKOV; KIDD, 2011). Entre os carboidratos, a sacarose é considerada a mais cariogênica, e esta característica é atribuída não somente ao metabolismo bacteriano e à produção de ácidos, mas ao seu papel como substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (ROLLA; SCHEIE; CIARDI, 1985) os quais são importantes fatores de virulência do biofilme dentário, permitindo a adesão entre microorganismos (TATEVOSSIAN, 1990; ROSE; DIBDIN; SHELLIS, 1993).

O biofilme dentário supra-gengival é constituído especialmente por *Streptococos* do tipo não mutans e por *Actinomyces*. Conforme há exposição ao açúcar e produção de ácidos, há uma modificação da microbiota, a qual passa a ser composta por microorganismos mais acidogênicos e acidúricos, que produzem e sobrevivem melhor em condições ácidas (TAKAHASHI; NYVAD, 2008, 2011). No início do desenvolvimento da lesão cariosa, há predominância de *Streptococos* não mutans, porém, conforme o pH reduz para menos de 5,0, *Streptococos* mutans, *Lactobacilos*, *bifidobactérias* e fungos tornam-se predominantes. O pH ainda pode ficar entre 4 e 4,5, situação em que somente *Lactobacilos*, *bifidobactérias* e fungos sobrevivem (TAKAHASHI; NYVAD, 2011).

A dinâmica do biofilme em termos de pH e concentração de cálcio, fosfato e fluoreto pode levar ao desenvolvimento do primeiro sinal clínico da lesão cariosa que se manifesta como mancha branca. A mancha branca é detectável clinicamente em função da presença de poros no esmalte que são ocupados por ar ou água, cujos índices de refração são diferentes da apatita dentária. Do ponto de vista microscópico esta lesão é caracterizada inicialmente como uma desmineralização superficial e com o avanço nos processos de des-remineralização, a lesão se torna subsuperficial pela formação de uma camada “pseudo-intacta”. A lesão é de subsuperfície, uma vez que o corpo da lesão encontra-se desmineralizado enquanto a camada superficial está parcialmente desmineralizada, a qual denominamos de

“pseudo-intacta”. A formação desta camada superficial ocorre pela deposição de fluoreto oriundo de fontes externas (presente no fluído do biofilme após aplicação tópica) e de minerais do próprio corpo da lesão (THEUNS et al., 1984a, b; ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986; FEJERSKOV; KIDD, 2011).

Uma vez que a mancha branca representa um estágio inicial da lesão cariosa, na qual o processo pode ser revertido ou controlado, evitando a cavitação, é importante entender as propriedades mecânicas dos tecidos desmineralizados e os mecanismos envolvidos nos processos de desmineralização e remineralização, para a formulação de estratégias preventivas. Para tal, vários estudos laboratoriais e clínicos têm sido realizados. É importante que os protocolos laboratoriais reproduzam uma lesão cariosa inicial de forma mais próxima possível daquela que ocorre *in vivo*. No entanto, as lesões de cárie artificiais apresentam características variadas na questão de conteúdo mineral e profundidade de lesão (SILVERSTONE, 1977). Dessa forma, foi um dos objetivos deste estudo, após pesquisa no pubmed, avaliar os protocolos preconizados para produção de lesões cariosas artificiais em esmalte e dentina *in vitro* e *in situ*, em termos de alteração de dureza superficial e longitudinal, conteúdo mineral e profundidade.

Considerando os objetivos propostos e as hipóteses nulas formuladas, a primeira e a segunda hipóteses nulas foram rejeitadas, visto que existem diferenças significativas em termos de dureza, conteúdo mineral e profundidade entre as diferentes lesões produzidas pelos diferentes protocolos *in vitro* e *in situ* tanto em esmalte como em dentina. A seguir serão discutidos alguns aspectos relacionados à metodologia e os resultados obtidos.

Os modelos *in vitro* são capazes de simular a dinâmica da perda e do ganho mineral dos tecidos dentários, de uma forma barata, rápida e sensível o suficiente para acessar a eficácia de diferentes agentes fluoretados, e gerar resultados experimentais com parâmetros únicos, indispensáveis na seleção das variáveis a serem estudadas nos experimentos *in situ* mais elaborados. Apesar destas vantagens, o modelo *in vitro* apresenta limitações significantes pela sua inabilidade em simular o processo biológico complexo que envolve a formação de lesão cariosa como ocorre *in vivo* (WHITE, 1995). Já o estudo *in situ* é considerado como um estágio intermediário entre as condições *in vitro* e *in vivo*, permitindo o

controle das condições clínicas relacionadas ao desenvolvimento da cárie dentária (TEN CATE, 1994).

Esses estudos *in vitro* e *in situ* podem ser realizados com dentes humanos e bovinos (BUSKES; CHRISTOFFERSEN; ARENDS, 1985; TEN CATE, 1994; AMAECHI, HIGHAM; EDGAR, 1998; CLASEN; OGAARD, 1999). Neste estudo, foram utilizados dentes bovinos, por serem de fácil coleta e fácil manipulação. Os dentes bovinos são bons substitutos dos humanos, apesar de serem menos mineralizados e mais porosos e, portanto apresentarem menor valor de dureza superficial e também maior susceptibilidade à desmineralização (AMAECHI, HIGHAM; EDGAR, 1998). Além disso, o dente bovino apresenta uma composição química relativamente mais uniforme, o que permite uma menor variação de resposta aos tratamentos anti-cariogênicos. Apesar de o processo de desmineralização ser mais rápido no esmalte bovino, as lesões cariosas produzidas em esmalte bovino têm estrutura microscópica similar às humanas (OGAARD; ROLLA, 1992; CLASEN; OGAARD, 1999; MELLBERG, 1992). Já o grau de desmineralização da dentina bovina parece ser similar à dentina humana, visto que não se encontrou diferença significativa entre perda mineral e profundidade da lesão entre os substratos em estudos prévios (MELLBERG, 1992; ZERO, 1995; HARA et al., 2003).

Neste estudo, todos os espécimes foram polidos até ficarem planos, requisito este necessário para a utilização do microdurômetro. Além disso, White (1987) verificou que quando o espécime não foi polido, a desmineralização se processou mais lentamente e as lesões foram menos reproduzíveis quando comparadas ao espécime polido. Contudo, há a necessidade de se padronizar a quantidade de estrutura polida, sendo que o dente bovino é considerado com boa reprodutibilidade quando têm até 200 μm de sua superfície polida (CLASEN; OGAARD, 1999). Adicionalmente, os espécimes foram protegidos com esmalte de unha vermelha de modo a se obter uma área controle e para verificar se os protocolos *in vitro* não provocaram erosão (lesão de superfície atacada) ao invés de uma lesão de subsuperfície.

Entretanto, o processo de desmineralização por mais padronizado que seja mostra algumas variabilidades. Durante a execução deste trabalho, pudemos perceber isso no estudo com o esmalte, o qual foi o primeiro a ser realizado. Este

estudo, que contou com um n inicial de 12 e final de 10 espécimes por grupo, apresentou um grande desvio-padrão nos parâmetros avaliados, especialmente nas amostras do grupo MDHP. Como tivemos algumas perdas amostrais neste trabalho que já foi publicado na revista Caries Research (MAGALHÃES et al., 2009) e, prevendo que para a dentina também teríamos essa variação, aumentou-se o número de espécimes para os outros experimentos, para aumentar a força amostral.

O dente é composto por hidroxiapatita carbonatada deficiente de cálcio (a relação $\text{Ca/P} = 1,61$ é um pouco mais baixa que da HAP - $\text{Ca/P} = 1,67$, $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{CO}_3)_z(\text{OH})_{2-u}\text{F}_u$). Apesar da presença de constituintes comuns, o esmalte e a dentina apresentam diferentes estruturais que afetam a progressão da cárie dentro dos tecidos (FEJERSKOV; KIDD, 2011). O esmalte apresenta-se na forma de cristais organizados em prismas, com a sua maior parte constituída de minerais (87 %vol). Já a dentina é diferente do esmalte em estrutura e composição, sendo a quantidade de mineral bem menor (50 %vol), enquanto sua parte orgânica é constituída principalmente de colágeno tipo I (33 %vol) (MARSHALL et al., 1997; ZAVGORODNIY; ROHANIZADEH; SWAIN, 2008; BERTASSONI et al., 2010; LUSI et al., 2011). A maior porção da dentina (circumpulpar) se organiza em regiões peritubulares (ao redor dos túbulos dentinários) e intertubulares. Além da diferença no conteúdo mineral, a dureza da dentina é bem menor quando comparada ao esmalte, e existem outros fatores que influenciam a medição da dureza em dentina, em particular as propriedades elásticas e a contração das fibrilas de colágeno devido à secagem. Além disso, as áreas peritubulares são 40% mais mineralizadas, e, portanto, apresentam maior valor de dureza, quando comparadas às áreas intertubulares (LUSI et al., 2011).

Adicionalmente, os cristais presentes no esmalte são mais largos e por isso têm uma área de superfície menos reativa (BERTASSONI et al., 2010; FEJERSKOV; KIDD, 2011; LUSI et al., 2011). Por outro lado, a dentina tem um alto conteúdo de apatita carbonatada. Assim, a dentina é mais susceptível ao ataque cariioso que o esmalte, sendo o seu pH crítico quase uma unidade acima do esmalte (pH crítico do esmalte entre 5,5-5,7 e pH crítico da dentina entre 6,2-6,5) (HOPPENBROUWERS et al., 1987). O pH crítico equivale ao valor de pH em que a solução está exatamente saturada em relação aos minerais; abaixo deste valor, há a subsaturação e os minerais de esmalte ou dentina podem se dissolver; e quando o

valor de pH está acima deste valor de pH crítico o oposto é verdadeiro, a solução encontra-se supersaturada e conseqüentemente há um favorecimento do processo de remineralização. Enquanto que para o esmalte a difusão do ácido é lenta e o ganho e perda de mineral ocorrem de uma forma mais linear; para a dentina, devido principalmente aos túbulos dentinários, o ganho é predominantemente na superfície, enquanto a perda mineral é em profundidade (TEN CATE; BUIJS; DAMEN, 1995).

Sendo assim, a lesão cariosa em dentina é um processo de desmineralização seguido da degradação da matriz exposta de colágeno, e esta degradação de colágeno é um pré-requisito para a formação de cavitação (VAN STRIJP et. al, 2003). A degradação da matriz orgânica possivelmente não ocorre com os protocolos *in vitro* testados no presente trabalho. No entanto, o modelo *in situ* simula melhor o desenvolvimento da lesão cariosa em dentina, visto que poderia haver degradação do colágeno por enzimas proteolíticas (metaloproteinases de matriz - MMPs) derivadas das bactérias, fungos e do hospedeiro (dentina e saliva), dependendo das condições de pH (VAN STRIJP et al, 2003; ZAVGORODNIY; ROHANIZADEH; SWAIN, 2008; FEJERSKOV; KIDD, 2011).

Comparando os substratos, este estudo está de acordo com a literatura. A desmineralização dos espécimes de dentina apresentou-se mais profunda e com maior perda de conteúdo mineral quando comparadas ao esmalte, visto que a maior profundidade do esmalte foi 86 μm para a MDHP e o menor valor para a dentina foi de 90 μm para o GEL MC II; o ΔZ variou para a dentina entre $1709,5 \pm 301,0$ e $7069,5 \pm 1071,3$ %vol min. μm , e para o esmalte entre $731,4 \pm 140,9$ e $3243,5 \pm 1689,0$ %vol min. μm ; e a camada superficial na dentina desmineralizada também foi mais espessa que para o esmalte (com valores entre $4,2 \pm 1,8$ a $10,7 \pm 5,8$ μm para o esmalte e entre $7,1 \pm 3,1$ e $19,4 \pm 5,5$ μm para a dentina).

Para tentar simular a dinâmica do fluído do biofilme dentário durante um desafio cariogênico, ácidos como o acético e lático são adicionados em concentrações variando de 0,05 a 0,1 M e ajustados a um pH entre 4,6 a 5,0. O ácido acético é um ácido fraco ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, pKa 4,75), que quando livre em água é chamado ácido acético glacial, e no pH que utilizamos apresenta uma alta capacidade tamponante; já o ácido lático ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$, pKa 3,86) é um ácido orgânico produzido por fermentação, mais forte comparado ao acético (LENHINGER, 1976). Assim, o tipo e a concentração do ácido usado determinam a taxa de

desmineralização e a característica da lesão. Soluções com ácido acético produzem uma lesão aproximadamente 1,5 vezes mais profunda e com menor intervalo de tempo quando comparada à solução com ácido láctico na mesma concentração e pH. Embora o ácido láctico seja um ácido mais forte em qualquer pH e concentração, uma maior proporção do ácido acético está na forma não ionizada, o que sugere uma difusão mais prolongada para dentro do substrato (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998).

Adicionalmente, sais de cálcio, fosfato e fluoreto (o último é opcional) são freqüentemente adicionados à solução desmineralizante com o objetivo de diminuir o grau de insaturação termodinâmica da solução e evitar uma desmineralização do tipo superfície atacada (o que seria mais similar a erosão dentária). Pensando na situação clínica, quando o biofilme cobre a superfície dentária, reduz o acesso a saliva ao dente e o fluido relevante passa a ser o fluido do biofilme e este em condições fisiológicas encontra-se supersaturado em relação à HAP (o produto da atividade iônica $IAP_{HA} = 1,4 \times 10^{-47} \text{ mol}^9/\text{l}^9$). O esmalte apresenta uma constante do produto de solubilidade ($K_{PS \text{ esmalte}}$) igual a $5,5 \times 10^{-55} \text{ mol}^9/\text{l}^9$, sendo esta constante relacionada às concentrações de cálcio, fosfato e hidroxila necessárias para a formação de cristais. Essa constante apresenta um valor mais alto comparado ao produto de solubilidade da hidroxiapatita - $K_{PS \text{ HAP}}$ ($7,41 \times 10^{-60} \text{ mol}^9/\text{l}^9$). Em situações fisiológicas (pH = 7,0) o IAP_{HAP} do fluído do biofilme é maior que o $K_{PS \text{ esmalte}}$, dessa forma o meio está supersaturado em relação à apatita do esmalte e a tendência nestes casos é que ocorra a remineralização ou a formação de cálculo supragengival pela força iônica de deslocamento dos íons para o dente. Após a ingestão de sacarose, a solução torna-se subsaturada, e proporcionalmente o IAP_{HA} se tornar menor que o $K_{PS \text{ esmalte}}$, ocorrendo a dissolução da HAP (BUZALAF et al., 2011; FEJERSKOV; KIDD, 2011). Entende-se que em um valor de pH mais baixo, a quantidade de minerais necessária para manter a solução saturada aumente ($K_{PS \text{ esmalte}}$); e ao mesmo tempo, a quantidade de íons existente poderia se alterar pela presença de H^+ que consumiria PO_4^{-3} e OH^- presente no fluido biofilme, o qual poderia em parte ser repostado pela porção sólida do biofilme e a própria saliva. No entanto, apesar de se acreditar que o IAP_{HAP} seja constante no biofilme em função dos reservatórios (porção sólida do biofilme) e quantidade constante de cálcio e fosfato na saliva, é possível que este reservatório não consiga repor os minerais no

fluido do biofilme, durante um desafio ácido prolongado e constante, resultando em uma possível alteração da constante de atividade.

No fluido do biofilme em repouso (pH = 7,0) a concentração de cálcio é de 3,5 mmol/l, fosfato é de 13,2 mmol/l, fluoreto $6,0^{1/4}$ mol/l, e $IAP_{HAP} = 1,42 \times 10^{-42} \text{ mol}^9/\text{l}^9$, portanto o meio encontra-se supersaturado em relação ao esmalte. Já no fluido do biofilme após bochecho com solução de sacarose a 5% (pH = 5,29) a concentração de cálcio é de 8,2 mmol/l (oriundo da porção sólida do biofilme ou do dente), fosfato 13,5 mmol/l, fluoreto $5,0^{1/4}$ mol/l, e $IAP_{HAP} = 1,02 \times 10^{-55} \text{ mol}^9/\text{l}^9$, portando o meio neste caso se torna subsaturado e ocorre a dissolução da HAP dentária (TEN CATE et al., 2008; LUSSI et al., 2011). Os protocolos laboratoriais para produção de lesão de subsuperfície tentam mimetizar esta última condição de subsaturação em relação à HAP, em soluções ou géis acidificados, de forma que o $K_{IAP \text{ HAP}}$ seja bem menor que o $K_{PS \text{ esmalte}}$. Dessa forma, as concentrações de cálcio (1,3 a 3 mM) e fosfato (0,78 a 3,0 mM) adicionadas às soluções e géis são menores que aquelas encontradas no fluido do biofilme, especialmente no que tange o fosfato, o qual é consumido pelo hidrogênio oriundo do ácido, para que o processo seja acelerado, uma vez que se as mesmas condições do biofilme dentário fossem simuladas igualmente *in vitro*, o processo de desmineralização seria muito prolongado. Algumas soluções seguem a estequiometria da HAP para determinar a concentração de cálcio e fosfato ($\text{Ca}^{+2} : \text{PO}_4^{-3} = 1,667$) como o caso da solução TAMPÃO para o esmalte.

Para que o fluoreto possa interferir na dinâmica de formação da lesão cariosa, é necessário que ele esteja presente constantemente no fluido do biofilme. O fluoreto protege os cristais da dissolução pela sua adsorção à superfície do cristal, durante as quedas de pH (BUZALAF et al., 2011), uma vez que o pH relacionado ao desenvolvimento da cárie dentária está acima do pH crítico para a FAP. Por outro lado, quando o recobrimento é parcial, as superfícies não protegidas podem ser dissolvidas durante o ataque ácido. Quando há uma queda no pH abaixo do nível crítico para a dissolução da HAP (pH 5,5), porém ainda elevado para FAP, pode-se favorecer a precipitação de mineral na forma de fluor-hidroxiapatita ou fluorapatita na superfície dentária previamente desmineralizada, formando cristais menos solúveis e tornando o esmalte mais resistente a futuros desafios cariogênicos (ARENDS et al., 1983; PEARCE, 1983; FEAGIN; CLARKSON; WEFEL, 1985; MARGOLIS;

MORENO; MURPHY, 1986; ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1990; FEATHESTONE, 1999).

A deposição de fluorapatita na camada superficial bloqueia os poros da superfície e restringe a difusão de íons para dentro da lesão, resultando uma superfície que pode ser mais cárie-resistente que o esmalte original, mas mantendo a aparência desmineralizada e dificultando a remineralização. Esta superfície é a camada “pseudo-intacta” (TEN CATE; DUIJSTERS, 1982; BUZALAF et al., 2011). Neste estudo, apenas o grupo TAMPÃO (para o esmalte) e TAMPÃO II (para a dentina) apresentaram fluoreto na solução, contudo somente para a dentina houve uma deposição de uma camada superficial “pseudo-intacta” espessa ($19,4 \pm 5,5$ μm), provavelmente porque a quantidade de fluoreto adicionado à solução do esmalte foi pequena (0,0315 ppm) e a dinâmica de perda e ganho mineral seja diferente na dentina, favorecendo a retenção do fluoreto mais superficialmente na camada orgânica desmineralizada. Em futuros estudos, seria interessante avaliar essa camada orgânica por microscopia eletrônica de varredura após secagem no ponto crítico.

Segundo Arends e Christoffersen (1986) a camada superficial que cobre a lesão em esmalte é porosa, mas uma rica área mineral, com um conteúdo mineral maior que 70%, o que não foi visto neste estudo, onde o Zmax não alcançou 70% em nenhum grupo estudado.

Dentre as opções para produção de cárie *in vitro* estão os géis, como o gel fluido à base de ácido poliacrílico - Carbopol (GEL PA) e gel de metilcelulose (GEL MC e GEL MC II). No caso do gel de metilcelulose, não se faz necessária a adição de cálcio e fosfato, pois o gel, por ser mais denso, reduz a velocidade de difusão do ácido (por isso há necessidade de um tempo maior de exposição) e consegue manter os íons perdidos pelo dente próximos à superfície do mesmo, permitindo a precipitação superficial e consequentemente a produção de uma lesão de subsuperfície, especialmente quando o mesmo gel permanece por vários dias sobre a superfície dentária (DAMATO; STRANG; STEPHEN, 1988). É relevante ressaltar que no caso do grupo GEL MC reduções na atividade do cálcio podem ter ocorrido como mostrado por Lynch, Mony e ten Cate (2006), devido a atividade de ligação do cálcio ao gel metilcelulose. A ligação do cálcio com o grupo carboxilato do gel favorece a permanência do cálcio próximo à superfície dentária e a troca de

ligação com o carboxilato pelo fosfato do dente. Esta atividade habilitaria a precipitação mineral na camada superficial, que por sua vez, pode ter reduzido a penetração em profundidade do ácido láctico e consequentemente, reduzido a profundidade da perda de subsuperfície, o que está de acordo com os achados neste estudo.

É importante ressaltar que a desmineralização é influenciada por muitos fatores, como o pH (4,5 - 5,0), que tem impacto predominantemente na taxa de desmineralização e consequentemente o tempo do experimento (THEUNS et al., 1984c), assim como a concentração do ácido, a grau de saturação da solução em relação aos minerais do dente, a presença de inibidores de desmineralização (fluoreto, metildifosfanato e proteínas) e temperatura (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986; AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998).

No presente trabalho, os GÉIS MC e MCII produziram lesões mais superficiais no esmalte e dentina, respectivamente, porém a camada superficial “pseudo-intacta” foi vista mais no esmalte, o que pode ser explicado pela concentração do gel utilizado na dentina, o qual poderia não ter permitido a permanência do cálcio tão próximo à superfície dentária. Adicionalmente a dentina por ser menos mineralizada e apresentar mais apatita carbonatada rica em magnésio que o esmalte pode não ter liberado minerais (ricos em cálcio) suficientes durante a desmineralização para a formação da camada superficial no caso do grupo GEL MC II (apenas 6 espécimes de 15 apresentaram camada superficial).

A lesão produzida em esmalte pelo GEL MC neste estudo foi bem menor quando comparada à lesão de esmalte produzida por ten Cate et al. (1996), a qual apresentou um ΔZ entre 2000 a 3000 %vol. μm . A diferença pode ser devido ao volume de material utilizado nos dois estudos. Quanto ao valor de R, o gel à base de metilcelulose produziu lesões com alto valor de R em concordância com Lynch, Mony e ten Cate (2007) e Lippert et al. (2011). Ao mesmo tempo, apresentou baixa porcentagem de perda superficial, contudo o valor de ΔKHN foi intermediário quando comparado aos demais grupos, não diferindo do GEL PA e TAMPÃO.

Similarmente ao esmalte, a menor lesão em dentina foi a produzida pelo GEL MC II em concordância com Markezan et al. (2009), os quais mostraram que o gel produziu uma lesão mais rasa em dentina coronária humana. Os dados encontrados neste estudo estão também de acordo com os estudos de McIntyre,

Feathestone e Fu (2000), o qual comparou lesões produzidas com os mesmos protocolos do presente estudo (TAMPÃO II, MDHP II e GEL MC II, sendo denominadas de A, L e G respectivamente). As lesões produzidas por A foram as mais profundas seguidas por L (sem diferença estatística), e ambas foram significativamente maiores quando comparadas à G. Em concordância com os dados da microradiografia, o GEL MC II apresentou a menor porcentagem de perda superficial e conseqüentemente o menor ΔKHN .

No grupo GEL PA houve à adição de hidroxiapatita solúvel no sistema gel carbopol/lactato, que segundo White (1987) é capaz de significativamente diminuir a taxa de amolecimento da superfície dos espécimes de esmalte, devido à redução da insaturação da solução em relação aos minerais do dente. Para a produção da solução o autor dissolveu o Carbopol sólido durante 2 a 4 horas (Carbopol 1%) em temperatura ambiente e a partir deste adicionou a hidroxiapatita, e depois de pronta, a solução foi filtrada e o sobrenadante coletado. No presente trabalho, o gel fluído à base de ácido poliacrílico (Carbopol), foi utilizado apenas para produzir desmineralização em esmalte. Para tal, adicionou-se hidroxiapatita, mas esta não se dissolveu completamente, apesar de ter permanecido 2 horas sob agitação, semelhante ao ocorrido com White (1987). Ao final do preparo, permaneceram partículas de HAP não dissolvidas na solução e com isso, a HAP pode não ter tido um significativo impacto sobre a saturação da solução em relação a este mineral. A lesão produzida pelo GEL PA apresentou-se superficial e está em concordância com White (1987). No entanto, está em discordância com Iijima et al. (2004) que mostraram uma lesão mais profunda e com maior perda mineral integrada. Neste caso, é provável que os autores tenham trocado o gel fluído diariamente. Quanto ao valor de R, o gel fluído à base de carbopol produziu lesões com baixo valor de R em concordância com Lynch, Mony e ten Cate (2007) e Lippert et al. (2011).

A solução de MDHP foi utilizada para a desmineralização do esmalte e dentina. A profundidade da lesão produzida neste estudo pelo MDHP está de acordo com Buskes, Christoffersen e Arends (1985) que relatam que o uso de MDHP é importante para a formação da camada superficial e pode reduzir a progressão da desmineralização. No esmalte, a solução MDHP produziu a maior profundidade da lesão em comparação aos outros grupos, porém a perda mineral média foi menor especialmente em relação ao IN SITU. Adicionalmente, foi o grupo que apresentou o

maior ΔKHN , contudo com menor porcentagem de perda superficial. Este último resultado pode se deve a maior espessura da camada superficial “pseudo-intacta” e o maior valor de Z_{max} em relação aos demais protocolos. Deve-se ressaltar que os resultados do grupo MDHP para o esmalte não foram homogêneos.

A distribuição mineral na dentina desmineralizada com MDHP II foi similar aos resultados do esmalte, na qual a lesão apresentou-se profunda (apesar de não tão profunda quanto o TAMPÃO II), porém com menor média de perda mineral por profundidade quando comparada aos demais grupos. Buchalla et al. (2003) utilizaram solução de MDHP em dentina, e as lesões produzidas por estes autores apresentaram maior valor ΔZ que no presente estudo, mesmo com o tempo de duração semelhante. É provável que Buchalla et al. (2003) tenham trocado a solução diariamente, o que pode ter evitado o aumento do grau de saturação da solução desmineralizante em comparação ao uso da mesma solução durante todo o experimento. Ao contrário do ΔZ , o ΔKHN obtido pelo MDHP II foi alto, obtendo valores mais altos que o grupo TAMPÃO II, sendo este último protocolo o com o maior valor de ΔZ . Deve-se considerar que o desvio padrão do ΔKHN para ambos os grupos foi grande.

As soluções TAMPÃO induziram uma desmineralização subsuperficial muito mais evidente em dentina que em esmalte, sendo que a diferença entre a II e III esteve relacionada ao pH e presença de fluoreto. A solução TAMPÃO II apresentou um pH 0,5 unidade abaixo da solução TAMPÃO III, e mesmo na presença de fluoreto na solução II, a desmineralização de subsuperfície foi mais pronunciada e profunda nas amostras de dentina expostas a 1ª solução.

Por outro lado, no estudo *in situ*, não houve exposição direta a concentrações conhecidas de ácido em solução subsaturada de HAP. Neste caso, os espécimes foram expostos à saliva humana e sobre os quais se permitiu o acúmulo de biofilme por 14 dias. O biofilme foi exposto diariamente às soluções de sacarose (esmalte- sacarose 20% 8x/dia e dentina sacarose 20% - 4x/dia) (CURY et al., 2000; HARA et al., 2003; AIRES et al. 2006; AIRES et al., 2008). Ten Cate (1994) cita que a velocidade de perda mineral é de 29% vol.µm para o esmalte e de 89% vol.µm para a dentina por dia em delineamentos *in situ*; porém no presente estudo a velocidade de perda mineral integrada foi maior.

O protocolo *in situ* produziu lesões mais superficiais, embora profundas, pois a camada “pseudo intacta” foi vista em apenas 11 espécimes para o esmalte e 2 para a dentina, representando melhor lesões de mancha branca em estágios iniciais (desmineralização superficial e não de subsuperfície). Não se pode descartar a possibilidade da degradação da camada de colágeno pelas metaloproteinases de matriz da saliva e dentina terem significativamente reduzido a formação da camada superficial “pseudo-intacta” na dentina, em concordância com Marquezan et al. (2009) os quais mostraram que em lesões cariosas produzidas por um protocolo microbiológico não foi possível a mensuração da perda mineral nos primeiros 50 μm . Estes autores justificaram este achado pela possível degradação do colágeno da dentina desmineralizada. Para a produção de lesões mais subsuperficiais, com a preservação de uma camada “pseudo-intacta”, talvez fosse necessário um maior tempo experimental, desafios cariogenicos mais brandos e a introdução ao uso de dentifrício fluoretado. Deve-se considerar que as exposições à sacarose em estudo *in situ* em geral são muito mais frequentes que em uma situação *in vivo*, sem ainda considerar que *in vivo* o fluoreto está sempre presente e que a dieta é variada em relação ao conteúdo de sacarose bem como de cálcio, proteínas, fosfato e outros nutrientes.

Os dados do presente estudo estão em discordância com Cury et al. (2000) e Aires et al. (2006) que obtiveram um $\Delta\text{KHN} / \Delta\text{Z}$ muito menor que o obtido neste estudo usando o mesmo protocolo experimental, o que pode ter sido influenciado pela forma de cálculo desta variável. Aires et al. (2006) utilizaram a fórmula de Featherstone et al. (1983) para converter o valor de dureza em conteúdo mineral. Em contrapartida, o estudo de Honório et al. (2010) obteve maior desmineralização e maior profundidade quando comparado ao presente trabalho, mostrando uma baixa reprodutibilidade do método.

A exposição à sacarose possibilitou não somente o metabolismo do açúcar e produção de ácidos pelos microorganismos, mas também a seleção de uma microbiota mais acidogênica e acidúrica (TAKAHASHI; NYVAD, 2011) simulando de forma mais próxima possível a condição clínica. As concentrações de cálcio e fosfato presentes no fluído do biofilme que são relativamente constantes em um indivíduo, mas podem variar entre indivíduos, determinam o pH crítico do fluido que pode variar conforme o tipo de apatita pura, carbonatada ou fluorapatita

presente no esmalte e dentina como já discutido anteriormente (LUSSI et al., 2011). A variabilidade entre os indivíduos em relação à concentração de cálcio e fosfato no fluido do biofilme assim como em relação à microbiota podem justificar a grande variabilidade de resposta encontrada no estudo *in situ*, quando comparamos os nossos resultados com estudos prévios (TEN CATE, 1994; CURY et al., 2000; AIRES et al, 2006; HONÓRIO et al., 2010).

Em resumo, para o esmalte, o protocolo que induziu a maior perda mineral integrada e maior profundidade de lesão foi o IN SITU, seguido pela solução MDHP e TAMPÃO. Resultado similar foi obtido com o Δ KHN (IN SITU e MDHP), o que pode ser devido ao maior tempo de experimento e exposição aos ácidos. A lesão mais rasa e com menor perda mineral foi a produzida pelo grupo GEL MC, que apesar do grande tempo de experimento, apresentou um gel de metilcelulose que pode ter reduzido a penetração do ácido. Para os grupos *in vitro* não houve diferença significativa entre o valor de R. Quanto à %SHC os grupos TAMPÃO, IN SITU e GEL PA, respectivamente, foram os que obtiveram maior porcentagem de perda mineral, sendo o grupo MDHP o que obteve a menor porcentagem de perda superficial, o que justifica pela espessa camada superficial.

Os protocolos em dentina apresentaram valores de R entre 15 – 30 % vol. Estes valores estão de acordo com Mc Intyre, Featherstone e Fu (2000) que relataram que o valor de R varia de 20-30 %vol para a dentina. Neste caso, o grupo com maior perda mineral e profundidade da lesão foi a solução TAMPÃO II, seguida pelo protocolo IN SITU e solução TAMPÃO III. Apesar do TAMPÃO II ter apresentado fluoreto, a desmineralização neste grupo foi profunda em função do menor valor de pH, mostrando que o fluoreto neste caso pode ter tido um papel importante somente para a formação da camada superficial. Os níveis de fluoreto necessários para inibir a desmineralização são 10 vezes maiores para a dentina que para o esmalte (FEJERSKOV; KIDD, 2011). No entanto, esta espessa camada pode ser explicada também pelo acúmulo de minerais na superfície da dentina oriundos do corpo da lesão (BUZALAF et al., 2011). A lesão mais rasa foi o MC GEL II que apresentou um menor Δ Z, Δ KHN e %SHC, em concordância com o esmalte

Depois de discutidos os diferentes protocolos utilizados em laboratório, como saber qual desses protocolos reproduz melhor o que acontece *in vivo*? Foi com esse pensamento, que se decidiu inserir no estudo a análise de lesões cariosas

naturais em esmalte, visto que na literatura existem poucos estudos utilizando lesões cariosas naturais.

A lesão de mancha branca (MB) é o estágio inicial do desenvolvimento da cárie em esmalte e dependendo do grau de desmineralização é caracterizada pela superfície “pseudo-intacta” do esmalte com uma subsuperfície desmineralizada (ZERO, 1999; HUANG et al., 2010). Clinicamente, ela apresenta-se como branco giz ou marron descolorado e pode ou não estar associado a superfície rugosa. A lesão de mancha branca é normalmente encontrada em áreas de fissuras, contato proximal ou na cervical próximo à margem gengival. É conhecido que estas lesões, embora se apresentem visualmente com superfície de esmalte intacta, apresentam-se mais fracas estruturalmente que o esmalte sadio e o devido cuidado é necessário durante a o exame clínico e o tratamento (HUANG et al., 2010). Além disso, estas lesões podem apresentar-se ativas, e a intervenção precoce é importante na prevenção, bem como no tratamento das mesmas, de forma a tornar lesões ativas em inativas, com redução do risco de cavitação e da necessidade de intervenções mais agressivas.

As lesões naturais foram obtidas de superfícies lisas de pré-molares (em especial de superfícies proximais) com indicação de extração por razões ortodônticas. Não se investigou a história de saúde bucal dos pacientes doadores, pois ainda não temos um serviço de banco de dentes na FOB-USP e os dentes coletados foram oriundos de diferentes locais da cidade. O critério de inclusão da amostra na análise se baseou unicamente no exame visual, não levando em consideração a história prévia de ingestão de fluoretos, hábitos alimentares entre outros aspectos que poderiam influenciar o desenvolvimento da lesão. A lesão deveria ser localizada e apenas apresentar aspecto branco opaco e sem brilho, sem pigmentação ou cavitação. Apesar desta preocupação no exame clínico, as imagens de microradiografia mostraram que os espécimes apresentavam lesões cariosas com diferentes estágios de progressão e com pouca homogeneidade em concordância com Iijima et al. (1999) e Huang et al. (2010). Não foi possível mensurar a perda mineral e profundidade da lesão, uma vez que algumas lesões cavitaram durante o preparo e a maioria apresentavam profundidade superior a 400 µm, acima do limite de detecção da TMR. De uma forma geral, pode-se constatar que é muito difícil se obter um padrão de lesão natural e, que de uma certa forma,

lesões cariosas artificiais superficiais e de subsuperfície poderiam simular diferentes estágios da lesão natural.

Para haver uma padronização nesta análise em futuros estudos, um número maior de espécimes deve ser coletado, deve-se investigar a história de saúde bucal do paciente doador e melhorar o exame clínico utilizando métodos de diagnóstico complementares como o método de quantificação da fluorescência induzida pela luz (QLF) (VAN DER VEEN; DE JOSSELIN DE JONG, 2000; GMUR et al., 2006; LIPPERT et al., 2011) e tomografia de coerência óptica (GIMBEL, 2008; KANG et al., 2010).

Além da comparação entre os métodos para produzir lesões de cárie artificiais, é importante entender melhor a relação entre dureza e conteúdo mineral, averiguando se esta relação pode ser dependente do tipo de lesão e se é possível o cálculo do conteúdo mineral a partir da dureza e o quanto a dureza é influenciada pelo conteúdo mineral. A dureza superficial e longitudinal (CSH) é considerada um método indireto para avaliar a desmineralização e a microradiografia transversal (TMR) é considerada a melhor técnica quantitativa para medir conteúdo, mudanças e distribuição mineral, sendo o método “padrão ouro” para se avaliar lesões dentárias de subsuperfície (CLASEN; OGAARD, 1999).

Neste sentido, a terceira hipótese foi validada, visto que não houve uma relação linear entre CSH e TMR, considerando os substratos e os protocolos para produção de lesão de cárie *in vitro* e *in situ*. A melhor relação estabelecida foi a quadrática para o esmalte desmineralizado pelos grupos GEL MC e TAMPÃO ($r^2=0,81$ e $r^2=0,73$, respectivamente). Para a dentina todas as relações foram fracas, com exceção do IN SITU que obteve uma relação com coeficiente de determinação médio ($r^2=0,46$).

A análise de dureza, apesar de ser facilmente realizada utilizando-se um equipamento mais barato em comparação a outras técnicas, apresenta certas limitações para avaliação da desmineralização por cárie tais como: (1) sofre influência da quantidade de material orgânico e grau de umidade do tecido durante a realização da endentação; (2) não é tão sensível para medir alterações nos primeiros 10-50 μm da subsuperfície do tecido dentário, pelo tamanho da endentação (CLASEN; OGAARD, 1999; ATTIN, 2006), diferentemente do TMR que mede a quantidade mineral a cada 2 μm e é apenas impreciso somente nos

primeiros 10µm; e (3) Não é possível definir precisamente a partir de qual profundidade o esmalte/dentina já apresentam-se sadios. A dureza da dentina apresenta outros fatores que limitam a medição, em particular, as propriedades elásticas do substrato e a contração das fibras colágenas após secagem (LUSSI et al., 2011). A dureza é o único método que considera as alterações da quantidade orgânica e inorgânica da dentina (HARA et al., 2003), o que pode levar a erros dependendo das condições deste tecido.

Como a dureza é um método indireto para avaliar a desmineralização, alguns autores passaram a converter estes valores em conteúdo mineral. Featherstone et al. (1983) e Kielbassa et al. (1999) produziram lesões em esmalte sendo o primeiro autor produziu lesão utilizando uma solução ácida *in vitro* e o segundo grupo produziu lesões cariosas *in situ*. Ambos encontraram uma relação linear entre CSH e TMR e uma fórmula de conversão de dureza em conteúdo mineral, contudo as fórmulas não são similares entre si, comprovando mais uma vez que a relação é dependente do tipo de lesão.

Segundo Kielbassa et al. (1999), a diferença entre os estudos pode ser explicada pela variação na calibração dos pesquisadores e/ou o instrumento usado ou, mais simplesmente, o largo número de dentes utilizados em seu estudo quando comparado ao Featherstone et al. (1983). Outra explicação para esta diferença entre as equações é que no estudo de Featherstone, as lesões foram cortadas em duas partes e metades opostas foram avaliadas por uma das técnicas, sendo este último modo de avaliação também utilizado neste estudo.

Um fato interessante encontrado no presente estudo é que quanto maior a perda mineral de subsuperfície, mais fraca foi a relação entre conteúdo mineral e CSH, para o esmalte. As lesões mais rasas em esmalte, GEL MC e TAMPÃO mostraram uma relação linear mais forte ($r^2=0,74$, $r^2=0,69$, respectivamente); sendo que as demais lesões produziram relação linear média a baixa. Quanto à dentina, não foram encontrados estudos na literatura que correlacionassem CSH com TMR, provavelmente devido às limitações da análise de dureza neste tecido. O presente estudo não encontrou uma relação linear entre as variáveis, sendo o melhor coeficiente de determinação encontrado para os espécimes de dentina desmineralizados IN SITU ($r^2=0,45$). Visto que, para o esmalte as melhores relações foram para os espécimes com maior quantidade de minerais no corpo da lesão,

assim, pode-se dizer que devido à dentina apresentar menor quantidade de minerais, estas relações foram em geral fracas.

Estes resultados sugerem que a relação entre CSH e conteúdo mineral pode ser altamente dependentes do tipo de lesão em análise e que nem todo valor de dureza sofre influencia direta do conteúdo mineral. Sugere-se que outros fatores como o tipo de mineral presente e o conteúdo orgânico podem ter influência na dureza do dente.

Em contraste com estudos prévios (FEATHERSTONE et al., 1983; KIELBASSA et al., 1999) e em concordância com Buchalla et al. (2008), a relação linear entre CSH ou sua raiz quadrada e conteúdo mineral não é válida, especialmente pelo fato dos dados apresentarem-se dispersos no gráfico. Para alguns grupos em esmalte, a relação quadrática respondeu melhor pela relação que a regressão linear entre as duas variáveis. Para a dentina, tanto relação linear como a quadrática mantiveram-se fracas e possivelmente, outros tipos de regressão também não resultariam em melhora na relação entre estas duas variáveis para a dentina.

Quanto às correlações entre os parâmetros de TMR e dureza superficial e longitudinal, apesar de em alguns grupos existir a correlação com um ou outro parâmetro, a maioria das correlações matemáticas não parecem ser adequadas e plausíveis quando analisadas na prática. Dentre as possíveis correlações coerentes, para o GEL MC, a correlação entre %SHC vs. SL ($r=-0,67$, $p=0,034$; Figura 32) foi inversa, isto é, quanto maior a porcentagem de perda de dureza, menor foi a profundidade da camada superficial. Para o GEL MC II, a correlação entre ΔKHN vs. profundidade da lesão ($r=0,76$, $p=0,007$; Figura 36) foi positiva, mostrando que quanto maior a perda de dureza integrada, maior a profundidade da lesão. O grupo MDHP II apresentou correlação forte e inversa entre SH final e ΔZ ($r=-0,70$, $p=0,004$; Figura 37) mostrando que quanto maior a dureza superficial final, menor foi a perda mineral integrada. As melhores correlações também foram encontradas para as lesões menos desmineralizadas em esmalte e dentina.

Embora a CSH não possa ser usada para estimar o conteúdo mineral com segurança, este método deveria ser utilizado para analisar lesões cariosas em esmalte somente, de preferência sem o cálculo do ΔKHN , uma vez este parâmetro é muito difícil de ser calculado com precisão pelas limitações da técnica. A CSH nos

dá uma importante evidência sobre as propriedades mecânicas do tecido desmineralizado em profundidade. Por outro lado, a dureza superficial deveria ser utilizada com cautela para avaliar lesões cariosas em esmalte, visto que apesar de significativa, houve uma baixa correlação com os dados de TMR para a maioria dos grupos. Esta sugestão está em discordância com prévios estudos que mostraram que a largura da endentação (que pode ser melhor representada pela raiz quadrada da dureza superficial) está relacionada à quantidade mineral na camada superficial (ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; WHITE, 1988) e com a profundidade da lesão (ARENDS et al., 1980).

Por fim, não podemos esquecer que as características da lesão de cárie artificial têm um papel importante na dinâmica de difusão mineral e são determinantes da eficácia de agentes preventivos como o fluoreto. Segundo Yamazaki e Margolis (2008), o uso de soluções remineralizadoras supersaturadas em fluorapatita com baixo pH são melhores que as com pH neutro para as lesões subsuperficiais, sendo que neste caso a remineralização foi maior na porção média da lesão (100-200 µm de profundidade). Já para as lesões de superfície amolecida, não há grandes diferenças entre as soluções ácidas e neutras, sendo a remineralização mais superficial (0-100 µm de profundidade) neste caso. Em concordância com os autores citados acima, Lynch e ten Cate (2006); Lynch, Mony e ten Cate (2007) e Lippert et al. (2011) mostraram que em espécimes de esmalte, nos quais a desmineralização inicial é grande (profunda), o efeito da remineralização é maior. Nestes casos, a remineralização é proporcional ao aumento da largura e do raio da lesão; já quando a lesão de cárie inicial é pequena (superficial), a remineralização é mais rápida, porém em menor proporção quando comparada à lesão profunda. Por outro lado, a desmineralização é mais pronunciada em lesões prévias menos desmineralizadas. Assim, as diferenças nas propriedades físicas e mecânicas das lesões produzidas por diferentes protocolos podem influenciar os resultados de subseqüentes desmineralizações e remineralizações.

Neste sentido, uma pesquisa está sendo realizada com o objetivo de avaliar a remineralização de lesões cariosas produzidas pelos protocolos *in vitro* testados no presente trabalho, a partir de um ensaio *in situ* no qual será avaliado o efeito da saliva humana apenas, do dentifrício fluoretado e do verniz mais dentifrício fluoretado (mestrado, processo FAPESP - 2011/03807-1). Adicionalmente, novos

estudos devem ser realizados utilizando dentes com lesões de cárie iniciais e naturais em esmalte e dentina humanos, para um melhor entendimento das características de lesões iniciais e da susceptibilidade a subseqüentes remineralizações comparando às lesões artificiais. A realização de novos estudos nesta área do conhecimento será facilitada com a aquisição do equipamento para microradiografia pelo Laboratório de Bioquímica da FOB-USP (processo FAPESP – 2009/53849-8), o qual poderá ser utilizado com padrão para comparação com outras variáveis de respostas utilizadas neste tipo de estudo e para um melhor entendimento da relação entre a dureza e o conteúdo mineral. Dessa forma, as vantagens do uso da dureza serão mantidas, e as desvantagens serão contrabalanceadas pela introdução da microradiografia. A dureza deverá ser usada para a avaliação das lesões somente em esmalte. A dentina deverá ser avaliada somente por microradiografia.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

O presente estudo teve como conclusões:

- 1a. As lesões cariosas produzidas em esmalte, pelos diferentes protocolos preconizados na literatura *in vitro* e *in situ*, apresentaram-se diferentes em relação à distribuição mineral, dureza superficial e longitudinal, profundidade, perda mineral integrada e camada superficial “pseudo-intacta”. Lesões mais rasas foram produzidas pelo GEL MC, GEL PA e TAMPÃO; por outro lado, lesões com maior perda mineral integrada e profundidade foram produzidas pelo MDHP e IN SITU, sendo este último o que levou a maior perda mineral média. Estas características iniciais podem ter influencia sobre uma subsequente des-mineralização (HIPOTESE NULA REJEITADA);
- 1b. As lesões cariosas naturais em esmalte apresentaram grande variabilidade entre si em termos de distribuição mineral, camada superficial e profundidade, o que impossibilitou a comparação com as lesões artificiais. Em futuros estudos, deve ser padronizada a forma de coleta dos dentes; o histórico do doador deve ser investigado quanto à exposição ao fluoreto, hábitos e dieta, e um maior número amostral deve ser considerado;
2. As lesões cariosas produzidas em dentina, pelos diferentes protocolos preconizados na literatura *in vitro* e *in situ*, apresentaram-se diferentes em relação à distribuição mineral, dureza superficial, profundidade, perda mineral integrada e camada superficial “pseudo-intacta”. O GEL MC II produziu lesões mais rasas; enquanto o TAMPÃO II levou a uma maior desmineralização em profundidade com preservação de uma espessa camada superficial. Em geral, a desmineralização induzida pelo TAMPÃO III, MDHP E IN SITU foi similar, com exceção de que este último protocolo induziu a uma maior perda mineral média sem a preservação de uma camada superficial. Estas características iniciais podem ter influencia sobre uma subsequente des-mineralização (HIPOTESE NULA REJEITADA);

3. Não houve relação linear quando se comparou CSH com TMR, especialmente porque os pontos foram dispersos nos gráficos de regressão especialmente para lesões mais desmineralizadas tanto em esmalte como em dentina (especialmente crítico neste último tecido). Alguns parâmetros de dureza apresentaram média correlação com os dados da microradiografia, para os espécimes de esmalte do GEL MC (%SHC e profundidade da camada superficial) e para espécimes de dentina (Δ KHN e profundidade da lesão para o grupo GEL MC II e inversa SH final e Δ Z para o grupo MDHP II). Ambos os métodos dão informações relevantes em relação à desmineralização, visto que o primeiro gera informações sobre propriedades mecânicas do esmalte e o segundo informações sobre conteúdo, mudanças e distribuição mineral do esmalte e dentina. Em função de algumas limitações da técnica, a dureza não deveria ser usada como variável de resposta para lesões em dentina (HIPÓTESE NULA ACEITA).

Referências

REFERÊNCIAS

AIRES, C. P. et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm and root dentine demineralization. **Caries Res**, v. 42, p. 380-386, 2008.

AIRES, C. P. et al. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. **Caries Res**, v. 40, p. 28-32, 2006.

AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Factors affecting the development of carious lesions in bovine teeth in vitro. **Arch Oral Biol**, v. 43, p. 619-628, 1998.

ANGMAR, B.; CARLSTROMD, D.; GLAS, J. E. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. **J Ultrastruct Res**, v. 8, p.12-23, 1963.

ARENDS J.; CHRISTOFFERSEN J. The nature of early caries lesions in enamel. **J Dent Res**, v. 65, p. 2-11, 1986.

ARENDS, J. et al. Influence of fluoride concentration on the progress of demineralization in bovine enamel at pH 4,5. **Caries Res**, v. 17, n. 5, p. 455-457, 1983.

ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. **J Dent Res**, v. 69, p. 601-605, 1990.

ARENDS, J.; DIJKMAN, T.; CHRISTOFFERSEN, J. Average mineral loss in dental enamel during demineralization. **Caries Res**, v. 21, n. 3, p. 249-254, 1987.

ARENDS, J.; RUBEN, J. L.; INABA, D. Major topics in quantitative microradiography of enamel and dentin: R parameter, mineral distribution visualization, and hyper-remineralization. **Adv Dent Res**, v. 11, n. 4, p. 403-414, Nov. 1997.

ARENDS, J.; SCHUTHOF J.; JONGEBLOED, WG. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. **Caries Res.**, v. 14, p. 190-195, 1980.

ARENDS, J.; TEN BOSCH, J. J. Demineralization and remineralization evaluation techniques. **J Dent Res**, v. 71, p. 924-928, 1992.

ATTIN, T. Methods for assessment of dental erosion. **Monogr Oral Sci**, v.20, p.152-172, 2006.

BERTASSONI, L. E. et al. Evaluation of surface structural and mechanical changes following remineralization of dentin. **Scanning Vol**, v. 32, p. 312-319, 2010.

BUCHALLA, W et al. Influence of olive oil emulsions on dentin demineralization in vitro. **Caries Res**, v. 27, n. 2, p. 100-107, 2003.

BUCHALLA, W. et al. Relationship between nanohardness and mineral content of artificial carious enamel lesions. **Caries Res**, v. 42, p. 157-163, 2008.

BUSKES, J. A. K. M.; CHRISTOFFERSEN, J.; ARENDS, J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. **Caries Res**, v. 19, p. 490-496, 1985.

BUZALAF, M. A. R. et al. Mechanisms of action of fluoride for caries control. **Monogr Oral Sci**, v. 22, p. 97-114, jun, 2011.

CHAUSSAIN-MILLER, C. et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the human caries. **J Dent Res**, v. 85, n. 1, p. 22-32, 2006.

CLASEN, A. B. S.; OGAARD, B. Experimental intra-oral caries models in fluoride research. **Acta Odontol Scand**, v. 57, p. 334-341, 1999.

COLUSSI, C. F.; FREITAS, S. F. T. Aspectos epidemiológicos da saúde bucal do idoso no Brasil. **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1313-1320, Set-Out. 2002.

CURY J. A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, v. 34, p. 491-497, 2000.

CURY, J. A. et al. Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. **Eur J Oral Sci**, v. 118, p. 370-375, 2010.

DAMATO, F. A.; STRANG R.; STEPHEN K. W. Comparison of solution- and gel-prepared enamel lesions – an *in vitro* pH-cycling Study. **J Dent Res**, v.67, n.8, p. 1122-1125, 1988.

DAMEN, J.J.; BUIJS, M.J.; TEN CATE, J. M. Fluoride-dependent formation of mineralized layers in bovine dentin during demineralization in vitro. **Caries Res**, v. 32, n.6, p. 435-440, 1998.

DUNG, S. Z. et al. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. **Caries Res**, v. 29, p. 483-489, 1995.

EDGAR, W. M. Distribution of acetic acid in enamel during demineralization in a hydroxyethyl cellulose/lactic acid system. In: **demineralization and remineralization of teeth**. Eds Leach AS, Edgar W.M. IRL Press, Oxford. 1983. p. 145-152.

FEAGIN, F. F.; CLARKSON, B. H.; WEFEL, J. S. Chemical and physical evaluation of dialyzed-reconstituted acidified gelatin surface lesions of human enamel. **Caries Res**, v.19, n.3, p. 219-227, 1985.

FEATHERSTONE, J. D. B. et al. Comparison of artificial caries-like by quantitative microradiograph and microhardness profiles. **Caries Res**, v. 17, n. 5, p. 385-391, 1983.

FEATHERSTONE, J. D. B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 27, p. 31-40, 1999.

FEJERSKOV, O. KIDD E. **Cárie Dentária**. A doença e o seu tratamento clínico. 2 ed. São Paulo:Santos, 2011.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B.; KIDD, E. A. M. Características clínicas e histológicas da cárie dentária. In: **Cárie dentária. A doença e o seu tratamento clínico**. São Paulo:Santos, 2005. Cap 5, p. 71-98.

FRIAS, A. C. et al. Determinantes individuais e contextuais da prevalência de cárie dentária não tratada no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 22, n. 4, p. 279-285, 2007.

- GANSS, C. et al. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine *in situ*. **Caries Res**, v. 38, n. 6, p. 561-6, 2004.
- GIMBEL, C. Optical coherence tomography diagnostic imaging. **Gen Dent**, v. 56, n. 7, p. 750-757, Nov-Dec. 2008.
- GMUR, R. et al. In vitro quantitative light induced fluorescence to measure changes in enamel mineralization. **Clin Oral Investig**, v. 3, p. 187-195, Sep. 2006.
- HANNAS, A. R. et al. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontol Scand**, v. 65, p. 1-13, 2007.
- HARA, A. T. et al. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine *in situ*. **Caries Res**, v. 37, p. 339-344, 2003.
- HAVATI, F. et al. An artificial biofilm induced secondary caries model for *in vitro* studies. **Aust Dent J**, v. 56, n. 1, p. 40-47. Mar. 2011.
- HONÓRIO, H. M. et al. Cross-sectional microhardness of human enamel subjected to erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges. **Caries Res**, v. 44, n. 1, p. 29-32, 2010.
- HOPPENBROUWERS, P. M.; DRIESSENS, F. C.; BORGGREVEN, J. M. The demineralization of human dental roots in the presence of fluoride. **J Dent Res**, v. 66, p. 1370-1374, 1987.
- HUANG, T. T. Y et al. Nano-indentation characterization of natural carious white spot lesions. **Caries Res**, v. 44, p. 101-107, 2010.
- HUANG, T. T. Y. et al. Characterisation of enamel white spot lesions using x-ray micro-tomography. **J Dent**, v. 35, p. 737-743, 2007.
- IJIMA Y. et al. Acid Resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. **Caries Res**, v. 38, p. 551-556, 2004.
- IJIMA Y. et al. In vitro remineralization of *in vivo* and *in vitro* formed enamel lesions. **Caries Res**, v. 33, p. 206-213, 1999.

INABA, D.; TAKAGI, O.; ARENDS, J. A computer-assisted videodensitometric method to visualize mineral distributions in vitro and in vivo formed root caries lesions. **Eur J Oral Sci**, v. 105, p. 74-80, 1997.

KANG, H. et al. Nondestructive assessment of early tooth demineralization using cross-polarization optical coherence tomography. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, v. 16, n. 4, p. 870-876, 2010.

KAWASAKI, K.; FEATHERSTONE, J. D. Effects of collagenase on root demineralization. **J Dent Res**, v. 76, p. 588-595, 1997.

KETLER, G. A. et al. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. **J Dent Res**, v. 73, p. 1523-1529, 1994.

KIELBASSA A. M. et al. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. **Arch Oral Biol**, v. 44, p. 243-251, 1999.

KIELBASSA, A. M. et al. Microradiographic study on the effects of salivary proteins on in vitro demineralization of bovine enamel. **J Oral Rehabil**, v. 32, n. 2, p.90-96, Feb. 2005.

LENHINGER, A. L. **Água**. In: Bioquímica: Componentes moleculares das células. 2. ed. 1976. Cap. 2, p. 28-38.

LIPPERT, F. et al. In situ fluoride response of caries lesions with different mineral distributions at baseline. **Caries Res**, v. 45, p. 47-55, 2011.

LUSSI, A. et al. Dental erosion – an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Res**, v. 43, p. 2-12, May. 2011.

LYNCH, R. J. M.; MONY, U.; TEN CATE, J. M. Effect of lesion characteristics and mineralizing solution type on enamel remineralisation *in vitro*. **Caries Res**, v. 41, p. 257-262, 2007.

LYNCH, R. J. M.; MONY, U.; TEN CATE, J. M. The effect of fluoride at plaque fluid concentration on enamel de- and remineralisation at low pH. **Caries Res**, v. 40, p. 522-529, 2006.

LYNCH, R. J. M.; TEN CATE, J. M. The effect of lesion characteristics at baseline on subsequent de- and remineralisation behavior. **Caries Res**, v. 40, p. 530-535, 2006.

MAGALHÃES, A. C. et al. Comparison of cross-sectional hardness and transversal microradiography of artificial carious lesions induced by different demineralising solutions and gels. **Caries Res**, v. 43, n. 6, p. 474-483, 2009.

MAGALHÃES, A. C. et al. Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF₄) varnish on demineralization and remineralization of bovine enamel *in vitro*. **J Dent**, v. 36, p. 158-162, 2008.

MAGALHÃES, A. C. et al. Effect of calcium pre-rinse and fluoride dentifrice on remineralisation of artificially demineralised enamel and on the composition of the dental biofilm formed *in situ*. **Arch Oral Biol**, v. 52, n. 12, p. 1155-1160, Dec. 2007.

MARGOLIS, H. C.; MORENO, E. C.; MURPHY, B. J. Effect of low levels of fluoride in solution on enamel demineralization *in vitro*. **J Dent Res**, v. 11, n. 1, p. 23-29, 1986.

MARQUEZAN, M. et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. **Arch Oral Biol**, v. 54, p. 1111-1117, 2009.

MARSHALL, G. W. et al. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J Dent**, v. 25, p. 441-458, 1997.

MC INTYRE, J. M.; FEATHESTONE J. D. B., FU, J. Studies of dental root surface caries. 1: Comparison of natural and artificial root caries lesions. **Aust Dent J**, v.41, n. 1, p. 24-30, 2000.

MEDEIROS, U. V.; WEYNE, S. C. A doença cárie dentária no Brasil e no mundo. **UFES Rev Odontol**, v. 3, n. 1, p. 88-95, 2001.

MELLBERG, J. R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity *in situ*. **J Dent Res**, v.71, p.913-919, 1992.

MOREIRA, R. S. et al. A saúde bucal do idoso brasileiro: revisão sistemática sobre o quadro epidemiológico e acesso aos serviços de saúde bucal. **Cad Saude Publica**, v. 21, n. 6, p. 1665-1675, 2005.

NARVAI, P. C. et al. Cárie dentária no Brasil: declínio, iniquidade e exclusão social. **Rev Panam Salud Publica**, v. 19, n. 6, p. 385-393, Jun. 2006.

ÖGAARD, B.; RÖLLA, G. Intra-oral models: comparison of in situ substrates. **J Dent Res**, v.71, p.920-923, 1992.

PEARCE, E. I. F. A microradiographic and chemical comparison of in vitro systems for the simulation of incipient caries in abraded bovine enamel. **J Dent Res**, v. 62, p. 969-974, 1983.

PERES, M. A.; ANTUNES, J. L.; PERES, K. G. Is water fluoridation effective in reducing inequalities in dental caries distribution in developing countries? Recent findings from Brazil. **Soz Präventivmed**, v. 51, n. 5, p. 302-310, 2006.

PETERSSON, G. H.; BRATHALL, D. The caries decline: a review of reviews. **Eur J Oral Sci**, v. 104, p. 436-443, 1996.

PRESTON, K. P.; SMITH, P. W.; HIGHAM, S. M. The influence of varying fluoride concentrations on in vitro remineralisation of artificial dentinal lesions with differing lesion morphologies. **Arch Oral Biol**, v. 53, p. 20-26, 2008.

QUEIROZ, C. S. et al. pH cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice enamel de- and remineralization. **Braz Dent J**, v. 19, n. 1, p. 21-27, 2008.

ROLLA, G.; SCHEIE, A. A.; CIARDI, J. E. Role of sucrose in plaque formation. **Scand J Dent Res**, v. 93, p. 105-111, 1985.

ROSE, R. K.; DIBDIN, G. H.; SHELLIS, R. P. A quantitative study of calcium binding and agglutination in selected oral bacteria. **J Dent Res**, v. 72, p. 78-84, 1993.

SHELLIS, R. P. A microcomputer program to evaluated the saturation of complex solutions with respect to biominerals. **Comput Appli Biosc**, v. 4, p. 373-379, 1988.

SILVERSTONE, L. M. Remineralization phenomena. **Caries Res**, v.11, Supl.1, p. 59-84, 1977.

SISSONS, C. H. Artificial dental plaque biofilm model systems. **Adv Dent Res**, v. 11, n. 1, p. 110-126, Apr. 1997.

SISSONS, C. H. et al. Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. **Caries Res**, v. 41, n. 5, p. 413-422, 2007.

SPIGUEL, M. H. et al. Evaluation of lase fluorescence in the monitoring of the initial stage of de-/remineralization process: An in vitro and in situ study. **Caries Res**, v. 43, p. 302-307, 2009.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries Ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. **Caries Res**, v. 42, n. 6, p. 409-418, 2008.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **J Dent Res**, v. 90, n. 3, p. 294-303, Mar. 2011.

TATEVOSSIAN, A. Facts and artefacts in research on human dental plaque fluid. **J Dent Res**, v. 69, p. 1309-1315, 1990

TEN CATE, J. M. et al. **Chemical interactions between the tooth and oral fluids**. In: Dental caries. The disease and its clinical management. 2 ed. Oxford:Blackwell Munksgaard, 2008. Cap. 4, p. 209-231.

TEN CATE, J. M. et al. Elevated fluoride products enhance remineralization of advanced enamel lesions. **J Dent Res**, v. 87, n. 10, p. 947-943, Oct. 2008.

TEN CATE, J. M. et al. Preparation and measurement of artificial enamel lesions, a four laboratory ring test. **Caries Res**, v. 30, p. 400-407, 1996.

TEN CATE, J. M. In Situ models, physic-chemical aspects. **Adv Dent Res**, v. 8, n. 2, p. 125-133, 1994.

TEN CATE, J. M.; BUIJS, M. J.; DAMEN, J. J. pH-cycling of enamel and dentine lesions in the presence of low concentrations of fluoride. **Eur J Oral Sci**, v. 103, p.362-367, 1995.

TEN CATE, J. M.; DUIJSTERS, P. P. E. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res**, v. 16, p. 201-210, 1982.

TEN CATE, J. M.; DUIJSTERS, P. P. E. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I Chemical data. **Caries Res**, v. 17, p. 193-199, 1983.

THEUNS H. M. et al. The influence of the composition of demineralizing buffers on the surface layers of artificial carious lesions. **Caries Res**, v. 18, p. 509-518, 1984b.

THEUNS, H. M. et al. Effect of the pH of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. **Caries Res**, v. 18, p. 7-11, 1984c.

THEUNS, H. M. et al. The surface layer during artificial caries lesion formation. **Caries Res**, v. 18, p. 97-102, 1984a.

THOMAS, R. Z. et al. Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. **J Dent**, v. 35, p. 547-551, 2007.

TJADERHANG, L. et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **J Dent Res**, v. 77, n. 8, p. 1622-1629, 1998.

VAN DER VEEN, M. H.; DE JOSSELIN DE JONG, E. Application of quantitative light-induced fluorescence for assessing early caries lesion. **Monogr Oral Sci**, v. 17, p. 144-162, 2000.

VAN STRIJP, A. J. P. et al. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. **Caries Res**, v. 37, p. 58-65, 2003.

WHITE, D. J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. **Caries Res**, v. 21, p. 126-140, 1987.

WHITE, D. J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. II. Effects on subsurface lesions: F uptake, F distribution, surface hardening and remineralization. **Caries Res**, v.22, p.27-36, 1988.

WHITE, D. J. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. **Adv Dent Res**, v. 9, n. 3, p. 175-193, 1995.

YAMAZAKI, H.; LITMAN, A; MARGOLIS, H. C. Effect of fluoride on artificial caries lesion progression and repair in human enamel: regulation of mineral deposition and dissolution under in vivo-like conditions. **Arch Oral Biol**, v. 52, p. 110-120, 2007.

YAMAZAKI, H.; MARGOLIS H.C. Enhanced enamel remineralization under acidic conditions *in vitro*. **J Dent Res**, v.87, n. 6, p. 569-574, 2008.

ZAURA, E.; BUJIS, M.J.; TEN CATE, J.M. Effects of ozone and sodium hypochlorite on caries-like lesions in dentin. **Caries Res**, v. 41, p. 489-492, 2007.

ZAVGORODNIY, A. V.; ROHANIZADEH, R.; SWAIN, M. V. Ultrastructure of dentine carious lesions. **Arch Oral Biol**, v. 53, p. 124-132, 2008.

ZERO, D. T. Dental caries process. **Dent Clin North Am**, v. 43, n. 4, p. 635-664. Oct, 1999.

ZERO, D. T. In situ caries models. **Adv Dent Res**, v. 9, n. 3, p. 214-230. Nov. 1995.

Anexos

ANEXO A

Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679
Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 057/2009

Bauru, 15 de maio de 2009.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "Comparação entre diferentes métodos para produção e análise de lesão de cárie artificial em esmalte e dentina", de autoria de Bruna Mangialardo Moron, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 29 de abril de 2009 o parecer do relator, aprovando o projeto, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Ana Carolina Magalhães
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B**CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA**

Nome do sujeito da pesquisa: _____

1 - Título do Trabalho Experimental

Comparação entre diferentes métodos para produção e análise de lesão de cárie artificial em esmalte e dentina.

2 - Objetivo

O objetivo deste estudo é comparar os diferentes métodos para produzir lesão de cárie artificial em esmalte e dentina bovino *in vitro* e *in situ*, sendo que as alterações serão avaliadas por microdureza interna e microradiografia transversal, com a finalidade de correlacionar os resultados dos dois métodos.

3 - Procedimentos da Fase Experimental

Os voluntários utilizarão, durante um período de 14 dias, um aparelho no céu da boca, confeccionado em resina acrílica, no qual serão fixados 4 blocos de dente bovino previamente esterilizados (2 fileiras verticais de 2 blocos). Durante cada período, os voluntários terão que realizar os seguintes experimentos: Para a fileira do esmalte, será gotejada uma solução de sacarose a 20%, 8x/dia, por 5 minutos; já para a fileira da dentina será gotejada uma solução de sacarose a 20%, 4x/dia, por 5 minutos *ex vivo*. Na sequência, o aparelho deverá ser reinserido na boca.

4 - Benefícios do Experimento

Durante muitos estudos para testar métodos preventivos da cárie dentária, principalmente produtos que contêm flúor, são feitas produções de cárie dentária artificial. No entanto, existem vários métodos para realizar este procedimento de formação da lesão cáries e para analisá-los. Assim, o experimento fará uma análise dessas soluções comparando a produção *in vitro* com a *in situ*, tanto em esmalte como em dentina, utilizando duas máquinas, uma que é utilizada muito no Brasil mas que apresenta algumas limitações (microdurômetro) e outra que não existe ainda aqui no país, mas que é considerada padrão ouro internacionalmente (microradiografia). Com isso buscamos uma melhor padronização dessas soluções e destes métodos, de modo que as futuras pesquisas sejam realizadas com maior precisão.

5 - Riscos do Experimento

Não há riscos ao voluntário pelo uso do aparelho e realização dos procedimentos.

Fica claro que o voluntário pode, a qualquer momento, retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Qualquer dúvida ou maiores esclarecimentos o sujeito da pesquisa pode recorrer a qualquer um dos membros da equipe do projeto (Laboratório de Bioquímica 14-3235-8246 ou Ana Carolina 14-3224-2441). Caso queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço da Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da Biblioteca, FOB/USP) ou pelo telefone (14)3235-8356.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o senhor(a) _____, portador(a) da cédula de identidade número _____, após leitura minuciosa da **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, devidamente explicada pela profissional em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**.

Fica claro que o sujeito da pesquisa pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Bauru, ____ de _____ de 2010.

Sujeito da pesquisa

Bruna Mangialardo Moron

Autora

ANEXO C

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

1. Todos os materiais utilizados na pesquisa não acarretam em custo ao voluntário.
2. Durante o experimento, os voluntários deverão utilizar apenas a escova, fio dental e dentifrício não fluoretado, fornecidos pela autora do trabalho.
3. A pesquisa será composta por uma fase de 14 dias.
4. Os voluntários deverão utilizar um dispositivo bucal palatino e só o removerão para as principais refeições diárias (café da manhã, almoço, lanche e jantar, 4x1h) e para os procedimentos de aplicação de sacarose.
5. Enquanto o dispositivo permanecer fora da boca durante as refeições, este deverá ficar envolvido em gaze umedecida em água deionizada fornecida pela autora do trabalho.
6. Durante o uso do dispositivo, nenhum tipo de alimento ou bebida poderá ser ingerido, exceto água (retirar o dispositivo para a ingestão de água e recolocá-lo imediatamente após a ingestão).
7. Evite que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a refeição (máximo de 1 hora por refeição).
8. Realize sua higiene bucal normalmente após as refeições, utilizando o dentifrício fornecido.
9. Os voluntários deverão aplicar uma gota de solução de sacarose (fornecida pela autora) em cada bloco da fileira verde (2 blocos de esmalte), 8 vezes ao dia, com um intervalo de 2 horas entre as aplicações.
10. Os voluntários deverão aplicar uma gota de solução de sacarose (fornecida pela autora) em cada bloco da fileira vermelha (2 blocos de dentina), 4 vezes ao dia, com um intervalo de 2 horas entre as aplicações.

11. Muito cuidado deverá ser tomado para que a solução de sacarose aplicada na fileira verde não escorra para a fileira vermelha e vice-versa. Esse cuidado é de extrema importância.
12. Uma vez ao dia, os voluntários poderão realizar a escovação do dispositivo, somente da face voltada para o palato e com o dentifrício fornecido pela autora.
13. Quando qualquer material estiver acabando, entrar em contato com a autora, para que este seja repostado.
14. Favor verificar todos os dias se os fragmentos estão em suas lojas e se a tela plástica e sua proteção em cera permanecem intactas. Caso não estejam, entrar em contato imediatamente com a autora.
15. Qualquer dúvida, entrar em contato com a autora do trabalho pelos telefones abaixo:

Bruna Mangialardo Moron

Celular: (14) 8122-7636

Laboratório de Bioquímica FOB/USP: (14) 3235-8246

Muito grata pela sua colaboração!

Bruna M. Moron

RESUMO DAS INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Durante o período de utilização do aparelho, o voluntário deverá utilizar apenas o dentífrico, a escova e o fio dentário fornecidos pela autora para a realização da pesquisa. Bem como não poderão realizar bochechos com enxaguatórios bucais, como por exemplo, Cepacol, Listerine, Periogard. Também não poderá ser submetido à aplicação tópica de flúor profissional.

1. Primeira noite: apenas dormir com o aparelho.
2. Durante 14 dias:
 - retirar o aparelho **4 vezes ao dia** (café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir), por um período de no máximo **1 hora** por vez. Enquanto isso o aparelho deverá permanecer envolvido em gaze umedecida com água deionizada.
 - após cada período, realizar a higiene bucal com dentífrico e escova dental fornecidos pela autora, antes do aparelho ser recolocado na boca.
3. Aplicar **1 gota de solução de sacarose** em cada bloco da fileira **VERDE** (2 blocos), com o aparelho fora da boca. Aguardar **5 minutos** e recolocar o aparelho na boca.
 - este procedimento deverá ser realizado **8 vezes ao dia**, de preferência com um intervalo de 2h entre as aplicações.
4. Aplicar **1 gota de solução de sacarose** em cada bloco da fileira **VERMELHA** (2 blocos), com o aparelho fora da boca. Aguardar **5 minutos** e recolocar o aparelho na boca.
 - este procedimento deverá ser realizado **4 vezes ao dia**, de preferência com um intervalo de 2h entre as aplicações.

Obs: Ao fazer a aplicação de sacarose na fileira VERDE, tomar o máximo de cuidado para que esta não escorra para a fileira VERMELHA, e vice-e-versa. No último dia, dormir com o dispositivo, retirar no dia seguinte pela manhã e guardar em gaze umedecida com água deionizada até a entrega para o pesquisador.

Muito grata.

Bruna M. Moron

ANEXO D

CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE

Senhor (a) paciente ou seu representante legal,

A Faculdade de Odontologia de Bauru – USP desenvolve pesquisas científicas utilizando dentes extraídos. Dessa forma, quando ocorrer, após análise clínica e realização do plano de tratamento, a necessidade de extração (arrancar) de um ou mais dentes, solicitamos que o (a) senhor (a) faça a doação de seus dentes ou dos dentes do(a) paciente representado legalmente pelo(a) senhor(a).

Esta doação não é obrigatória!

É assegurado ao doador(a) que seu nome não será revelado.

A doação não dará ao doador qualquer prioridade de tratamentos futuros na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

Bruna Mangialardo Moron

Autora

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o senhor(a) _____, portador(a) da cédula de identidade número _____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pela profissional em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância da doação de seus dentes a serem extraídos ou dos dentes extraídos do(a) paciente representado legalmente pelo(a) senhor(a) por indicação ortodôntica ou periodontal à Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Os dentes extraídos serão utilizados em pesquisas.

Bruna Mangialardo Moron

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Paciente (Representante legal em caso de menores de idade).