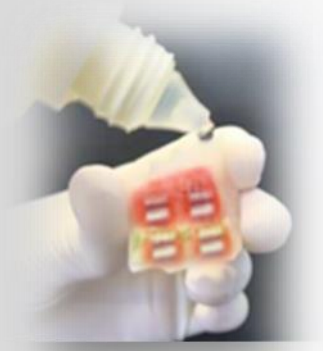
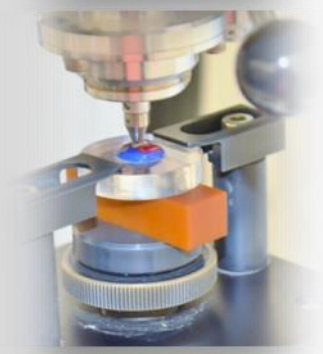
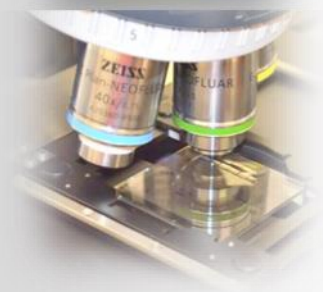
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

PRISCILA MARIA ARANDA SALOMÃO

Efeito do tipo de lesão cariosa artificial em esmalte bovino sobre o potencial remineralizante da saliva, do dentifrício e do verniz fluoretado: um estudo *in situ*







BAURU
2013

PRISCILA MARIA ARANDA SALOMÃO

Efeito do tipo de lesão cariosa artificial em esmalte bovino sobre o potencial remineralizante da saliva, do dentifrício e do verniz fluoretado: um estudo *in situ*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientadora: Profª Drª Ana Carolina Magalhães

Versão corrigida

BAURU
2013

Sa36e

Salomão, Priscila Maria Aranda
Efeito do tipo de lesão cariosa artificial em esmalte bovino sobre o potencial remineralizante da saliva, do dentifrício e do verniz fluoretado: um estudo *in situ*. / Priscila Maria Aranda Salomão. – Bauru, 2013.
128 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: 036/2011
Data: 28/04/2011

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus que sempre me guiou mostrando os melhores caminhos e ao amor da minha vida, Diogo, que está ao meu lado desde o começo deste sonho, e que me ajudou muito para que tudo isso se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que sempre transformou a incerteza em certeza, a insegurança em segurança e mais que isso, sempre me deu determinação, persistência e saúde e iluminou os caminhos que eu deveria seguir.

Ao meu marido, companheiro, amigo, e meu maior incentivador **DIOGO**, que foi meu maior presente de Deus, que está comigo em todos os momentos, que me viu rir, chorar, surtar e vibrar com este trabalho, que sabe o quanto é importante pra mim depois de tanta luta chegar até aqui!! Você é meu grande Amor!! Te Amo muito!!

Aos meus pais, **Tânia** e **Milton**, que me trouxeram à vida e me deram forças para lutar pelos meus sonhos, amo muito vocês!! Obrigada por acompanharem meu desenvolvimento e me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

Aos meus avós **Maria** e **Benedito** que não estão mais aqui, mas nunca deixaram de morar em meu coração, que sempre amei muito e são uma inspiração pra mim!!

À minha companheira de trabalho **Lívia**, que foi uma grande colaboradora desta pesquisa. Obrigada por toda sua ajuda!!

Aos meus voluntários **Adriana**, **Alessandra**, **Mariana**, **Lívia**, **Melina**, **Priscila**, **Aline**, **Isabela**, **Janete**, **Jéssica**, **Camila Roque**, **Camila Perfeito**, **Juliana e Kellen**, sem vocês não seria possível realizar esta pesquisa, agradeço por se dedicarem ao experimento e por me ajudarem neste trabalho.

Aos professores da disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Prof^{a}. Dr^{a}. Marília Afonso Rabelo Buzalaf** e **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, pela convivência e ensinamentos. Tenho grande admiração por vocês.

Aos técnicos e especialistas do laboratório, **Aline**, **Ovídio**, **Thelma** e **Larissa** pela companhia diária e por sempre estarem à disposição e ajudarem em todos os momentos.

A todos os amigos do laboratório de Bioquímica, pelas conversas, risadas e pelo companheirismo, cada um com seu jeitinho especial tornou meu trabalho mais agradável.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru-USP**, 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**, pela oportunidade em realizar pós-graduação em nível de Mestrado nesta instituição. Muito obrigada FOB-USP por ser o palco deste sonho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP/ Processo 2011/03907-1), por aprovar meu projeto e acreditar em meu trabalho concedendo apoio financeiro durante a realização deste estudo de Mestrado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

O meu agradecimento mais que especial à Prof[a]. Dr[a]. **Ana Carolina Magalhães**, que é mais umas das obras de Deus em minha vida. Tudo começou com uma menina perdida em uma prova de mestrado, que você acolheu. Nunca vou esquecer suas palavras "Eu posso ser sua orientadora", você me escolheu mesmo sem me conhecer, confiou em mim e sempre me atendeu com muita prontidão e atenção. Você é uma pessoa admirável, isso sem falar em sua inteligência e o esforço que é coisa de outro mundo. Nem todos os professores têm o dom que você tem, eu me surpreendo a cada dia com sua didática, sua humanidade, seu respeito e paciência com os alunos. Espero ser um dia um pouquinho parecida com você. Tenho uma grande admiração e muito carinho por você. Obrigada de coração por tudo.

"Existem coisas reservadas pra gente que foge do nosso entendimento, mas que lá na frente vai fazer todo o sentido. Por isso nunca perca a fé!"
(Reynaldo Gianecchini)

"A persistência é o menor caminho do êxito." (Charles Chaplin)

"Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa."
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Este trabalho avaliou o efeito do tipo de lesão cariosa artificial em esmalte produzido por quatros protocolos *in vitro* em relação ao potencial remineralizante *in situ*, utilizando como variáveis de resposta a microdureza superficial (SH) e longitudinal (CSH) e a microradiografia transversal (TMR). Para tal, 288 espécimes de esmalte bovino polidos (4x4mm) foram divididos de acordo com os valores de SH inicial em 4 tipos de protocolos desmineralizantes: Gel MC (gel de metilcelulose a 8%, ácido lático 0,1 M, pH 4,6, 14 dias); Gel PA (ácido poliacrílico 20g/L, ácido lático 0,1 M com hidroxiapatita a 500 mg/L, pH 4,8, 16h); Solução MHDP (ácido lático 50 mM, cálcio, fosfato e tetraetil metilenodifosfanato, pH 5,0, 6 dias) e Solução Tampão (ácido acético 50 mM, cálcio, fosfato e fluoreto, pH 5,0, 16h). Os espécimes desmineralizados foram tratados com agentes remineralizantes em um modelo *in situ* cruzado e duplo cego, com a participação de 12 voluntários que utilizaram aparelhos palatinos contendo 2 amostras de cada tipo de lesão de esmalte em cada fase, durante 3 fases experimentais com duração de 3 dias cada. Na fase da "saliva humana", os voluntários realizaram o tratamento dos espécimes com dentifrício placebo (sem fluoreto, solução 1:3) *ex vivo*, 2x1min/dia. Na fase "dentifrício fluoretado", o mesmo procedimento foi repetido em relação ao tratamento dos espécimes, porém utilizando o Dentifrício *Crest* (1.100 ppm F). Na fase "verniz fluoretado", os mesmos procedimentos da fase "dentifrício fluoretado" foram repetidos, porém os espécimes foram tratados com verniz *Duraphat* (22.600 ppm F, 6h *in vitro*) anteriormente à fase *in situ.* Os dados foram submetidos à análise estatística (ANOVA ou similar não paramétrico e ANOVA a 2 critérios, $p<0,05$). Os diferentes protocolos desmineralizantes produziram lesões cariosas com perfis diferentes (resultados similares entre SH, CSH e TMR. Grau de desmineralização: Solução MHDP > Gel MC > solução Tampão = Gel PA) sendo nítida a diferença no grau de remineralização entre as diferentes lesões cariosas artificiais (resultados incoerentes entre SH, CSH e TMR). Na análise de SH, o Gel PA foi capaz de mostrar diferenças significativas entre os 3 protocolos remineralizantes, enquanto o Gel MC e Solução Tampão mostraram diferenças significativas entre as fases com fluoreto e controle. Para a solução MHDP não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos remineralizantes. Em relação à CSH, o padrão de remineralização foi inversamente relacionado ao grau de desmineralização inicial. Na análise da porcentagem de recuperação de CSH, apenas o gel PA foi capaz de mostrar diferenças significativas entre as fases com

fluoreto e controle até os 30 μm de profundidade. Na análise pela TMR (parâmetro ΔΔZ), houve diferença significativa entre as lesões cariosas artificiais em relação à remineralização (Solução Tampão < Solução MHDP = gel PA < Gel MC), com exceção da fase "verniz fluoretado". Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos remineralizantes pela TMR, mostrando uma modesta remineralização, independentemente do tratamento. Pode-se concluir que o tipo de lesão cariosa artificial tem influência sobre o grau de remineralização do esmalte e isto deve ser considerado no delineamento experimental.

Palavras-Chave: Cárie dentária. Desmineralização. Esmalte dentário. Fluoreto. Remineralização.

ABSTRACT

Effect of type of artificial bovine enamel caries lesion on the remineralizing potential of Saliva, fluoride dentifrice and varnish: an *in situ* study.

This study evaluated the effect of type of artificial enamel carious lesion produced by four *in vitro* protocols in respect to the remineralizing potential *in situ*, using as response variables: surface microhardness (SH), cross-sectional microhardness (CSH) and transverse microradiography (TMR). Thus, 288 polished enamel specimens (4x4mm) were divided according to the baseline SH values in 4 demineralizing protocols: MC gel (8% methylcellulose gel, 0.1 M lactic acid, pH 4.6, 14 days); PA gel (20g/L polyacrylic acid, 0.1 M lactic acid with 500 mg/L hydroxyapatite, pH 4.8, 16h); MHDP solution (50 mM lactic acid, calcium, phosphate and tetraethyl methylene diphosphanate, pH 5.0, 6 days) and Buffer Solution (50 mM acetic acid, calcium, phosphate and fluoride, pH 5.0, 16h). The demineralized specimens were treated with the remineralizing agents in an *in situ* model, with crossover and double-blind design. Twelve volunteers wore intra-oral appliances containing two specimens of each type of enamel lesion in each phase, during 3 experimental phases with duration of 3 days each. In the phase "human saliva", the volunteers performed the treatment of specimens with placebo toothpaste (no fluoride, solution 1:3) *ex vivo*, 2x1min/day. In phase "fluoride toothpaste", the same procedure was repeated, but using the toothpaste *Crest* (1100 ppm F). In the phase "fluoride varnish", the same procedures of the phase "fluoride toothpaste" were repeated, but the specimens were treated with *Duraphat* varnish (22600 ppm F, 6h *in vitro*) prior to the *in situ* phase. The data were submitted to statistical analysis (ANOVA or similar nonparametric test and 2-way ANOVA, $p<0.05$). The different demineralizing protocols produced artificial carious lesions with different profiles (similar results among SH, CSH and TMR. Degree of demineralization: MHDP solution> MC Gel > Buffer solution = PA Gel). There was a clear difference in the degree of remineralization between the different artificial carious lesions (contradictories results among SH, CSH and TMR). In SH analysis, PA Gel was able to show significant differences among the 3 remineralizing protocols, while MC Gel and Buffer Solution showed significant differences between the fluoride phases and control. MHDP solution did not show any significant difference among the remineralizing treatments. In respect to the CSH, remineralization was inversely related to the degree of initial

demineralization. In the analysis of the percentage of CSH recovery, only PA gel was able to show significant differences between the fluoride and control phases up to 30 µm depth. For TMR (ΔΔZ parameter), there was significant difference between the artificial carious lesions in respect to the remineralization (buffer solution < MHDP Solution = PA gel < MC Gel), except during “fluoride varnish” phase. No significant differences were found among the remineralizing treatments by TMR, showing a modest remineralization, regardless of the treatment. It can be concluded that the type of artificial carious lesion has influence on the degree of enamel remineralization and this should be considered in experimental design.

Keywords: Dental caries. Demineralization. Fluoride. Remineralization. Tooth enamel.

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 4 x 4 mm obtido da porção mais plana da coroa, depois da secção dupla no sentido mésio distal 58

Figura 2 –a. Planificação da dentina interna; b. politriz metalográfica; c. Espécimes de esmalte após a planificação e polimento final 59

Figura 3 – a. Microdurômetro utilizado para seleção e distribuição dos espécimes; b. visão da ponta KNOOP; c. endentações que foram realizadas com carga de 25g por 10s. 59

Figura 4 – 1/3 do espécime protegido com esmalte cosmético de unha vermelho 60

Figura 5 – Delineamento do estudo 61

Figura 6 – Espécime colado em um J10 protegido com esmalte de unha vermelho na presença do gel 63

Figura 7 – Espécime protegido com esmalte de unha vermelho (1/3 da superfície) sendo imerso em solução desmineralizante dentro do pote de filme fotográfico 64

Figura 8 – 2/3 do espécime protegido com esmalte cosmético de unha vermelho, sendo uma região protegida hígida e a outra desmineralizada. 65

Figura 9 – a. modelo em gesso pedra 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 68

Figura 10 – a. verniz sendo aplicado na superfície do espécime. b.Espécime imersos em saliva artificial. c. verniz sendo removido com auxílio de uma espátula. d. remoção do verniz com auxílio de uma haste flexível Cotonete® umedecida em solução de acetona. 68

Figura 11 – a. modo como foi feito o gotejamento da solução dentifrício sobre os espécimes; b. kit entregue aos voluntários, onde continha a caixa plástica com o aparelho, gaze, o pote com a solução, dentifrício e uma escova 69

Figura 12 – a. visão da ponta KNOOP do microdurômetro; b. cinco endentações iniciais, pós-lesão e pós-remineralização 70

Figura 13 – Espécimes incluídos em resina acrílica e polidos para a análise de microdureza longitudinal. 71

Figura 14 – Análise da microdureza longitudinal mostrando as endentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 e 330 µm m da superfície externa do esmalte 71

Figura 15 – a. Paquímetro digital utilizado para checar a espessura dos espécimes para a análise com o TMR. b. Paquímetro digital com amostra de esmalte (espessura de 100 µm) 72

Figura 16 – a. espécimes posicionados no porta-amostras; b. porta-amostra contendo a fatia de alumínio "stepwedge" dentro do cassete; c. Cassete e placa de vidro sensível ao raio-X sendo posicionados na cabine do raio-X; d. Painel de controle do equipamento..... 73

Figura 17 – a. potes com revelador, fixador e água para a revelação da placa de vidro. b. placa de vidro sendo lavada em água corrente. c. placa de vidro sensível ao raio-X com as amostras radiografadas 73

Figura 18 – a. microscópio com câmera acoplada; b Placa de vidro radiografada sendo analisada no microscópio; c. software utilizado para as análises..... 74

Figura 19 – Fotomicrografias e perfis minerais representativos da lesão produzida pelo **Gel MC** no *baseline* (desmineralização) e após a remineralização pela saliva, dentifrício fluoretado e verniz/dentifrício fluoretados *in situ*... 91

Figura 20 – Fotomicrografias e perfis minerais representativos da lesão produzida pelo **Gel PA** no *baseline* (desmineralização) e após a remineralização pela saliva, dentifrício fluoretado e verniz/dentifrício fluoretados *in situ* 92

Figura 21 – Fotomicrografias e perfis minerais representativos da lesão produzida pela **Solução MHDP** no *baseline* (desmineralização) e após a remineralização pela saliva, dentifrício fluoretado e verniz/dentifrício fluoretados *in situ* 93

Figura 22 – Fotomicrografias e perfis minerais representativos da lesão produzida pela **Solução Tampão** no *baseline* (desmineralização) e após a remineralização pela saliva, dentifrício fluoretado e verniz/dentifrício fluoretados *in situ* 94

LISTA DE QUADROS, GRÁFICO E TABELAS

QUADROS

Quadro 1. Tipos de solução e géis que foram utilizados na pesquisa (n=113/grupo)..... 62

Quadro 2. Quadro referente ao resultado, tipo de variável de resposta, teste estatístico utilizado e número amostral..... 75-76

GRÁFICOS

Gráfico 1. Média e desvio-padrão da porcentagem de recuperação de microdureza (%) nas profundidades de 10 e 30 µm das amostras desmineralizadas utilizando diferentes protocolos *in vitro* (gel MC, gel PA, solução MHDP e solução Tampão) e remineralizadas pela saliva, dentifrício fluoretado ou dentifrício/verniz fluoretados *in situ* 85

TABELAS

Tabela 1. Média da porcentagem de remineralização (%SHR) das amostras desmineralizadas *in vitro* e remineralizadas *in situ* (n=1) 66

Tabela 2. Média (mediana) e desvio padrão da microdureza inicial, pós-lesão (KHN) e %SHC..... 79

Tabela 3. Média (± DP) de recuperação de microdureza superficial (%) das lesões artificiais de esmalte submetidas a diferentes protocolos remineralizantes *in situ* 80

Tabela 4. Média e desvio-padrão dos valores de microdureza longitudinal (KHN, por profundidade: 10-330 µm) da área do esmalte hígido das amostras provenientes de diferentes grupos (tipo de lesão e remineralização) 82

Tabela 5. Média e desvio-padrão dos valores de microdureza longitudinal (KHN, por profundidade: 10-330 µm) da área do esmalte desmineralizada utilizando diferentes protocolos *in vitro* (gel MC, gel PA, solução MHDP e solução tampão) antes da remineralização (área do esmalte somente desmineralizada)..... 83

Tabela 6. Média e desvio-padrão dos valores de microdureza longitudinal (KHN, por profundidade: 10-330 µm) da área do esmalte desmineralizada utilizando diferentes protocolos *in vitro* (gel MC, gel PA, solução MHDP e solução tampão) e remineralizada pela saliva, dentifrício fluoretado ou dentifrício/verniz fluoretado *in situ* (final) 84

Tabela 7. Média e desvio-padrão (mediana) dos valores de perda mineral integrada (ΔZ, % mineral x µm), profundidade da lesão (P, µm), valor de perda mineral média (R, % mineral) e profundidade de camada superficial (S, µm) da área do esmalte desmineralizada utilizando diferentes protocolos *in vitro* (Gel MC, Gel PA, Solução MHDP e Solução Tampão) antes da remineralização (área do esmalte somente desmineralizada) 86

Tabela 8. Média e desvio-padrão dos valores de perda mineral integrada inicial (ΔZ_I, % mineral x µm, somente desmineralizado) e final (ΔZ_F, % mineral x µm, des-remineralizado) das lesões produzidas por diferentes protocolos *in vitro* (Gel MC, Gel PA, Solução MHDP e Solução Tampão) e remineralizadas pela saliva, dentifrício fluoretado ou verniz/dentifrício fluoretados *in situ* 88

Tabela 9. Média e desvio-padrão dos valores da diferença de perda mineral integrada (ΔΔZ, % mineral x µm), profundidade da lesão (ΔP, µm), valor de perda mineral média (ΔR, %) e profundidade de camada superficial (ΔS, µm) entre as áreas desmineralizadas e des-remineralizadas das lesões produzidas por diferentes protocolos *in vitro* (Gel MC, Gel PA, Solução MHDP e Solução Tampão) e remineralizadas pela saliva, dentifrício fluoretado ou verniz/dentifrício fluoretados *in situ* 89

Tabela 10. Pontuação das lesões cariosas artificiais conforme preparo, produção da lesão subsuperficial, reprodutibilidade e resposta à remineralização *in situ* 107

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

MHDP	Tetraetil Metilenodifosfanato
PA	Poliacrílico
MC	Metilcelulose
CSH	Microdureza Longitudinal
SH	Microdureza superficial
TMR	Microradiografia Transversal
DP	Desvio Padrão
P	Profundidade da lesão
R	Média de perda mineral da lesão ao longo da lesão
S	Profundidade da zona superficial pseudo-intacta
ΔZ	Perda mineral integrada
KHN	Knoop
µm	Micrometro
M	Molar
%	Porcentagem
pH	Potencial de hidrogênio
Ca^{+2}	Cálcio
F^{-}	Fluoreto
PO_4^{-3}	Fosfato
CaF_2	Fluoreto de cálcio
CH_3COOH	Ácido acético
$CaCl_{2.}2H_2O$	Cloreto de cálcio dihidratado
KH_2PO_4	Fosfato de potássio dihidrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
HAP	Hidroxiapatita
H_3PO_4	Ácido fosfórico
NaH_2PO_4	Fosfato de sódio dihidrogênio
NaSCN	Tiocianato de sódio
KOH	Hidróxido de potássio
$(CaNO_3)_{2.}4H_2O$	Nitrato de cálcio tetrahidratado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 REVISÃO DE LITERATURA 27

2.1 Produção de lesão cariosa artificial em esmalte *in vitro* 29

2.2 Remineralização de lesões artificiais e naturais com diferentes padrões iniciais 36

2.3 Microdureza x microradiografia 47

3 PROPOSIÇÃO 51

4 MATERIAL E MÉTODOS 55

4.1 Obtenção dos dentes e preparo dos blocos de esmalte 57

4.2 Amostra e delineamento experimental 60

4.3 Indução de lesão de cárie artificial em esmalte *in vitro* 62

4.4 Remineralização *in situ* 65

4.5 Avaliação da microdureza de superfície e longitudinal 69

4.6 Microradiografia transversal – TMR 72

4.7 Análise estatística 75

5 RESULTADOS 77

5.1 Microdureza Superficial 79

5.2 Microdureza longitudinal 81

5.3 Microradiografia transversal 86

6 DISCUSSÃO 97

7 CONCLUSÕES 109

REFERÊNCIAS 113

ANEXOS 121

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é resultado da atuação de ácidos oriundos de bactérias cariogênicas organizadas na forma de biofilme dentário, e submetidas a frequentes exposições ao açúcar, levando à sobreposição de episódios de desmineralização em relação à remineralização (TEN CATE et al., 2008). O principal ácido envolvido no desenvolvimento das lesões de cárie é o ácido lático, que quando produzido reduz o pH do biofilme (4,5 <pH< 5,5), o que gera inicialmente uma desmineralização superficial (chamada por alguns autores de lesão tipo amolecida) que pode progredir para uma lesão do tipo subsuperficial, a qual é visualizada clinicamente como mancha branca, podendo tornar-se cavitada diante a desafios ácidos constantes (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005; TEN CATE et al., 2008;).

Nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento foi constatada uma redução na incidência e severidade de lesões cariosas (MARCENES et al., 2013), que podemos justificar pelos avanços na prevenção da doença cárie dentária e no acesso ao fluoreto. No entanto, o Brasil ainda apresenta algumas populações com alta prevalência dessas lesões, cujo acesso à educação em saúde bucal e a métodos preventivos é baixo. Esta situação é denominada polarização da doença e caracteriza significativas inequidades no acesso à saúde. O nível socioeconômico é apontado como um dos principais fatores associados à prevalência de cárie dentária entre crianças. Indicadores socioeconômicos, como a escolaridade, renda e ocupação estão associadas a maior gravidade da cárie dentária (COSTA et al., 2012). Trabalhos realizados em diferentes municípios brasileiros têm destacado ainda que a prevalência de cárie dentária é significativamente maior em populações com baixa condição socioeconômica (PETERSSON; BRATTHALL, 1996; NARVAI et al., 2006; FREIRE et al., 2010; PIOVESAN et al., 2011). Portanto, esta doença bucal ainda é de grande relevância clínica em nosso país.

Como citado anteriormente, a lesão cariosa inicial é descrita histologicamente como uma desmineralização subsuperficial, apresentando-se clinicamente como mancha branca (denominada também de lesão não cavitada ou incipiente). Índices mais atuais para detecção e quantificação do número de lesões cariosas em populações, como o ICDAS, têm considerado as lesões de mancha branca como primeiro sinal clínico da doença, diferentemente do índice preconizado pela OMS (CPOD/ CPOS) (VARMA; BANERJEE; BARLETT, 2008; DOWNER, 2012; CHU; CHAU; LO, 2013).

Apesar da prevalência dessas lesões de mancha branca e de seu significado para a Odontologia (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986), sua estrutura e densidade mineral ainda

não são amplamente compreendidas. Fenômenos dinâmicos como a desmineralização e a remineralização são constantes em lesões cariosas iniciais (HUANG et al., 2007).

Para o estudo de tais lesões iniciais, 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 são capazes de 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 podem afetar estes processos, como o fluoreto (WHITE, 1995).

Amostras de esmalte bovino são geralmente expostas a soluções ou géis desmineralizantes compostos por ácido acético ou lático (pH entre 4,5-5,0) subsaturados em relação à apatita, simulando parcialmente as condições do fluído do biofilme 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; MAGALHÃES et al., 2009, HUANG, 2010).

Diferenças entre estas soluções ou géis em relação ao 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 explorado diferenças no 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” (ou lesão de superfície amolecida), comparação entre diferentes géis e soluções desmineralizantes parece necessária.

Magalhães et al. (2009) realizaram um estudo cujo objetivo foi comparar os diferentes métodos para a produção de lesões de cárie artificiais em esmalte bovino *in vitro* utilizando dois tipos de análises: microdureza longitudinal e microradiografia transversal. Os protocolos testados (***gel MC*** – gel de metilcelulose a 8% + ácido lático a 0,1 M, pH 4,6, 14 dias; ***gel PA*** - ácido poliacrílico a 20g/L + ácido lático a 0,1 M com hidroxiapatita a 500 mg/L, pH 4,8, 16h; **solução *MHDP*** - ácido lático a 50 mM + cálcio, fosfato e metildifosfanato, pH 5,0, 6 dias; **solução *Tampão*** - ácido acético a 50 mM + cálcio, fosfato e

fluoreto, pH 5,0, 16h) produziram lesões cariosas com características completamente diferentes em termos de profundidade e espessura da camada superficial. As amostras de esmalte bovino submetidas à solução *MHDP* apresentaram maior profundidade de lesão (µm), perda mineral integrada (%vol.µm) e espessura da camada superficial (µm) em comparação às amostras desmineralizadas pelos outros protocolos. Por outro lado, maior média perda mineral (R-% vol) foi encontrada para as amostras dos grupos solução Tampão e gel PA. Portanto, claramente há evidência de que estas lesões cariosas apresentam características microscópicas distintas.

Adicionalmente, estudos anteriores já apontaram que o tipo de lesão cariosa pode ter influência sobre os efeitos de uma subsequente des-remineralização *in vitro*, 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).

Portanto, ainda não se sabe se as lesões produzidas por estes protocolos acima citados (*géis PA e MC, soluções MHDP* e *tampão*) poderiam apresentar diferenças em relação à remineralização. Na literatura, a maioria dos trabalhos avalia o ganho mineral utilizando diferentes produtos remineralizantes (ricos em cálcio e fluoreto) aplicados somente sobre um tipo de lesão cariosa, a qual nem sempre reflete a mancha branca vista clinicamente e, adicionalmente, pode apresentar características microscópicas que podem modular, tanto positivamente como negativamente, o desempenho dos produtos remineralizantes (ALTENBURGER et al., 2009; BANSAL et al., 2010; LAHEIJ; VAN STRIJP; VAN LOVEREN, 2010).

Lippert et al. (2011) testaram o efeito de lesões cariosas artificiais com baixo e alto valor de distribuição da perda mineral (R) na remineralização *in situ* utilizando dentifrício fluoretado apenas, por 3 a 4 semanas. Os autores mostraram que distribuição mineral das lesões no "*baseline"* teve impacto direto na resposta da lesão ao fluoreto *in situ.* No entanto, os autores não consideraram o efeito de outros parâmetros da lesão cariosa artificial, tais como profundidade da lesão e espessura da camada superficial, assim como não testaram o impacto da saliva apenas e de um produto para uso profissional indicado para o tratamento de lesões de mancha branca na clínica, como o verniz fluoretado.

Portanto, o objetivo deste presente estudo foi avaliar o efeito do tipo de lesão cariosa artificial produzida por diferentes protocolos *in vitro* em relação ao potencial remineralizante da saliva humana apenas e na presença do dentifrício fluoretado (aplicação caseira do fluoreto) e do verniz (aplicação profissional de fluoreto) + dentifrício fluoretado *in*

situ, utilizando como variáveis de resposta a microdureza superficial e longitudinal e a microradiografia transversal.

Entre os diferentes métodos de remineralização temos a saliva, os dentifrícios fluoretados e os vernizes fluoretados. A saliva humana age na remineralização por ser rica em minerais e proteínas, sendo capaz de recuperar parcialmente ou totalmente a perda mineral do esmalte (GRAZZIOTIN et al., 2011). Em relação ao uso do fluoreto, temos a aplicação caseira na forma de dentifrício (1.100-1.450 ppm F) e a aplicação profissional na forma de verniz (22.600 ppm F). O dentifrício fluoretado juntamente à fluoretação da água de abastecimento foi responsável pela substancial redução da prevalência de cárie dentária no Brasil e no mundo. De acordo com revisões sistemáticas, o uso frequente de dentifrícios fluoretados com concentrações a partir de 1.000 ppm F são capazes de controlar a cárie dentária em crianças e adolescentes em comparação ao dentifrício placebo, reduzindo a prevalência de cárie entre 21 a 28% (MARINHO et al., 2003; WALSH et al., 2010).

Por outro lado, os vernizes fluoretados têm sido utilizados nos consultórios odontológicos, com o objetivo de possibilitar a deposição e incorporação de fluoreto ao esmalte hígido e desmineralizado, tornando-a mais resistente à dissolução por ácidos e acelerando o processo de remineralização induzido pela saliva. Em geral, os vernizes fluoretados são considerados seguros e podem ser usados em áreas específicas como manchas brancas (STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001; SEPPÄ, 2004). Diversos estudos laboratoriais e clínicos têm apontado para o valor das aplicações tópicas profissionais no controle da lesão de cárie (HICKS et al., 2001; MUNSHI; REDDY; SHETTY, 2001; JACOBSEN; YOUNG, 2003; DEMITO et al., 2004; DOHNKE-HOHRMANN; ZIMMER, 2004; MOBERG SKÖLD et al., 2005; GREIG; CONWAY, 2012; ARRUDA et al., 2012).

Revisões sistemáticas indicam que a aplicação de verniz fluoretado tem a capacidade de reduzir a prevalência de cárie dentária em dentes permanentes em torno de 30% em comparação ao grupo sem tratamento (PETERSSON et al., 2004). Em estudo recente, Greig e Conway (2012) verificaram redução na incidência de lesões cariosas em crianças com alto risco à carie dentária, tratadas com verniz NaF a 5% (1 ou 2 aplicações) em comparação ao placebo, por 1 ano (fração prevenida: 40%).

Entretanto, uma revisão sistemática publicada por Marinho et al. (2004) apontou que a inclusão de produtos fluoretados profissionais (verniz, gel e solução) tem pouco efeito adicional na prevenção da cárie em comparação ao uso do dentifrício fluoretado, considerando a população em geral e não aquela com alto risco ou em atividade de cárie. Portanto, ainda não temos evidência científica, a partir de revisões sistemáticas e meta-

análises, sobre o efeito dos produtos com alta concentração de fluoreto no tratamento das lesões de cárie e para pacientes de alto risco à cárie somente.

Portanto, os resultados deste trabalho contribuirão para o entendimento dos processos de des-remineralização do esmalte *in vitro* e *in situ* o que promoverá uma melhor base para se avaliar o processo de reparo das lesões de mancha branca e das estratégias preventivas, como a aplicação de fluoreto utilizando os diferentes veículos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura abordará com detalhes todos os artigos científicos que foram importantes para o delineamento experimental e discussão dos resultados do estudo.

2.1 Produção de lesão cariosa artificial em esmalte *in vitro*

Ten Cate e Duijsters (1983a; b) avaliaram o efeito do pH e da concentração do fluoreto em 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. A solução testada por estes autores é semelhante à solução tampão do presente estudo. O fluoreto foi adicionado à solução preparada de modo a obter uma concentração final variando entre 0 e 10 ppm. Os blocos permaneceram imersos nas soluções a 37ºC por 21 dias. No pH 4,0 as concentrações de fluoreto testadas foram 0/ 0,5/ 1 e 5 ppm. 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 para a análise por microradiografia 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 a estequiometria da hidroxiapatita (Ca/P=1,72). Entretanto, no inicio 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 (hidroxiapatita). 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). Solução desmineralizante supersaturada de CaF_2 pareceu ser mais efetiva em retardar a taxa de desmineralização do esmalte quando comparada àquela supersaturada de FAP.

Buskes, Christoffersen e Arends (1985) apresentaram um método de composição constante 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 e humanos (somente para o grupo com 2µM de metilhidroxidifosfato). A solução desmineralizante continha $CaCl_2.2H_2O$ a 3 mM, KH_2PO_4 a 3 mM, metilhidroxidifosfato e CH_3COOH (ácido acético) a 50 mM, pH 5,0. Nesse estudo também foi avaliada a concentração metilhidroxidifosfato a 2, 6 ou 50 µM, visto que a adição deste reagente leva à formação de lesões de subsuperfície e inibe a desmineralização *in vitro*. A solução testada por estes autores é semelhante à solução MHDP do presente estudo, com exceção do tipo de ácido. Apenas espécimes desmineralizados com a solução desmineralizante contendo MDHP a 6µM, por 120h, foram expostos a uma solução remineralizante durante 360h. Esta solução remineralizante continha $CaCl_2.2H_2O$ a 1,5 mM, KH_2PO_4 a 0,9 mM e Hepes a 20 mM, pH 7,0. 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 (1-2µm). A maior concentração de metilhidroxidifosfato na solução reduziu significantemente a profundidade da lesão quando comparada às demais concentrações (145 ± 12, 118 ± 7 e 52 ± 11µm para soluções com MHDP a 2, 6 e 50 µM, respectivamente). Neste estudo pode-se notar diferenças acentuadas entre o esmalte humano e o bovino, sendo que o esmalte bovino apresentou maior desmineralização, devido provavelmente a 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 induz 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 a 0,1 M de ácido lático, sendo a solução Carbopol a 1% não saturada em relação à hidroxiapatita, e as soluções com Carbopol a 0,1 e 0,2%, 25, 50 ou 100% saturadas com relação à hidroxiapatita (HAP). Todas os géis fluídos foram ajustados ao pH 5,0 pela adição de NaOH a 1M. O gel fluído testado por estes autores é similar ao gel PA do presente

estudo. Os espécimes de esmalte (4 mm x 1,5 mm) foram imersos individualmente em 25 mL deste gel fluído a 37ºC, 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 lático para a produção da lesão de cárie. Alguns espécimes foram selecionados e remineralizados em 25 mL (sob agitação) de solução que continha cálcio a 1 mM, fosfato a 0,6 mM e 1 ppm de fluoreto na forma de NaF e NaCl a 0,15 mM, por 16h, 72h ou 14 dias. As técnicas utilizadas para avaliar a progressão da lesão após a desmineralização e/ou remineralização incluíram dureza superficial, microradiografia transversal e microscopia de luz polarizada. A adição de hidroxiapatita ao sistema gel carbopol/lactato significantemente diminuiu a taxa de amolecimento da superfície dos espécimes de esmalte, devido à redução do grau de 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 (produção de lesão subsuperficial) em comparação à solução com metilhidroxidifosfato. No entanto, a concentração de carbopol 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 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 cariosa artificial *in vitro* e comparar as análises entre vários laboratórios, ten Cate et al. (1996) desenvolveram um estudo no qual lesões iniciais em esmalte 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 lático a 0,1M ajustado a um pH de 4,6, durante 7 dias a 37ºC (todos os espécimes juntos). O gel testado por estes autores é similar ao gel MC do presente estudo. O protocolo escolhido pelo laboratório A foi realizado em dentes bovinos, os quais foram expostos individualmente a uma solução com metilhidroxidifosfato a 0,2 mM,

ácido lático a 0,1 M (10 cm^3 solução/dente), ajustada a um pH de 4,5, durante 1 semana a 37ºC. Já o laboratório B utilizou dentes humanos com a superfície vestibular não polida, os quais foram desmineralizados (5 dentes por vez) em uma solução $CaCl_2$ a 3mM, NaH_2PO_4 a 3 mM, ácido acético a 50 mM (50 cm^3 solução/dente) ajustada a um pH de 4,5, a 37ºC durante 5 dias. O laboratório C desmineralizou 15 dentes bovinos juntos em uma solução $CaCl_2$ a 2,2 mM, KH_2PO_4 a 2,2 mM e ácido acético a 50 mM (50 cm^3 solução/dente) ajustada a um pH de 4,3, a 37ºC durante 4 dias. E por fim, o laboratório D desmineralizou 25 dentes humanos juntos utilizando gel de metilcelulose a 8% e ácido lático a 0,1 M ajustado a um pH 4,6, durante 15 dias, a 37ºC. As lesões produzidas foram distribuídas de modo que os laboratórios analisassem todos os espécimes produzidos em todos os laboratórios. Cada laboratório determinou a perda mineral integrada (% volume mineral.µm) e profundidade de lesão (µm) de todos os espécimes. Os resultados mostraram que as lesões produzidas com o protocolo padrão apresentam uma perda mineral integrada entre 2.000 a 3.000 %vol min.µm e uma profundidade entre 65 a 116µm. Já a faixa de perda mineral integrada para os protocolos locais variou entre 1.800 a 6.300 %vol min. µm, com profundidade entre 75 e 181µm. A grande variabilidade nesses valores pode ser atribuída tanto à variação biológica entre as lesões, como também variações nos parâmetros utilizadas para as medições (como tempo e calibração do equipamento) e o cálculo da perda mineral integrada. Portanto, recomenda-se padronizar o método de cálculo da perda mineral integrada e profundidade da lesão e sempre incluir uma lesão referência para comparação com a lesão cariosa artificial produzida por um novo método.

Além da composição da solução ou gel, outros fatores são importantes na produção da lesão de cárie 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 cariosas artificiais em esmalte bovino. Para isso, utilizaram um sistema gel acidificado e uma solução ácida tampão parcialmente saturada, a temperatura ambiente (±20ºC) e/ou 37ºC. Lesões de cárie foram produzidas em janelas (3X2mm) das áreas incisal, média e cervical da superfície vestibular das coroas de dentes bovinos. Dois tipos de protocolos desmineralizantes foram testados, (A) sistema gel acidificado segundo Edgar (1983), no qual hidroxietilcelulose a 6% p/v foi adicionada continuamente e devagar a uma solução de ácido lático a 0,1M sob agitação e ajustada a um pH de 4,5; e (B) solução ácida parcialmente saturada descrita por ten Cate e Duijsters (1983a; b) que continha $CaCl_2$ a 2,2 mM, KH_2PO_4 a 2,2 mM, ácido acético a 50 mM e fluoreto a 0,5 ppm, com pH ajustado a 4,5. Quatro grupos experimentais foram

formados de acordo com a temperatura e o tipo de protocolo aos quais os espécimes foram expostos: (1) gel vs. solução, ambos a 20ºC; (2) gel vs. solução, ambos a 37ºC; (3) solução a 20 ºC vs. solução a 37 ºC; e (4) gel a 20 ºC vs. gel a 37ºC. Os espécimes (n=180/grupo) foram imersos em 20 ml de gel/solução, sendo que quando em solução os mesmos permaneceram sob agitação constante, durante 3, 4 ou 5 dias. Os espécimes foram analisados por microradiografia transversal. Através do microscópio óptico pôde-se observar 3 tipos de lesões formadas (lesão de subsuperfície com camada superficial regular, superficial irregular "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 37ºC, 62% dos espécimes apresentaram lesão de subsuperfície, 27% esmalte erodido e 11% esmalte amolecido. Para o gel a 20ºC, 49% dos espécimes apresentaram lesão de subsuperfície, 37% esmalte erodido e 14% esmalte amolecido. Comparando os dois protocolos 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 significantemente maior que o sistema gel. Comparando o efeito da temperatura na desmineralização, para a solução tampão, não houve diferença significativa entre 20ºC e 37ºC, embora a 37ºC 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 37ºC, porém esta diferença somente foi significativa nos 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 foram encontradas diferenças significativas. Assim, lesões cariosas artificiais podem ser produzidas em esmalte bovino com uma solução tampão parcialmente saturada a 20ºC ou 37ºC a partir de 3 dias.

Os protocolos citados nos primeiros quatro artigos desta revisão de literatura foram posteriormente testados isoladamente (com pequenas modificações) por outros autores em relação à des-remineralização. 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 utilizadas amostras de esmalte oriundas de terceiros molares humanos que, após polimento e proteção com esmalte de unha (9 mm x 1mm), foram desmineralizadas na gel fluído preconizado por White (1987), mas modificado, contendo 20g/L de Carbopol 907, 500mg/L de hidroxiapatita e ácido lático a 0,1 M, a um pH de 4,8, por 16 horas, a 37ºC

(idêntico ao nosso GEL PA). Um terço da amostra foi ainda cortado para servir de controle da desmineralização. Os dois terços restantes foram inclusos em um aparelho intra-bucal 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*, as amostras foram cortadas ao meio e metade de cada janela foi protegida com esmalte de unha. As amostras foram imersas mais uma vez na solução desmineralizante (pH 4,8) por 8 e 16 horas, a 37ºC. As amostras foram analisadas por microradiografia transversal. A lesão produzida pela solução desmineralizante apresentou 87 ± 11,5 µm de profundidade e um ΔZ de 3363 ± 557 % vol min.µm. O consumo de goma contendo CPP-ACP produziu uma remineralização da lesão de cárie artificial em esmalte de 17,9 ± 1,0% sendo significantemente diferente da goma de mascar controle que remineralizou 9,0 ± 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 à 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*.

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). Blocos de esmalte bovinos foram submetidos aos modelos e tratados com soluções com concentrações crescentes de fluoreto (água destilada, 70, 140 e 280 ppm F) para validar os modelos em termo de dose-resposta ao fluoreto. A solução desmineralizante (DES) continha $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ a 1,28 mM, KH_2PO_4 a 0,74 mM, NaF a 0,03 ppm F e ácido acético a 50 mM ajustada a pH 5,0. A solução remineralizante (RE) continha $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ a 1,5 mM, KH_2PO_4 a 0,9 mM, KCl a 150 mM, 0,05 ppm F e Tris a 0,1 M 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 blocos permaneceram 4h na DES e 20h na RE, e os tratamentos nas concentrações crescentes de fluoreto foram realizados 2 vezes ao dia (antes e após a imersão dos blocos na solução DES) por 5 minutos sob agitação. Após o oitavo dia de ciclagem, os blocos permaneceram por 24h na RE. Para o modelo de ciclagem de pH remineralizante, foram produzidas lesões de cárie artificial inicial, pela imersão dos

blocos de esmalte na DES por 16h individualmente (2 mL/mm^2 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 ppm F), Tandy (1100 ppm F) e Crest (1100 ppm F, como controle positivo) a partir dos modelos validados anteriormente. Foi utilizado dentifrício não fluoretado como controle negativo. Perda e ganho mineral foram avaliados 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 ppm F. Os resultados sugerem que os modelos desenvolvidos devem ser capazes de avaliar dose-resposta da aplicação de fluoreto tanto na desmineralização e remineralização. No presente trabalho não foi testado modelo de ciclagem de pH, mas somente a solução DES testada neste trabalho (idêntica a nossa solução TAMPÃO).

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 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 influencia sobre a subsequente desmineralização e remineralização (LYNCH; TEN CATE, 2006; YAMAZAKI; LITMAN; MARGOLIS, 2007; LIPPERT et al., 2011).

É importante destacar que as lesões de cárie artificiais (criadas no laboratório) não simulam de forma apropriada as lesões naturais como discutido recentemente por Huang et al. (2010). Os autores realizaram um estudo com o objetivo de caracterizar em detalhes as propriedades mecânicas da lesão de mancha branca 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 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 de 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 (profundidade de 100 - 300µm) e frequentemente sem uma camada superficial distinta. A base para a produção da camada superficial da lesão não está bem esclarecida, mas pode ser devido a um processo interno, em que há o transporte dos minerais dissolvidos da subsuperfície do corpo da lesão para a superfície e/ou um processo externo, a partir da saliva e biofilme *in vivo*.

Trabalhos comparando o comportamento de diferentes lesões sejam artificiais ou naturais, e não apenas testando um tipo de lesão isoladamente, frente a novos desafios des-remineralizantes *in vitro* e *in situ* serão abordados no 2º item desta revisão.

2.2 Remineralização de lesões artificiais e naturais com diferentes padrões iniciais

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, produzidas 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 remineralizante. Lesões em esmalte humano foram preparadas utilizando dois métodos: sistema gelatinoso acidificado e solução ácida tamponada (12 dentes/grupo). O sistema gelatinoso acidificado foi composto por gelatina a 10%, $Ca_3(PO_4)_2$ a 1mM, ácido lático a 80 mM, 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 8,3 mM, NaH_2PO_4 a 8,3 mM, ácido acético a 50 mM 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 (120µm), 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 desmineralizante para ambos os grupos foi composta por Ca^{+2} a 2 mM, PO_4^{-3} a 2 mM, ácido acético a 50 mM ajustada a um pH de 4,8. A solução remineralizante para ambos os grupos foi composta por Ca^{+2} a 2 mM, PO_4^{-3} a 2 mM, ajustada a um pH de 6,85. Na solução remineralizante dos grupos B & D,

foram adicionados 2 ppm de fluoreto. Nos grupos A & C, a quantidade de fluoreto na solução remineralizante foi menor que 0,03 ppm. A quantidade mineral foi avaliada por microradiografia, com intervalos de dois dias na primeira semana e uma vez por semana, nas semanas subsequentes. Todos os grupos testados exibiram desmineralização, porém a desmineralização total pelo sistema de solução foi significantemente maior que a produzida pelo sistema gelatinoso. Todos os espécimes de esmalte do grupo sem exposição ao fluoreto mostraram desmineralização subsuperficial. Somente o grupo com lesão criada pela solução ácida exposta à des-remineralização com 2 ppm de fluoreto (grupo D) apresentou um aumento significativo na quantidade mineral ao final do experimento. 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.

Iijima et al. (1999) compararam a remineralização *in vitro* de lesões de mancha branca natural (WS) 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 lático 0,1M ajustado a um pH de 5,0 a 37ºC durante 3 semanas. Em seguida, os espécimes foram seccionados para análise. 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 WS 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 remineralizante contendo HEPES a 20 mM, cálcio a 1,5 mM, fosfato a 0,9 mM e 1 ppm de fluoreto, ajustada ao pH 7,0, a 37ºC, durante 2 e 4 semanas. Os espécimes foram analisados por microradiografia transversal. Os resultados mostraram que os valores de profundidade de lesão não variaram significantemente durante 2 e 4 semanas de remineralização. As lesões iniciais de mancha branca apresentaram uma profundidade maior (486 ± 242 µm) que as produzidas *in vitro* (184 ± 34 µm). A perda mineral integrada para os espécimes com lesões artificiais foi de 6.370 ± 1.738 %vol.µm e os espécimes de lesões naturais com 15.706 ± 12.285 %vol.µm. 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 promoveram maior deposição mineral que as lesões artificiais, ambos os espécimes remineralizaram similarmente em relação às respectivas lesões iniciais.

Lynch e ten Cate (2006) avaliaram o comportamento de lesões cariosas artificiais em esmalte humano e bovino submetidos à desmineralização e à remineralização, com objetivo de provar duas hipóteses: a. Lesões rasas seriam mais vulneráveis à desmineralização e b. Lesões profundas seriam 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 volume de ácido lático a 0,1 M com pH ajustado para 4,6 com KOH, a 37º 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 desmineralizada foi ainda mais desmineralizada pela imersão em uma solução contendo ácido acético a 50 mM, cloreto de cálcio dihidratado a 2,25 mM, ortofosfato de potássio dihidrogenado a 1,35 mM e cloreto de potássio a 130 mM em pH ajustado a 5,0, por 24 horas. Enquanto a outra porção dos espécimes foi remineralizada em solução neutra contendo Hepes a 20 mM, cloreto de cálcio dihidratado a 1,50 mM, ortofosfato de potássio dihidrogenado a 0,9 mM e cloreto de potássio a 130 mM (pH 7,0), por 190 horas. Uma segunda secção foi realizada e analisada. Mudanças no volume 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 significante relação inversa entre maior valor de ΔZ_{base} e a subsequente menor desmineralização. Já para a remineralização, o ganho mineral foi proporcional ao ΔZ_{base}, ou seja, quanto maior o $\Delta Z_{base,}$ 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 fluído do biofilme (PF), em lesões artificiais *in vitro*. Dois tipos de lesões artificiais de cárie

em esmalte foram testados, ambos com perdas minerais integradas (ΔZ) similares, porém um grupo com valor de R alto e outro com baixo valor de R (média de perda mineral). Para tal, foram preparados espécimes de esmalte bovino (4 mm 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 lático a 0,1M, 50% saturado com hidroxiapatita, com pH ajustado a 5,0, a 37º C, durante 14 dias. No segundo método, os blocos de esmalte foram cobertos com 2,5 cm de gel de metilcelulose 8%, *overnight*, a 4º C. Na sequência, foram cobertos com volume similar de ácido lático a 0,1M com pH ajustado a 4,5 a 37ºC, 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 20 mM, cloreto de cálcio dihidratado a 1,5 mM, dihidrogênio de potássio ortofosfato a 0,9 mM e cloreto de potássio a 130 mM, em pH 7,0. Já a solução PF continha HEPES a 20 mM, cloreto de cálcio dihidratado a 1,0 mM, dihidrogênio de potássio ortofosfatado a 12,7 mM e cloreto de potássio a 130 mM, em pH 6,58. Em cada uma dessas soluções foi inserida a metade dos espécimes desmineralizados de cada grupo, por 192 horas a 37º C. Na sequência, avaliou-se a perda mineral por microradiografia transversal. As lesões com baixo valor de R (perda mineral: 14 ± 1,56 % vol - sistema carbopol) apresentaram ΔZ (perda mineral integrada) de 1240 ± 272 %vol.µm, profundidade de 88,3 ± 13,9 µm e Zmax (% mineral na camada superficial) 76,1 ±4,21. Já as lesões produzidas com alto valor de R (34,8 ± 5,14 – sistema gel ácido) apresentaram ΔZ de 1220 ± 182 %vol.µm, profundidade de 35,8 ± 7,45 µm e Zmax de 52,7 ± 7,78 %vol. As lesões naturais de mancha branca apresentaram ΔZ de 5660 ± 5110 %vol.µm, profundidade de 307 ± 107 µm, Zmax de 79,4 ± 7,54 %vol e valor de R de 16,3 ± 6,63 %vol. Todas as lesões com baixo R remineralizaram com um significante aumento do Zmax e redução da profundidade da lesão. Em alguns espécimes da solução remineralizante PF e em todos os da solução St a característica de subsuperfície foi mantida, com maior remineralização na superfície 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 Zmax. 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 blocos apresentaram profunda remineralização ao longo da subsuperfície enquanto outros não. Assim, mostrou-se que o uso da solução remineralizante PF aumentou significativamente a velocidade e proporção de remineralização em comparação à solução tradicional St para lesões cariosas mais desmineralizadas (maior valor de R). Concluiu-se com este estudo que tanto o tipo de lesão cariosa inicial como o tipo de solução remineralizante tem influência sobre a 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 insaturadas em relação à hidroxiapatita e supersaturada em relação à fluorapatita. 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 utilizados 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 4 mM, fosfato a 15 mM, ácido lático a 50 mM e 20 ppm de fluoreto ajustada para o pH 4,8; já a solução neutra continha cálcio a 1,5 mM, fosfato a 0,9 mM, ácido lático a 50 mM e 9,6 ppm de fluoreto, ajustada para pH 7,0. Oito secções de esmalte com lesão de cárie superficial ou de subsuperfície foram expostas individualmente em 20 mL de solução remineralizante ácida ou neutra, a 25ºC. Em tempos selecionados (22, 47, 69, 133, 180, 346, 490 e 701 horas) as secções foram removidas e analisadas por microradiografia transversal. A porcentagem de conteúdo mineral foi avaliada de acordo com a profundidade da lesão e o tempo. Foram avaliados o tamanho da lesão inicial e a porcentagem 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. Maior deposição mineral na camada mais externa da lesão exposta à solução neutra foi observada a 69, 181 e 346 h, em comparação à porção média da lesão. Após os mesmos períodos, 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. A taxa e extensão de remineralização da lesão de subsuperfície induzida pela solução ácida foram melhores que a observada para a solução neutra em todas as profundidades. 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 volume 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 lático a 0,1 M, $CaCl_2.2H_2O$ a 4,1 mM, KH_2PO_4 a 8 mM e 0,2% p/v de Carbopol, ajustado a um pH 5,0 a 37ºC durante 11 dias (modificação de WHITE, 1987). Para criar as lesões com alto valor R, os espécimes foram desmineralizados a um pH 4,6 a 37ºC em gel de metilcelulose a 8%, coberto por um mesmo volume de ácido lático 0,1 M 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 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 15 mL 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 volume 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 tendem a remineralizar enquanto que lesões com baixo valor R tendem a desmineralizar. A profundidade da lesão aumentou em lesões com baixo valor R, mas manteve-se inalterada em

lesões com alto valor de R. Já o volume mineral na camada superfícial "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*.

Lippert, Butler e Lynch (2011) analisaram a desmineralização e remineralização de lesões em esmalte bovinos expostas a uma solução de ácido acético parcialmente saturada, variando os valores de pH e concentração de fluoreto. Lesões de cárie artificiais foram produzidas utilizando um gel de metilcelulose descrito por ten Cate et al. (1996) com 8% de metilcelulose coberto com mesmo volume de ácido lático a 0,1 M, pH ajustado em 4,6, por 12 dias a 37ºC. Após o período de desmineralização, os espécimes foram analisados pelo método de quantificação da fluorescência induzida pela luz (QLF) e alocados em 15 grupos de tratamento (n=9 por grupo) baseado no ΔF das lesões criadas. Quinze diferentes soluções simulando o fluído do biofilme (PF) foram preparadas. Todas as soluções continham ácido lático a 30 mM, cloreto de cálcio di-hidratado a 5,5 mM, di-hidrogenofosfato de potássio a 9,4 mM e cloreto de potássio a 63 mM, variando na concentração de fluoreto (0/ 0,1/ 0,5/ 1,5 e 4 ppm de F como NaF) e pH (4,9/ 5,2 e 5,5, ajustado utilizando KOH). Um grupo controle foi adicionado (solução sem o acréscimo de fluoreto ou ajuste de pH). Os espécimes ficaram expostos a estas soluções por 11 dias a 37ºC, sendo estas renovadas após 2, 4, 7 e 9 dias e os espécimes avaliados por QLF. Após este período, os espécimes foram expostos a outra solução parcialmente saturada (PSAs), proposta por Lynch e Ten Cate (2006), contendo ácido acético a 50 mM, cloreto de cálcio di-hidratado a 2,25 mM, di-hidrogenofosfato de potássio a 1,35 mM e cloreto de potássio a 130 mM, pH ajustado para 5,0 com KOH, a 37° C, durante dois períodos consecutivos de 24 horas. Para as análises por QLF, as imagens foram sobrepostas para a obtenção dos valores de ΔΔF (variação da perda de fluorescência) para cada espécime. Os valores de ΔΔF foram calculados utilizando as seguintes equações: $\Delta\Delta F_{PF} = \Delta F_{PF\ (11\ dias)} - \Delta F_{base}$ (descrevendo o grau de desmineralização ou remineralização de lesões após exposição ao PF em relação às lesões criadas inicialmente-*baseline*); $\Delta\Delta F_{PSAc} = \Delta F_{PSAc\ (48\ h)} - \Delta F_{PF\ (11\ dias)}$ (descrevendo o grau de desmineralização de lesões após a exposição ao ácido acético em relação a lesões após exposição PF), e $\Delta\Delta F_{Net} = \Delta\Delta F_{PF} + \Delta\Delta F_{PSAc} = \Delta F_{PSAc\ (48\ h)} - \Delta F_{base}$ (descrevendo o grau de desmineralização ou remineralização de lesões após a exposição ao PF e ao ácido acético em relação à lesão *baseline*). Assim, valores positivos de ΔΔF indicaram remineralização, enquanto valores negativos de ΔΔF indicaram desmineralização. O grau de saturação das soluções com respeito a hidroxiapatita (DS_{HA}), octacálcio de fosfato (DS_{OCP}), bruxita (DS_{BR}), fluorapatita (DS_{FA}) e fluoreto de cálcio

(DS_{CaF2}) foram calculados com auxílio de um programa de computador proposto por Shellis (1988). Soluções PF contendo maior [F] resultaram em maiores valores de remineralização ($\Delta\Delta F_{PF}$), independente do pH. Os valores de pH mais elevados também resultaram em maior remineralização, porém este efeito foi modulado pela [F] (para pH 4.9 [F] = 4 ppm, pH 5,2 [F] ≥ 1,5 ppm e pH 5,5 [F] ≥ 0,5 ppm). Na subsequente desmineralização ($\Delta\Delta F_{PSAc}$), em geral a remineralização produzida pela solução PF mostrou pouco efeito protetor, isto é, todas as amostras desmineralizaram. Quando o $\Delta\Delta F_{net}$ foi calculado, a [F] novamente apresentou um efeito mais forte que o pH. Esse estudo demonstrou que QLF pode ser uma ferramenta valiosa no estudo de lesões submetidas à desmineralização e remineralização em condições similares às do fluído do biofilme (PF). A [F] parece ser mais importante que o pH na remineralização de lesões e subsequente proteção contra a desmineralização.

Tschoppe e Meyer-Lueckel (2012) testaram o efeito de dentifrícios com concentração regular (*Elmex*, 1.400 ppm F, AmF) e alta concentração de fluoreto (*Duraphat*, 5.000 ppm F, NaF) combinados a salivas artificiais (3 substitutos de saliva) sobre dois tipos diferentes de lesões (lesão superficial e lesão profunda *in vitro*). As lesões artificiais foram preparadas por imersão em uma solução com metilhidroxidifosfato a 6 μM, cloreto de cálcio di-hidratado a 3 mM, dihidrogenofosfato de potássio a 3 mM, e ácido acético a 50 mM em pH 4,95, por 7 dias para lesões superficiais (SL) e por 26 dias para lesões profundas (DL), a 37ºC. Os espécimes desmineralizados foram divididos em 4 grupos: água mineral sem gás, pH 6,66; solução de ácido cítrico experimental tamponada contendo carboximetilcelulose (CMC), pH 6,31; Saliva "Natura" à base de polissacarídeo modificada com adição de cálcio, fosfato e fluoreto, pH 5,95; e Saliva "Glandosane" à base de carboximetelcelulose, pH 5,35. O tratamento durou 5 semanas a 37ºC, sendo as soluções trocadas a cada 2 dias e acompanhadas em relação à variação de pH. As amostras foram ainda subdivididas nos tratamentos com fluoretos (escovação com dentifrício 1400 ppm F e 5000 ppm F diluídos 1:3) que foram realizados 3 vezes por dia durante 5 s. Um grupo controle sem escovação também foi incluído. Após duas semanas, a metade das superfícies expostas foram cobertas com esmalte de unhas, para comparação dos períodos de 2 e 5 semanas de exposição. As amostras foram analisadas por microradiografia transversal (TMR). Todas as amostras desmineralizadas *in vitro* desenvolveram lesões de subsuperfície, sem sinais de perda erosiva. Para as lesões rasas, o ΔZ foi de 1915 (543) %vol x μm e para as lesões profundas ΔZ foi de 5804 (427) %vol x μm. Em geral, as lesões profundas (DL) revelaram menor perda mineral que as lesões superficiais após as cinco semanas de tratamento. As amostras armazenadas na solução CMC (pH 6,31) e na saliva comercial Glandosane (pH 5,35) mostraram uma desmineralização

significativa em relação as outras salivas, sendo mais pronunciadas em lesões superficiais que em lesões profundas. Dentifrícios com alta concentração de fluoreto reduziram significativamente a desmineralização, especialmente para lesões mais profundas; Por outro lado, os espécimes armazenados em saliva "Natura" (supersaturadas em relação ao fosfato de cálcio) mostraram remineralização, independentemente do dentifrício fluoretado. Esse estudo mostrou que o tipo de solução de armazenamento (saliva), concentração de fluoreto no dentifrício e o tipo de lesão influenciam a perda ou ganho mineral de lesões de cárie artificiais em esmalte.

Gonzáles-Cabezas et al. (2012) produziram dois tipos de lesões em esmalte, precoce e avançada, para comparar o efeito na remineralização e incorporação de fluoreto pelo tratamento com solução de NaF a 2% (com diferentes valores pH). Amostras de esmalte humano foram desmineralizadas em uma solução contendo ácido lático a 0,1 M e 0,2% de Carbopol C907, 50% saturada com hidroxiapatita, pH 5,0, a 37ºC por 13 horas, para produção de lesão precoce (EL) e por 90 horas, para lesão avançada (AL). Uma mistura 50:50 de saliva humana estimulada (10-15 indivíduos) e saliva artificial (2,20 g/L mucina gástrica, 0,381 g/L NaCl, 0,213 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,738 g/L KH_2PO_4, 1,114 g/L KCl, pH 7,0) foi preparada diariamente como a solução remineralizante. No primeiro dia, as amostras foram incubadas na mistura de saliva durante 2h (37ºC) para permitir a formação de uma película e, em seguida, imersas durante 4 minutos nos seguintes tratamentos (n=12/grupo para cada tipo de lesão): NaF a 2%, com pH 3,5 (H_3PO_4 a 0,1 M), NaF a 2% com pH 7,0, ou água deionizada (pH 7,0). Após o tratamento, as amostras foram colocadas na mistura de saliva por mais 3h, seguidas por incubação em solução desmineralizante por 4h. Após o período de desmineralização, as amostras foram incubadas na mistura de saliva até a próxima desmineralização do dia seguinte. Realizaram-se mais 4 dias de ciclagem de pH (20h remineralização e 4h desmineralização), o tratamento foi repetido ao final do 5º dia e as amostras foram submetidas as mais 5 dias de ciclagem de pH. Ao final dos 10 dias de ciclagem de pH, as amostras foram avaliadas por microdureza superficial. O teor de fluoreto de cada espécime de esmalte foi determinado por biópsia ácida microabrasiva (µg F/cm^2). As lesões (EL e AL) tratadas com NaF (pH ácido) apresentaram um maior endurecimento da superfície do esmalte e incorporação de fluoreto em comparação àquelas tratadas com NaF (pH 7,0). Em EL, o endurecimento da superfície do esmalte foi ainda mais pronunciado que AL. Esse trabalho sugere que o tratamento de fluoreto acidulado é mais eficaz que solução fluoretada neutra. Além disso, este efeito parece ser maior em lesões menos desmineralizadas ("superficiais"), quando comparados a lesões mais avançadas.

Lippert (2012) investigou o efeito da característica inicial de lesões e de diferentes proporções de estrôncio (Sr) /cálcio (Ca) em soluções simulando o fluído do biofilme (PF) sobre a desmineralização e remineralização da lesões em esmalte. Para a formação das lesões cariosas artificiais foram utilizados 3 diferentes protocolos: Gel de metilcelulose ácido (MeC) no qual as amostras ficaram em contato com gel de metilcelulose a 8% coberto com ácido lático a 0,1 M (pH 4,6) por 7 dias; solução contendo carboximetilcelulose (CMC) com ácido lático a 0,1 M e $CaCl_2 2H_2O$ a 4,1 mM, KH_2PO_4 a 8 mM e 1% de carboximetilcelulose, pH 5,0 por 7 dias; ou solução idêntica à anterior, porém sem CMC, pH 5,0, por 7 dias (SOLN). As amostras foram então cortadas e uma parte das amostras, referente a cada lesão, foi analisada por microradiografia transversal. Somente as lesões que exibiram uma zona superficial intacta foram inclusas no estudo. As lesões de esmalte foram distribuídas aleatoriamente entre as soluções de tratamento simulando as condições do fluído do biofilme (pH 5,5, ácido lático a 30 mM, 1 ppm F, KCl a 63 mM e KH_2PO_4 a 9,4 mM), as quais variaram na proporção de Sr/Ca (0, 1/3, 1 e 3). As amostras foram tratadas por 7 dias, a 37ºC, sendo as soluções renovadas após 3 dias. Novamente as amostras foram analisadas por TMR. Os graus de saturação das soluções com relação à hidroxiapatita (DS_{HA}), octacálcio de fosfato (DS_{OCP}), bruxita (DS_{BR}), fluorapatita (DS_{FA}) e fluoreto de cálcio (DS_{CaF2}) foram calculados usando um programa de computador proposto por Shellis (1988). Todas as lesões apresentaram diferenças significativas em suas distribuições de minerais iniciais. Na análise após a exposição às diferentes soluções simulando o fluído do biofilme, as lesões do MEC mostraram desmineralização, enquanto aquelas do CMC e SOLN exibiram remineralização. Quanto à relação Sr:Ca, a proporção de 1/3 exibiu alguma remineralização, enquanto as outras proporções induziram à desmineralização (similar ao controle sem Sr). Em conclusão, foi verificado que tanto as características iniciais das lesões como a proporção Sr:Ca mostraram induzir diferentes respostas quando lesões foram expostas às soluções simulando o fluído do biofilme.

Para investigar os efeitos da concentração de fluoreto na progressão de lesões cariosas em termos de severidade e distribuição mineral, Lippert et al. (2012) produziram 3 tipos de lesões cariosas artificiais em esmalte bovino e ainda dentro de cada protocolo de desmineralização, foram criadas lesões com alto e baixo valor de ΔZ determinadas pela variação no tempo de exposição aos diferentes géis desmineralizantes. Um dos protocolos utilizados foi o gel de metilcelulose ácido (MeC) descrito por ten Cate et al. (1996), no qual as amostras de esmalte foram desmineralizadas a 37°C em 8% de metilcelulose, e solução contendo ácido lático a 0,1 M (pH 4,6) por 5, 6 e 7 dias para lesões com baixo ΔZ, e por 9 e

10 dias para lesões com alto ΔZ. O outro protocolo de desmineralização utilizado foi o Gel de hidroxietilcelulose ácido (HEC) modificado do método descrito por Amaechi, Higham e Edgar (1998), o qual foi solubilizado em solução de ácido lático a 0,05 M (pH 4,5) em uma proporção de 140g de HEC por litro de solução (14%, pH 5,5). Para as lesões com baixo ΔZ, as amostras ficaram imersas por 7 dias, para lesões com alto ΔZ, por 17 dias. O último grupo foi desmineralizado com gel ácido de carboximetilcelulose (CMC), modificado do método descrito por Lippert et al. (2011). As amostras foram imersas em solução contendo ácido láctico a 0,1M, $CaCl_2 2H_2O$ a 4,1 mM, KH_2PO_4 a 8 mM e 1% de carboximetilcelulose (pH ajustado a 5,0) a 37°C, por 10 e 11 dias para lesões com baixo ΔZ e por 21 e 22 dias para lesões com alto ΔZ. Parte das amostras foi seccionada e analisada por TMR. As amostras foram então alocadas em 4 grupos de desmineralização secundária que foi realizada a 37ºC por 24 horas na presença de 0, 1, 2 ou 5 ppm de F (como NaF), em uma solução de ácido acético parcialmente saturada (LYNCH; TEN CATE, 2006): ácido acético a 50 mM, $CaCl_2 2H_2O$ a 2,25 mM, KH_2PO_4 a 1,35 mM e KCl a 130 mM, pH ajustado para 5,0. As lesões foram então seccionadas e as alterações na distribuição mineral da lesão, comparativamente às lesões produzidas inicialmente (*baseline*), foram quantificadas utilizando TMR. Adicionalmente, o grau de saturação da segunda solução desmineralizante foi calculado em relação à hidroxiapatita (DS_{HA}), octacálcio de fosfato (DS_{OCP}), bruxita (DS_{BR}), fluorapatita (DS_{FA}) e fluoreto de cálcio (DS_{CaF2}) usando um programa de computador proposto por (Shellis, 1988). Os protocolos produziram lesões iniciais com características diferentes, sendo que as lesões com alto ΔZ apresentavam aproximadamente duas vezes o valor de ΔZ que as lesões com baixo ΔZ dentro de cada protocolo. Os valores de "R" variaram em 18-39% de perda mineral: HEC<CMC<MeC e baixo ΔZ < alto ΔZ. As amostras expostas ao HEC exibiram uma camada superficial consideravelmente maior, devido provavelmente a maior viscosidade. Após a exposição à segunda solução desmineralizante, a qual continha diferentes concentrações de fluoreto, foram reveladas diferenças na resposta ao F entre e dentro dos tipos de lesão. Em geral, as lesões com ΔZ baixos responderam melhor, em termos de ΔΔZ, para F que lesões com ΔZ altos, onde os autores notaram uma laminação (remineralização do corpo da lesão e desmineralização da parte hígida) abaixo da lesão inicial. Observou-se uma relação dose-resposta ao fluoreto. As lesões com baixo ΔZ oriundas da solução MeC, cuja camada superficial era a menos mineralizada mostraram melhor resposta ao fluoreto, enquanto as lesões com alto ΔZ oriundas da solução HEC foram quase inalteradas pelo F, provavelmente pela interação do fluoreto com a camada superficial mais mineralizadas neste grupo, não permitindo sua penetração em profundidade, como comprovado pela presença de

laminações. Ambos ΔZ baseline e camada superficial da lesão afetam diretamente a resposta ao fluoreto e o grau de desmineralização secundária das lesões de cárie artificiais.

2.3 Microdureza x Microradiografia

Alguns estudos na literatura comparam diferentes métodos para quantificar a desmineralização do esmalte, correlacionando-os de forma a averiguar se uma variável (ex. volume mineral) pode ser calculada a partir de outra variável (ex. dureza). Featherstone et al. (1983) correlacionaram os dados de microdureza longitudinal 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 composta por ácido lático a 0,1 M, metilhidroxidifosfanato (MHDP) a 0,1 ou 0,2 mM, em pH 5,0, durante 3 dias para a coroa de número 1 e durante 14 dias para as demais coroas, a 37ºC. 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 ¼, ½, e ¾ da largura da lesão, com 12 endentações em profundidade para cada posição. Na microradiografia, a quantidade mineral foi calculada a intervalos de 1 µm usando a fórmula de Angmar, Carlstromd e Glas (1963). O porcentual de volume mineral foi calculado a partir dos valores de dureza obtidos utilizando uma fórmula de regressão ($\%vol. = 4{,}3[\sqrt{KHN}] + 11{,}3$). Os dados de porcentagem de volume 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 da microradiografia transversal: (1) a média de perda mineral de lesões em esmalte e dentina em %volume (valor de R); (2) a distribuição mineral em esmalte e dentina; e (3) a hipermineralização em dentina. O valor de R é definido como a média da quantidade mineral perdida nas lesões por unidade de profundidade e é um parâmetro eficiente para avaliações e

comparações da distribuição mineral do esmalte e dentina. A profundidade da lesão (em µm) é definida como a distância da superfície externa até o ponto em que a quantidade mineral é 95% do valor de volume mineral estabelecido para o esmalte e dentina hígidos. O ΔZ corresponde à média da perda mineral integrada (R x profundidade). Os resultados mostraram que *in vitro*, o valor de R é relativamente constante para o esmalte e dentina. O valor de R é reduzido pela presença de pequenas quantidades de fluoreto no sistema de desmineralização. O valor da perda mineral integrada (ΔZ) e profundidade da lesão são em geral parâmetros dependentes durante estudos *in vitro* e *in situ*.

Na sequência, trabalho similar ao do Featherstone et al. (1983) foi realizado. Com o objetivo de avaliar se 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) prepararam espécimes de esmalte humano (3x4x1,5 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 de 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 da superfície do aparelho removível, para permitir o acúmulo de biofilme. Cinco voluntários utilizaram o dispositivo durante 6 semanas. O voluntário foi orientado a escovar diariamente com dentifrício não fluoretado o lado esquerdo, e não fazer nada do lado direito, apenas passar na água, sem escovar os blocos, 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 CSH a qual foi medida a 25, 50 e 75µm da superfície externa. Na sequência, o mesmo espécime foi submetido à analise por 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 √KHN e a porcentagem de volume mineral. Portanto, pode-se converter dureza knoop em volume mineral utilizando a fórmula [3,66√KHN + 21,19]. Esta equação apresenta dados com coeficiente de correlação confiável (r^2 = 0,915). Assim, segundo os autores, a correlação entre dados de TMR e CSH para lesões cariosas induzidas *in situ* em esmalte irradiado e não irradiado não foi documentado na literatura. Em um estudo com lesões cariosas artificiais, Featherstone et al. (1983) encontraram uma relação linear entre TMR e CSH onde os dados pareceram ser bem similares, mas claramente fora dos limites de

confiabilidade como os avaliados neste estudo. A diferença pode ser explicada pela variação na calibração dos pesquisadores e/ou o instrumento usado ou, mais simplesmente, o largo número de dentes utilizados neste estudo. Outra explicação que os autores dão para esta diferença entre as equações é que, no estudo de Featherstone et al. (1983), lesões foram cortadas em duas partes e metades opostas foram avaliadas por uma das técnicas. Embora, seja bem conhecido que a desmineralização em esmalte é bastante uniforme, Featherstone et al. (1983) realizaram microradiografia e microdureza em metades opostas do mesmo espécime, em contraste com o estudo de Kielbassa et al. (1999), em que as mesmas áreas foram avaliadas. Assim, os autores concluem que o presente estudo apresenta uma relação que pode ser considerada mais confiável que o estudo anterior.

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 volume mineral. Para tal, utilizaram-se 16 incisivos bovinos (espécimes com tamanho de 3 mm de diâmetro) que foram imersos em 1 litro de solução desmineralizante a 37º C por 6 dias para criar a lesão de carie artificial em esmalte. A solução foi composta por $CaCl_2x2H_2O$ a 3 mM, KH_2PO_4 a 3 mM , ácido lático a 50 mM, metildihidroxifosfato 6 µM, traços de timol, pH 5,0 (BUSKES; CHRISTOFFERSEN; ARENDS, 1985). O volume 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 volume mineral obtidas pela microradiografia e os 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 volume 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 avaliar a perda mineral do esmalte. O método de escolha para quantificação do volume mineral em lesões cariosas 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.

Por fim, Magalhães et al. (2009) compararam diferentes métodos para a produção de "lesão de cárie artificial" em esmalte *in vitro* correlacionando microdureza longitudinal (CSH) com microradiografia transversal (TMR). Os espécimes foram divididos em cinco grupos: MC gel – gel de metilcelulose 8% + ácido lático 0,1 M (pH 4,6, 37ºC, 14 dias); PA gel – gel de carbopol 0,2% e ácido lático a 0,1 M saturado com hidroxiapatita (pH 4,8, 37ºC, 16h); MHDP – solução de ácido lático a 50 mM, com metilenodifosfanato, cálcio e fosfato (pH 5,0, 37ºC, 6 dias); Tampão – solução de ácido acético a 50 mM com cálcio, fosfato e fluoreto (pH 5,0, 37ºC, 16h); e uma ciclagem de pH. 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 correlação entre √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 validas para estimar a quantidade mineral a partir da dureza já que mostram uma relação não linear. O mesmo é valido para o grupo MHDP, que por sua vez apresentou uma baixa correlação 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 é a relação entre volume 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 volume 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 microdureza em secção transversal para porcentagem de volume mineral e estudos recentes mostram que esta relação não é linear, trabalhos mais recentes não têm convertido os valores de dureza para volume mineral, e sim utilizam os valores de dureza knoop em número (kg/mm^2) (AIRES et al., 2008; MARQUEZAN et al., 2009; CURY et al., 2010; HONÓRIO et al., 2010; SOUCHOIS; VIEIRA, 2012).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho avaliou o efeito do tipo de lesão cariosa artificial produzida por quatro protocolos desmineralizantes *in vitro* em relação ao potencial remineralizante da saliva humana, do dentifrício fluoretado e do verniz/dentifrício fluoretado, utilizando como variáveis de resposta: microdureza superficial (SH) e longitudinal (CSH) e a microradiografia transversal (TMR).

Com base nisto, as seguintes hipóteses nulas foram testadas:

1. Não há diferença na remineralização *in situ* de lesões cariosas artificiais em esmalte bovino produzidas pelos diferentes protocolos *in vitro*, independentemente do agente remineralizante, a partir das análises de microdureza superficial, longitudinal e microradiografia transversal.
2. Não há diferença entre os diferentes agentes remineralizantes na remineralização do esmalte *in situ*, independentemente do tipo de lesão cariosa artificial produzida pelos diferentes protocolos *in vitro*, a partir das análises de microdureza superficial, longitudinal e microradiografia transversal.

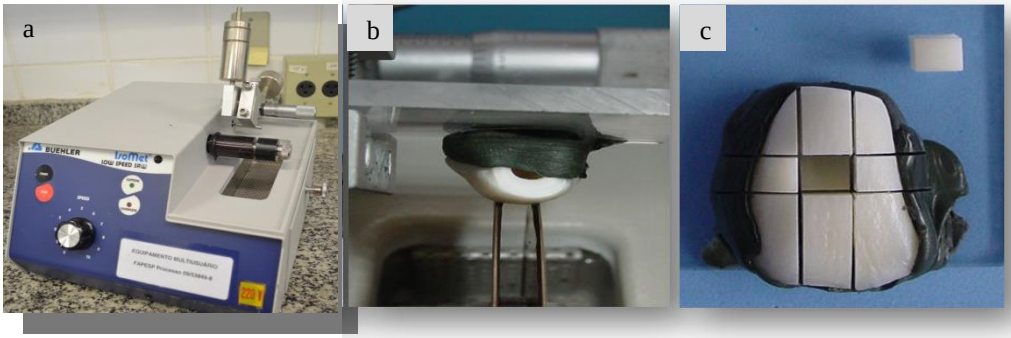
4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos dentes e preparo dos blocos de esmalte

Foram utilizados dentes bovinos permanentes extraídos recentemente, livres de cárie, os quais foram armazenados em solução tamponada de Timol a 0,1%, em pH 7,0 sob temperatura ambiente, por no mínimo 30 dias, 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, Brasil) para preparar os dentes para o corte. Primeiramente foram removidas as raízes, com o auxílio de um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltda, EUA) e um disco diamantado dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 x 0,3 x 12,7 mm^3 (Extec Corp., EUA), sendo feita uma secção na porção cervical dos dentes.

Na sequência, as coroas foram fixadas com godiva (Kerr) em uma placa de acrílico (40x40x5 mm^3). A placa foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA - Figura 1a), e com dois discos diamantados dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 x 0,3 x 12,7 mm^3 (Extec Corp., EUA) 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 blocos de esmalte 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 (Figuras 1b-c).

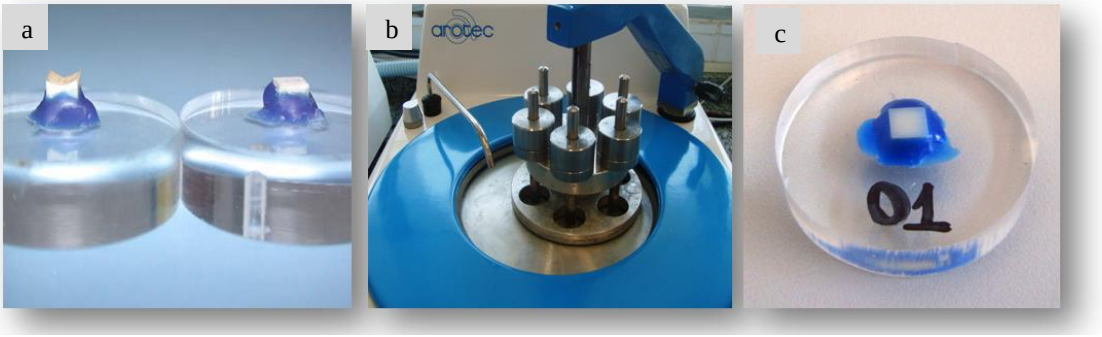


Figuras 1 – a. aparelho de corte de precisão ISOMET, vista frontal; b. secção dupla no sentido cérvico-incisal da coroa bovina; c. espécime de esmalte bovino 4 x 4 mm obtido da porção mais plana da coroa, depois da secção dupla no sentido mésio-distal.

Após o corte, estes blocos foram submetidos a um polimento. Foram fixados com cera pegajosa Kota com o auxílio de um instrumento de PKT (Duflex, Brasil) e uma lamparina (JON, Brasil) no centro de um disco de acrílico (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura), com a face de esmalte voltada para o disco, com o intuito de realizar primeiramente a planificação da dentina (Figura 2a). O conjunto (disco/dente) foi adaptado em uma Politriz Metalográfica (Figura 2b) 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 blocos ficassem com espessura de aproximadamente 3 mm (Figura 2a). Para tanto, a politriz foi acionada em baixa velocidade, entre 30 s e 3 min, até se alcançar a espessura desejada.

Em seguida, os blocos foram removidos dos discos de acrílico, sendo estes limpos com xilol (MERCK, Alemanhã), para que se retirasse todo o resíduo de cêra aderido a eles. Posteriormente, os blocos de esmalte foram novamente fixados com cera pegajosa no centro da placa de acrílico com a face de esmalte exposta, para que fosse feito o polimento, objetivando a obtenção de uma superfície absolutamente plana e paralela à base (Figura 2c), indispensável para a realização dos testes. Novamente o conjunto foi adaptado a politriz e o esmalte foi desgastado inicialmente com uma lixa de carbeto de silício de granulação 600, sob refrigeração com água deionizada, durante 2 minutos, com 2 pesos (311,160g), em velocidade baixa. Em seguida, foi feito o polimento do esmalte com lixa de carbeto de silício de granulação 1200 (Extec Corp., EUA), sob refrigeração, durante 2-3 minutos, com 2 pesos, em velocidade alta. A espessura do esmalte polido foi mensurada com ajuda de um paquímetro

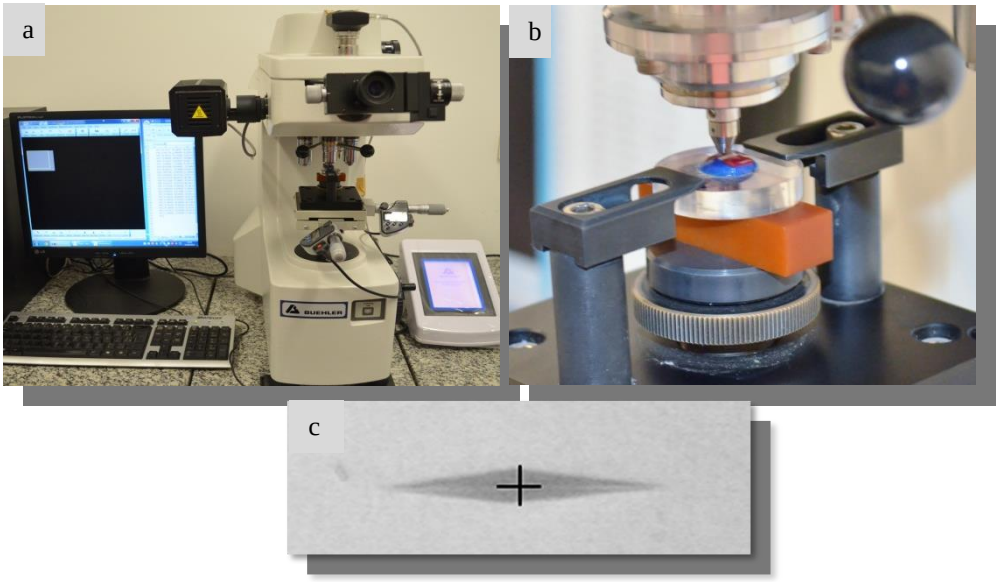
antes e após o polimento do esmalte, para obter as médias dos valores de desgaste da camada de esmalte durante polimento (média: 260±100 µm).



Figuras 2 – a. Planificação da dentina interna; b. politriz metalográfica; c. Espécimes de esmalte após a planificação e polimento final.

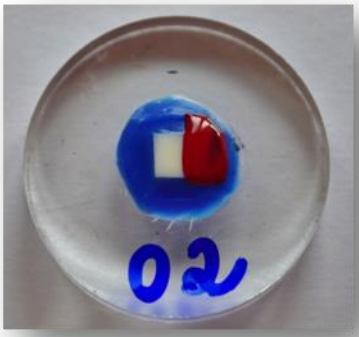
Para impedir que os grãos das primeiras lixas interferissem na qualidade do polimento das seguintes, entre cada etapa de polimento, o conjunto dente/disco foi levado a um aparelho de ultrassom T7 Thornton, com frequência de 40 KHz, durante 2 minutos, com água deionizada. Ao final do polimento dos blocos,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

Após esta etapa, foram selecionados os espécimes de esmalte bovino pelos valores de microdureza de superfície inicialmente aferida no centro da amostra pelo Microdurômetro Buehler (KNOOP, média de 5 endentações a distância de 100 µm cada, 25g e 10s) (Figuras 3 a-c).



Figuras 3 – a. Microdurômetro utilizado para seleção e distribuição dos espécimes; b. visão da ponta KNOOP; c. endentações que foram realizadas com carga de 25g por 10s.

Ao final do período, foi analisada a microdureza superficial de 500 blocos de esmalte bovino, obtendo-se uma média e desvio padrão de 356,4±16,9 KHN. Destes, foram então selecionados 452 espécimes de esmalte bovino. Todos os espécimes foram protegidos com esmalte cosmético de unha vermelho, expondo somente a superfície de interesse (2/3 do esmalte) aos desafios cariogênicos (Figura 4).



Figuras 4 – 1/3 do espécime protegido com esmalte cosmético de unha vermelho.

4.2 Amostra e delineamento experimental

Para o estudo foram utilizados 452 espécimes de esmalte bovino polidos, aleatoriamente divididas em 4 grupos, de acordo com o tipo de solução/gel desmineralizante, utilizando os valores da média de microdureza de superfície inicialmente aferida pelo Microdurômetro Buehler (SH-330-390 KHN). Após a desmineralização, um numero amostral de 360 espécimes foi alocado, de acordo com os valores de microdureza de superfície pós-lesão, para 15 voluntários que participaram do experimento de remineralização das lesões produzidas *in vitro* em 3 fases experimentais *in situ* (cada fase com 8 blocos, sendo 2 de cada protocolo de desmineralização).

As três fases experimentais diferiram pelo agente remineralizante testado: A) somente saliva; B) dentifrício fluoretado; e C) verniz fluoretado (aplicação única) + dentifrício fluoretado. As variáveis de resposta foram: microdureza superficial, longitudinal e microradiografia transversal. A figura 5 mostra o delineamento do experimento.

Preparo de 452 espécimes de esmalte bovino desmineralizados por 4 protocolos *in vitro*

↓

Seleção de 360 espécimes de esmalte bovino desmineralizados que foram alocados para a fase *in situ*

↓

Seleção de 15 voluntários (assinatura do termo e moldagem/confecção do aparelho)

↓

7 dias de descanso antes da fase *in situ* (uso de dentifrício sem fluoreto)

↓

1ª fase do estudo: Tratamento A (n=5, voluntários de 1-5), tratamento B (n=5, voluntários de 6-10) e tratamento C (n=5, voluntários de 11-15)

↓

Período de descanso (7 dias de *washout)*

↓

2ª fase do estudo: Tratamento C (n=5, voluntários de 1-5), tratamento A (n=5, voluntários de 6-10) e tratamento B (n=5, voluntários de 11-15)

↓

Período de descanso (7 dias de *washout*)

↓

3ª fase do estudo: Tratamento B (n=5, voluntários de 1-5), tratamento C (n=5, voluntários de 6-10) e tratamento A (n=5, voluntários de 11-15)

↓

Análise da microdureza de superfície, longitudinal e microradiografia transversal

↓

Análise estatística (n final=12 voluntários)

Figura 5 – Delineamento do estudo.

4.3 Indução de lesão de cárie artificial em esmalte *in vitro*

Os 452 blocos de esmalte bovino selecionados (4x4mm), com 1/3 da superfície protegida com esmalte cosmético de unha, foram submetidos à produção de lesão de cárie artificial a partir dos seguintes grupos de solução/gel desmineralizante (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); após 12 horas adicionaram-se 1,5 mL de acido lático a 0,1 M (Sigma) no mesmo volume que o gel (0,5 cm)	pH 4,6 / 37°C	14 dias
	GEL PA (WHITE, 1987; LYNCH et al., 2007; IIJIMA et al., 2004)	Ácido poliacrílico 20 g/L (Sigma-Aldrich) + ácido lático a 0,1 M (Sigma), hidroxiapatita 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)	$CaCl_2.2H_2O$ 3 mM (LabSynth); KH_2PO_4 3 mM (Sigma-Aldrich); ácido lático 50 mM (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 (MAGALHÃES et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009)	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$ a 1,28 mM (Merck); $Na_2HPO_4.2H_2O$ a 0,74 mM (LabSynth); Ácido acético glacial a 50 mM (Merck); 0,03 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 solução e géis que foram utilizados na pesquisa (n=113/grupo).

O grau de saturação da solução em relação sais de fosfato de cálcio foi calculado para todas as soluções/géis utilizando software de Shellis (1988) em trabalho anterior descrito por Magalhães et al. (2009).

Para o grupo **GEL MC**, o gel de metilcelulose 8% foi manipulado em farmácia (Bauru Fórmulas, Bauru, São Paulo, Brasil). O bloco de esmalte foi colado em um pote de J10 utilizando esmalte cosmético de unha vermelho e todas as faces, exceto 2/3 da face de esmalte dentário, foram cobertas com este mesmo esmalte de unha 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 4ºC. Na sequência, foi adicionado o mesmo volume de ácido lático a 0,1 M, pH 4,6 ajustado com KOH 10 M (0,5 cm de altura=1,5ml), permanecendo sobre o bloco por 14 dias, na estufa, a 37ºC.

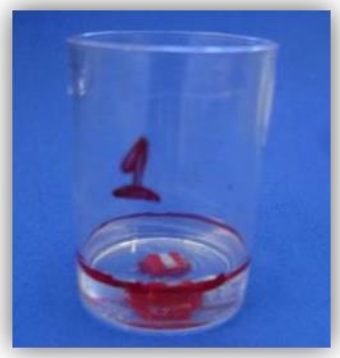


Figura 6 – Espécime colado em um J10 protegido com esmalte de unha vermelho na presença do gel.

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 sequência, a hidroxiapatita foi adicionada e a solução foi agitada por mais 2h. Além destes reagentes, foi adicionado ácido lático em uma concentração final de 0,1 M e o pH ajustado a 4,8 pela adição de uma solução de KOH a 10 M. Um volume 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 16 h em contato com este gel, na estufa a 37ºC. O protocolo original para a preparação deste gel foi proposto por White (1987). No entanto, o gel utilizado no grupo GEL PA foi similar à fórmula original descrita por White (1987), mas com algumas modificações apresentadas por Iijima et al. (2004).

Para a produção da **SOLUÇÃO MHDP** foi adicionado ácido lático 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

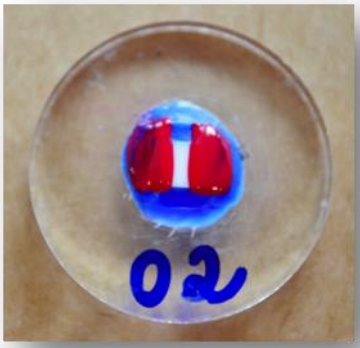
de KOH a 10M. Um volume de 30 mL de solução foi adicionado aos potes de filme fotográfico, os quais continham um espécime colado em disco de acrílico por pote (Figura 7). Os espécimes permaneceram por 6 dias imersos nesta solução, na estufa a 37ºC.

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 volume de 30 mL de solução foi adicionado aos potes de filme fotográfico, os quais continham um espécime colado em disco de acrílico por pote (Figura 7). Os espécimes permaneceram por 16 horas imersos nesta solução, dentro de uma estufa, a 37ºC.

Figura 7 – Espécime protegido com esmalte de unha vermelho (1/3 da superfície) sendo imerso em solução desmineralizante dentro do pote de filme fotográfico.

Para todos os grupos, antes da imersão dos espécime em cada solução/gel testado, foram feitos testes-pilotos, considerando como desmineralização superficial aceitável a perda de microdureza superficial entre 70 a 95%.

Após a exposição das amostras aos géis/soluções desmineralizantes, a microdureza de superfície foi novamente aferida pelo Microdurômetro Buehler (5 endentações, 25g e 10s). Na sequência, o outro 1/3 da superfície do espécime foi protegido com esmalte cosmético vermelho (Risque), para a obtenção de 3 superfícies diferentes (1- controle – sem desmineralização, 2- desmineralizada apenas, e 3- desmineralizada e remineralizada) (Figura 8).



Figuras 8 – 2/3 do espécime protegido com esmalte cosmético de unha vermelho, sendo um região protegida hígida e a outra desmineralizada.

4.4 Remineralização *in situ*

Este trabalho foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB – USP (Processo: 036/2011, ANEXO A). Os voluntários que participaram da pesquisa receberam 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. Os voluntários só participaram da pesquisa após a assinatura do termo (ANEXOS B e C).

Para a remineralização *in situ*, foram selecionados 15 adultos jovens, na faixa etária de 18 a 30 anos, residentes em área fluoretada (Bauru-SP, 0,8 ppm F na água de abastecimento), a partir de uma anamnese, da avaliação de parâmetros salivares não estimulado (0,5 ± 0,2 ml/min) e estimulado (1,1±0,4 ml/min), CPOD e presença de placa dentária (índice PHP). Foram selecionados os voluntários com boa saúde geral (exclusão: gestantes, pacientes com doenças sistêmicas e com uso de medicação) e com boa saúde bucal (exclusão: baixo fluxo salivar não estimulado < 0,1 mL/min, cárie ativos e com doença periodontal). O calculo do número amostral foi baseado nos estudos de Lippert et al. (2011) e Comar et al. (2012).

Este estudo *in situ* com 3 fases experimentais foi duplo-cego, aleatorizado e cruzado, com a duração da cada fase experimental de 3 dias e com um período de 7 dias de descanso entre as fases experimentais (*washout*). As três fases experimentais diferiram pelo agente remineralizante (tratamento) testado: A) somente saliva; B) dentifrício fluoretado; e C) verniz fluoretado (aplicação única) + dentifrício fluoretado.

Para determinação do tempo do experimento *in situ*, foi realizado um piloto, por um voluntário, que participou de 2 fases experimentais, para verificar qual o melhor período de remineralização comparando dentifrício sem flúor (Tratamento A, somente saliva) e dentifrício fluoretado (Tratamento B). O piloto foi realizado durante 14 dias em cada fase, e entre esse período foi analisada a microdureza superficial final após 1, 3, 7, 10 e 14 dias. O período mais apropriado para averiguar diferença entre dentifrício placebo e fluoretado para a remineralização das diferentes lesões e, com bom custo-benefício em relação à adesão dos voluntários, foi o tempo de 3 dias. Dessa forma, o projeto inicial em que constava o período entre 7 a 14 dias, foi alterado para 3 dias, conforme Tabela 1 , a qual mostra a média da porcentagem de ganho de microdureza de superfície [%SHC = (SH Final – SH lesão)/(SH inicial- SH lesão) x100]. Este tempo adotado também está de acordo com o estudo de Delbem et al. (2010) que, em 3 dias de fase experimental, observou maior remineralizacão para as amostras tratadas com fluoreto (gel e mousse) em relação ao grupo placebo ($p < 0,05$).

Tabela 1. Média da porcentagem de remineralização (%SHR) das amostras desmineralizadas *in vitro* e remineralizadas in situ (n=1)

	Tratamento A (placebo)					**Tratamento B (com F)**				
	Dias					**Dias**				
	1	**3**	**7**	**10**	**14**	**1**	**3**	**7**	**10**	**14**
Gel MC	5,1	12,1	26,5	12,9	5,4	16,1	20,3	21,7	24,2	24,2
Gel PA	-0,5	2,8	9,4	10,3	15,3	5,6	9,9	11,4	11,8	12,1
MHDP	-3,8	3,2	10,3	11,9	14,4	6,7	10,4	12	12	12,1
Tampão	13,8	17	21,7	24,7	24,8	4,9	8,1	12,6	14,4	15,2

* valores positivos mostram remineralização e valores negativos, desmineralização.

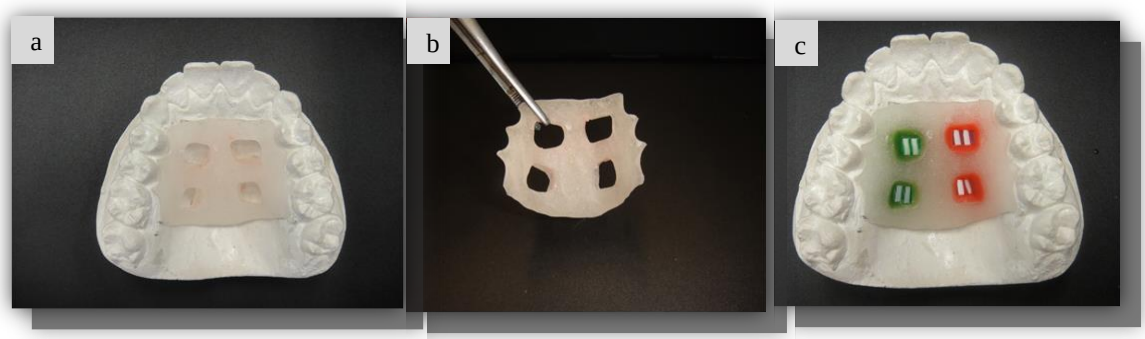
Para a fase *in situ*, os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados com alginato para a confecção do modelo de gesso pedra e do aparelho intrabucal palatino em resina acrílica, (Figura 9a). no qual foram realizados 4 nichos (10x10x3 mm^3), 2 de cada lado (esquerdo e direito Figura 9b) , para a fixação de 2 blocos de esmalte por nicho com cera pegajosa Kota (Figuras 9c). Em cada nicho, foram inseridos 2 blocos correspondentes a um tipo de lesão cariosa artificial. Não foi criado espaço para acúmulo de biofilme nos aparelhos, pois de acordo com resultados anteriores (COMAR et al., 2012), o biofilme impede a remineralização de lesões cariosas artificiais após 14 dias *in situ*. Dessa forma, como objetivo do projeto foi de analisar a remineralização e não a desmineralização, optamos por não permitir o acúmulo de biofilme sobre as amostras desmineralizadas.

Uma semana antes do início da fase *in situ* e durante os períodos de descanso, os voluntários utilizaram dentifrício placebo (0,043 ppm F, com sílica, IceFresh, Bauru-SP, Brasil), uma escova dentária extra-macia nova (Colgate 360°, Sensitive Pro-Alivio) e fio dental sem flúor (Sanifill, Brasil) para a higiene bucal. O aparelho foi instalado um dia antes do início da fase experimental, à noite, após a última higiene bucal. Durante a fase *in situ*, os voluntários só removeram o aparelho para a realização de 4 refeições (café da manhã, almoço, lanche e jantar, 1 h no máximo cada refeição), ocasião em que o dispositivo ficou envolvido em gaze umedecida por água de abastecimento. O intervalo entre as refeições foi de pelo menos 2 a 3 h. Após as refeições, a higiene bucal foi realizada e o aparelho reposicionado na boca.

Em cada fase experimental foi testado um tipo de agente remineralizante. No tratamento A, "saliva humana", os voluntários realizaram a higiene bucal e tratamento das amostras com dentifrício placebo (sem fluoreto). A higienização bucal foi realizada 4x/dia, após as refeições citadas acima, sendo que na 1ª e última higiene, os voluntários trataram as amostras *ex vivo*, por 1 minuto, com uma solução de dentifrício placebo (*slurry*, 1:3 água, 1 gota de solução/ amostra Fig. 11a), totalizando uma frequência de 2x1min/dia (LIPPERT et al., 2011). Após o tratamento, o aparelho foi recolocado na boca e os voluntários realizaram um bochecho com água de abastecimento (v=10 mL) por 5s. No tratamento B, "dentifrício fluoretado", o mesmo procedimento foi repetido em relação à higiene bucal e tratamento das amostras, porém utilizando o Dentifrício *Crest* (1.100 ppm F, Procter & Gamble, EUA). No tratamento C, "verniz fluoretado", os mesmos procedimentos da fase "dentifrício fluoretado" foram repetidos, porém as amostras foram tratadas adicionalmente com verniz *Duraphat* (22.600 ppm F, Colgate, Brasil) antes da fase *in situ.* A aplicação do verniz foi realizada utilizando *microbrushes, in vitro.* Após a aplicação, as amostras foram imersas em saliva artificial (composição: glicose a 0,2 mM, NaCl a 9,9 mM, $CaCl_2$. H_2O a 1,5 mM, NH_4Cl a 3 mM, KCl a 17 mM, NaSCN a 2 mM, K_2HPO_4 a 2,4 mM, uréia a 3,3 mM, NaH_2PO_4 a 2,4 mM e traços de ácido ascórbico, pH 6,8) (KLIMEK; HELLWIG; AHRENS, 1982) por 6h (MAGALHÃES et al., 2008). Na sequência, o verniz foi removido da superfície do esmalte com espátula e solução de acetona (1:1 água) (Figura 10a a 10d). Os espécimes de esmalte tiveram 2/3 da superfície protegidos novamente com esmalte cosmético de unha vermelho e foram inseridos nos aparelhos palatinos.

Os voluntários foram orientados a usar o aparelho por todo período experimental, removendo-o somente para os experimentos (2x/dia) e refeições (4x/dia), sendo o tempo de

exposição à boca de 20h/diárias. Além disso, foram orientados a não usar outros produtos fluoretados ou antibacterianos, durante a fase *in situ*. Todos os materiais da pesquisa foram cedidos e repostos pelos pesquisadores (Figura 11b). Os voluntários foram orientados e treinados para a execução correta do experimento (ANEXO D).



Figuras 9 – a. modelo em gesso pedra 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.

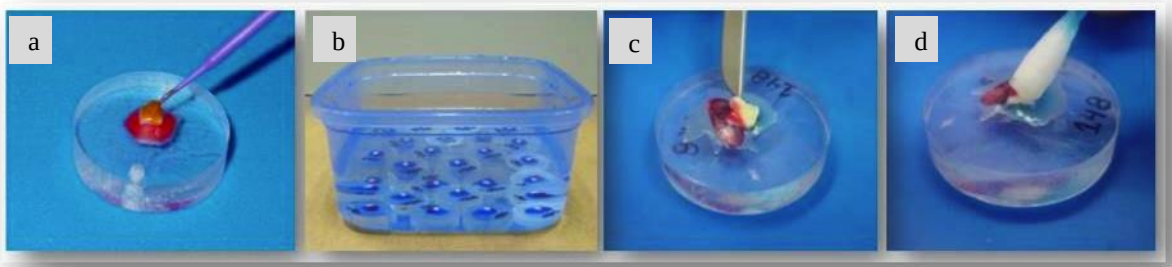
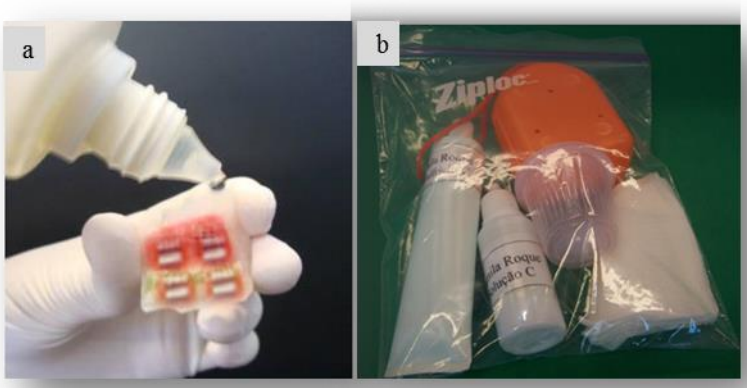


Figura 10 – a. verniz sendo aplicado na superfície do espécime. b. Espécime imersos em saliva artificial. c. verniz sendo removido com auxílio de uma espátula. d. remoção do verniz com auxílio de uma haste flexível Cotonete® umedecida em solução de acetona.

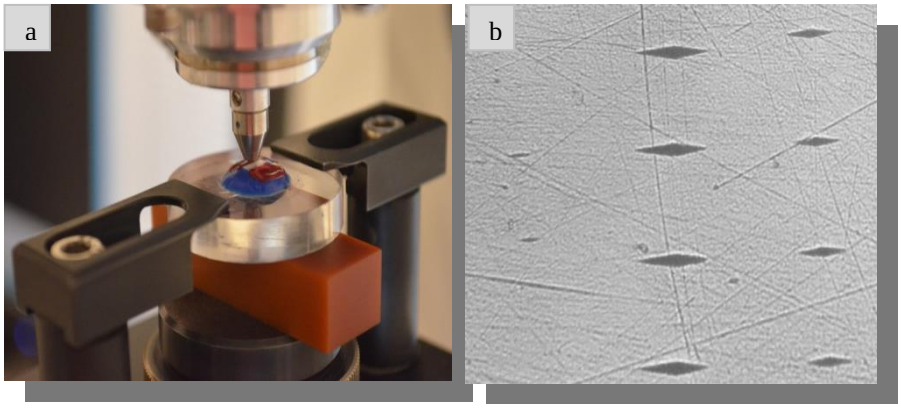


Figuras 11 – a. modo como foi feito o gotejamento da solução dentifrício sobre os espécimes; b. kit entregue aos voluntários, onde continha a caixa plástica com o aparelho, gaze, o pote com a solução, dentifrício e uma escova.

4.5 Avaliação da microdureza de superfície e longitudinal

A microdureza de superfície (SH) foi avaliada em todos os espécimes utilizando o Microdurômetro Buehler (Figura 12a), acoplado em um software, composto por um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP, com carga de 25 g aplicada por 10s , a partir da realização de cinco endentações por leitura, a distância de 100 µm cada (Figura 12b), no inicio (SH inicial), após a desmineralização *in vitro* (SH lesão) e ao final do experimento *in situ* (SH final). Todas as leituras foram realizadas no centro da amostra.

Após a fase *in* vitro, calculou-se a porcentagem de perda de microdureza de superfície [%SHC = (SH lesão – SH inicial)/ SH inicial) x100] e foram excluídos do estudo os espécimes que apresentaram valores 10% abaixo ou acima da média de todas as amostras e com desvio-padrão superior a 10% da média das cinco leituras. Ao final do experimento *in situ* foi calculada a porcentagem de ganho de microdureza de superfície [%SHR=(SH final-SH lesão)/(SH inicial-SH lesão)*100].



Figuras 12 – a. visão da ponta KNOOP do microdurômetro; b. cinco endentações iniciais, pós-lesão e pós-remineralização.

Após a análise da microdureza de superfície final (SH final), secções longitudinais foram feitas no centro dos espécimes usando para tal um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, EUA), com um disco diamantado de dupla face – XLI 2205, “high concentration”, 102 mm longitudinalmente X 0,3 mm X 12,7 mm (Extec Corp., EUA) posicionado perpendicularmente à superfície e as linhas de divisão dos terços da superfície, refrigerado com água deionizada, sendo que uma das metades foi incluída em resina acrílica (Figura 13) com a parte interna voltada para a superfície externa da resina, utilizando pó de resina acrílica o qual foi polimerizado em uma Embutidora (Arotec, Brasil) variando a pressão, temperatura e tempo. Foram embutidos 16 espécimes por disco. Os espécimes embutidos no disco foram posteriormente polidos. O polimento foi realizado com as lixas 320, 600 e 1200 (Extec. Corp., EUA) em uma politriz metalográfica conforme descrito anteriormente até a obtenção de espécimes planos e brilhantes.

Figura 13 – Espécimes incluídos em resina acrílica e polidos para a análise de microdureza longitudinal.

A microdureza longitudinal (CSH) foi realizada a partir de três sequências de oito endentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 e 330 μm da superfície externa do esmalte (25 g, 10 s, Figura 14), com um intervalo de 100 μm entre as sequências, na área do esmalte remineralizada pós in situ. Adicionalmente, duas sequências de oito endentações foram realizadas nas partes hígida e apenas desmineralizada do esmalte, utilizando as mesmas distâncias citadas anteriormente. As médias de microdureza foram calculadas para cada distância e região da amostra (KHN).

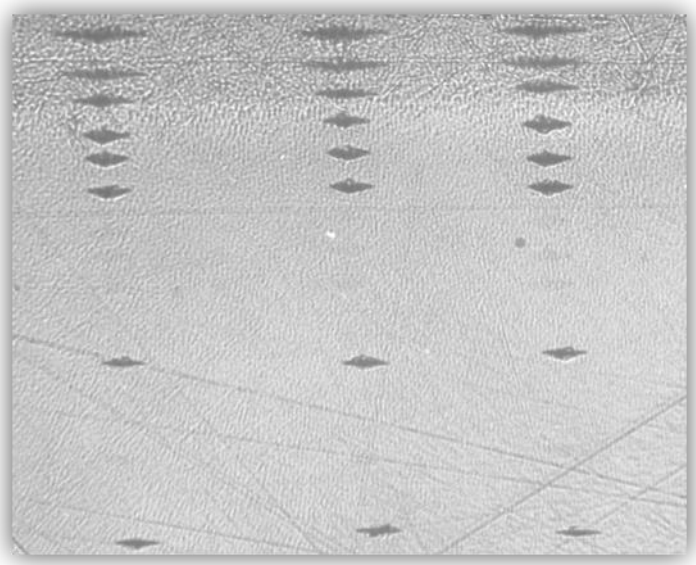


Figura 14 – Análise da microdureza longitudinal mostrando as endentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 e 330 μm m da superfície externa do esmalte.

4.6 Microradiografia transversal – TMR

A outra metade dos espécimes seccionados foi fixada com cera pegajosa Kota com o auxílio de um instrumento de PKT (Duflex, Brasil) e uma lamparina (JON, Brasil) no centro de um disco de acrílico (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura). O disco foi adaptado à politriz e o esmalte foi desgastado com uma lixa de carbeto de silício de granulação 600, sob refrigeração com água deionizada, durante aproximadamente 2 minutos, com 2 pesos, em velocidade baixa, possibilitando a obtenção de um fragmento com a espessura de aproximadamente 500 µm, espessura esta que era possível ser obtida utilizando a politriz de modo a não fraturar o espécime. Para o obtenção da espessura apropriada de 100 µm para a análise, foi realizado o polimento manual desses fragmentos utilizando lixas 600 e 1200 (Extec. Corp., EUA). A espessura final foi checada com paquímetro digital (Figuras 15a e 15b).

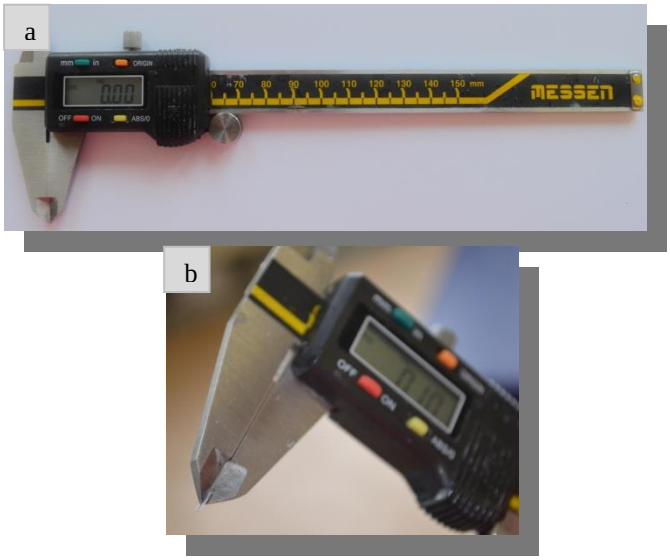
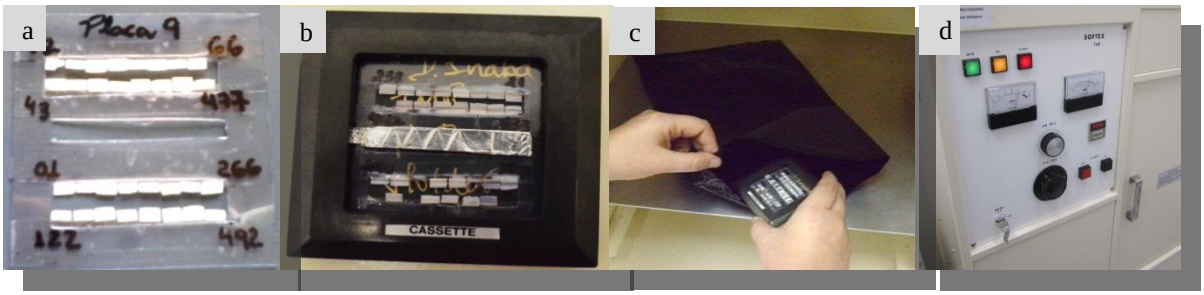


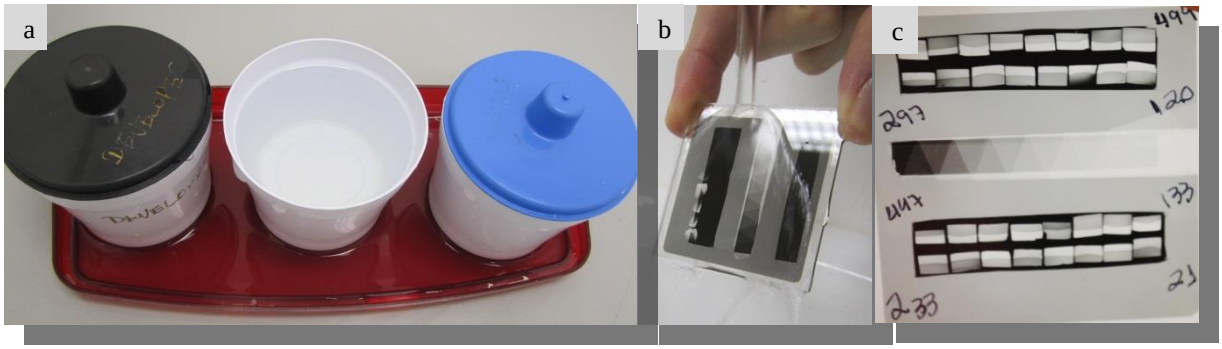
Figura 15 – a. Paquímetro digital utilizado para checar a espessura dos espécimes para a análise com o TMR. b. Paquímetro digital com amostra de esmalte (espessura de 100 µm).

Os espécimes foram colados com fita adesiva no porta-amostra (em torno de 30-40 amostras/porta-amostra, Figura 16a), contendo o padrão de alumínio com diferentes espessuras, as quais geram diferentes gradações de cinza (“*stepwedge*”). O porta amostra foi

inserido no *cassette* (Figura 16b), juntamente à placa de vidro em ambiente escuro, sendo o *cassette* envolvido em um saco preto e inserido dentro do gerador de raio X (Softex, Japão) (Figuras 16c e 16d). Dessa forma, a placa de vidro foi sensibilizada pelo raio-x (20 kv e 20 mA) por 20 min. Após cada exposição, a placa de vidro foi revelada, fixada em ambiente escuro a 20ºC e lavada (Figuras 17a a 17c).



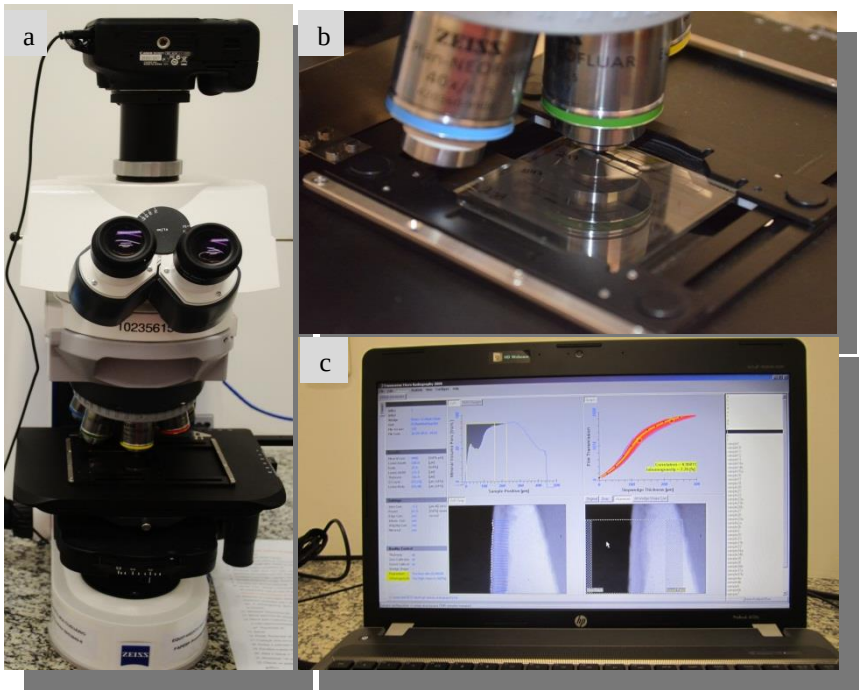
Figuras 16 – a. espécimes posicionados no porta-amostras; b. porta-amostra contendo a fatia de alumínio "stepwedge" dentro do cassete; c. Cassete e placa de vidro sensível ao raio-X sendo posicionados na cabine do raio-X; d. Painel de controle do equipamento.



Figuras 17 – a. potes com revelador, fixador e água para a revelação da placa de vidro. b. placa de vidro sendo lavada em água corrente. c. placa de vidro sensível ao raio-X com as amostras radiografadas.

A análise da imagem foi realizada utilizando microscópio (Zeiss, Alemanha) com câmera CCD (Canon, Japão) e acessórios (Figuras 18a e 18b) acoplado a um computador com software 2012 para captura e 2006 para a análise (Inspektor Research System bv, Holanda) (Figura 18c). A partir das análises das fatias de alumínio (11 fatias para a construção da "curva-padrão") e das amostras foram calculadas a perda mineral integrada (ΔZ) e

profundidade da lesão (µm) usando a fórmula de Angmar; Carlstromd; Glas (1963). O ΔZ (%vol.µm) é o produto da diferença entre a porcentagem de volume mineral de um esmalte sadio e porcentagem de volume mineral do esmalte desmineralizado (espécime) em relação à profundidade da lesão (µm). Já a profundidade da lesão (P) é definida pela distância da superfície (0% vol min) até a profundidade em que o esmalte volta a apresentar um conteúdo mineral igual ou maior que 95% do conteúdo mineral do esmalte sadio (ARENDS; TEN BOSCH, 1992). O volume mineral do esmalte hígido corresponde a 87%. A profundidade da zona superficial pseudo-intacta (S, µm) e o valor R (ΔZ/profundidade), sendo este ultimo representativo da média de perda mineral da lesão ao longo da lesão (% vol.min), também foram calculados. Para calcular o valor obtido ao final do experimento *in situ*, o ΔΔZ foi calculado pela diferença entre o ΔZ lesão e ΔZ efeito (pós *in situ*), o ΔP foi calculado pela diferença entre o P lesão e P efeito (pós *in situ*), ΔR foi calculado pela diferença entre o R lesão e R efeito (pós *in situ*) e o ΔS foi calculado pela diferença entre o S efeito e S lesão (pós *in situ*).



Figuras 18 – a. microscópio com câmera acoplada; b Placa de vidro radiografada sendo analisada no microscópio; c. software utilizado para as análises.

4.7 Análise estatística

Os dados referentes à microdureza superficial e longitudinal (KHN), assim como os valores de ΔZ/ΔΔZ, R/ΔR, profundidade da lesão (P/ΔP) e espessura da superfície "pseudo-hígida" (S/ΔS) foram tabulados em planilhas de Excel. Programas do Graph Pad Software (USA) foram utilizados para a análise estatística. Para verificar se os dados apresentavam distribuição normal e homogeneidade foram aplicados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. Após esta verificação foi aplicado o teste estatístico mais adequado de acordo com o Quadro 2. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

Tabela/ Gráfico	**Variável de Resposta**	**Teste estatístico**	**N**
Tabela 2	Mediana da % Perda de microdureza superficial	Kruskall-Wallis seguido pelo Dunn	90
Tabela 3	Média da % Recuperação de microdureza superficial	ANOVA a dois critérios (tratamento e tipo de lesão) seguida pelo teste de Bonferroni	15
Tabela 4	Média da microdureza longitudinal da área hígida	ANOVA a dois critérios (tratamento e tipo de lesão) seguida pelo teste de Bonferroni para cada profundidade	12
Tabela 5	Média da microdureza longitudinal da área desmineralizada (lesão)	ANOVA a dois critérios (tratamento e tipo de lesão) seguida pelo teste de Bonferroni para cada profundidade	12
Tabela 6	Média da microdureza longitudinal da área des-remineralizada (final)	ANOVA a dois critérios (tratamento e tipo de lesão) seguida pelo teste de Bonferroni para cada profundidade	12
Gráfico 1	Média da % recuperação microdureza longitudinal	ANOVA a dois critérios (tratamento e tipo de lesão) seguida pelo teste de Bonferroni para cada profundidade	12

Tabela 7	Média (mediana) dos valores de ΔZ, P, R e S (lesão)	ΔZ e P (teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey) R e S (Kruskall-Wallis e Dunn)	12
Tabela 8	Média dos valores de ΔZ_I e ΔZ_F	ΔZ_F e ΔZ_I (Teste t pareado) ΔZ_F entre os agentes remineralizantes para cada lesão (ANOVA de medidas repetidas e teste de Tukey)	12
Tabela 9	Média dos valores de ΔΔZ, ΔP, ΔR e ΔS (final)	ANOVA a dois critérios (tratamento e tipo de lesão) seguida pelo teste de Bonferroni	12

Quadro 2. Quadro referente ao resultado, tipo de variável de resposta, teste estatístico utilizado e número amostral.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Os 15 voluntários selecionados finalizaram o estudo, porém 3 voluntários foram excluídos por razões como perda de amostra no preparo do TMR ou por apresentarem resultados atípicos ("*outliers*"). Os voluntários não relataram nenhum efeito colateral oriundo da utilização do aparelho e dos tratamentos realizados no estudo.

5.1 Microdureza superficial

A Tabela 2 mostra os valores de microdureza superficial inicial das 90 amostras distribuídas aleatoriamente para cada um dos protocolos de desmineralização bem como os valores médios de microdureza superficial após a lesão e a porcentagem de perda de microdureza.

Tabela 2. Média (mediana) e desvio padrão da microdureza inicial, pós-lesão (KHN) e %SHC

Lesão	SH inicial	SH lesão	%SHC
Gel MC	357,65±15,03^{A}	57,74±14,01 (55,96)^{A}	83,87±3,79 (83,82)^{A}
Gel PA	358,21±16,58^{A}	54,48±8,85 (53,77)^{AB}	84,78±2,40 (84,90)^{AB}
Solução MHDP	357,55±16,10^{A}	22,46±17,36 (17,18)^{C}	93,72±4,79 (95,24)^{C}
Solução Tampão	357,14±15,89^{A}	48,88±19,88 (47,58)^{B}	86,34±5,52 (87,05)^{B}

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as lesões cariosas artificiais. Valores de SH inicial foram similares entre os protocolos (ANOVA, p=0,97), porém houve diferença significativa entre os protocolos na SH Lesão e % SHC. (Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, p<0,0001, n=90).

A solução MHDP provocou uma redução na microdureza superficial significativamente maior que os demais protocolos, seguida pela solução tampão, a qual não diferiu do gel PA, mas diferiu do gel MC. O gel PA e o gel MC mostraram resultados similares nas porcentagens de perda de microdureza superficial.

A Tabela 3 mostra os valores de recuperação de microdureza superficial (%) das lesões artificiais do esmalte submetidas a diferentes protocolos remineralizantes *in situ* pelos 15 voluntários que iniciaram a pesquisa.

Tabela 3. Média (± DP) de recuperação de microdureza superficial (%) das lesões artificiais de esmalte submetidas a diferentes protocolos remineralizantes *in situ*

Gel/Solução	Saliva	Dentifrício Fluoretado	Verniz + Dentifrício Fluoretado
Gel MC	10.0 ± 3.1^{Ab}	16.1 ± 4.8^{Bb}	17.3 ± 6.4^{Bb}
Gel PA	9.6 ± 2.2^{Aab}	15.2 ± 3.0^{Bb}	23.8 ± 4.5^{Cc}
Solução MHDP	6.0 ± 2.9^{Aa}	8.9 ± 3.7^{Aa}	6.8 ± 4.5^{Aa}
Solução Tampão	12.5 ± 4.4^{Ab}	21.9 ± 6.3^{Bc}	22.2 ± 7.1^{Bc}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferenças significativas entre as lesões para cada protocolo remineralizante. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas entre os protocolos de remineralização para cada lesão (ANOVA a dois critérios seguida pelo teste de Bonferroni: $p<0,0001$ para tratamento, $p<0,0001$ para lesão e $p<0,0001$ para interação entre os fatores, $n=15$).

Os espécimes de esmalte desmineralizados pelas soluções tampão e MDHP apresentaram o melhor e o pior padrão de remineralização, respectivamente, independentemente do protocolo remineralizante. No que diz respeito aos protocolos remineralizantes, houve uma diferença significativa entre as fases com fluoreto (tratamentos B e C) e o controle (tratamento A), para as lesões produzidas utilizando gel MC e solução tampão. Não foram encontradas diferenças entre os protocolos remineralizantes para a solução MHDP, enquanto as amostras desmineralizadas com gel PA demonstraram diferenças significativas entre os três protocolos remineralizantes. Portanto, o tipo de lesão tem influência sobre o grau de remineralização superficial e sobre a detecção de diferenças entre agentes remineralizantes, sendo a lesão provocada por gel PA com melhor capacidade de demonstrar efeito da associação entre diferentes veículos fluoretados.

5.2 Microdureza longitudinal

As Tabelas 4 a 6 mostram a média de microdureza longitudinal das amostras hígidas, apenas desmineralizadas (lesão) e des-remineralizadas (pós-*in situ*), respectivamente.

Em geral, houve diferença significativa entre as lesões cariosas artificiais em relação à recuperação da microdureza longitudinal, em que as lesões sofreram remineralização em ordem crescente: Solução MHDP < Gel MC < Solução Tampão ≤ Gel PA. O padrão de remineralização foi inversamente relacionado ao grau de desmineralização inicial (Solução MHDP > Gel MC > Solução Tampão = Gel PA), isto é, quanto maior o grau de desmineralização inicial, menor foi o grau de remineralização.

Tabela 4. Média e desvio-padrão dos valores de microdureza longitudinal (KHN, por profundidade: 10-330 µm) da área do esmalte hígido das amostras provenientes de diferentes grupos (tipo de lesão e remineralização)

	Saliva				Dentifrício				Verniz/Dentifrício Fluoretado			
µm	**Gel MC**	**Gel PA**	**Solução MHDP**	**Solução Tampão**	**Gel MC**	**Gel PA**	**Solução MHDP**	**Solução Tampão**	**Gel MC**	**Gel PA**	**Solução MHDP**	**Solução Tampão**
10	286,5±61,5 B	314,2±29,9 AB	336,4±34,5 A	329,2±32,8 A	317,3±38,1 A	304,2±46,2 A	312,7±64,0 A	325,4±47,5 A	311,8±32,5 A	300,1±35,8 A	315,85±49,7 A	325,7±43,8 A
30	345,4±23,1 A	347,8±17,6 A	350,1±23,2 A	345,2±25,5 A	348,4±24,8 A	352,7±30,3 A	349,4±24,3 A	345,2±32,7 A	339,0±23,0 A	342,4±23,4 A	333,4±24,7 A	355,4±33,7 A
50	352,1±13,1 A	355,4±26,4 A	356,1±27,3 A	353,5±22,6 A	349,5±28,2 A	351,1±24,8 A	347,7±30,5 A	361,1±25,3 A	351,5±24,0 AB	344,3±22,7 AB	331,1±18,6 B	360,7±26,8 A
70	345,9±22,1 A	357,7±20,8 A	363,5±21,6 A	348,9±19,7 A	350,4±36,2 A	353,6±24,7 A	355,9±27,0 A	360,4±19,8 A	350,2±29,6 A	340,5±22,8 A	331,9±19,6 A	354,0±22,2 A
90	355,0±23,3 A	360,5±19,9 A	363,4±20,4 A	344,6±23,4 A	353,7±31,8 A	344,5±32,0 A	350,3±22,0 A	365,8±17,7 A	350,8±26,5 A	346,9±18,4 A	343,1±21,9 A	365,2±18,4 A
110	349,9±16,0 A	350,1±18,6 A	355,9±24,0 A	351,3±20,3 A	356,0±33,7 A	358,6±15,0 A	358,9±25,9 A	358,7±23,4 A	348,9±25,9 AB	341,9±24,9 B	344,1±23,1 B	367,1±22,1 A
220	345,0±18,6 A	350,6±26,6 A	346,3±16,8 A	340,9±23,1 A	355,6±22,3 A	348,2±21,1 A	352,8±25,4 A	355,3±17,4 A	342,0±17,7 A	338,3±27,6 A	337,6±19,9 A	350,8±25,9 A
330	348,8±10,1 A	347,4±20,7 A	357,3±20,0 A	343,7±15,8 A	340,1±20,5 A	354,6±20,8 A	357,6±25,8 A	358,9±14,0 A	350,3±21,8 A	336,1±23,9 A	339,6±24,7 A	353,3±24,7 A

Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre lesões, dentro de cada tratamento. Não houve comparação entre os tratamentos (ANOVA a dois critérios seguido pelo teste de Bonferroni: $p<0,05$ para tratamento, $p<0,05$ para lesão, $p<0,05$ para interação entre os fatores na profundidade de 90 µm e $p>0,05$ nas profundidades de 10, 30, 50, 70, 110, 220 e 330 µm, n=12).

Tabela 5. Média e desvio-padrão dos valores de microdureza longitudinal (KHN, por profundidade: 10-330 µm) da área do esmalte desmineralizada utilizando diferentes protocolos *in vitro* (gel MC, gel PA, solução MHDP e solução tampão) antes da remineralização (área do esmalte somente desmineralizada)

	Saliva				**Dentifrício**				**Verniz/Dentifrício Fluoretado**			
µm	**Gel MC**	**Gel PA**	**Solução MHDP**	**Solução Tampão**	**Gel MC**	**Gel PA**	**Solução MHDP**	**Solução Tampão**	**Gel MC**	**Gel PA**	**Solução MHDP**	**Solução Tampão**
10	51,8±15,2 AB	63,7±14,1 A	23,4±5,6 C	47,0±13,3 B	35,3±8,5 AB	45,5±13,1 A	26,6±11,2 B	37,6±14,3 AB	35,0±15,7 B	53,4±18,9 A	19,4±5,4 C	41,0±21,2 AB
30	72,3±28,6 B	204,0±45,4 A	27,9±10,6 C	174,3±42,7 A	61,5±23,2 B	137,9±46,6 A	27,2±10,9 B	176,4±67,1 A	44,4±13,2 B	158,4±44,0 A	31,2±17,3 B	184,9±55 A
50	134,9±58,1 B	306,6±44,3 A	98,8±58,0 B	295,7±57,7 A	170,4±83,8 B	285,5±74,5 A	66,3±30,7 C	311,2±36,4 A	100,2±38,7 B	261,6±47,2 A	72,3±52,1 B	292,3±49,9 A
70	252,5±71,5 B	344,1±22,7 A	226,1±69,1 B	320,3±34,8 A	273,1±88,7 B	306,3±65,0 AB	210,9±65,3 C	338,5±30,5 A	234,0±62,3 B	299,0±38,6 A	204,8±71,7 B	328,5±44,2 A
90	310,7±46,0 A	345,0±29,8 A	314,7±41,3 A	332,0±41,4 A	306,3±64,4 A	316,2±50,8 A	284,9±63,6 A	330,7±44,2 A	320,7±56,0 A	323,1±25,1 A	236,0±67,0 B	333,5±33,1 A
110	319,8±25,9 A	337,0±30,7 A	348,6±29,9 A	328,7±39,4 A	334,0±43,0 AB	318,9±41,5 AB	299,0±41,6 B	338,7±24,5 A	331,9±47,6 A	326,8±26,0 AB	290,9±54,4 B	339,8±34,9 A
220	317,3±24,4 A	346,3±26,5 A	343,9±39,0 A	320,9±31,5 A	342,0±34,5 A	336,8±22,8 A	318,7±43,4 A	339,9±21,4 A	324,9±36,3 A	322,3±29,7 A	312,6±34,8 A	342,3±29,5 A
330	321,6±22,3 B	349,0±25,3 AB	350,3±20,5 A	326,8±33,1 AB	331,5±33,8 A	336,2±29,6 A	338,3±30,4 A	350,8±28,2 A	327,2±40,4 A	314,9±32,4 A	325,4±31,7 A	334,9±20,3 A

Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre lesões, dentro de cada tratamento (comparação por linha) e para cada profundidade separadamente. Não houve comparação entre os tratamentos (ANOVA a dois critérios seguida pelo teste de Bonferroni: $p<0,0001$ para tratamento, $p<0,05$ para lesão, $p<0,05$ para interação entre os fatores nas profundidades 10, 50 e 70 µm, e $p>0,05$ nas profundidades 30, 90, 110, 220 e 330 µm, n=12).

Tabela 6. Média e desvio-padrão dos valores de microdureza longitudinal (KHN, por profundidade: 10-330 µm) da área do esmalte desmineralizada utilizando diferentes protocolos *in vitro* (gel MC, gel PA, solução MHDP e solução tampão) e remineralizada pela saliva, dentifrício fluoretado ou dentifrício/verniz fluoretados *in situ* (final)

	Saliva				Dentifrício				Verniz/Dentifrício Fluoretado			
µm	**Gel MC**	**Gel PA**	**Solução MHDP**	**Solução Tampão**	**Gel MC**	**Gel PA**	**Solução MHDP**	**Solução Tampão**	**Gel MC**	**Gel PA**	**Solução MHDP**	**Solução Tampão**
10	62,8±19,7 Aa	75,9±20,0 Aa	36,1±13,9 Ba	56,7±16,4 ABb	63,9±14,3 ABa	89,7±35,8 Aa	38,6±13,2 Ba	77,3±28,0 Ab	60,9±14,2 Ba	99,0±19,8 Aa	33,1±11,8 Ca	108,8±65,7 Aa
30	88,1±41,3 Ba	252,1±44,3 Aa	53,4±33,5 Ba	218,0±48,3 Aa	106,9±29,2 Ba	215,6±59,3 Aa	53,7±22,4 Ca	254,5±38,7 Aa	108,2±27,6 Ba	254,0±44,5 Aa	57,4±32,4 Ca	260,2±51,1 Aa
50	211,2±56,5 Ba	335,9±36,4 Aa	159,1±59,7 Ca	315,8±51,6 Aa	234,8±69,6 Ba	321,0±45,6 Aa	139,3±55,2 Ca	348,9±22,9 Aa	199,1±52,4 Ba	320,3±43,7 Aa	131,5±80,6 Ca	348,0±19,4 Aa
70	313,1±32,9 ABa	345,3±28,6 Aa	284,5±44,0 Ba	324,7±41,6 Aa	320,6±57,6 ABa	348,1±25,6 Aa	257,7±40,6 Ba	352,8±21,9 Aa	318,7±57,4 ABa	329,6±20,8 Aa	248,0±57,9 Ba	350,7±22,4 Aa
90	323,7±33,0 Aa	352,0±15,4 Aa	347,6±38,5 Aa	335,6±35,1 Aa	350,7±28,5 Aa	345,1±28,0 Aa	329,5±34,3 Aab	353,0±24,5 Aa	338,9±42,6 Aa	346,8±25,0 Aa	308,3±44,0 Bb	352,1±21,9 Aa
110	328,6±40,5 Aa	351,9±28,6 Aa	354,0±24,3 Aa	330,0±33,0 Ab	353,0±18,8 Aa	345,2±27,9 Aa	339,5±23,0 Aa	349,6±11,6 Aab	343,2±33,9 ABa	339,9±25,3 ABa	329,9±17,7 Ba	359,6±22,5 Aa
220	324,8±32,0 Ba	347,7±19,9 Aa	352,1±19,5 Aa	331,1±19,7 ABa	342,5±29,0 Aa	345,1±18,5 Aa	344,7±22,3 Aa	350,5±17,1 Aa	336,5±27,4 Aa	341,8±20,8 Aa	340,7±24,9 Aa	349,3±26,0 Aa
330	325,0±22,7 Ba	346,6±18,5 ABa	357,4±25,3 Aa	329,5±25,0 Ba	345,2±29,3 Aa	341,6±21,4 Aa	337,4±21,4 Aa	353,8±24,2 Aa	339,3±27,9 Aa	331,7±21,9 Aa	334,6±22,8 Aa	350,2±21,7 Aa

Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre lesões, dentro de cada tratamento (comparação por linha) e para cada profundidade separadamente. Letras minúsculas diferentes mostram diferença significativa entre tratamentos, para cada tipo de lesão (comparação a cada 4 colunas) e profundidade (ANOVA a dois critérios seguida pelo teste de Bonferroni: $p<0,0001$ para tratamento, $p<0,0001$ para lesão, $p<0,05$ para interação entre os fatores nas profundidades 10, 90, 110 e 330 µm e $p>0,05$ nas profundidades 30, 50, 70 e 220 µm, n=12).

No que diz respeito aos diferentes tratamentos remineralizantes, as diferenças foram vistas na porção superficial da lesão. O Gráfico 1 nos mostra a porcentagem de recuperação de microdureza longitudinal (variação de 4-44%) em que conseguimos ver diferenças significativas entre a

saliva e a presença do fluoreto (seja na forma de dentifrício somente ou associação entre dentifrício/verniz) para as lesões produzidas pelo gel PA e solução Tampão nos primeiros 10 µm e apenas para gel PA aos 30 µm de profundidade. Não houve diferença significativa entre os tratamentos remineralizantes para as lesões provocadas pela solução MHDP e gel MC bem como entre as outras profundidades.

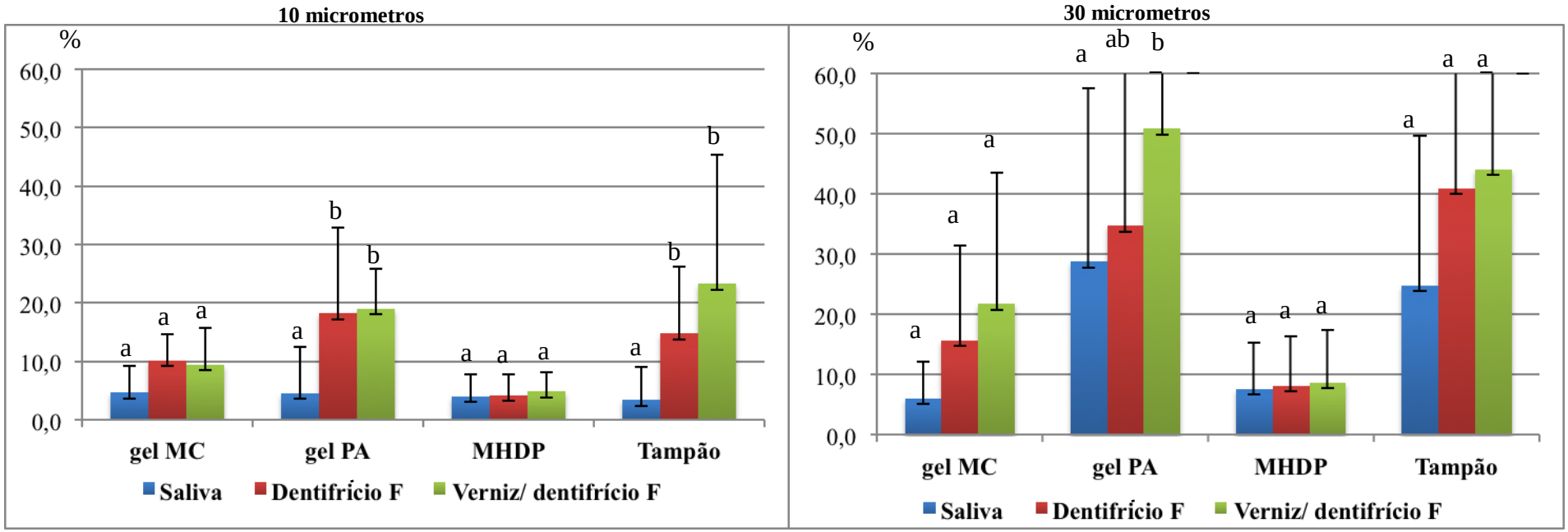


Gráfico 1. Média e desvio-padrão da porcentagem de recuperação de microdureza (%) nas profundidades de 10 e 30 µm das amostras desmineralizadas utilizando diferentes protocolos *in vitro* (gel MC, gel PA, solução MHDP e solução Tampão) e remineralizadas pela saliva, dentifrício fluoretado ou dentifrício/verniz fluoretados *in situ*.

Letras minúsculas diferentes mostram diferença significativa entre tratamentos, para cada tipo de lesão separadamente (ANOVA a dois critérios seguida pelo teste de Bonferroni: $p<0,001$ para tratamento, $p<0,0001$ para lesão e $p<0,001$ para interação entre os fatores na profundidade de 30 µm e $p>0,05$ para interação entre os fatores na profundidade de10 µm, n=12).

Portanto o tipo de lesão tem influência sobre o grau de remineralização subsuperficial e sobre a detecção de diferenças entre os agentes remineralizantes, sendo a lesão provocada pelo gel PA com melhor capacidade de distinguir o efeito do fluoreto em relação ao controle nos primeiros 30 µm de profundidade. Desta forma, pode-se inferir também que remineralização foi restrita as porções mais superficiais da lesão.

5.3 Microradiografia transversal (TMR)

Os protocolos desmineralizantes produziram lesões com características iniciais distintas em relação aos parâmetros da TMR, como pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7. Média e desvio-padrão (mediana) dos valores de perda mineral integrada (ΔZ, % mineral x µm), profundidade da lesão (P, µm), valor de perda mineral média (R, % mineral) e profundidade de camada superficial (S, µm) da área do esmalte desmineralizada utilizando diferentes protocolos *in vitro* (Gel MC, Gel PA, Sol MHDP e tampão) antes da remineralização (área do esmalte somente desmineralizada)

	ΔZ	P	R	S
Gel MC	2452,8±403,7 B	81,5±12,3 A	29,8±2,1 (30,0) AB	7±3,6 (7,0) A
Gel PA	1445,9±387,4 C	54,6±14,2 B	26,9±5,8 (26,0) B	0,8±1,0 (0,0) B
Sol. MHDP	2949,8±462,9 A	81,4±10,7 A	37,2±4,6 (38,0) A	6,9±2,0 (7,0) A
Sol. Tampão	1349,0±208,9 C	50,3±11,1 B	28,9±4,7 (28,0) B	2,3±1,3 (2,0) B

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as lesões cariosas artificiais. Os dados de ΔZ e P foram submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p<0,0001$), já os dados de R e S foram analisados pelos testes de Kruskall-Wallis e Dunn ($p<0,0002$ e $p<0,0001$, respectivamente) (n=12).

Os protocolos desmineralizantes solução MHDP e gel MC produziram lesões mais desmineralizadas e profundas em relação aos protocolos gel PA e solução Tampão. Estes resultados apresentaram-se coerentes com os dados de microdureza longitudinal.

Cem por cento das amostras desmineralizadas com Gel MC, solução MHDP e solução Tampão apresentaram camada superficial pseudo-intacta, caracterizando a lesão

como sendo de subsuperfície; apenas 42% das lesões produzidas pelo gel PA apresentaram este padrão.

As tabelas 8 e 9 mostram os resultados obtidos pela TMR após a remineralização *in situ*.

Tabela 8. Média e desvio-padrão dos valores de perda mineral integrada inicial (ΔZ_I, % mineral x µm, somente desmineralizado) e final (ΔZ_F, % mineral x µm, des-remineralizado) das lesões produzidas por diferentes protocolos *in vitro* (Gel MC, Gel PA, Solução MHDP e Solução Tampão) e remineralizadas pela saliva, dentifrício fluoretado ou verniz/dentifrício fluoretados *in situ*

	Gel MC		**Gel PA**		**MHDP**		**Tampão**	
	ΔZ_I	ΔZ_F	ΔZ_I	ΔZ_F	ΔZ_I	ΔZ_F	ΔZ_I	ΔZ_F
Saliva	2610,8±745,1	1780,4±476,5* A	1358,9±407,3	1013,3±266,8* A	3064,5±777,3	2768,8±744,4 A	1232,5±361,7	1050,8±324,8* A
Dentifrício	2357,9±503,0	1663,8±372,2* A	1422,3±356,0	1085,4±229,6* A	3002,0±752,4	2379,7±605,3* AB	1319,2±439,4	1095,4±416,7* A
Verniz/Dentifrício Fluoretado	2389,6±818,1	1676,3±500,8* A	1556,7±763,8	1025,4±409,8* A	2782,9±495,3	2210,8±448,3* B	1495,4±502,4	1047,5±239,4* A

* mostra diferença significativa entre ΔZ_F e ΔZ_I encontrada em cada tipo de lesão e tratamento remineralizante individualmente (teste t pareado, $p < 0,05$). Somente a saliva não conseguiu remineralizar significativamente as lesões produzidas pela solução MHDP. Comparações também foram realizadas entre os tratamentos remineralizantes para cada lesão individualmente (ANOVA de medidas repetidas e teste de Tukey, $p<0,046$, letras distintas na mesma coluna mostram diferenças entre os tratamentos remineralizantes). Neste caso, diferenças foram encontradas entre verniz/ dentifrício fluoretados com relação à saliva para as lesões produzidas pela solução MHDP (n=12).

Tabela 9. Média e desvio-padrão dos valores da diferença de perda mineral integrada (ΔΔZ, % mineral x µm), profundidade da lesão (ΔP, µm), valor de perda mineral média (ΔR, %) e profundidade de camada superficial (ΔS, µm) entre as áreas desmineralizadas e des-remineralizadas das lesões produzidas por diferentes protocolos *in vitro* (Gel MC, Gel PA, Solução MHDP e Solução Tampão) e remineralizadas pela saliva, dentifrício fluoretado ou verniz/dentifrício fluoretados *in situ*

	Saliva				**Dentifrício**				**Verniz/Dentifrício Fluoretado**			
	ΔΔZ	**ΔP**	**ΔR**	**ΔS**	**ΔΔZ**	**ΔP**	**ΔR**	**ΔS**	**ΔΔZ**	**ΔP**	**ΔR**	**ΔS**
MC	830,4±626,1 Aa	19,3±15,0 Aa	3,8±4,4 Aa	0,5±3,8 Aa	694,2±458,8 Aa	18,1±17,2 Aa	1,4±2,8 Aa	0,2±4,0 Aa	713,3±580,7 Aa	11,5±10,5 Aa	5,1±4,9 Aa	0,1±1,8 Aa
PA	345,6±307 Ba	11,3±19,0 ABa	-2,3±8,2 Ba	0,3±0,9 Aa	336,8±237,3 ABa	12,5±8,6 Aa	0,5±2,9 Aa	0,0±0,0 Aa	531,3±629,0 Aa	15,9±12,4 Aa	0,6±6,1 Aa	1,4±2,2 Aa
MHDP	295,8±683,8 Ba	5,0±18,1 Ba	2,2±6,2 ABa	-0,1±2,1 Aa	622,3±451,3 ABa	15,1±12,9 Aa	1,7±6,5 Aa	0,2±2,8 Aa	572,1±335,7 Aa	13,0±12,7 Aa	2,6±7,6 Aa	1,3±3,2 Aa
Tampão	181,7±171 Ba	5,9±5,7 ABa	0,5±3,8 ABa	0,1±3,2 Aa	223,8±322,1 Ba	10,9±10,5 Aa	0,3±8,9 Aa	-0,2±1,7 Aa	447,9±367,2 Aa	2,9±15,4 Aa	1,1±3,2 Aa	0,9±1,3 Aa

Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre lesões, dentro de cada tratamento (comparação dentro da mesma coluna). Letras minúsculas diferentes mostram diferença significativa entre tratamentos, para cada tipo de lesão (comparação a cada 4 colunas). ANOVA a dois critérios seguida pelo teste de Bonferroni ($p > 0,05$ para tratamento, e $p<0,05$ para lesão, $p>0,05$ para interação entre os fatores). Valores positivos significam remineralização e valores negativos, desmineralização (n=12).

Em geral, houve diferença significativa entre as lesões cariosas artificiais em relação à remineralização, para a condição saliva e dentifrício fluoretado, em que as lesões sofreram remineralização em ordem crescente: Solução Tampão = gel PA = Solução MHDP ≤ Gel MC (no parâmetro ΔΔZ, Tabela 9). Na presença do dentifrício/verniz fluoretados, não houve diferença significativa entre as lesões. O padrão de remineralização não mostrou relação clara (inversa ou proporcional) com o grau de desmineralização inicial (Solução MHDP ≥ Gel MC ≥ Gel PA= Solução Tampão). Dados obtidos pela TMR para as amostras apenas desmineralizadas foram similares àqueles obtidos com a microdureza. Já em relação à remineralização, encontramos diferentes resultados quando analisamos as lesões pelos dois métodos (TMR e microdureza longitudinal), desta forma, não foi realizado a análise de correlação ou regressão ente os métodos.

No que diz respeito aos diferentes tratamentos remineralizantes, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos remineralizantes considerando os dados da Tabela 9 (ΔΔZ). Em geral, as lesões remineralizaram, independentemente do tratamento, sendo que apenas no caso da lesão produzida pela solução MHDP houve diferença significativa no ΔZ_F entre a saliva e o dentifrício/verniz fluoretados, porém este resultado se deve ao fato da saliva ter apresentado baixo potencial de remineralização deste tipo de lesão, principalmente considerando que a diferença de perda mineral integrada deve ser maior que 400 % min x µm (Tabela 8). Valores baixos de ΔΔZ foram também encontrados para a solução Tampão, no caso da saliva, porém na análise comparativa dos valores de ΔZ_F entre os tratamentos, a diferença não foi significativa. As Figuras 19-22 mostram uma imagem de um espécime de esmalte representativo de cada lesão dentro de cada tratamento remineralizante assim como o perfil mineral de cada tratamento e lesão.

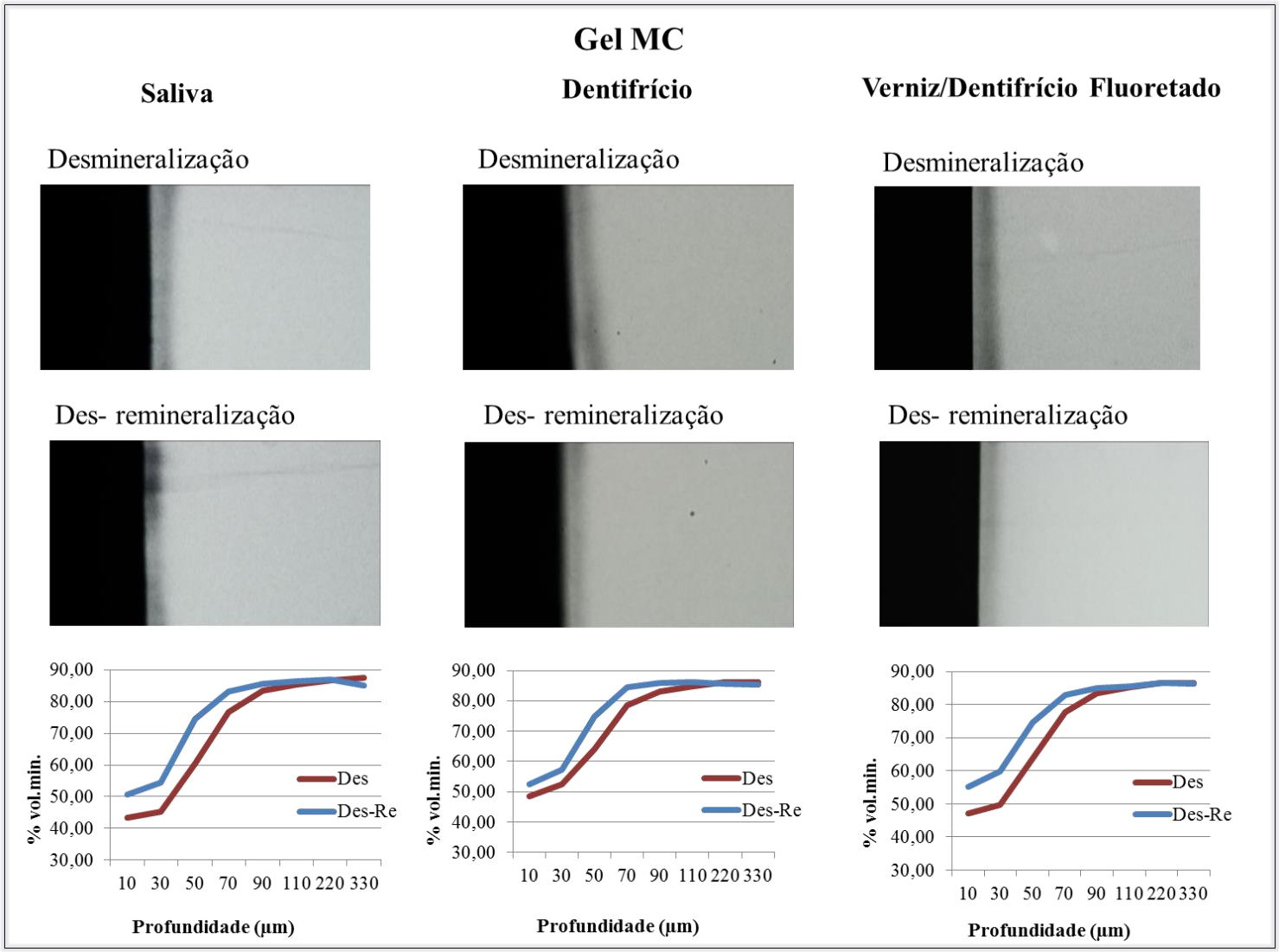


Figura 19- Fotomicrografias e perfis minerais representativos da lesão produzida pelo **Gel MC** no *baseline* (desmineralização) e após a remineralização pela saliva, dentifrício fluoretado e verniz/dentifrício fluoretados *in situ*.

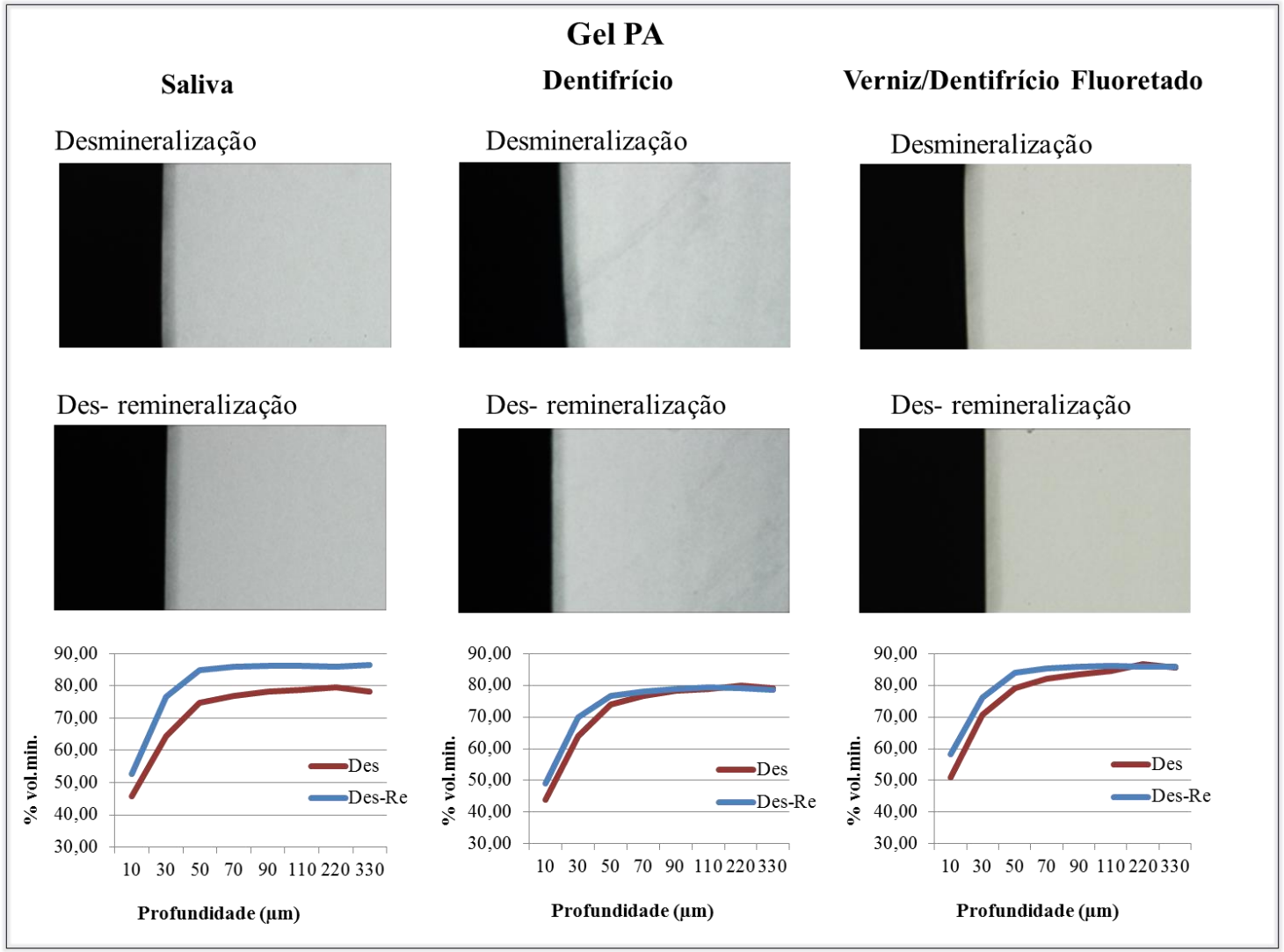


Figura 20- Fotomicrografias e perfis minerais representativos da lesão produzida pelo **Gel PA** no *baseline* (desmineralização) e após a remineralização pela saliva, dentifrício fluoretado e verniz/dentifrício fluoretados *in situ*.

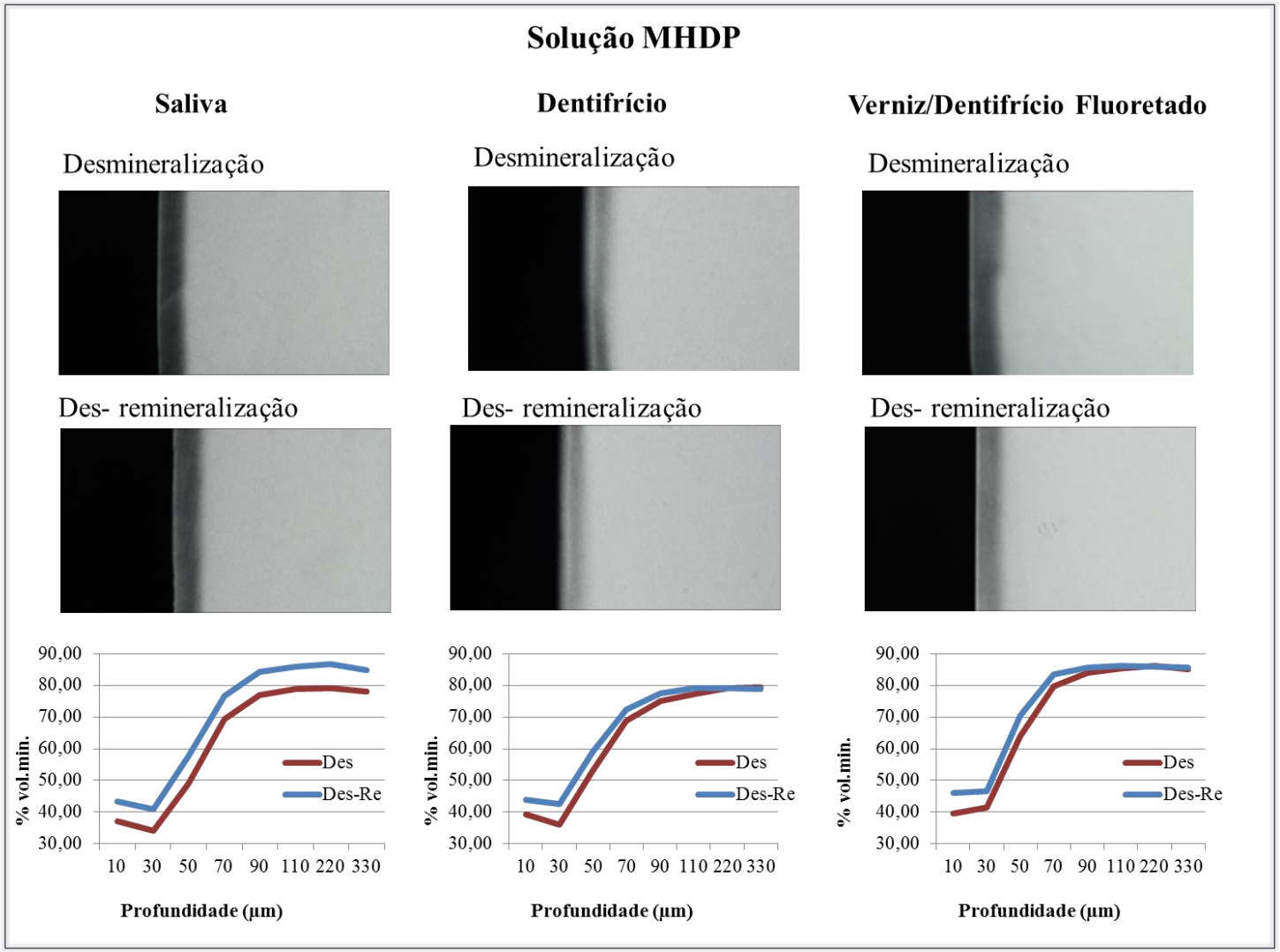


Figura 21- Fotomicrografias e perfis minerais representativos da lesão produzida pela **Solução MHDP** no *baseline* (desmineralização) e após a remineralização pela saliva, dentifrício fluoretado e verniz/dentifrício fluoretados *in situ*.

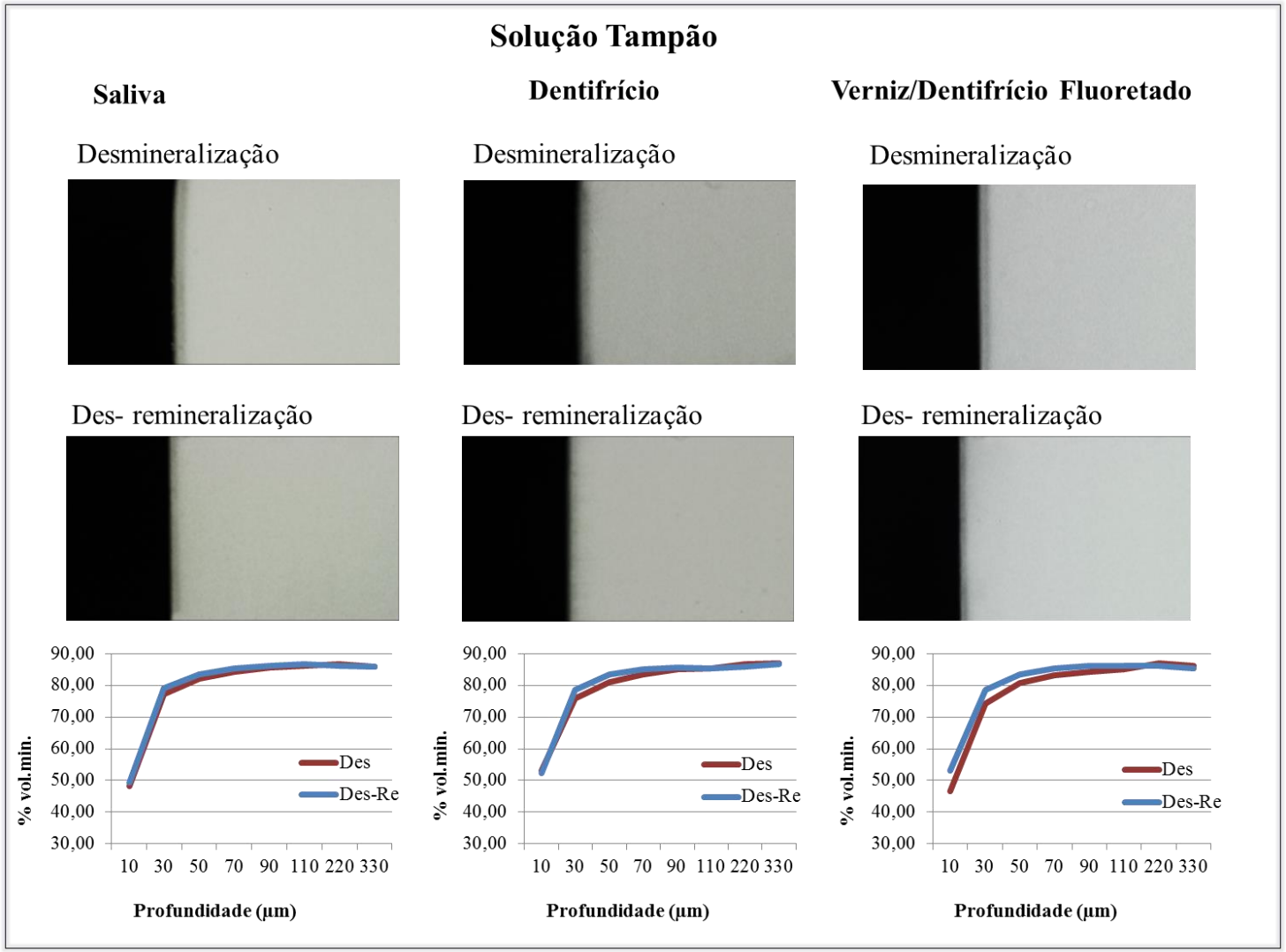


Figura 22- Fotomicrografias e perfis minerais representativos da lesão produzida pela **Solução Tampão** no *baseline* (desmineralização) e após a remineralização pela saliva, dentifrício fluoretado e verniz/dentifrício fluoretados *in situ*.

Portanto, o tipo de lesão tem influência sobre o grau de remineralização subsuperficial principalmente pela saliva e também em parte pelo dentifrício fluoretado, considerando os dados da TMR. Na presença de verniz/dentifrício fluoretados, as diferenças entre o grau de remineralização das lesões não foram encontradas. Nenhuma das lesões mostrou-se capaz de distinguir o efeito do fluoreto em relação ao controle na remineralização de subsuperfície pelos parâmetros do TMR.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A mancha branca representa um estágio clínico inicial da lesão cariosa, que pode ser controlado ou até mesmo revertido, evitando-se assim a cavitação e a necessidade de tratamentos mais invasivos. Para tal, é necessário entender os mecanismos envolvidos na desmineralização e remineralização do esmalte de forma que os protocolos laboratoriais reproduzam uma lesão cariosa inicial mais próxima possível daquela que ocorre *in vivo*. No entanto, as lesões artificiais de cárie apresentam características variadas com relação ao conteúdo mineral e profundidade de lesão (SILVERSTONE, 1977). Neste trabalho, foram produzidas lesões cariosas artificiais de acordo com quatro métodos publicados na Literatura. Anteriormente à exposição/imersão de todos os espécimes aos géis/soluções desmineralizantes, foram realizados testes pilotos para avaliar se as lesões produzidas nos espécimes atingiam um valor de perda de microdureza superficial aceitável (70 a 95% de perda de dureza).

Um dos protocolos de desmineralização produzido foi o Gel MC, o qual foi primeiramente preconizado por Edgar (1983) e modificado por ten Cate et al. (1996). Para este gel foi realizado apenas um teste piloto, o que nos mostra que o método é de fácil execução. No entanto, a lesão produzida por este método não foi homogênea ao longo da área exposta, o que provavelmente ocorreu devido à consistência do gel de metilcelulose a 8% que impossibilitou a penetração do ácido lático uniformemente em toda a superfície da amostra. Lippert (2012) mostrou que a viscosidade do gel pode ter impacto na produção da lesão cariosa, sendo que géis mais viscosos tendem a produzir lesões menos desmineralizadas que géis menos viscosos. Neste referido trabalho, o autor variou a concentração e o tipo de polissacarídeo usado para dar a viscosidade ao gel, sendo que essa viscosidade permite que o cálcio e fosfato liberados do esmalte fiquem próximos a superfície da amostra desmineralizada permitindo a formação da camada superficial, bem como reduz a difusão do ácido.

O Gel PA foi similar ao protocolo preconizado por White (1987), porém com algumas modificações preconizadas por Iijima et al. (2004) tais como concentração de HAP e ácido poliacrílico e o pH da solução. Não encontramos dificuldades para a preparação desta solução, sendo necessário apenas um teste piloto. As lesões produzidas por este gel foram as mais fáceis de avaliar por testes de microdureza superficial e longitudinal, pois as endentações apresentavam-se bem definidas.

A solução MHDP produzida foi similar à solução preconizada por Buskes, Christoffersen e Arends (1985) com exceção ao tipo de ácido utilizado. No trabalho de Buskes, Christoffersen e Arends (1985) foi utilizado o ácido acético, enquanto no estudo de Magalhães et al. (2009) houve a substituição por ácido lático, o que foi repetido no presente trabalho. Para esta solução foram realizados três testes pilotos até que obtivéssemos uma desmineralização superficial dentro da porcentagem de perda de dureza aceitável. Esta foi a solução que encontramos maior dificuldade de preparação, pois os valores de desmineralização superficial apresentavam-se variados e, na maioria das vezes, elevados, o que também dificultou a leitura de microdureza superficial e longitudinal nos primeiros micrômetros de profundidade.

Por fim, a solução Tampão produzida foi preconizada por ten Cate e Duijsters (1983a;b), com alteração na proporção Ca/P, seguindo a estequiometria da hidroxiapatita, e foi semelhante à solução produzida por Queiroz et al. (2008), Magalhães et al. (2008) e Magalhães et al. (2009). Neste caso, foram realizados dois testes pilotos até a obtenção dos valores de desmineralização superficial (perda de dureza) esperados.

A desmineralização pode ser influenciada por vários 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., 1984), 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). Todos os protocolos desmineralizantes utilizados no presente trabalho foram padronizados a temperatura de 37ºC de forma que fosse possível obter lesões de subsuperfície com grande perda mineral e profundidade da lesão, de acordo com o que foi descrito por Amaechi, Higham e Edgar (1998). Estes autores mostraram que temperatura é um importante fator no processo de desmineralização, sendo que lesões mais profundas e subsuperficiais são obtidas a temperatura de 37° C comparada à de 20° C.

Nós padronizamos o preparo das amostras em diferentes aspectos. Um deles se referiu à região de obtenção das amostras, que no caso foi do terço médio da coroa bovina. Amaechi, Higham e Edgar (1998) também verificaram que a região do esmalte onde o espécime é cortado não tem influência sobre o grau de desmineralização obtido. Para a análise de microdureza dos espécimes é imprescindível a realização do polimento, no entanto o polimento também é um outro fator importante que pode influenciar a desmineralização.

Desta forma, padronizamos o polimento dos espécimes dentro de uma média de desgaste da superfície de 200-300 µm. White (1987) verificou que quando os espécimes não foram polidos, a desmineralização se processou mais lentamente e as lesões foram menos reproduzíveis quando comparadas aos espécimes polidos. Portanto, há a necessidade de se padronizar a quantidade de esmalte removido, sendo que o dente bovino é considerado com boa reprodutibilidade quando têm sua superfície polida em 200 µm (CLASEN; OGAARD, 1999).

Neste estudo, foram utilizados dentes bovinos, por serem de fácil coleta e manipulação. Os dentes bovinos são bons substitutos dos humanos, apesar de serem menos mineralizados e mais porosos e, portanto apresentarem menor valor de microdureza superficial e também maior susceptibilidade à desmineralização (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998; IIJIMA, et al., 1999; HUANG et al., 2010). 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 algumas limitações, as lesões cariosas produzidas em esmalte bovino têm estrutura microscópica similar às humanas (OGAARD; ROLLA, 1992; CLASEN; OGAARD, 1999; MELLBERG, 1992). Em testes pilotos, ainda não publicados, realizados em nosso laboratório, verificamos a necessidade de dobrar o tempo de exposição dos dentes humanos à solução MHDP para obter o mesmo grau de desmineralização dos dentes bovinos.

Para obtenção de uma área controle e uma área somente desmineralizada, os espécimes foram protegidos com esmalte de unha vermelha. Dessa forma, foi ainda possível verificar se os protocolos de desmineralização realizados *in vitro* não provocaram erosão (lesão com perda de estrutura superficial) ao invés de uma lesão de subsuperfície.

Em relação aos resultados da desmineralização, as lesões provocadas pelo gel MC apresentaram semelhanças nos valores de profundidade da lesão e ΔZ quando comparadas às lesões produzidas por ten Cate et al. (1996). Estes mesmos autores mostraram que há uma variabilidade entre os laboratórios para a reprodução deste método, onde a variação foi 2.000 a 3.000 %vol min.µm para o ΔZ e de 65 a 116 µm para a profundidade da lesão. Comparamos os valores obtidos em nosso estudo com os valores de Lynch e Ten Cate (2006), esses autores obtiveram maiores valores em relação ao ΔZ e profundidade da lesão, porém os valores de R (distribuição mineral) foram semelhantes. Já no estudo de Magalhães et al. (2009), os valores de profundidade, ΔZ e R encontrados nas lesões foram menores que os valores obtidos neste trabalho e foi vista semelhança somente na camada superficial entre os

dois trabalhos. Considerando a comparação entre os trabalhos, este gel induz lesões que não são bem reproduzíveis entre os diferentes autores e laboratórios.

Com relação aos valores de desmineralização obtidos pelo Gel PA, White (1987) mostrou valores mais baixos com relação à profundidade da lesão e ΔZ e valores de dureza superficial semelhantes aos resultados obtidos neste trabalho. Em comparação ao trabalho de Iijima et al. (2004), esses autores obtiveram valores menores que o presente trabalho para profundidade da lesão e valores maiores para ΔZ. Quando comparamos os resultados obtidos no presente estudo com a mesma lesão produzida por Magalhães et al. (2009), os valores de profundidade, ΔZ e R da lesão foram semelhantes, porém o valor da camada superficial foi menor no presente trabalho. As lesões induzidas pelo gel PA parecem ser parcialmente reproduzíveis, pelo menos quando comparadas ao estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa (MAGALHÃES et al., 2009). No entanto é importante ressaltar que apenas 42% das lesões criadas pelo Gel PA foram de subsuperfície.

A solução MHDP apresentou resultados diferentes do trabalho de Buskes, Christoffersen e Arends (1985). Esses autores obtiveram maiores valores para a profundidade da lesão e menores para a camada superficial que os obtidos no presente trabalho, porém Buskes, Christoffersen e Arends (1985) utilizaram ácido acético ao invés de ácido lático. Comparando os valores com os dados de Magalhães et al. (2009), cuja solução foi idêntica à testada no presente trabalho, é possível verificar resultados similares com relação à profundidade da lesão e camada superficial, porém não foram obtidos resultados semelhantes para ΔZ e R, que apresentaram valores menores no estudo anterior. Por outro lado, quando comparamos os valores obtidos com um estudo mais recente realizado em nosso laboratório, houve semelhança em todos os parâmetros avaliados (profundidade da lesão, camada superficial, ΔZ e R) (COMAR et al., 2012). Considerando a comparação entre os trabalhos, este sistema induz lesões que são parcialmente reproduzíveis entre os diferentes autores e laboratórios.

Por fim, as lesões produzidas pela solução tampão mostraram ser bem reproduzíveis quando comparamos os resultados do presente trabalho com os dados de microdureza superficial obtidos por Queiroz et al. (2008) e os parâmetros da microradiografia do estudo de Magalhães et al. (2009).

De acordo com ten Cate et al. (1996) diferenças entre os sistemas de microradiografia (TMR) podem ser um dos fatores responsáveis pelas diferenças encontradas

nos parâmetros avaliados quando à reprodutibilidade dos métodos de desmineralização testados.

Com respeito aos métodos de análise da desmineralização, apesar dos resultados de TMR e dureza superficial e longitudinal terem sido similares na avalição do *baseline* (desmineralização), na remineralização esses dois métodos apresentaram resultados distintos. Em relação à analise da microdureza superficial, a solução que apresentou maior remineralização foi a solução tampão e a que menos remineralizou foi a solução MHDP; o contrário foi visto na análise por TMR, na qual a solução Tampão apresentou a remineralização mais modesta. De acordo com Magalhães et al. (2009) nem sempre o que é mais duro superficialmente é igualmente mais mineralizado internamente.

Comparando a microdureza longitudinal com a análise por TMR no *baseline* (desmineralização) houve uma tendência semelhante de resultados, apesar de relação linear não ter sido encontrada em estudos prévios (BUCHALLA et al. 2008; MAGALHÃES et al., 2009). Quanto à remineralização, não há na literatura outro trabalho até o momento que avaliou o grau de remineralização entre as diferentes lesões comparando os dois métodos de análise. Esse trabalho mostrou que a relação vista no *baseline* (desmineralização) não foi repetida após a remineralização, isto é, os dados do TMR e da microdureza longitudinal foram completamente distintos.

Enquanto a microdureza longitudinal mostrou que a remineralização foi inversamente relacionada ao grau de desmineralização inicial, os parâmetros de TMR não apontaram para uma relação muito clara (apesar da “tendência” à maior remineralização, quanto maior a desmineralização). Dentro dos parâmetros do TMR, o valor de R parece ser o mais importante que a própria profundidade da lesão de acordo com Lynch, Mony e ten Cate (2007), uma vez que lesões mais desmineralizadas (alto valor de R) tendem a remineralizar mais que aquelas menos desmineralizadas (menor valor de R). De uma forma geral, os trabalhos têm mostrado que lesões mais desmineralizadas e profundas inicialmente remineralizam mais que lesões mais rasas e menos desmineralizadas (IIJIMA et al., 1999; LYNCH; TEN CATE, 2006; LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007; TSHOPPE; MYER-LUECKEL, 2012). Outro fator que parece ser importante na des e remineralização de lesão de cárie é a camada superficial pseudo-intacta, Lippert et al. (2012) mostraram que lesões, cuja camada superficial era menos mineralizada (nas lesões com baixo ΔZ), responderam melhor ao fluoreto, o que foi o caso do gel PA para a análise de microdureza nos primeiros 30 µm de superfície.

A análise de microdureza (superficial e longitudinal) é considerada um método indireto para avaliar a desmineralização. A microdureza superficial deve ser utilizada com cautela para avaliar lesões cariosas em esmalte, visto que apesar de significante, não houve correlação com os dados de TMR em trabalho anterior (MAGALHÃES et al., 2009). A microdureza longitudinal (CSH), por outro lado, nos dá uma importante evidência sobre as propriedades mecânicas do tecido desmineralizado em profundidade. Magalhães et al. (2009) mostraram que há uma correlação entre a CSH e TMR, porém a relação não foi linear no referido estudo. A 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). Apesar de não termos realizado teste de correlação entre os dados (TMR e CSH) no presente trabalho, resultados similares entre os dois métodos foram obtidos apenas para o esmalte desmineralizado em concordância com Buchalla et al. (2008) e Magalhães et al. (2009). A relação dureza e volume mineral parece ser intrinsicamente relacionada ao tipo de lesão criada, sendo que para lesões altamente desmineralizadas, como as lesões produzidas pela solução MHDP, a relação entre esses dois métodos é fraca (MAGALHÃES et al., 2009). No entanto para o esmalte des-remineralizado, os dados da TMR diferiram distintamente da microdureza longitudinal, como já discutido, mostrando que neste caso não há nenhuma correlação e isto justifica o fato de não termos submetido os dados para uma análise estatística de correlação e tão pouco subdividimos a discussão neste tópico.

Apesar das vantagens dos modelos para a remineralização *in vitro*, optamos pelo estudo *in situ*, por ele ser considerado como um estágio intermediário entre as condições *in vitro* e *in vivo*, permitindo o controle das condições clínicas relacionadas à dinâmica de ganho e perda de mineral da cárie dentária (TEN CATE, 1994). É importante considerar que a remineralização utilizando saliva artificial (solução remineralizante) *in vitro* é maior que *in situ/in vivo*, uma vez que a saliva humana apresenta algumas proteínas que modulam e podem inibir a precipitação mineral (GRAZZIOTIN et al., 2011). Para verificar o potencial de remineralização das diferentes lesões *in situ*, nós testamos o efeito da saliva sem exposição ao fluoreto, com exposição ao dentifrício fluoretado (representando aplicação caseira de fluoreto) associada ou não à aplicação do verniz fluoretado (representando a aplicação profissional de fluoreto). Esta ideia surgiu de estudos prévios, a partir dos quais discutiu-se que produtos remineralizantes podem ter diferentes impactos na remineralização de lesões cariosas

dependendo do tipo de lesão testada (LYNCH; TEN CATE, 2006; LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007; LIPPERT et al., 2011).

Foi realizado um teste-piloto para definição do tempo mais adequado para a remineralização, onde apenas um voluntário realizou o experimento *in situ* por 14 dias e o valor de microdureza superficial foi avaliado no 1º, 3º, 7º, 10º e 14º dia do experimento. O melhor valor de remineralização foi obtido após 3 dias do experimento *in situ*, sendo que após este período os valores se mostraram estabilizados, não apontando para aumento da remineralização.

No entanto, com base nos resultados obtidos no estudo principal, sugerimos a realização de mais trabalhos *in situ* testando o tempo de experimento, porém desta vez avaliando os valores de remineralização por TMR, ao invés da definição do tempo pela microdureza superficial. Gonzáles e Cabezas et al. (2012) avaliaram o grau de remineralização obtido pela aplicação de solução fluoretada ácida e neutra apenas usando microdureza superficial e concluíram que a remineralização foi maior em lesões menos desmineralizadas que lesões mais avançadas, o que contraria toda a literatura existente a respeito do impacto da lesão na subsequente remineralização. O resultado deste trabalho é esperado uma vez que avaliou-se a remineralização apenas na superfície, porém a lesão de cárie é uma lesão tipicamente de subsuperfície, sendo assim a análise de microdureza superficial pode não refletir a lesão como um todo.

Lippert et al. (2011) mostraram que mesmo após 3 a 4 semanas de estudo *in situ* com utilização de dentifrício fluoretado, houve modesta remineralização para lesões que apresentavam alto valor de R ($\Delta\Delta Z$= 291) e para as lesões que apresentavam baixo valor de R houve desmineralização com $\Delta\Delta Z$ negativo (-525) após 3 semanas, mostrando que não houve remineralização significante, na presença de biofilme, *in situ*. Este trabalho não pode ser comparado diretamente ao presente estudo, pois os autores variaram o valor de R e padronizaram o ΔZ, o que não aconteceu no presente trabalho. Nós tivemos variados valores de R e ΔZ. No entanto, este trabalho nos mostra a limitação da saliva em remineralizar o esmalte, especialmente na presença de biofilme, mesmo após 3 semanas de remineralização sem desafio cariogênico. Este resultado está de acordo com o obtido por Comar et al. (2012), no qual o verniz fluoretado teve pouco impacto na remineralização de lesões cariosas artificiais, na presença de biofilme, em 14 dias de exposição à saliva *in situ.* Com base nestes trabalhos, decidimos testar a remineralização sem acumulo de biofilme, porém ainda assim a remineralização foi modesta em 3 dias de exposição à saliva *in situ.*

Em geral, nosso estudo não foi capaz de gerar um resultado coerente entre associação de diferentes veículos fluoretados em relação a um único veículo fluoretado. O efeito do fluoreto foi visto somente nos primeiros micrometros de profundidade do esmalte especialmente para aquele que apresentava uma camada superficial pseudo-intacta menos profunda (superfície amolecida). Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Tschoppe e Myer-Luecke (2012). Estes autores só conseguiram mostrar uma relação dose-resposta aos dentifrícios contendo diferentes concentrações de fluoreto, quando os espécimes desmineralizados foram expostos a substitutos de saliva que induziram à desmineralização ao invés de remineralização. Por outro lado, quando as lesões de cárie foram imersas em substitutos de saliva capazes de promover remineralização, o efeito do fluoreto (controle, 1400 vs. 5000 ppm F) não foi visto em 2 e 5 semanas de experimento *in vitro*. Isto indica a necessidade de novos estudos incluindo desafios ácidos, entre os períodos de remineralização, para uma melhor detecção da associação de diferentes veículos fluoretados em relação a um único veículo fluoretado. De acordo com o que foi discutido por Yamazaki e Margolis (2008), solução remineralizante ácida possui a maior capacidade de aumentar a penetração de íons na lesão que a solução neutra, melhorando dessa forma a remineralização da lesão em profundidade. Em oposição, Lippert, Butler e Lynch et al. (2011) mostraram, em um modelo alternando des e remineralização, que a concentração de fluoreto parece ser mais importante que a variação de pH nesses processo, porém devemos considerar que neste trabalho o pH variou de 4,9 a 5,5, muito abaixo das condições encontrada na saliva humana especialmente na ausência de desafios cariogênicos como foi realizado no presente estudo.

Portanto, sugerimos que este trabalho seja repetido no futuro, com a inclusão de biofilme e desafios cariogênicos com diferentes graus de agressividade (variando a frequência de exposição à sacarose) entre os períodos de remineralização, de forma a simular de maneira mais apropriada o ambiente bucal assim como para a obtenção de uma possível resposta da associação de diferentes veículos fluoretados em comparação a um único veículo fluoretado na remineralização de lesões cariosas artificiais, utilizando a TMR como variável de resposta primária e a microdureza, como secundária. Esta sugestão contraria a nossa hipótese inicial de que o biofilme “atrapalharia” a remineralização, pois com base nos resultados e na discussão da literatura, acreditamos que os desafios cariogênicos brandos poderiam possibilitar um melhor efeito do fluoreto na remineralização das lesões cariosas artificiais, especialmente no caso do verniz fluoretado. Outro aspecto que precisa ser melhor estudado é se uma aplicação

única de verniz fluoretado é suficiente para a remineralização de lesões de mancha branca em comparação a várias aplicações de verniz fluoretado, como realizadas na clínica.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pontuamos as lesões cariosas artificiais em quatro aspectos: dificuldades de preparo, produção de lesão de subsuperfície, reprodutibilidade (em comparação à literatura) e capacidade de distinguir o efeito dos fluoretos *in situ* conforme Tabela 10.

Tabela 10. Pontuação das lesões cariosas artificiais conforme preparo, produção da lesão subsuperficial, reprodutibilidade e resposta à remineralização *in situ*

Parâmetros	Gel MC	Gel PA	Solução MHDP	Solução Tampão
Preparo	+++	+++	+	++
Lesão de subsuperfície	+++	+	+++	+++
Reprodutibilidade	+	++	+++*	+++
Resposta à Remin.	-	+ (dureza)	-	-
Média da pontuação	**++**	**++**	**++**	**++**

* considerando comparação ao trabalho de Comar et al. (2012)

- (ruim), + (regular), ++ (bom) e +++ (ótimo)

Portanto, podemos inferir que não há um protocolo superior a outro para a produção da lesão cariosa artificial, levando em consideração todos os aspectos mencionados acima em conjunto. No entanto, deve ser considerada que a resposta à remineralização pode ser influenciada fortemente pelo modelo experimental e a variável de resposta. A decisão deve ser tomada levando em consideração os aspectos abordados na Tabela 10, de acordo com a prioridade e facilidade do Laboratório, e sempre que possível, considerando as características da lesão cariosa natural (lesão subsuperficial, com baixo valor de R e mais profunda).

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados, concluímos que:

1. Há diferença no grau de remineralização entre as diferentes lesões cariosas artificiais produzidas pelos diferentes protocolos (hipótese nula rejeitada), sendo esta resposta dependente do agente remineralizante e do método de análise. Enquanto para microdureza, as lesões produzidas pelo Gel PA e Solução Tampão mostraram maior grau de remineralização, especialmente na presença de fluoreto (dentifrício com ou sem verniz); na avaliação da TMR, as lesões produzidas pelo gel MC remineralizaram mais, especialmente na saliva, mas também na presença do dentifrício fluoretado; enquanto que na presença do verniz/dentifrício fluoretados, não houve diferença entre as lesões.
2. Há diferença ente os agentes remineralizantes somente na avaliação da microdureza (hipótese parcialmente aceita), sendo esta resposta também dependente do tipo de lesão. A presença de fluoreto (dentifrício e verniz/dentifrício fluoretados) foi capaz de aumentar a microdureza superficial e dos primeiros 30µm de profundidade em comparação ao controle (saliva) somente para lesão produzida pelo gel PA. Na análise por TMR, não houve diferença entre os agentes remineralizantes.

Referências

REFERÊNCIAS

AIRES, C. P. et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Res,** v. 42, n. 5, p. 380-386, 2008.

ALTENBURGER, M. J. et al. In situ fluoride retention and remineralization of incipient carious lesions after the application of different concentrations of fluoride. **Eur J Oral Sci,** v. 117, n. 1, p. 58-63, 2009.

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, n. 8, p. 619-628, 1998.

ANGMAR, B.; CARLSTROM, 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, n. 1, p. 2-11, 1986.

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, 1997.

ARENDS, J.; TEN BOSCH, J. J. Demineralization and remineralization evaluation techniques. **J Dent Res,** v. 71, Spec No, p. 924-928, 1992.

ARRUDA, A. O. et al. Effect of 5% fluoride varnish application on caries among school children in rural Brazil: a randomized controlled trial. **Community Dent Oral Epidemiol,** v. 40, n. 3, p. 267-276, 2012.

BANSAL, K. et al. In vivo remineralization of artificial enamel carious lesions using a mineral-enriched mouthrinse and a fluoride dentifrice: a polarized light microscopic comparative evaluation. **J Indian Soc Pedod Prev Dent,** v. 28, n. 4, p. 264-270, 2010.

BUCHALLA, W. et al. Relationship between nanohardness and mineral content of artificial carious enamel lesions. **Caries Res,** v. 42, n. 3, p. 157-163, 2008.

BUSKES, J. A.; CHRISTOFFERSEN, J.; ARENDS, J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. **Caries Res,** v. 19, n. 6, p. 490-496, 1985.

CHU, C. H.; CHAU, A. M.; LO, E. C. Current and future research in diagnostic criteria and evaluation of caries detection methods. **Oral Health Prev Dent,** v. 11, n. 2, p. 181-189, 2013.

CLASEN, A. B.; OGAARD, B. Experimental intra-oral caries models in fluoride research. **Acta Odontol Scand,** v. 57, n. 6, p. 334-341, 1999.

COMAR, L. P. et al. In situ effect of sodium fluoride or titanium tetrafluoride varnish and solution on carious demineralization of enamel. **Eur J Oral Sci,** v. 120, n. 4, p. 342-348, 2012.

COSTA, S. M. et al. A systematic review of socioeconomic indicators and dental caries in adults. **Int J Environ Res Public Health,** v. 9, n. 10, p. 3540-3574, 2012.

CURY, J. A. et al. Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. **Eur J Oral Sci,** v. 118, n. 4, p. 370-375, 2010.

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

DELBEM, A. C. et al. Effect of rinsing with water immediately after neutral gel and foam fluoride topical application on enamel remineralization: An in situ study. **Arch Oral Biol,** v. 55, n. 11, p. 913-918, 2010.

DEMITO, C. F. et al. The efficacy of a fluoride varnish in reducing enamel demineralization adjacent to orthodontic brackets: an in vitro study. **Orthod Craniofac Res,** v. 7, n. 4, p. 205-210, 2004.

DOHNKE-HOHRMANN, S.; ZIMMER, S. Change in caries prevalence after implementation of a fluoride varnish program. **J Public Health Dent,** v. 64, n. 2, p. 96-100, 2004.

DOWNER, M. C. Do we really need another system for recording caries? Thoughts on ICDAS. **Community Dent Health,** v. 29, n. 4, p. 258-259, 2012.

EDGAR, W. M. Distribuition 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.

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

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

FREIRE, M. O. C. et al. Oral health in 12 year-old students from public and private schools in the city of Goiânia, Brazil. **Rev Panam Salud Publica,** v. 28, n. 2, p. 86-91, 2010.

GONZÁLEZ-CABEZAS, C. et al. Effect of low pH on surface rehardening efficacy of high concentration fluoride treatments on non-cavitated lesions. **J Dent,** v. 40, n. 6, p. 522-526, 2012.

GRAZZIOTIN, G. B. et al. In situ investigation of the remineralizing effect of saliva and fluoride on enamel following prophylaxis using sodium bicarbonate. **Eur J Dent,** v. 5, n. 1, p. 40-46, 2011.

GREIG, V.; CONWAY, D. I. Fluoride varnish was effective at reducing caries on high caries risk school children in rural Brazil. **Evid Based Dent,** v. 13, n. 3, p. 78-79, 2012.

HICKS, J. et al. Fluoride varnishes and caries development in primary tooth enamel: an in vitro study. **ASDC J Dent Child,** v. 68, n. 5-6, p. 304-310, 2001.

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.

HUANG, T. T. et al. Characterisation of enamel white spot lesions using X-ray micro-tomography. **J Dent,** v. 35, n. 9, p. 737-743, 2007.

HUANG, T. T. et al. Nano-indentation characterisation of natural carious white spot lesions. **Caries Res,** v. 44, n. 2, p. 101-107, 2010.

IIJIMA, 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, n. 6, p. 551-556, 2004.

IIJIMA, Y. et al. In vitro remineralization of in vivo and in vitro formed enamel lesions. **Caries Res,** v. 33, n. 3, p. 206-213, 1999.

JACOBSEN, P.; YOUNG, D. The use of topical fluoride to prevent or reverse dental caries. **Spec Care Dentist,** v. 23, n. 5, p. 177-179, 2003.

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, n. 3, 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, 2005.

KLIMEK, J.; HELLWIG, E.; AHRENS, G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. **Caries Res,** v. 16, n. 2, p. 156-161, 1982.

LAHEIJ, A. M.; VAN STRIJP, A. J.; VAN LOVEREN, C. In situ remineralisation of enamel and dentin after the use of an amine fluoride mouthrinse in addition to twice daily brushings with amine fluoride toothpaste. **Caries Res,** v. 44, n. 3, p. 260-266, 2010.

LIPPERT, F. The effects of lesion baseline characteristics and different Sr:Ca ratios in plaque fluid-like solutions on caries lesion de- and remineralization. **Arch Oral Biol,** v. 57, n. 10, p. 1299-1306, 2012.

LIPPERT, F.; BUTLER, A.; LYNCH, R. J. Enamel demineralization and remineralization under plaque fluid-like conditions: a quantitative light-induced fluorescence study. **Caries Res,** v. 45, n. 2, p. 155-161, 2011.

LIPPERT, F. et al. Effect of fluoride, lesion baseline severity and mineral distribution on lesion progression. **Caries Res,** v. 46, n. 1, p. 23-30, 2012.

LIPPERT, F. et al. In situ fluoride response of caries lesions with different mineral distributions at baseline. **Caries Res,** v. 45, n. 1, p. 47-55, 2011.

LYNCH, R. J.; MONY, U.; TEN CATE, J. M. Effect of lesion characteristics and mineralizing solution type on enamel remineralization in vitro. **Caries Res,** v. 41, n. 4, p. 257-262, 2007.

LYNCH, R. J.; TEN CATE, J. M. The effect of lesion characteristics at baseline on subsequent de- and remineralisation behaviour. **Caries Res,** v. 40, n. 6, p. 530-535, 2006.

MAGALHAES, A. C. et al. Comparison of Cross-Sectional Hardness and Transverse Microradiography of Artificial Carious Enamel 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 demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. **J Dent,** v. 36, n. 2, p. 158-162, 2008.

MARCENES, W. et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. **J Dent Res,** v.92, n.7, p. 592-597, 2013.

MARINHO, V. C. et al. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD002781, 2004.

MARINHO, V. C. et al. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD002278, 2003.

MARQUEZAN, M. et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. **Arch Oral Biol,** v. 54, n. 12, p. 1111-1117, 2009.

MELLBERG, J. R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. **J Dent Res,** v. 71, Spec No, p. 913-919, 1992.

MOBERG SKÖLD, U. et al. Effect of school-based fluoride varnish programmes on approximal caries in adolescents from different caries risk areas. **Caries Res,** v. 39, n. 4, p. 273-279, 2005.

MUNSHI, A. K.; REDDY, N. N.; SHETTY, V. A. Comparative evaluation of three fluoride varnishes: an in-vitro study. **J Indian Soc Pedod Prev Dent,** v. 19, n. 3, p. 92-102, 2001.

NARVAI, P. C. et al. Dental caries in Brazil: decline, polarization, inequality and social exclusion. **Rev Panam Salud Publica,** v. 19, n. 6, p. 385-393, 2006.

OGAARD, B.; RØLLA, G. Intra-oral models: comparison of in situ substrates. **J Dent Res,** v. 71, Spec No, p. 920-923, 1992.

PETERSSON, G. H.; BRATTHALL, D. The caries decline: a review of reviews. **Eur J Oral Sci,** v. 104, n. 4 (Pt 2), p. 436-443, 1996.

PETERSSON, L. G. et al. Professional fluoride varnish treatment for caries control: a systematic review of clinical trials. **Acta Odontol Scand,** v. 62, n. 3, p. 170-176, 2004.

PIOVESAN, C. et al. Inequalities in the distribution of dental caries among 12-year-old Brazilian schoolchildren. **Braz Oral Res,** v. 25, n. 1, p. 69-75, 2011.

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

SEPPÄ, L. Fluoride varnishes in caries prevention. **Med Princ Pract,** v. 13, n. 6, p. 307-311, 2004.

SHELLIS, R. P. A microcomputer program to evaluate the saturation of complex solutions with respect to biominerals. **Comput Appl Biosci,** v. 4, n. 3, p. 373-379, 1988.

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

SOUCHOIS, M. W.; VIEIRA, R. S. Effect of a glass ionomer cement and a fluoride varnish on cross-sectional microhardness values of artificial occlusal caries: in vitro study. **Indian J Dent Res,** v. 23, n. 6, p. 732-737, 2012.

STROHMENGER, L.; BRAMBILLA, E. The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: a short review. **Oral Dis,** v. 7, n. 2, p. 71-80, 2001.

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

TEN CATE, J. M.; DUIJSTERS, P. P. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res,** v. 16, n. 3, 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, n. 3, p. 193-199, 1983a.

TEN CATE, J. M.; DUIJSTERS, P. P. E. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. II. Microradiographic data. **Caries Res,** v. 17, n. 6, p. 513-519, 1983b.

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. Preparation and measurement of artificial enamel lesions, a four-laboratory ring test. **Caries Res,** v. 30, n. 6, p. 400-407, 1996.

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, n. 6, p. 509-518, 1984.

TSCHOPPE, P.; MEYER-LUECKEL, H. Effects of regular and highly fluoridated toothpastes in combination with saliva substitutes on artificial enamel caries lesions differing in mineral content. **Arch Oral Biol,** v. 57, n. 7, p. 931-939, 2012.

VARMA, S.; BANERJEE, A.; BARTLETT, D. An in vivo investigation of associations between saliva properties, caries prevalence and potential lesion activity in an adult UK population. **J Dent,** v. 36, n. 4, p. 294-299, 2008.

WALSH, T. et al. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD007868, 2010.

WHITE, D. J. Use of synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation. **Caries Res,** v. 21, n. 3, p. 228-242, 1987.

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, n. 2, 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.

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 036/2011

Bauru, 28 de abril de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "**Efeito do tipo de lesão cariosa artificial em esmalte bovino sobre o potencial remineralizante da saliva, do dentifrício e do verniz fluoretado: um estudo in situ.**", de autoria de Priscíla Maria Aranda, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 27 de abril de 2011 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
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FOB-USP

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Profª Drª Maria Teresa Atta
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FOB-USP

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

Efeito do tipo de lesão cariosa artificial em esmalte bovino sobre o potencial remineralizante da saliva, do dentifrício e do verniz fluoretado: um estudo in situ.

2 - Objetivo

O objetivo deste estudo *in situ* é avaliar três tipos de tratamento para cárie em esmalte bovino (lesões criadas em Laboratório) descritas a seguir: saliva humana, dentifrício fluoretado (aplicação caseira do flúor) e verniz fluoretado (aplicação profissional do flúor).

3 - Procedimentos da Fase Experimental

Vocês utilizarão, durante três fases experimentais que poderão variar de 7 a 14 dias de duração cada uma, com um período de descanso de 7 dias entre elas, um aparelho no céu da boca, confeccionado em resina acrílica, no qual serão fixados 8 blocos de dente bovino (esmalte) previamente desinfetados com solução de formol e cariados (desmineralizados no Laboratório). Uma semana antes do início da fase *in situ* e durante os períodos de descanso, vocês deverão utilizar dentifrício placebo (sem flúor) para a higiene bucal. O aparelho será instalado um dia antes do início da fase experimental, à noite, após a última higiene bucal.

Durante o período experimental, vocês só poderão remover o aparelho para a realização das 4 principais refeições, sendo que neste período o aparelho deverá ficar envolvido em gaze umedecida por água de abastecimento.

Na fase 1, vocês deverão higienizar os próprios dentes com escova (Oral B extra-macia), fio dental e dentifrício placebo (sem flúor) cedidos pelos pesquisadores, 4 vezes ao dia, após as refeições. Apos a primeira e a última higiene bucal, o tratamento das amostras deverá ser realizado durante 1 minuto com solução deste dentifrício (1 gota/amostra). Na sequência, o aparelho deverá ser recolocado na boca e vocês deverão realizar um bochecho com água de abastecimento por 5 segundos. Na segunda fase, os mesmos procedimentos serão repetidos, porém utilizando dentifrício fluoretado (Crest) cedido pelos pesquisadores. Na

terceira fase, as amostras serão previamente tratadas com verniz fluoretado (6h) e então inseridas ao aparelho. Os procedimentos realizados pelos voluntários serão iguais aos da 2ª fase. Ao final das fases experimentais, os aparelhos deverão ser devolvidos aos pesquisadores. A sequência de fases pode variar de acordo com cada voluntário.

4 - Benefícios do Experimento

O uso de dentifrício ou verniz fluoretado vem de encontro com a necessidade de proteção do dente contra cárie dentária. Dessa forma, o entendimento mais detalhado do papel do fluoreto, com diferentes concentrações e finalidades (caseiro e profissional), na remineralizacao dos diferentes tipos de lesões cariosas preparadas no Laboratório, simulando as lesões de mancha branca, tem suma importância para que as medidas preventivas e terapêuticas para a carie dentaria sejam melhor delineadas.

5 - Riscos do Experimento

Não há riscos aos voluntários pelo uso dos aparelhos palatinos com dentes desinfetados, procedimento comumente realizado em estudos desta natureza. Alguns voluntários eventualmente podem apresentar enjoos ou dor de garganta. Nestes casos, os voluntários serão excluídos do experimento. Como os voluntários deverão apresentar baixo risco à carie dentaria, o uso temporário de dentifrício sem flúor também não acarreta a uma maior risco ao desenvolvimento das lesões cariosas.

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 para maiores esclarecimentos, o sujeito da pesquisa pode recorrer a qualquer um dos membros da equipe do projeto (Laboratório de Bioquímica 14-3235-8246) ou a pesquisadora responsável Priscila Maria Aranda (telefone 14 81398293) 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.

ANEXO C

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 2012.

_____

Sujeito da pesquisa

_____

Ana Carolina Magalhães

ANEXO D
INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

1. Todos os materiais utilizados na pesquisa não acarretarão em custo ao voluntário.

2. Durante o experimento, os voluntários deverão utilizar apenas a escova, fio dental e os dentifrícios (pasta de dente) fornecidos pela autora do trabalho.

3. A pesquisa será composta por três fases de __ dias cada uma, com 7 dias de descanso entre elas.

4. Os voluntários deverão utilizar um dispositivo bucal palatino e só o removerão para as principais refeições diárias (4x/dia por no máximo 1h cada: café da manhã, almoço, jantar, lanche). Dormir com o aparelho.

5. Enquanto o dispositivo permanecer fora da boca durante as refeições, este deverá ficar envolvido em gaze umedecida em água de abastecimento 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). Total máximo: 4 horas

8. Realize sua higiene bucal ao final das 4 refeições, utilizando o dentifrício fornecido sem o aparelho na boca. Não realizar a higiene bucal em outros horários.

9. Os voluntários deverão aplicar uma gota de solução de dentifrício fornecida para cada fase em cada bloco, 2x ao dia por 1 minuto cada (na primeira e última higienização bucal do dia), e em seguida recolocar o aparelho na boca e enxaguar com água de torneira (bochechar água por 5s para lavar o aparelho e os próprios dentes).

10. Uma vez ao dia, os voluntários poderão realizar a escovação do dispositivo (na última higiene bucal), somente da face voltada para o palato (“céu da boca”) e com o dentifrício fornecido pela autora.

11. Quando qualquer material estiver acabando, entrar em contato com a autora, para que este seja reposto.

12. Favor verificar todos os dias se os fragmentos estão em suas lojas e se sua proteção em cera permanecem intactas. Caso não estejam, entrar em contato imediatamente com a autora.

13. Qualquer dúvida, entrar em contato com a autora do trabalho pelos telefones abaixo:

Priscila Celular: (14) 81398293 Residência Bauru: (14) 3208-4579
Laboratório de Bioquímica FOB/USP: 32358246

Muito grata pela sua colaboração!
Priscila