MARIA APARECIDA ALVES DE CERQUEIRA LUZ

REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES NATURAIS DE CÁRIE DE DENTINA *IN VITRO*

São Paulo 2007 Maria Aparecida Alves de Cerqueira Luz

Remineralização de lesões naturais de cárie de dentina *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Livre-Docente.

Área de Concentração: Dentística

São Paulo 2007 Luz MAAC. Remineralização de lesões naturais de cárie de dentina *in vitro* [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, 2007

Banca Examinadora

1)	Prof(a). Dra(a) Titulação: Julgamento:	Assinatura:
2)	Prof(a). Dra(a) Titulação:	Accipatura
3)	Prof(a). Dra(a)	Assinatura.
	Titulação: Julgamento:	Assinatura:
4)	Prof(a). Dra(a) Titulação:	
5)	Prof(a) Dra(a)	Assinatura.
5)	Titulação: Julgamento:	Assinatura:

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Margarida e Walney, por me proporcionarem uma

formação com

valores inestimáveis, sem os quais não teria alcançado esta etapa profissional.

Aos meus dois grandes amores João Gualberto e Júlia Beatriz pela compreensão

e motivação durante a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Narciso Garone Netto, responsável pela minha carreira universitária, pelo reconhecimento das várias oportunidades que me proporcionou para a evolução profissional.

HOMENAGENS PÓSTUMAS

À Profa. Célia Regina Martins Delgado Rodrigues a quem recorri para me auxiliar na realização de parte deste experimento e que o fez de modo científico, sem críticas, embora com vários questionamentos construtivos. Surpreendi-me ao reconhecer nela uma pessoa tão solidária e tão nobre. Seu falecimento foi para mim e acredito que para todos dessa comunidade, motivo de muito pesar. Alegrei-me, entretanto, por ter tido a oportunidade de conviver tão proximamente com ela, mesmo que por tão curto espaço de tempo.

> Ao técnico da microscopia Gerson Batista da Silva quem pacientemente me auxiliou no microscópio eletrônico de varredura. Sua competência e entusiasmo tornaram nosso trabalho sempre muito agradável... Pena que nossas lindas imagens de microscopia não possam mais ir para a sua coleção.

Acredito que Deus também necessite dos nobres junto dele.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos talentos que me deu e por nos ter oferecido uma natureza tão pródiga ...

> Sou grata a todos os meus mestres, professores, alunos e pacientes que diretamente compuseram o meu saber; aos familiares, parentes e agregados que tanto me estimularam e se orgulham dos meus feitos; aos amigos e todos os colegas de trabalho que ao trocarem idéias comigo enriqueceram meus conhecimentos; aos autores, não só os que constam da bibliografia desta tese mas também a tantos outros que transformaram meus conhecimentos. A todos meu verdadeiro obrigada.

> > (Içami Tiba)

Luz MAAC. Remineralização de lesões naturais de cárie de dentina *in vitro* [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

A literatura relata a remineralização das lesões incipientes de esmalte como um fato consagrado, mas muito se especula a respeito da remineralização das lesões de dentina. Estudamos como se processa a remineralização das lesões naturais de cárie de dentina, em processo contínuo, em solução remineralizante contendo duas concentrações diferentes de flúor. Vinte dentes humanos cariados, recém extraídos, foram identificados, radiografados e fotografados, sendo aleatoriamente separados em dois grupos (N=10). Cada elemento dental teve a lesão de cárie dividida ao meio. Uma das metades das lesões foi submetida ao processo de remineralização em frascos individuais de solução contendo cálcio, fosfato e 1ppm de flúor (grupo 1) ou 500ppm de flúor (grupo2), durante 30 dias, em temperatura de 37°C, com trocas diárias. A outra metade das lesões foi fragmentada em dois quartos, um para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e outro para análise de microdureza, prévias à remineralização. Após este processo, a metade da lesão remineralizada foi fragmentada em dois quartos, um para análise ao MEV e outro para análise de microdureza. O conteúdo de flúor de cada frasco com a solução utilizada foi analisado a cada troca, utilizando-se um eletrodo seletivo. O cálculo do flúor absorvido foi realizado pela diferença entre o conteúdo do íon da solução inicial e da final que conteve a lesão. A área das lesões foi estimada através de cálculo matemático, utilizando-se as radiografias e dois softwares. Deste modo, pode-se calcular a absorção por unidade de área. As observações ao MEV mostraram a formação de um depósito mineral lamelar superficial ou em forma de grânulos, provavelmente de fluoreto de cálcio, sendo mais denso para o grupo 500ppm do que para o grupo 1ppm. A análise de absorção de flúor revelou um comportamento cíclico de perda e ganho deste mineral ao longo do processo, mostrando perda final de flúor para o grupo 1ppm e ganho para o grupo 500ppm. Os testes de microdureza não reveleram diferenças estatisticamente significantes pré e pós-remineralização para ambos os grupos, entretanto, houve um ligeiro aumento numérico da dureza para o grupo 500ppm. Concluiu-se que a solução contendo 500ppm de flúor proporcionou a remineralização das lesões naturais de cárie de dentina, apresentando melhor efeito do que a solução contendo 1ppm de flúor, através da formação de um depósito superficial de compostos fluoretados, sem entretanto, produzir aumento estatisticamente significante da dureza superficial.

Palavras-Chave: Cárie de dentina; Flúor; Remineralização

Luz MAAC. *In vitro* remineralization of natural dentin caries lesions [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

Researches have showed the remineralization of enamel lesions in early stages of development as a established fact. This research studied the remineralization of natural dentin caries lesions, in a continued process, in a remineralizing solution with two different fluoride concentrations. Twenty human carious newly extracted teeth were identified, radiographed, photographed and randomly divided in two groups (N=10). Each caries lesion in each tooth was half divided. One half each lesion was individually submitted to a reminaralization process into a calcium and phosphate solution with 1ppm fluoride (group 1) or 500ppm fluoride (group 2), during thirty days, in 37°C, daily changed. The other half was divided in tow quarters, one quarter for scanning electron microscopy analysis and the other for microhardness analysis previous reminaralization process. After remineralization process each half lesion was also divided in two quarters, one of them for scanning electron microscopy analysis and the other for microhardness analysis. The fluoride content of the used solutions and of the initial solutions was measured using a fluoride ion analyzer. The difference of fluoride concentration into the solutions was considered absorbed by the caries lesion. The lesion square dimensions were calculated using the radiographs and two softwares. This way the absorptions was calculated by lesion unity square. SEM observations of the lesions showed images of mineral deposition on lesions surface, probably of calcium fluoride granules, which was more dense for 500ppm group than for 1ppm group. Fluoride absorptions analysis showed a cyclic behavior of fluoride loss and gain during all process. At the end of the process it was observed fluoride loss, considering all specimens of 1ppm group and fluoride gain considering all specimens of 500ppm group. Microhardness tests do not revealed significant differences before and after remineralization for both groups, nevertheless it was observed a numerical increase in microhardness values for 500ppm group. It was concluded that 500ppm fluoride solutions provided the remineralization of natural dentin caries lesions showing better effect than 1ppm solution, through a mineral surface deposition of fluorides, not producing a significant increase of the surface hardness.

Keywords: Dentin caries lesion; Dentin remineralization; Fluoride

SUMÁRIO

	р.
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Características da dentina sadia	18
2.2 Aspectos relevantes da cárie de dentina	22
2.3 Remineralização das lesões de cárie com ênfase nas lesões de dentina	37
2.4 Microdureza da dentina sadia, cariada e remineralizada	52
3 PROPOSIÇÃO	63
4 MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1 Material	64
4.1.1 Material e instrumental para armazenamento e identificação dos dentes	64
4.1.2 Material e instrumental para remineralização das lesões de cárie	65
4.1.3 Material e instrumental para observação ao MEV	65
4.1.4 Material e instrumental para testes de microdureza	66
4.1.5 Material e instrumental para análise da absorção de flúor	67
4.2 Métodos	68
4.2.1 Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa	68
4.2.2 Seleção dos dentes e exame das lesões	68
4.2.3 Preparo dos dentes para remineralização	91
4.2.4 Preparo dos espécimes para análises ao MEV e testes de microdureza pré-remineralização .	94
4.2.5 Análise ao MEV pré-remineralização	94
4.2.6 Análise de microdureza pré-remineralização	95
4.2.7 Remineralização	99
4.2.8 Análise ao MEV pós-remineralização	100
4.2.9 Análise de microdureza pós-remineralização	101
4.2.10 Análise de absorção de flúor	101
4.2.11 Cálculo da absorção de flúor	104
5 RESULTADOS	107
5.1 Análise em microscopia eletrônica de varredura	107
5.1.1 Análise das lesões pré-remineralização	107
5.1.2 Análise das lesões pós-remineralização	117

5.1.2.1 grupo 1ppm	117
5.1.2.2 grupo 500ppm	121
5.2 Análise de microdureza	125
5.3 Análise de absorção de flúor	128
6 DISCUSSÃO	133
6.1 Características das lesões de cárie de dentina ao MEV	138
6.2 Remineralização das lesões de cárie de dentina	140
6.2.1 Análise ao MEV	141
6.2.2 Absorção de flúor	146
6.2.3 Microdureza da dentina remineralizada	150
6.3 Considerações gerais	154
7 CONCLUSÕES	156
REFERÊNCIAS	157
APÊNDICES	165
ANEXOS	176

1 INTRODUÇÃO

A remineralização de lesões de cárie incipientes de esmalte tem sido motivo de vários estudos pela possibilidade de, através do uso do flúor, realizar tratamentos mais conservadores das lesões (ARENDS et al., 1987; DIJKMAN; SCHUTHOFF; ARENDS, 1986; HELLWING e LUSSI, 2001). Recentemente, a remineralização da dentina tem sido estudada (HEILMAN et al, 1997;HATIBOVIC-KOFMAN et al., 1997; MALTZ et al., 2002) pois acredita-se que seja uma técnica de grande benefício para se tentar controlar a progressão das lesões antes do tratamento restaurador propriamente dito. Desta forma poder-se-ia estar aumentando a possibilidade de manutenção da vitalidade pulpar em lesões de cárie profundas (MALTZ et al., 2002).

Jaeger (1988), por sua vez, observou através da microscopia eletrônica de varredura, que após 40 dias de capeamento indireto, a dentina remanescente apresentou um padrão tubular próximo do normal, com remineralização da dentina intertubular e algumas áreas de esclerose.

Pode-se supor que a remineralização das lesões de cárie de dentina seja um processo complexo ou até impossível uma vez que a formação da lesão envolve não somente a dissolução mineral como também a proteólise da matriz colágena. Entretanto, Arends et al. (1989a) demonstraram que, até mesmo se metade da quantidade de mineral originalmente presente em dentina sadia for removida com o ataque da cárie, a estrutura dentinária estará alterada, mas ainda bastante preservada. Os mesmos autores demonstraram que em três semanas de ataque de cárie, *in vivo*, os túbulos dentinários tornam-se alargados em cerca de 30%, sendo

que a perda mineral ocorre não só na dentina peritubular, mas também na intertubular.

Arends et al. (1990) destacaram a importância da presença do flúor no processo de remineralização da dentina cariada, sendo que os autores observaram que, além da remineralização interna da lesão reduzir sua profundidade em cerca de 20%, pode ocorrer uma super mineralização superficial, sendo que o grau de remineralização é proporcional ao nível de flúor presente na solução e à sua capacidade de difusão nos tecidos. Concentrações muito elevadas de flúor, entretanto, podem levar à precipitação de CaF2, o que seria indesejado.

Clarkson et al. (1991) e Wefel, Heilman e Jordan (1995) observaram clinicamente que, em cáries radiculares iniciais, a superfície de colágeno não suportado colapsa ou é abrasionada e que não é possível refazer ou readquirir esse tecido perdido através da detenção do processo ou da remineralização da lesão. A remineralização não ocorre sobre a matriz orgânica completamente sem mineral, mas apenas sobre mineral remanescente o que foi confirmado por Heilman et al. (1997) em estudo *in vitro*.

Entretanto, Larsen e Pearce (1992) demonstraram, através de um estudo complexo, que a remineralização de lesões de cárie de dentina pode ocorrer somente até uma profundidade na qual a supersaturação com relação às apatitas pode ser mantida. Os autores demonstram que por esse motivo a remineralização não ocorre em partes muito profundas das lesões e que, na maioria das vezes, está restrita a camadas superficiais.

Para Maltz et al. (2002) a escavação parcial da lesão de cárie no caso de capeamento indireto e do processo de ART, dispensaria a reabertura, considerando que o número de bactérias viáveis nestes casos é reduzido e que os sinais clínicos e

radiográficos da progressão das lesões são ausentes depois do selamento das mesmas, sugerindo uma remineralização.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características da dentina sadia

A observação da dentina não descalcificada de dentes humanos, realizada por Frank (1959), através de microscopia eletrônica, revelou que na predentina e na dentina próxima à polpa os processos odontoblásticos parecem ser extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, os quais preenchem o lúmem dos túbulos dentinários. Na dentina central e externa os processos odontoblásticos assumem a forma tubular, sendo que a dentina peritubular circunda tanto a projeção citoplasmática quanto a parte tubular do processo odontoblástico. O elevado grau de absorção de elétrons da dentina peritubular associado a áreas seletivas de difração de elétrons revelou a presença de apatita nesta área, concluindo-se que a dentina peritubular é mais calcificada que a dentina intertubular. A dentina peritubular consiste de uma matriz fibrilar com depósitos de elementos inorgânicos, ambos facilmente destruídos com 0 processo histológico de descalcificação. Ocasionalmente, em alguns túbulos, a dentina peritubular esteve ausente.

A observação microscópica da dentina fraturada de diferentes espécies de *mammalian*, segundo Boyde e Lester (1967), revelou que os aspectos estruturais, normalmente presentes na dentina intertubular, peritubular, túbulos e canalículos, foram claramente evidentes em todas as espécies examinadas, sendo que detalhes da estrutura dentinária também foram observados. A aparência da dentina intertubular variou de acordo com a presença ou ausência da fase fibrilar, enquanto

que evidências desta fase fibrilar na dentina peritubular foram restritas a alguns casos. Várias conformações fibrilares foram encontradas associadas às paredes tubulares as quais apresentaram um aspecto de lisura superficial com aparência quase idêntica à dentina peritubular. Ramos laterais dos túbulos, de vários tipos, foram claramente visualizados, sendo que uma pequena variedade destes pareceu confinada à dentina peritubular.

Mjör (1972) descreveu a estrutura da dentina e as características da mesma frente a reações pulpares. Segundo o autor, mais de 90% do componente orgânico da dentina é colágeno que está provavelmente distribuído de maneira uniforme na dentina intertubular. Fibras colágenas não mineralizadas e terminações nervosas podem ser encontradas no espaço periodontoblástico. Na dentina peritubular a matriz orgânica é escassa. Um aumento da mineralização da dentina humana tem sido relacionado com a idade, lesões de cárie, atrição, exposição dentinária à cavidade bucal e posterior aplicação de material restaurador. Este aumento de mineralização resulta de reações específicas que dependem das condições à que a dentina foi exposta. Esclerose pode ocorrer devido à idade simplesmente, ou devido a outros fatores: atrição, cárie, erosão, aplicação de Ca(OH)₂, observados *in vivo,* além de desmineralização e preparo cavitário, observados *in vitro*. O material de obturação dos túbulos detectado no estudo foram cristais rombóides ou em forma de agulha.

O estudo da dentina coronária incisal de dentes humanos, realizado por Tronstad (1973), através da microscopia eletrônica de transmissão, mostrou que a grande maioria dos túbulos dentinários estava aberta independentemente da idade. No interior dos túbulos foram identificadas uma certa variedade de estruturas fibrilares com diâmetros variando de 50nm a 0.7µm, nas quais ocasionalmente foram identificadas as bandas cruzadas típicas do colágeno. Algumas fibras apresentavam tendência à arborescência o que foi interpretado como fibras nervosas. Distúrbios de mineralização foram identificados na dentina central entre os cornos pulpares e a borda incisal; nesta área central os túbulos estavam ocluídos com um material de fina textura e a dentina peritubular foi dificilmente distinguível. Uma quantidade variável de dentina secundária foi observada nos cornos pulpares dos dentes jovens.

As propriedades dos cristais de fosfato de cálcio dos tecidos dentais são fortemente afetadas pelo meio ácido, pelos íons flúor e carbonatos do interior dos mesmos. O carbonato é naturalmente incorporado aos cristais de apatita durante sua formação e é responsável pela sua maior reatividade, o que leva à maior dissolução em meio ácido. Contrariamente, os íons flúor são responsáveis pela sua estabilidade no meio bucal, principalmente no ambiente da placa dental. A camada externa do esmalte dental tem alto conteúdo de flúor e baixo conteúdo de carbonato, provavelmente devido às trocas iônicas entre os fluidos dos tecidos vizinhos, durante a formação dental e, posteriormente, com os fluidos da placa após a erupção. Este aspecto da maturação dos minerais dentais é influenciado pelo equilíbrio mineral intra-oral e pelos tratamentos com flúor (KOULOURIDES, 1990).

Luz e Garone Netto (1995) em estudo sobre a permeabilidade dentinária concluíram que a camada de esfregaço, principalmente os tampões da entrada dos túbulos, são responsáveis pela restrição da permeabilidade da dentina. Por conseqüência, restringem também o deslocamento do fluido dentino-pulpar e a passagem de substâncias para o interior do complexo dentina-polpa. A camada de esfregaço se forma com a ação de qualquer instrumento rotatório ou manual sobre os tecidos dentais, podendo ser parcialmente removida com a ação de ácidos fracos, detergentes ou hipoclorito de sódio ou totalmente removida pelo ácido fosfórico a

37%, componente de alguns procedimentos adesivos, expondo a trama colágena dentinária superficial, removendo os tampões e alarlargando a entrada dos túbulos (LUZ, GARONE NETTO; ARANA-CHAVES, 2001).

O conteúdo mineral normal da dentina é encontrado em duas áreas: entre os túbulos, na dentina intertubular, e na dentina peritubular em íntima associação com as fibras colágenas. Os cristais de apatita da dentina são menores do que os de esmalte e estão aleatoriamente depositados ao longo das fibras colágenas. Estes cristais são de menor tamanho do que os de esmalte, com composição defeituosa por ter baixo conteúdo de cálcio e alto conteúdo de carbonato, levando a uma maior solubilidade e maior potencial para substituição iônica. A taxa cálcio/fósforo dos cristais de apatita da dentina é de 1.57, enquanto que da hidroxiapatita do esmalte é de 1.67. Estas características são de importância fundamental para os tratamentos preventivos e restauradores (MARSHALL JR, 1998).

A composição da dentina é de 70% de mineral e 20% de substância orgânica em relação ao seu peso, e, 50% de mineral e 50% de substância orgânica em relação ao seu volume. Como ocorre no esmalte, a fase mineral é representada pela hidroxiapatita mas os cristais têm dimensões muito menores do que os do esmalte. Os cristais podem ser hexagonais ou como lâminas, com secções transversais que variam de 3 a 30nm, com 50 nm de comprimento, o que resulta em uma maior proporção superfície/volume tornando-os mais reativos. Isto pode fazer com que a dentina apresente íons contaminantes que não sejam cálcio, fosfato e hidroxila, mais do que o esmalte (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005).

A matriz orgânica da dentina é composta de colágeno que se apresenta como uma tripla hélice com três cadeias de polipeptídeos entrelaçadas. Existem também muitos outros componentes que determinam as propriedades da matriz: fosfoproteínas, fosfolipídeos e proteoglicanos. Estes componentes são responsáveis pela formação dos núcleos minerais e pela regulação da mineralização durante a dentinogênese e por isto podem interferir também no processo de desmineralização e remineralização. Entretanto a principal estrutura de suporte da dentina é o colágeno que mantém juntos os cristais de apatita, sendo que alguns estão precipitados dentro da fina estrutura da hélice o que confere uma sinergia entre a matriz orgânica e a fase mineral. Isto pode fazer com que o mineral só possa ser parcialmente dissolvido pelo ataque ácido e a matriz só parcialmente digerida pela ação das enzimas, durante o ataque bacteriano pela cárie (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005).

A cárie de esmalte e a de dentina são geralmente descritas como duas entidades diferentes. Esta posição é explicável pelo fato de os tecidos diferirem consideravelmente, tanto em termos de origem quanto em estrutura de desenvolvimento. O esmalte é de origem ectodérmica e a dentina é de origem mesenquimal. O esmalte é avascular e não pode responder às injúrias, enquanto a dentina é parte integrante do órgão pulpar e por isto considerada um tecido vital pela presença dos odontoblastos, reagindo de modo específico às agressões externas (FEJERSKOV;NYVAD; KIDD, 2005).

2.2 Aspectos relevantes da cárie de dentina

Análises através de Raios X, microscopia comum e microscopia eletrônica (FRANK; WOLFF; GUTMANN, 1964) revelaram que as cáries de dentina

22

inorgânicos túbulos apresentam cristais no interior dos dentinários que correspondem a cristais de apatita, os quais se depositam progressivamente em uma matriz orgânica, que por sua vez, se origina de remanescentes de processos odontoblásticos destruídos, sendo que estes cristais acabam obstruindo os túbulos. Em estágios iniciais, da cárie de dentina, grandes cristais romboédricos de fosfato de cálcio (Ca₃(PO₄)₂), denominados "whitelockite" podem ser vistos em túbulos esclerosados e algumas vezes nos limites entre a dentina peritubular e o túbulo obstruído e outras, no próprio interior dos túbulos. Os autores observaram também microorganismos invadindo a dentina peritubular e o lúmen dos túbulos. Uma desmineralização difusa da dentina peritubular precede a lise da matriz orgânica provocada pela invasão bacteriana que resulta na formação de grandes crateras preenchidas com bactérias. A confluência ou junção destas crateras resulta na zona de completa destruição.

Para Mjör (1972) a dentina secundária irregular, também chamada de terciária, representa um tecido cicatricial que se forma como resposta a lesões locais sendo irregular e suas características histológicas dependem do número de odontoblastos associados ao processo. É um tecido de importância biológica, entretanto, contém mais material orgânico do que a dentina normal e portanto pode ser mais permeável do que a dentina primária. Para o autor, na prevenção de danos pulpares, o tratamento deve ser conduzido de modo a reduzir a permeabilidade dentinária mais do que estimular a formação de dentina secundária ou reacional.

Ohgushi e Fusayama (1975) concluíram, em estudo com microscopia eletrônica de lesões produzidas *in vivo* e *in vitro*, que as estruturas orgânicas e inorgânicas das duas camadas de cárie de dentina (externa e interna) são diferenciadas através da coloração com fucsina básica 0,5% em propileno glicol.

Cortes ultrafinos destas lesões foram obtidos, sendo metade destes observados sem descalcificação (para estruturas inorgânicas) e metade com descalcificação (para estruturas orgânicas). A camada interna da dentina cariada, adjacente à dentina sadia, não se corou e apresentou a dentina intertubular parcialmente descalcificada com os cristais de apatita dispostos como "franjas" unidas às fibras colágenas sadias, apresentando bandas e interbandas distintas. Nesta camada, a dentina peritubular teve sua espessura reduzida, mas a trama colágena e os processos odontoblásticos puderam ser identificados. Na camada externa, corável pela fucsina, a dentina intertubular mostrou-se muito descalcificada, apresentando cristais granulares ou em forma de folhas irregularmente espalhados. As fibras colágenas remanescentes são poucas e deterioradas, apresentando bandas dificilmente identificáveis, não apresentando interbandas. A dentina peritubular bem como os processos odontoblásticos estavam ausentes e a abertura dos túbulos apresentou-se preenchida com cristais de formatos variados.

Nas cáries crônicas, a camada naturalmente escurecida, que se interpõe entre a camada externa e interna, é menos corável pela fucsina, entretanto o exame das estruturas revelou que esta camada apresenta características da camada externa. Nas cáries agudas a dentina peritubular não se distingue da intertubular e os túbulos encontram-se preenchidos com os mesmos cristais que se espalham de modo irregular sobre a dentina intertubular, em forma de folha ou de disco (OHGUSHI; FUSAYAMA 1975).

Kuboki, Ohgushi e Fusayama (1977) estudaram as alterações bioquímicas que ocorrem nos processos de cárie de dentina e verificaram que não há alterações na composição padrão dos aminoácidos das fibras colágenas, tanto da primeira quanto da segunda camada de cárie, em comparação com a dentina sadia.

alterações bioquímicas Entretanto, marcantes nas ligações cruzadas intermoleculares das fibras colágenas foram observadas nas camadas de cárie, de modo distinto. Na segunda camada de cárie observaram menor número de ligações cruzadas e aumento do aldeído precursor destas ligações, alterações consideradas reversíveis. Na primeira camada, além da diminuição das ligações cruzadas, houve diminuição marcante dos precursores. com aumento das hexitolisinas (polissacarídeo relacionado ao metabolismo bacteriano), além de diversos outros compostos desconhecidos. Estas alterações da primeira camada indicam alteração irreversível das ligações cruzadas das fibras colágenas, nesta camada de cárie.

Através de estudo in vivo, em dentes humanos e em dentes de cães, Miyauchi, Iwaku e Fusayama (1978) confirmaram a possibilidade de recalcificação da camada interna da cárie de dentina. O estudo foi realizado em 3 pares de dentes humanos em que, após a remoção da camada externa da dentina cariada utilizando fucsina básica em propilenoglicol, um elemento foi imediatamente extraído e o outro vedado com cimento de policarboxilato de zinco e extraído 3 meses após. Na outra parte do estudo, 4 caninos de cães receberam preparos cavitários de classe V em cujas paredes de fundo foi provocada desmineralização através de um método químico. Em seguida estas paredes receberam um dos seguintes tratamentos: deixadas expostas ao meio bucal ou vedadas com cimento de policarboxilato ou capeadas com óxido de zinco e vedadas com cimento de policarboxilato ou ainda capeadas com hidróxido de cálcio e vedadas com cimento de policarboxilato. Em todos os grupos observou-se aumento da quantidade de cálcio (Ca) analisado através de eletromicrosonda, além do aumento da microdureza, especialmente nas cavidades expostas ao meio bucal e capeadas com hidróxido de cálcio, cujos valores das medições foram superiores aos dos demais grupos. Entretanto, as cavidades expostas apresentaram diminuição da quantidade de Ca e diminuição da microdureza até a profundidade de 10µm a partir da superfície.

Para Fusayama (1979), a cárie de dentina apresenta duas camadas distintas que apresentam estruturas ultramicroscópicas e químicas diferentes. Uma é a camada externa, irreversivelmente desnaturada, infectada e não remineralizável e que necessita ser removida no tratamento das lesões. A outra é a camada interna, reversivelmente desnaturada, não infectada e remineralizável, por isto preservada no tratamento das lesões. Segundo Fusayama (1979), estas duas camadas podem ser distinguidas clinicamente, através da aplicação de corante à base de fucsina básica em propileno glicol a 0,5%, que cora apenas a camada externa. Esta diferenciação permitiria a completa remoção da camada infectada com total preservação da camada interna remineralizável, sendo ainda o corante biocompatível com a polpa dental. Para o autor, o amolecimento e a descoloração da dentina contaminada não são parâmetros para possibilitarem sua total remoção com preservação da camada afetada.

Frank e Vogel (1980), estudaram a ultra-estrutura dos processos odontoblásticos em cárie de dentina. A análise das lesões de cárie de dentes humanos, com microscopia eletrônica de transmissão e difração de elétrons, mostrou que na camada interna da dentina, abaixo da zona translúcida, não há sinais de degeneração odontoblástica os quais mostraram-se ricos em microfilamentos, microtúbulos e grandes vacúolos. Foram detectadas calcificações intratubulares e até um início de calcificação dos espaços periodontobláticos, seguido de calcificação do processo odontoblástico ou por uma calcificação inicial intracitoplasmática, seguida de mineralização periodontoblástica secundária. Os processos odontoblásticos não se retraem e nem se regeneram antes da esclerose,

sendo envolvidos pelos minerais, podendo atuar como matriz para a mineralização que pode iniciar por eles ou pelos depósitos periodontoblásticos. Normalmente o processo odontoblástico não se estende além da camada interna da dentina. Os depósitos iniciais de cristais inorgânicos, no espaço periodontoblástico, constituem cristais "whitelokite", com presença de hidroxiapatita em estágios posteriores.

Com a finalidade de estudar as alterações das camadas de cárie de dentina em comparação com a dentina sadia, Shimizu et al. (1981) realizaram estudos com microscopia eletrônica de cortes ultrafinos (0,1µm) de dentes cariados, pelo método "longspan" através do qual obtiveram cortes desde a polpa até o assoalho cavitário em uma única peça. Pequenos fragmentos de dentina normal e de dentina da camada profunda da cárie, vizinhos ao longo fragmento, também foram estudados. Foram observadas alterações graduais e contínuas desde as camadas mais profundas até a camada superficial da lesão. A união periódica dos cristais de apatita às fibras colágenas tornam-se gradualmente indistinguível a partir das camadas mais profundas, em direção à camada superficial, devido à dissolução periférica dos cristais de apatita. Na camada externa, esta alteração é abrupta e definitiva, sendo que o arranjo das fibras e a união periódica dos cristais desaparecem; há alta dissolução dos cristais, de modo irregular que agora aparecem sem nenhuma relação com a matriz colágena. Na camada interna, não foram observadas alterações na espessura da dentina peritubular, entretanto, na camada externa, esta se encontrava por vezes comprimida ou perdida pela invasão bacteriana.

Para Ogawa et al. (1983) a cárie de dentina consiste basicamente de duas camadas: 1. lesão externa que está irreversivelmente desnaturada, não remineralizável, infectada e não vital; 2. lesão interna que é reversivelmente

desnaturada, fisiologicamente remineralizável, não infectada e vital. Esta camada interna está dividida internamente em camada descolorida, camada transparente e camada subtransparente. A camada transparente da cárie de dentina é a camada mais profunda da dentina afetada. Depósitos intratubulares de finos cristais foram inicialmente observados na camada mais superior da dentina normal, aumentando na camada subtransparente e gradualmente substituídos por depósitos de cristais rombóides na camada transparente. Estes cristais não foram identificados na camada imediatamente superior, a camada descolorida, que é amolecida devido à desmineralização da dentina intertubular e peritubular a qual tem início no fundo da camada subtransparente e vai aumentando em direção ao meio externo (OGAWA et al.,1983).

Arends et al. (1987) realizaram estudo da cárie de esmalte analisando fragmentos submetidos ao desafio criogênico, *in situ*, por quatro semanas, período em que as superfícies de esmalte com cáries iniciais foram submetidas à análise microrradiográfica e análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), realizadas nos mesmos fragmentos, para avaliação do conteúdo mineral. Os resultados mostraram um remanescente mineral de cerca de 50%, com porosidades presentes ao nível dos prismas e na região interprismática e muito raramente ao nível de cristais, indicando perdas minerais nestas áreas. A morfologia superficial do esmalte desmineralizado, em aumentos microscópicos pequenos, mostrou-se semelhante ao esmalte sadio, entretanto, em aumentos maiores, as porosidades superficiais tornaram-se visíveis.

Jones e Boyde (1987), realizaram um importante estudo da dentina cariada, utilizando várias técnicas de microscopia eletrônica. Análises ao Mev demonstraram ausência de dentina peritubular, redução da densidade da dentina intertubular, com

28

formação de fendas ou orifícios. No fundo das lesões, na área do "front", há um considerável aumento na densidade do tecido dentinário, notado em pequenos aumentos microscópicos, sendo que em altas resoluções, foi possível notar que este aumento de densidade representa acúmulo de material elétron-denso no interior dos túbulos, algumas vezes junto à dentina peritubular. As formas gerais das lesões de esmalte e de dentina coronária são de triângulo com base junto ao l.a.d. com extensão igual, nesta área, para ambos os tecidos. A progressão da lesão em esmalte ocorre na direção dos prismas, em dentina na direção dos túbulos e em cemento na direção das fibras de Sharpey. A extensão lateral das lesões depende da extensão da cárie.

Em lesões muito profundas, Jones e Boyde (1987) encontraram a formação de dentina secundária (reacional) abaixo da dentina primária cariada em que se vê áreas sem túbulos ou com disposição muito irregular destes, entrecortando áreas com túbulos irregularmente orientados. As lesões profundas apresentam outros aspectos particularmente importantes: presença de dentina peritubular projetando-se das superfícies reabsorvidas, muito mais do que ocorre nas projeções fisiológicas com osteoclastos em dentina normal. Estes túbulos com a dentina peritubular projetada podem ainda conter um material cilíndrico central que pode projetar-se mais do que a dentina peritubular. Para os autores este material se deposita no interior dos túbulos durante o avanço da lesão e está freqüentemente relacionado à resposta fisiológica normal dos odontoblastos frente ao processo patológico. Pode também se tratar de redeposição de mineral dissolvido pelo processo bacteriano nas lesões avançadas de cárie. Nestas, a matriz colágena se apresenta exposta pelo processo de reabsorção.

Nas lesões controladas, a dentina envolvida pela cárie oclusal e proximal é resistente à reabsorção. Nestas, é possível verificar-se até a projeção da dentina remineralizada e a reabsorção da dentina afetada pela cárie em dentes decíduos. Em dentes permanentes estas áreas controladas aparecem como um tecido polido que se assemelha ao cemento. Este aumento do nível de mineralização que pode ser observado abaixo das lesões oclusais e proximais, mas não lateralmente, pode ocorrer devido à liberação de cálcio e fosfato da dentina das áreas afetadas. Observações em "backscattered eletron" (BSE) associada à MEV permitiram afirmar que estes novos cristais de fosfato de cálcio podem apresentar maior resistência ácida do que os cristais de apatita originais o que pode requerer condições biológicas especiais para a sua dissolução. Isto poderia explicar a dificuldade de reabsorção das lesões oclusais e proximais. Outra explicação seria que a dentina afetada poderia conter uma matriz orgânica alterada por produtos bacterianos o que dificultaria o processo enzimático de reabsorção (JONES; BOYDE, 1987).

Em cáries radiculares a lesão se estende mais em superfície do que em profundidade, com remoção seletiva da dentina peritubular como nas lesões coronárias. Nas áreas de dentina desmineralizada, mas não totalmente removida, uma interessante estratificação foi notada, paralela às linhas incrementais de dentina, provavelmente decorrente da penetração bacteriana através dos canalículos (JONES; BOYDE, 1987).

Quando a lesão de cárie se estende para a junção amelodentinária, o primeiro sinal de desmineralização da dentina pode ser visto ao longo desta junção como uma descoloração de tom acastanhado, sem se estender além dos limites da área de contato da lesão de esmalte. As reações dentinárias laterais aos limites da lesão em esmalte representam continuação das reações dentino-pulpares aos estímulos transmitidos pela lesão de esmalte (BJORNDAL¹, 1991 apud FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005).

As características do fluido interno das lesões de cárie de esmalte são diferentes das do fluido da placa dental, sendo que o fluido da lesão pode ser definido como aquele que preenche os poros do corpo da zona escura e da zona translúcida. O fluido da zona superficial, por sua vez, pode ter características do fluido interno e do fluido da placa, sendo uma mistura de ambos (LARSEN; PEARCE, 1992).

Wefel, Heilman e Jordan (1995) estudaram lesões de cárie radicular desenvolvidas artificialmente por diferentes métodos químicos. As lesões desenvolvidas foram avaliadas através de microscopia de luz polarizada e através de microrradiografias de contato, nas quais identificaram de modo geral, duas zonas histológicas que eram sempre distintas em todas as lesões: a zona do "front" e o corpo da lesão. Nos modelos experimentais que continham flúor, as lesões desenvolvidas apresentaram bandas de remineralização no corpo da lesão, além de menor contração superficial.

Em revisão de literatura, Luz e Birman (1996) abordaram os aspectos clínicos, terapêuticos e preventivos da cárie em pacientes com hiposalivação e concluíram que além do estímulo do fluxo salivar, o tratamento destes pacientes deve incluir o combate à placa bacteriana através da orientação de higiene bucal e o emprego de agentes químicos, além do uso do flúor como agente facilitador da remineralização. Quanto aos tratamentos restauradores, os cimento de ionômero de vidro (CIV) seguidos do amálgama de prata são os materiais mais indicados.

¹ Bjorndall L. Carieslesionens tidligeudvikling I emlje og pulpa-dentinor-ganet. Dissertation. Copenhagen: Univ of Copen, 1991.

Segundo Fejerskov (1997), a cárie dental não é uma doença por si só e não é um evento simples. A cárie é conseqüência do acúmulo de eventos, um processo que se desenvolve ao longo de um período de tempo. É um processo dinâmico de desmineralização e remineralização resultante do metabolismo bacteriano junto à superfície dental que pode resultar na perda mineral levando ou não à cavitação, resultante de um desequilíbrio fisiológico, já que a placa dental bacteriana habita normalmente a superfície dos dentes. O autor sugere que o termo "cárie dental" se refira apenas à perda mineral, ou seja, à cavidade formada, quando presente clinicamente. A cárie dental não se desenvolve de maneira contínua e ininterrupta, ao contrário, apresenta estágios de interrupção. O modo como a lesão de cárie se desenvolve em esmalte, dentina, dentina radicular e / ou cemento é um pouco diferente em cada tecido, sendo que por este motivo estas lesões podem responder diferentemente tanto aos tratamentos operatórios quanto aos tratamentos com flúor. Além disto, os tratamentos com flúor podem resultar em respostas diferenciadas dependendo do estágio de desenvolvimento das lesões, se predominantemente não cavitadas ou cavitadas. Com relação ao benefício promovido pelo flúor no desenvolvimento das lesões de cárie dental, no passado acreditava-se que era promovido principalmente pelo íon incorporado na apatita o que conferia resistência ao desenvolvimento das lesões, levando ao extenso uso do flúor sistêmico. Atualmente, reconhece-se que o flúor exerce efeito cariostático predominantemente por interferir na dinâmica do processo de desenvolvimento da lesão, na interface entre a superfície mineral dental e o fluido oral e/ou fluido da placa dental (FEJERSKOV, 1997).

Segundo Marshall Jr (1998), a desmineralização provocada pela cárie, assim como o tratamento ácido da dentina, removem preferencialmente a dentina

peritubular, causando uma alteração do formato dos túbulos, tornando-os afunilados. O ataque ácido também desmineraliza a dentina intertubular adjacente. Estudos em microscópio de força atômica (AFM), realizados pelo autor, demonstraram claramente, em dentina desmineralizada artificialmente em ácido nítrico diluído, as características de afunilamento dos túbulos, provocadas pela desmineralização da dentina peritubular e deixaram evidente que a matriz intertubular começa a contrair ou colapsar nos estágios iniciais de desmineralização. Sendo assim, mesmo uma pequena desmineralização dentinária provocaria alterações geométricas de superfície.

Para Featherstone (2000), o estudo dos mecanismos de desenvolvimento da cárie dental é responsável pelas novas abordagens preventivas e de controle do desenvolvimento das lesões. Estes métodos incluem a terapia com flúor para inibição da desmineralização e aumento da remineralização, provas de consultório para detectar quantidade de bactérias cariogênicas, estabelecimento do risco de cárie individual através de programas de computador, anticorpos IgA produzidos pela engenharia genética para inibirem a recolonização bacteriana da superfície dental, antibioticoterapia através do uso controlado da clorexidina, laserterapia específica (CO₂) para remoção da cárie e tratamento preventivo dos tecidos. Tratamentos estes indicados tanto para crianças quanto para adultos.

Bactérias do biofilme raramente estão presentes no interior da lesão de cárie antes da cavitação da superfície. Entretanto, em lesões não cavitadas, a dentina pode apresentar-se amolecida com ligeira perda de estrutura superficial (RATLEDGE; KIDD; BEIGHTON, 2001)

Maltz et al. (2002) observaram a paralisação de lesões de cárie após o período de 6 a 7 meses da remoção incompleta das lesões e selamento das

cavidades com óxido de zinco e eugenol do tipo II. A avaliação radiográfica antes e após tratamento sugeriu ganho mineral. A contagem de bactérias revelou significativa redução de aeróbicas, anaeróbicas, *S.mutans* e *lactobacillus*, indicando redução ou ausência da atividade bacteriana. Estes resultados levaram os autores ao questionamento do procedimento de escariação de lesões profundas em duas etapas com a reabertura da cavidade para completar a remoção do tecido cariado, mantido na primeira escariação. Além da possibiidade de exposição pulpar na segunda escariação, a redução de bactérias viáveis e a ausência de sinais clínicos e radiográficos de progressão da lesão apontam para a capacidade de defesa do órgão pulpar.

Segundo Kidd e Fejerskov (2004), a lesão de cárie é decorrente do processo de alterações substanciais de pH no interior do biofilme dental. Este por sua vez é onipresente e decorre de fenômenos naturais que ocorrem diuturnamente na cavidade bucal. O resultado destas alterações de ph pode ser visível inicialmente (1^a semana) através de análises químicas e ultra-estruturais (nível sub-clínico). No prazo de 2 a 4 semanas as alterações de pH do biofilme dental podem resultar em uma perda mineral mais substancial , detectável clinicamente. A aparência clínica desta lesão pode variar desde uma perda superficial até uma grande destruição. A remoção regular do biofilme através da escovação dental, de preferência com dentifrício fluorado, adia ou até paralisa o desenvolvimento da lesão, sendo que isto pode ocorrer em qualquer estágio de progressão da mesma, porque é o biofilme que dirige o processo. A formação do biofilme sobre a estrutura dental não pode ser totalmente prevenida, mas pode ser controlada.

A reação de defesa mais comum do complexo dentina-polpa frente à presença do biofilme, nos processos de cárie é a esclerose tubular e a formação de

dentina reacional. A esclerose tubular pode ser observada antes da frente bacteriana atingir o limite amelo-dentinário. Quando esta junção é atingida, é possível observarse a descoloração da dentina que se torna amarronzada, sendo os primeiros sinais de sua desmineralização. Esta descoloração nunca ultrapassa os limites da lesão de esmalte em contato com a junção amelo-dentinária, o que representa simplesmente a reação à presença do biofilme em contato com a superfície da lesão. Portanto, o controle do biofilme, mesmo em lesões que atingem a dentina, através de sua remoção ou do selamento cavitário, pode paralisar ou retardar o desenvolvimento da lesão de cárie (KIDD; FEJERSKOV, 2004)

As cáries de dentina radicular desenvolvem-se de modo semelhante às de esmalte, com desmineralização subsuperficial maior que a superficial. Entretanto, a superfície destas pode se apresentar amolecida mesmo nos primeiros estágios de desenvolvimento da lesão. Observa-se a penetração bacteriana em estágios anteriores ao da cárie coronária. Apesar destas lesões se apresentarem normalmente extensas, sua profundidade varia de 0,5 a 1mm. Esta lenta invasão bacteriana e degradação tecidual conferem oportunidade à paralisação das lesões radiculares através do controle da placa bacteriana pela escovação dental com dentifrício fluoretado. Foram as conclusões a que chegaram Kidd e Fejerskov (2004), no Workshop Internacional sobre Aspectos Clínicos da Cárie Dental.

O esmalte, mesmo sadio é poroso e por isto deixa passar estímulos do meio bucal em direção ao órgão dentino-pulpar. Com a desmineralização provocada pela cárie, há um aumento das porosidades e os estímulos externos chegam até o órgão dentino-pulpar com maior facilidade (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005).

O primeiro sinal de resposta da dentina à lesão do esmalte que pode ser visualizado ao microscópio óptico é a esclerose tubular, que se forma na porção

mais profunda da progressão da lesão do esmalte. A esclerose tubular inicial é observada antes que a frente de avanço da lesão do esmalte alcance a junção amelo-dentinária. Tem-se assumido que quando a cárie de esmalte atinge a dentina, trata-se de um estágio de progressão que requer tratamento operatório para controlar avanço da lesão (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005).

A invasão tubular superficial de bactérias evidente na dentina coronária não é notada antes da exposição direta da dentina à biomassa bacteriana na cavidade. Condição semelhante ocorre quando as bactérias se acumulam diretamente nas superfícies radiculares expostas, levando à formação de lesões de cárie ativas. Entretanto, estas lesões iniciais podem ser controladas com tratamento não restaurador apropriado, podendo-se concluir que a invasão bacteriana por si só não pode representar uma indicação para o tratamento restaurador. Logo após a exposição da dentina às massas bacterianas da cavidade de cárie, sua superfície é decomposta devido à ação dos ácidos e das enzimas proteolíticas, formando a zona de destruição. Sob esta zona, caracteriza-se a zona de invasão bacteriana dos túbulos dentinários. Se a progressão da lesão é muito rápida, é comum observarem-se os chamados "tratos mortos" que representam áreas em que os processos odontoblásticos foram destruídos sem que ocorresse a esclerose tubular. Estes túbulos vazios são invadidos por bactérias e quando se unem formam os "focos de liquefação" (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005).

A cárie dental é um processo dinâmico que compreende episódios intermitentes de desmineralização e remineralização. Em pH baixo, quando o microambiente está insaturado com relação ao mineral dental, a desmineralização ocorre. Ao contrário, quando os líquidos que circundam os tecidos dentais estão supersaturados, os minerais dissolvidos reprecipitam remineralizando a lesão.
Quando a remineralização predomina, a lesão de cárie estaciona ou até mesmo regride (TANTBIROJN et al., 2006)

2.3 Remineralização das lesões de cárie com ênfase nas lesões de dentina.

Wei, Kaqueler e Massler (1968) confirmaram, em estudo *in vitro*, a hipótese de que a dentina cariada desmineralizada poderia ser remineralizada. Com base em evidências radiográficas e microrradiográficas, os autores verificaram que o tratamento destas lesões, com fluoreto de estanho a 10%, foi capaz de remineralizar a dentina cariada melhor do que outras soluções remineralizantes não fluoretadas. Após a remineralização os autores também verificaram resistência à penetração de corantes como o azul de toluidina ou o "orange G", além da deposição de um material elétron denso na matriz dentinária das lesões, através da microscopia eletrônica de transmissão.

Wescott, Starck e Shanon (1975) comprovaram, em estudo *in vivo* de 24 pacientes submetidos à radioterapia com cobalto – 60, que o tratamento com fluoreto de estanho a 0,4% em gel aplicado com escova dental, associado à rigorosa orientação de higiene bucal, durante o tratamento radioterápico, foi eficiente na redução da perda mineral do esmalte e da dentina radicular, tanto nos pacientes com total colaboração quanto naqueles com colaboração esporádica. Em nove pacientes que não cooperaram de modo algum, 57 coroas foram amputadas pela cárie dental e 75 novas superfícies cariadas foram detectadas até 3,75 anos após o tratamento. Em seis pacientes com total cooperação que utilizaram o flúor

diariamente, nenhuma coroa foi amputada pela cárie e nenhuma nova superfície cariada foi detectada no mesmo período de tempo.

A absorção de flúor pelos tecidos dentais, como parte do processo de remineralização, favorece a formação de precipitados que melhoram a resistência destes tecidos a subseqüentes ataques ácidos (OSTROM et al., 1984). Segundo os autores, a reação entre o esmalte, o desafio cariogênico e o flúor resultam em um aumento da resistência do esmalte à cárie dental. De acordo com o que foi observado neste estudo e que outros autores denominaram de teoria da adaptação do esmalte ao desafio cariogênico, no processo de desmineralização o esmalte se beneficia do flúor do ambiente bucal de duas maneiras: aumentando a taxa de remineralização e aumentando a resistência superficial quando o flúor é incorporado em altas concentrações, assemelhando-se à resistência do início do processo. De acordo com esta teoria, indivíduos com alta atividade de cárie, tratados com aplicações de flúor, desenvolveriam maior resistência em áreas normalmente susceptíveis do que indivíduos com baixa cariogenicidade.

Mellberg e Mallon (1984) observaram através de estudo quantitativo com microrradiografias, comparando lesões tratadas com lesões não tratadas, a ocorrência de uma significante remineralização da camada superficial e do corpo de lesões de cárie artificial, desenvolvidas em superfície de esmalte desgastado, tratadas com 75 a 900ppm de flúor através de MFP, NaF, a combinação de ambos, ou água, duas vezes ao dia, por dez dias, sendo que entre os tratamentos as lesões permaneceram em solução remineralizante a 37°C. Todos os grupos mostraram significante remineralização, inclusive com água (controle), entretanto os tratamentos com flúor aumentaram significativamente a remineralização. Aumentos

da concentração de NaF produziram apenas um pequeno efeito na remineralização, entretanto o MFP foi mais efetivo em concentrações mais elevadas.

Estudo *in situ* em 11 participantes, realizado por Dijkman, Schuthoff e Arends (1986), sugere que a remineralização natural sem fornecimento de flúor adicional, depende mais do ambiente bucal do que das propriedades do esmalte. O estudo verificou que, após seis semanas de indução de cárie por placa bacteriana em fragmentos de esmalte humano, obteve-se o desenvolvimento de lesões com cerca de 47µm de profundidade e com perda mineral de 1,284%vol/µm. Após seis semanas do ajuste das condições experimentais para propiciar a remineralização, 80% dos espécimes remineralizaram significativamente, enquanto 20% continuaram a desmineralizar.

Arends et al. (1989b) realizaram um estudo remineralizando lesões de cárie de dentina produzidas artificialmente por método químico em gel ácido, em dentes bovinos. Lesões aproximadamente 180µm profundidade com de foram remineralizadas por 8 a 21 dias em solução contendo Fluoreto de Sódio (0.02, 2 ou 10ppm), 1,5mM de Cálcio, 0,9mM de Fosfato, em pH 7.0 a 37°C. A amostra foi analisada através de microrradiografias e microscopia eletrônica de varredura e os resultados demonstraram que a remineralização, sem a presença de flúor, produziu uma diminuição da perda mineral e da profundidade da cavidade. Entretanto guando o flúor foi incorporado à solução, houve um aumento do acúmulo mineral substancial de cerca de 67 a 70 %/vol, respectivamente para 2 ou 10ppm de flúor, sendo que este acúmulo ocorreu nas proximidades da superfície externa das lesões, mais do que no interior das mesmas, tanto na dentina intertubular quanto no interior dos túbulos, sendo que no interior destes foram observados precipitados densos. A

superfície externa de lesões de cárie de dentina pode ser super remineralizada em soluções contendo flúor.

Níveis de *Streptococcus mutans* na placa dental das margens de restaurações de classe II de amálgama (Dispersalloy), resina composta (P-10) e cimento de ionômero de vidro (Ketac Silver) foram comparados em primeiros molares de 51 crianças. A percentagem de *Streptococcus mutans* em relação ao total de UFC (unidades formadoras de colônias) foi maior nas restaurações de resina (13,7%) e nas de amálgama (4,3%) do que nas de cimento de ionômero (1,1%). Estas diferenças foram estatisticamente significantes entre os três materiais (SVANBERG; MJÖR; ORSTAVIK,1990).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ação cariostática do flúor que por isto tem sido descrita como multifatorial. Com respeito à reatividade dos cristais de apatita, dois fatores devem ser considerados: Primeiro é que o flúor incorporado ao cristal confere resistência à solubilidade em ácido. Este flúor incorporado transforma o cristal com carbonato em um cristal com flúor, muito mais resistente; entretanto o flúor incorporado após a formação do cristal está presente em níveis inferiores aos dos cristais de fluorapatita, sendo liberado durante os processos de cárie favorecendo a remineralização e inibindo a desmineralização; segundo, é que o flúor iônico presente nos fluidos da placa dental ou nos fluidos entre os cristais dos tecidos dentais, desequilibra a reação de desmineralização / remineralização em direção à remineralização , diminuindo os danos causados pelo ataque da cárie e levando à formação de um cristal mais resistente. Ambos os fatores relativos à reatividade dos cristais de apatita protegem a estrutura dental contra o ataque da cárie (KOULOURIDES, 1990).

Outro aspecto da efetividade do flúor contra o desenvolvimento de lesões de cárie diz respeito à concentração ideal deste íon para que o benefício aconteça. Deve-se enfatizar que toda a aplicação tópica de flúor, incluindo as de consultório e as auto-aplicações promovem um benefício de 30 a 50% na redução da cárie dental o qual é compatível com o benefício causado pela água de abastecimento com 1ppm de flúor. Não há dúvida de que a freqüência do contato do flúor com os tecidos dentais promove uma grande proteção contra o desenvolvimento de lesões de cárie. Qualquer método que ofereça flúor em uma concentração mínima eficiente, em maior ou menor freqüência será benéfico para a prevenção do desenvolvimento da cárie dental (KOULOURIDES, 1990).

Arends et al. (1990) compararam quantitativamente a remineralização de dentina humana com a bovina, através de microrradiografias e concluíram que em ambos os casos a eficácia do processo é proporcional à raiz quadrada do nível de flúor presente na solução remineralizante e concluíram também que a quantidade de mineral depositado em dentina é controlada pela difusão de fluoretos no interior dos tecidos. Apesar de existir uma diferença quantitativa numérica na remineralização de ambos os tecidos, o processo ocorre de modo bastante semelhante tanto em dentina humana quanto em dentina bovina. A presença de flúor nas soluções remineralizantes é essencial para a eficácia do processo, *in vitro*, ocorrendo até mesmo uma super remineralização.

Com intuito de elucidar aspectos importantes da remineralização das lesões de cárie, Larsen e Pearce (1992), estudaram a difusão de íons ácidos e alcalinos nas lesões de esmalte e observaram que esta difusão é restrita e o pH do fluido interno das mesmas se mantém com certa estabilidade. A estabilidade do pH do corpo da lesão depende se sua superfície está coberta, da espessura e do grau de

porosidade desta camada superficial e do tamanho interno da lesão em relação à superfície. A estes fatores acrescenta-se a capacidade tampão do esmalte, sendo que qualquer alteração do pH deste, normalmente está acompanhada de alterações de sua solubilidade.

Larsen e Pearce (1992) também observaram que a remineralização das lesões de esmalte não ocorre em profundidade porque esta depende da penetração de certos íons, acontecendo até a profundidade em que a supersaturação em relação à apatita possa ser mantida. Por isto esta é restrita às camadas externas das lesões. Sendo assim, algumas das lesões observadas neste estudo apresentaram-se quase que isoladas do meio circundante por uma camada externa espessa, com aparência vitrificada clinicamente. A remineralização pode ocorrer em profundidade apenas quando esta camada externa for rompida. Algumas lesões sem a camada superficial apresentaram uma camada secundária bem mineralizada, mais profunda, a qual pode ser resultado da remineralização. Segundo os autores, a remineralização completa das camadas mais profundas das lesões de esmalte não pareceu ser possível.

lijima et al. (1993) demonstraram que a dentina enriquecida com flúor, altamente mineralizada ou hipermineralizada é mais ácido resistente do que a dentina sadia ou desmineralizada. Os autores realizaram o estudo em dentina desmineralizada em gel ácido (pH 5.0) e remineralizada em solução contendo 1.5 mM de cálcio, 0.9mM de fosfato e 10ppm de flúor, em pH7.0 a 37°C, por 8 dias. A amostra foi novamente submetida à desmineralização nas mesmas condições iniciais, por uma duas ou três semanas e submetida à análise de conteúdo de flúor e distribuição de conteúdo de flúor utilizando técnicas diferenciadas. Os resultados demonstraram que o conteúdo de flúor da dentina hipermineralizada se mantém

42

semelhante após a desmineralização, sendo que estes valores são bem superiores aos valores do conteúdo de flúor da dentina sadia, ocorrendo sim uma redistribuição do conteúdo mineral em partes mais profundas levando ao fenômeno da laminação. Portanto o desafio ácido da dentina hipermineralizada pode conduzir a uma redistribuição do depósito mineral, inicialmente superficial, para partes mais profundas da dentina.

Ao estudarem alguns mecanismos de ação do flúor tópico na prevenção da cárie dental, White, Nelson e Faller (1994) observaram a ação do NaF em forma de creme dental no processo de remineralização de lesões de esmalte produzidas *in vitro*, através do processo de ciclagem DES-RE, e verificaram a formação de diferentes compostos fluorados, principalmente a fluoridroxiapatita, apesar de não ser este cristal necessariamente o primeiro produto de reação; outros compostos não específicos também foram formados e posteriormente transformados em fluoridroxiapatita. No mesmo estudo, testes de microdureza e microrradiografias revelaram que estes cristais formados endureceram a superfície do esmalte em comparação com a superfície desmineralizada, tornando-a mais resistente ao ataque ácido posterior. Teoria do Acid Atac Resistence, "AAR" (KOULOURIDES², 1982 apud WHITE; NELSON; FALLER, 1994).

O flúor na dentina de dente íntegro somente é incorporado através da ingestão sistêmica e não é normalmente reabsorvido, sendo que continua a acumular ao longo da vida e é protegido da exposição ao meio bucal através do esmalte ou cemento (TEN CATE, 1994).

43

² Koulourides T. Increasing tooth resistance to caries through remineralization. Foods Nutr Dent Health 1982; 2:193-207.

ten Cate e van Duinen (1995) demonstraram, através de experimento *in situ*, que lesões superficiais (100µm) de dentina foram hipermineralizadas em contato com restaurações com cimento de ionômero de vidro. Restaurações com amálgama ou com resina composta utilizadas como controle, provocaram aumento da profundidade das lesões. Segundo os autores este experimento permite concluir que o efeito protetor das restaurações com cimento de ionômero de vidro deve-se a hipermineralização que este pode provocar, o que aumenta a resistência deste tecido ao ataque ácido bacteriano, pela diminuição dos canais de difusão.

Hatibovic-Kofman, Suljak e Koch (1997) demonstraram em um estudo *in vitro* a capacidade do cimento de ionômero de vidro (CIV) em remineralizar lesões de cárie das proximidades onde estão inseridos. O estudo foi realizado utilizando secções de dentes decíduos extraídos, com lesões incipientes de esmalte (manchas brancas proximais) as quais foram unidas a dentes de plástico restaurados com CIV e expostos a 30ml de saliva artificial durante 7 e 14 dias. As lesões foram fotografadas e a área do corpo das mesmas foi determinada antes e após a remineralização. Houve redução da área do corpo das lesões em 62% dos casos, ocorrendo uma redução média de 43% da área após a primeira semana e 14% adicionais após a segunda semana.

Heilman et al. (1997) realizaram um estudo para investigar a localização, a extensão e a quantidade de remineralização de lesões de cárie de raízes de dentes humanos, produzidas *in vitro*, por método químico. A desmineralização ocorreu em meio contendo diferentes concentrações de flúor e após o início da formação das lesões as mesmas foram colocadas em um meio remineralizante, contendo 10ppm de flúor. As lesões foram analisadas após a desmineralização e novamente após a remineralização, através de microscopia de luz polarizada (MLP) e

microrradiografias. Após a desmineralização observou-se que a profundidade das lesões foi inversamente proporcional à concentração de flúor presente na solução. Da mesma forma, com a presença do flúor, observou-se a formação de bandas no interior do corpo da lesão reveladas pelos dois métodos de análise; análises quantitativas através das microradiografias revelaram variações no conteúdo mineral e na distribuição do mesmo. O exame das lesões após remineralização revelou que a deposição mineral ocorreu sobre o remanescente mineral e não sobre a matriz orgânica desmineralizada o que pode ser de grande significado para o controle e tratamento das lesões radiculares, *in vivo*.

Nyvad, ten Cate e Fejerskov (1997) demonstraram que a remoção diária da placa associada com aplicações tópicas de flúor em alta concentração altera de maneira significante o padrão de distribuição mineral de lesões de cárie paralisadas, desenvolvidas *in vitro*, sem alterar o conteúdo mineral. Raízes sadias nunca anteriormente expostas, submetidas às mesmas condições, também tiveram alteração da distribuição mineral, ocorrendo até mesmo o desenvolvimento de uma lesão subsuperficial sem ser detectada clinicamente. Estes fatos sugerem que a exposição radicular ao meio bucal pode levá-las a alterações minerais decorrentes do metabolismo bacteriano que podem alterar sua permeabilidade e reatividade a tal ponto de torná-las resistentes a futuros desafios cariogênicos.

Segundo Featherstone (2000), o uso do flúor na prevenção e controle da cárie dental resulta em três mecanismos de ação tópica: (1) inibição da atividade bacteriana reagindo com o hidrogênio livre quando cai o pH da placa dental, formando um composto (HF) que se difunde no interior da célula bacteriana, acidificando-a; (2) inibição da desmineralização quando os fluoretos estão presentes nas superfícies dos cristais de apatita, durante o ataque ácido; (3)

aumento da remineralização durante o processo DES-RE, formando uma camada protetora de baixa solubilidade ácida, semelhante ao cristal de fluorapatita.

Kawasaki et al. (2000) verificaram que existe uma relação entre o perfil mineral das lesões originais de cárie de dentina e as lesões remineralizadas. Para tanto os autores produziram lesões in vitro, com grau de desmineralização típico de lesões naturais que foram submetidas à remineralização em soluções sem flúor, com 2ppm ou com 4ppm de flúor. As análises da distribuição mineral foram realizadas através de microrradiografia e espectroscopia interna de reflectância. A quantidade de mineral presente nos, aproximadamente 50µm superficiais da lesão, influenciou o perfil mineral após remineralização, provavelmente através do transporte de íons, sendo que quando esta quantidade era maior que 10% do volume, e o mineral original, provavelmente, atuava como núcleo de crescimento. Quando a superfície era bem mineralizada atuava como barreira e, quando esta não existia, o mineral se depositava mais profundamente na lesão. Portanto, o efeito do flúor na remineralização das lesões de dentina depende do conteúdo mineral original e de sua distribuição na lesão. Embora altas concentrações de flúor sejam bem efetivas em lesões bem desmineralizadas, produzem hipermineralização em lesões com maior conteúdo mineral, atuando como barreira à penetração em profundidade.

Mukai, Lagerweij e ten Cate (2001), em estudo semelhante ao de Heilman et al. (1997), avaliaram o efeito de diferentes concentrações de flúor, aplicado em diferentes formas, em lesões de cárie rasas e profundas em dentina radicular. Lesões foram produzidas em ciclagem de pH por 4 semanas seguidas por 5 semanas de remineralização e mais 10 dias de desmineralização. Durante a ciclagem as lesões foram submetidas a um dos seguintes tratamentos: aplicação diária de NaF sob forma de creme dental, aplicação semanal de NaF 4000ppm em solução e uma combinação dos dois. Em todas as lesões o tratamento com solução de NaF 4000ppm e a combinação com o creme dental mostrou remineralização significativamente maior , comparando-se com o controle (que não recebeu tratamento algum durante a ciclagem de pH) ou com o grupo do creme dental apenas. Nas lesões rasas, houve um aumento da deposição mineral na frente ativa da lesão em até 400um de profundidade, que ocorreu na maior parte das vezes durante a ciclagem de pH. Nas lesões mais profundas uma segunda camada ligeiramente hipermineralizada foi detectada. No processo de desmineralização, o grupo controle mostrou mais perda mineral. Para os autores, o processo contínuo de remineralização foi aplicado para se avaliar o quanto este pôde ocorrer, seguido da desmineralização para se avaliar a resistência ácida dos tecidos remineralizados.

Para Hellwig e Lussi (2001), os experimentos *in vitro* têm demonstrado que apenas pequenas quantidades de flúor são necessárias para promover a remineralização de lesões de cárie incipientes de esmalte. Sob o ponto de vista clínico existem evidências de que apenas sob certa circunstâncias ocorre a estabilização da zona superficial das lesões incipientes através dos mecanismos de ação do flúor tópico. Entretanto, uma concentração ótima, universalmente válida para que estes processos ocorram, ainda não pode ser estabelecida.

Maltz et al. (2002) observaram a paralisação de lesões de cárie após o período de 6 a 7 meses da remoção incompleta das lesões e selamento das cavidades com óxido de zinco e eugenol do tipo II. A avaliação radiográfica antes e após tratamento sugeriu ganho mineral. A contagem de bactérias revelou significativa redução de aeróbicas, anaeróbicas, *S.mutans* e *lactobacillus*, indicando redução ou ausência da atividade bacteriana. Estes resultados levaram os autores ao questionamento do procedimento de escariação de lesões profundas em duas

etapas com a reabertura da cavidade para completar a remoção do tecido cariado, mantido na primeira escariação. Além da possibilidade de exposição pulpar na segunda escariação, há redução de bactérias viáveis e ausência de sinais clínicos e radiográficos.

Segundo Cruz (2003), os dados disponíveis na literatura apontam para a formação de fluoreto de cálcio como resultado da aplicação tópica de fluoreto de sódio, como fase precursora do aumento da resistência superficial do esmalte dental, inibindo a desmineralização e potencializando a remineralização através do fornecimento de flúor de baixa concentração, sendo este fornecimento controlado pelas variações cíclicas do pH da placa dental ou biofilme dental. Já foi demonstrado que este mesmo fluoreto de cálcio é depositado em dentina e cemento dentais, após aplicação tópica de solução aquosa de fluoreto de sódio em pH neutro (SAXEGAARD; VALDERHAUG; RÖLLA³, 1987 apud CRUZ, 2003).

O fluoreto de cálcio tem solubilidade limitada na saliva, permanecendo sobre os tecidos durante semanas, sendo importante reservatório de flúor controlado pelas variações do pH do biofilme dental ou dos fluidos da lesão, liberando flúor para o processo de remineralização dentro do ciclo DES-RE. Este fluoreto é subseqüentemente depositado em forma de fluoridroxiapatita, através da liberação dos íons cálcio e fosfato da estrutura dental durante o desafio cariogênico. Entretanto, sua proteção também pode ocorrer mecanicamente, pela forma como se deposita nas superfícies formando glóbulos esparsos ou aglomerados de pequenos grânulos de formato esferoidal, sendo que o número e tamanho destes grânulos podem ser aumentados com o aumento da exposição ao fluoreto de sódio. Estes

³ Saxegaard E, Valderhaug J, Rölla G. Deposition of fluoride on dentin and cementum after topical application of 2% Naf. In: Dentin and Dentin reactions in the oral cavity, Oxford, IRLPress, 1987, pp 199-206.

glóbulos aderem no esmalte e na dentina pelo fenômeno da epitaxia, ou seja, acumulando-se na superfície de outro cristal (CRUZ, 2003).

O efeito do flúor no processo de formação de lesões de cárie em esmalte, *in vitro*, também foi estudado por Argenta, Tabchoury e Cury (2003). Os autores utilizaram concentrações de 70,140 e 280ppm de flúor, resultante de diluição de cremes dentais, em processos de ciclagem de pH para produção de cáries incipientes de esmalte. Antes e após o período de desmineralização (3h), cada grupo experimental foi submetido a um dos tratamentos com flúor e um grupo controle ao tratamento com água deionizada, para a seguir serem submetidos ao período de remineralização (20h), ciclo repetido por cinco dias, acrescido de 48h de remineralização no final do processo. Testes de microdureza superficial associados à análise de perda mineral e observações com microscopia de luz polarizada permitiram afirmar que todos os tratamentos utilizados foram capazes de diminuir a desmineralização após o período de ciclagem, sendo que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados, embora os tratamentos com flúor diminuíram o grau de desmineralização além do que o fez o grupo controle, em termos numéricos.

Uma lesão ativa inicial de esmalte apresenta erosão superficial e porosidade subsuperficial. Lesões inativas ou paralisadas apresentam superfície abrasionada e polida, mas a perda mineral subsuperficial se mantém e a remineralização da subsuperfície é raramente alcançada, porque a camada superficial atua como barreira para a difusão de íons (KIDD; FEJERSKOV, 2004).

Os autores avaliaram a concentração de flúor e o grau de fluorose em 137 dentes coletados de várias regiões do Canadá e do Brasil, sendo que esta concentração em dentina variou de 110 a 860ppm, enquanto que em esmalte variou de 32 a 940ppm. Para os autores, a fluorose dental depende de fatores genéticos além dos ambientais que determinam a concentração de flúor nos tecidos. Já, o grau de mineralização é determinado apenas pelos fatores ambientais. Neste estudo os dentes que apresentaram maior grau de dureza foram os menos mineralizados, entretanto com maior contéudo de flúor (Fortaleza, Brasil). Neste caso, provavelmente a qualidade do mineral foi responsável pelos resultados (VIEIRA et al., 2005).

Lagerweij e ten Cate (2006) observaram em experimento, *in vitro*, que na desmineralização em presença de flúor, os poros formados permitem a penetração do íon que determina o padrão de desmineralização em forma de lâminas, caracterizando o fenômeno DES-RE, até 140µm para o esmalte e 190µm para a dentina. Os autores trabalharam com espécimes de esmalte e dentina submetidos à ciclagem de pH em presença de diferentes concentrações de flúor, 0, 1, 1.000, 2000 e 3.000ppm para o esmalte e 0,1,2000,e 5.000ppm para a dentina.Cortes transversais destes espécimes foram submetidos à nova desmineralização em solução não fluoretada e avaliados por microrradiografia de contato,onde foram observados diferentes graus de desmineralização em camadas ou lâminas.

O uso de liners que contêm flúor pode aumentar a remineralização da dentina desmineralizada pela liberação de flúor, sendo que o uso destes liners em cavidades profundas pode inibir o progresso de lesões secundárias, através deste processo. Foi o que demonstraram Itota et al. (2006) em um estudo em que lesões de cárie foram desenvolvidas, *in vitro,* pelo processo bacteriano em dentes em que o tecido pulpar foi substituído por solução de Hanks (solução de Cálcio).

Tantbirojn et al. (2006) demonstraram, em estudo *in vitro*,que lesões de cárie artificial, desenvolvidas em fragmentos de dentina bovina, exibiram uma deposição

mineral em áreas adjacentes ao cimento de ionômero de vidro resino modificado, depois de 2 e 6 semanas de imersão em saliva artificial. A quantidade de ganho mineral foi significativamente maior do que em grupos controle onde não havia proximidade das lesões com o cimento de ionômero de vidro. Estas superfícies remineralizadas mantiveram-se mais resistentes a um segundo desafio ácido.

Estudando o desenvolvimento de cáries secundárias, *in vitro*, Gama-Teixeira et al. (2007) restauraram a face vestibular e lingual de 50 terceiros molares humanos com cimento de ionômero de vidro, amálgama, resina composta e resina composta com liberação de flúor, após serem submetidos à esterilização em radiação gama. Os dentes restaurados foram submetidos a desafio cariogênico através de um sistema bacteriano, utilizando *Streptococcus mutans*. As lesões formadas foram observadas em cortes transversais, através de microscopia comum e de luz polarizada e observou-se que as mesmas restringiam-se ao esmalte, sem formação de lesões de parede. Após medições de extensão e profundidade das lesões, além do halo de inibição, a análise estatística dos dados revelou que as menores lesões secundárias formadas foram ao redor do cimento de ionômero de vidro, além de promoverem o maior halo de inibição ao redor das restaurações. Estes resultados foram atribuídos à liberação de flúor, característica do material.

Buchalla et al. (2007) estudaram o efeito da presença da smear layer nos tratamentos de superfícies dentinárias com solução fluoretada com 1200 ou 12000 ppm de flúor. A análise de conteúdo de flúor iônico e flúor estruturalmente unido (Ca F₂-) revelou que a presença da camada de esfregaço pode influenciar a absorção de flúor, dependendo da concentração da solução administrada: aumentou a absorção para a solução de menor concentração e não teve influência no grau de

absorção da solução de maior concentração. A presença da camada de esfregaço não representou uma barreira para a absorção de flúor.

2.4 Microdureza da dentina sadia, cariada e remineralizada

Craig, Geehring e Peyton (1959) utilizaram o corante tricromo de Pollack modificado para corar cortes transversais de coroas e raízes dentais de dentes recém-extraídos, a fim de comparar áreas histologicamente diferentes com as respectivas microdurezas. Testes de microdureza de cortes coronários mostraram que a dureza da dentina próxima ao I.a.d. é cerca de 15KHN (Knoop Microhardness Number) menor do que da dentina adjacente e teste de cortes radiculares mostraram que próxima à polpa a dureza da dentina é cerca de 30KHN menor do que em áreas adjacentes. A dureza da dentina coronária da região central é semelhante à da radicular distante da polpa. Os testes de dureza Knoop foram realizados com carga variando de 2 a 25 gramas, sendo que cargas de 10 gramas produziram menores variações de valores. O tempo de contato da agulha para cada endentação foi de 15 segundos.

Os valores de microdureza dentinária encontrados por Craig, Geehring e Peyton (1959), em cortes coronários de quatro dentes humanos, foram de 65 a 83KHN em áreas mais calcificadas, enquanto que em áreas menos calcificadas, próximas ao l.a.d. a microdureza variou de 52 a 56 KHN. Neste estudo as diferenças encontradas não foram relacionadas à densidade dos túbulos dentinários, apenas à concentração orgânica ou mineral que foi diferenciada pelo corante histológico utilizado, sendo que a menor dureza da dentina próxima ao l. a. d. foi relacionada à presença de dentina interglobular nesta área. Newbrun e Pigman (1960), analisaram a microdureza do esmalte e da dentina e verificaram que a microdureza do esmalte varia de 300 a 400KHN e da dentina de 60 a 150KHN. Estes valores não foram influenciados pelo sexo, idade ou grupos dentais. Variações de dureza do esmalte e da dentina não podem predizer a susceptibilidade à cárie, entretanto esta é alterada de acordo com a progressão das lesões. Quantidades excessivas de flúor sistêmico, aparentemente, provocam diminuição da dureza superficial do esmalte e aplicações tópicas aumentam a dureza do esmalte amolecido pelas lesões iniciais de cárie.

Ainda em 1960, Pigman, Koulourides e Newbrun realizaram um estudo para avaliar as alterações de dureza do esmalte tratado com fluoretos: fluoreto de estanho (0,4 e 4%), fluoreto de sódio (2%) e fluorfosfato de sódio (1%) aplicados por 2 horas, submetidos à desmineralização pelo sistema da boca artificial por 8 a 10 horas. Observou-se uma taxa de desmineralização, respectivamente, de 27%, 35%, 50% e 35% daquela produzida nas superfícies não tratadas (controle) que apresentaram uma taxa de desmineralização de 7,4% por hora. Quando uma solução endurecedora contendo cálcio, fosfato e flúor foi incorporada ao meio utilizado no sistema de boca artificial, os dentes expostos por cinco dias não apresentaram redução de dureza superficial considerável, sendo que os controles, submetidos às condições experimentais normais, apresentaram amolecimento acima dos limites mensuráveis pelo experimento (<90 KHN). Os autores concluíram que os tratamentos com flúor produzem aumento significante da resistência dental.

Em 1962, Dalitz estudando a dureza da dentina radicular, não exposta ao meio bucal, que é mais preservada das alterações por cárie, restaurações, trauma ou atrição e abrasão, em 26 elementos dentais, não encontrou relação entre a idade dos indivíduos e variações da microdureza dentinária.

Para investigar a relação entre a microdureza da camada descolorida com a da zona de invasão bacteriana, Fusayama, Okuse e Hosoda (1966) estudaram cortes verticais de dentes cariados e sadios recém-extraídos. Para cada dente, utilizaram um corte para estudo da microdureza e outro corte para estudo histológico da microbiota nas camadas de cárie. Desta forma, a dureza da dentina intacta atingiu o pico a 450µm do I. a. d. (70KHN) e foi muito baixa na camada mais interna junto à polpa (20KNH), a qual revelou-se menos dura do que algumas medições da dentina infectada. A dureza da dentina não variou abaixo das cáries de esmalte e a dentina secundária ou esclerótica foi mais fregüentemente encontrada em cáries crônicas do que em agudas. A dureza da dentina na camada descolorida foi menor em cáries agudas e maior em crônicas, sendo que a distância da camada descolorida à camada afetada é maior em cáries agudas. A dureza da dentina na zona de invasão bacteriana foi menor nas cáries agudas (min. 4,4KHN) e maior nas crônicas (max. 61KHN), sendo que a distância da zona de invasão bacteriana à camada afetada foi maior em cáries agudas (1.750µm) e menor em crônicas (50µm). A mesma relação entre as camadas afetadas, descolorida e de invasão bacteriana foi observada tanto em cáries de sulcos e fóssulas quanto em cáries de superfície lisa. O pico de dureza da cárie de dentina foi encontrado imediatamente antes da camada afetada, no sentido da polpa para o meio externo. As distâncias entre as camadas de cárie medidas obliguamente aos túbulos foram geralmente menores do que aquelas medidas paralelamente.

Shanon e Keuper (1976) estudando a microdureza da dentina sadia verificaram que esta poderia ser dividida em três zonas diferentes: central com 68,4KHN; periférica (do manto) com 54,9KHN e interna (pulpar) com 43,5KHN.

No mesmo estudo os autores (SHANON; KEUPER, 1976) avaliaram as variações da microdureza em função da aplicação de flúor em forma de APF e de SnF₂. Uma ou duas aplicações de APF por dois minutos provocou diminuição da microdureza da dentina sadia, enquanto que duas aplicações sucessivas de SnF₂ promoveram aumento significante da microdureza. A aplicação de APF seguida da aplicação de SnF₂ também provocou diminuição da microdureza. Estes resultados levaram os autores a concluírem que a escolha adequada dos agentes fluorados nos programas de prevenção da cárie dental é importante para se alcançar os resultados esperados.

Segundo Terashima⁴ et al. (1969 apud FUSAYAMA, 1979) a dureza Knoop da dentina após a remoção clínica da camada amolecida é de 22,8± 9,65 KHN quando a remoção foi realizada com escavadores em forma de colher e de 28,4+-16,36 KHN quando a remoção foi realizada com ICR esféricos.

Medidas de microdureza Vickers foram tomadas em cortes transversais e longitudinais de raízes de elementos dentais unirradiculares de pacientes humanos com faixa etária variada, a fim de se comparar a dureza da dentina esclerosada ou transparente com a dentina normal ou opaca. Os autores (GRAJOWE; AZAZ; BRON-LEVI, 1977) verificaram que a dureza da dentina radicular opaca é menor do que a esclerosada, próximo à coroa, mas é maior do que a opaca junto ao ápice. Em indivíduos adultos a dureza foi maior do que em pré-adolescentes.

Seaman e Shannon (1979) estudaram o grau de endurecimento da dentina em função de diferentes tratamentos com fluoretos e com água deionizada, através de testes de dureza Knoop aplicados nas mesmas áreas antes e após os

⁴ Terashima S, Watanabe M, Kurosaki N, Kono A. Hardness of dentin after clinical excavation of soft dentin. Japanese Journal of Conservative Dentistry, 1969; 11:115-20.

tratamentos. A aplicação de APF em pH 3,0 reduziu significativamente a dureza (de 58,4 para 57,3 KHN) e nenhum efeito significante foi observado com a aplicação de APF em pH 4,0 (de 59,7 para 59,4 KHN). A aplicação de SnF₂ produziu ligeiro aumento da dureza (de 62,3 para 62,6 KHN) que não diferiu do efeito da água deionizada (de 60,6 para 60,9 KHN). Entretanto o tratamento seqüencial de APF e SnF₂ produziu aumento significante da dureza dentinária (de 60,6 para 62,2 KHN). Todas as soluções foram aplicadas por 2 minutos, sendo a seguir os fragmentos enxaguados e mantidos secos até os testes se processarem.

Através de análise ultra-estrutural, com microscopia eletrônica de transmissão e de análise de microdureza, utilizando agulhas do tipo Knoop, Ogawa et al. (1983) verificaram que a camada transparente da cárie de dentina não é uma camada esclerosada, sendo sim a porção mais profunda da parte interna da lesão, considerada vital, com grau de dureza intermediária entre a porção externa da lesão e a dentina sadia. Os autores observaram certa deposição mineral de cristais em forma de discos, no interior dos túbulos da dentina sadia imediatamente adjacente à camada subtransparente os quais aumentam de tamanho e de número na camada subtransparente e são gradualmente transformados em cristais rombóides na camada transparente, tornando-se ausentes na camada descolorida. Com a desmineralização provocada pelo processo de cárie, observou-se a dissolução da periferia destes cristais na dentina intertubular e peritubular que se inicia na junção entre dentina normal e camada subtransparente sendo mais evidente na camada transparente o que justifica sua menor dureza Knoop. Estes cristais são compostos também por material orgânico e não somente inorgânico, daí a menor dureza Knoop, apresentando menor solubilidade em ácido.

Em 1983, Featherstone et al. observaram uma relação linear entre a percentagem mineral do esmalte, determinada por microrradiografias, e a raiz quadrada dos valores de dureza Knoop obtidos por testes de microdureza, em cortes transversais de lesões de cárie artificial de esmalte, medidas a partir da superfície em direção ao limite amelo-dentinário (l.a.d.). Os autores concluíram que ambas as técnicas podem ser utilizadas para mensurar o perfil mineral resultante da desmineralização provocada pelas lesões de cárie e provavelmente da remineralização.

Pashley, Okabe e Parham (1985), realizaram um estudo relacionando a microdureza da dentina com a densidade tubular em dentes permanentes humanos sadios, através de uma técnica que permitiu as medições seriadas no mesmo grupo de túbulos desde a junção amelo-dentinária até a câmara pulpar. Os resultados mostraram uma relação inversa altamente significante entre a microdureza dentinária e a densidade tubular, ou seja, a microdureza dentinária diminui à medida que se aproxima da polpa. Este fato está associado à diminuição da dentina intertubular e aumento do diâmetro dos túbulos.

Para Jones e Boyde (1987) os testes de microdureza não se aplicam para a avaliação do grau de desmineralização ou de remineralização nos processo de cárie do esmalte ou da dentina, pois as diferenças de microdureza podem estar relacionadas à orientação das fibras colágenas ou dos cristais de apatita, além da presença de poros que ocorrem em ambos os tecidos nos processos de cárie, mascarando os testes de microdureza.

White e Adams (1996) confirmaram estudos anteriores de que o tratamento da dentina com laser Nd:YAG (200j/cm²) com comprimento de onda de 1.06µm aumenta a microdureza da dentina e a torna mais resistente à desmineralização ácida. Os autores utilizaram discos de dentina de terceiros molares humanos livres de cárie, os quais foram submetidos a um dos seguintes tratamentos: aplicação de laser (L), ácido nítrico a 10% /45s (A), aplicação de laser seguida do ácido (L+A), aplicação do ácido seguido do laser (A+L) e controle (C). Testes de dureza Knoop, com carga de 300grs por 15s realizados antes e após todos os tratamentos, indicaram diferenças estatisticamente significantes entre todos os tratamentos. Os valores encontrados pelos autores foram: C= 62, L= 149, L+A= 40 e A+L= 333 KHN. Análises das superfícies tratadas sob microscopia eletrônica de varredura, indicaram alterações morfológicas para todas as superfícies tratadas. As alterações produzidas pelo laser, antes e após o condicionamento ácido, aumentaram a microdureza da dentina, o que, segundo os autores, poderia ser extrapolado para os ácidos biológicos produzidos pelas bactérias cariogênicas.

As medidas de microdureza da dentina, assim como de outras propriedades mecânicas, representam uma média de um largo volume de tecido, sem ter a possibilidade de considerar as diferenças de seus componentes estruturais como dentina intertubular e peritubular que apresentam composições muito diferentes, um com maior concentração do colágeno e outro com predominância dos cristais de apatita. Além disto o grau de mineralização pode variar ao longo deste tecido (MARSHALL JR., 1998). Técnicas mais sensíveis propostas pelos autores, como, por exemplo, a nanoendentação para testes de dureza ou a tomografia microscópica por Raios X, podem revelar medidas e/ou características mais localizadas e por isto mais precisas dentro deste tecido heterogêneo em sua estrutura (MARSHALL JR, 1998).

Banerjee et al. (1999) examinaram lesões naturais de cárie cuja profundidade foi padronizada em 1,5mm além do l.a.d. a fim de tentar relacionar a coloração das

camadas de cárie com suas respectivas microdurezas e com os sinais de auto fluorescência obtidos através da microscopia confocal que segundo os autores são maiores em tecidos menos mineralizados. Medições da dureza Knoop em dentina sadia circumpulpar revelaram valores entre 55,77 KHN e 64,17 KHN, para a dentina periférica junto ao I. a. d., entre 48,88 KHN e 53,91 KHN. Já para a dentina cariada, os valores de microdureza ficaram entre 13,64 KHN e 37,93 KHN até 1,000µm do l. a. d., zona que incorporou toda a lesão exceto a zona translúcida. Dentro da zona translúcida, que para os autores ficava entre 1500 e 2000µm do l. a. d., os valores foram crescendo gradualmente até o pico de 55,02 KHN próximo à dentina sadia. Teste de microscopia de auto fluorescência (AF) revelaram picos de intensidade de sinais no centro da lesão, próximo ao I. a. d. que foi gradualmente reduzido em direção à zona de avanço, cessando dentro da faixa de dentina pigmentada de marrom claro que corresponde ao início da zona translúcida. Os autores observaram que a camada transparente (camada superficial da zona translúcida) não corresponde à zona de maior dureza da dentina coronária, sendo esta encontrada na camada subtransparente (camada mais profunda da zona translúcida). Por isto os autores não concordam com o termo "dentina esclerosada" para designar a zona translúcida.

Comparando área de dentina sadia com áreas de dentina cariada, Hosoya et al. (2000) também verificaram que em dentes decíduos a dureza da dentina decresce a partir do limite amelo-dentinário em direção à câmara pulpar. A dureza das áreas adjacentes às lesões de cárie é sempre menor do que a dentina sadia, mesmo nas áreas mais internas desta, sugerindo que estas área adjacentes à lesão sejam de alguma forma afetadas pela cárie. Sendo assim, a dureza da camada transparente, nas lesões de cárie, apresentaram dureza significativamente menor do que a dentina sadia, em dentes decíduos. Os autores sugerem que esta diminuição da dureza compromete a adesão a estes tecidos, uma vez que o condicionamento ácido pode diminuir ainda mais a dureza desta dentina. Por isto a técnica de adesão a estes tecidos deve ser melhor estudada.

Kielbassa et al. (2002) avaliaram o efeito da desmineralização e da remineralização com diferentes compostos fluorados na microdureza da dentina irradiada, em estudo *in vitro*, em dentes bovinos. Os autores verificaram que a dentina irradiada tem sua dureza Knoop diminuída, de 62,63 da dentina normal para 8,74. Entretanto, no processo de desmineralização, a diminuição da dureza foi significativamente minimizada pela fluoretação, tanto para a dentina irradiada quanto para a normal. A remineralização com flúor gel resultou no maior aumento da microdureza, sendo de 14,94 KHN para 35,95 KHN em dentina normal e de 7,30 KHN para 17,70 KHN em dentina irradiada, após dois dias de remineralização. Portanto, a desmineralização da dentina irradiada pela aplicação regular de flúor, entretanto os níveis de dureza não voltam ao normal.

Fuentes et al. (2003), estudaram a dureza da dentina aplicando dois métodos de endentação: Vickers e Knoop com duas cargas diferentes para cada um. Os autores utilizaram doze discos de dentina com aproximadamente 2mm de espessura, obtidos de dentina superficial e profunda, através da secção transversal de coroas de terceiros molares humanos sadios, extraídos por indicação. As superfícies dentinárias foram polidas com seqüência de lixas abrasivas e 20 endentações em cada superfície dentinária foram realizadas com cargas de 300grs e 500grs ou de 50grs e 100grs respectivamente depara o endentador Vickers e Knoop. A análise estatística das médias revelou que a microdureza da dentina não foi influenciada pelas cargas aplicadas para ambos os métodos de endentação. A

dureza Knoop foi significativamente maior em dentina superficial do que em dentina profunda, sendo que a dureza Vickers não apresentou diferenças para ambos os substratos. Segundo os autores, estas diferenças da microdureza da dentina em função da profundidade não devem ser relevantes e nenhuma alteração na distribuição de estresses ao longo de uma interface adesiva deve ser esperado em função destas diferenças.

Paes Leme et al. (2003) compararam o efeito de dentrifícios fluoretados com o efeito de tratamentos com flúor fosfato acidulado (APF) em lesões incipientes de esmalte. Blocos de esmalte de dentes bovinos foram submetidos à ciclagem de pH para desenvolvimento de lesões de cárie. Antes da ciclagem de pH os fragmentos receberam um dos seguintes tratamentos: (1) dentrifício não fluoretado,(2) dentifrício fluoretado,(3) flúor fosfato acidulado (12.300 ppm em pH 3,5) e dentifrício fluoretado, (4) flúor fosfato acidulado e dentifrício não fluoretado. Todos os grupos também receberam tratamento com dentifrício fluoretado durante a ciclagem de pH. Os resultados mostraram que 61 a 81% do flúor previamente depositado nos fragmentos de esmalte foi perdido durante a ciclagem. A concentração final de flúor no esmalte foi reduzida, entretanto nos grupos tratados com creme dental fluoretado esta redução não foi significante. Da mesma forma o tratamento com creme dental fluoretado aumentou a dureza da lesão de cárie de modo significante, de 142.6KHN com dentifrício placebo para 204.8 KHN para o dentifrício fluoretado, sendo semelhante aumento produzido pelo tratamento associado com APF.

Paolinelis, Watson e Banerjee (2006) aplicaram o método da análise de microdureza para detectar a quantidade de dentina sadia que é removida junto com a remoção da dentina cariada utilizando ar abrasivo com partículas médias de 27µm. Os autores utilizaram dentes naturais humanos com lesões não cavitadas que foram

seccionadas exatamente no centro. As endentações foram realizadas ao longo de uma linha reta atravessando o centro da lesão desde o l.a.d. até a polpa, com 250µm de intervalo entre elas, mensurando assim dentina cariada e sadia. Os valores de dureza para dentina sadia foram de 35 a 70KHN e para a dentina cariada de 5,5 a 14KHN. A quantidade de estrutura perdida com a remoção tecidual foi mensurada através da construção de réplicas dos espécimes em que foram realizadas as endentações e posterior remoção da cárie. A eficiência da abrasão foi calculada como a relação entre a área desgastada, em mm², versus a taxa de abrasão, em mm/s, e os autores concluíram que o método de abrasão remove de modo mais eficiente a dentina sadia do que a cariada, o que o torna crítico no sentido da economia de estrutura dental durante os preparos cavitários.

Turssi et al. (2006) avaliaram, através de testes de microdureza Knoop o efeito remineralizante de substitutos salivares e de saliva humana em cáries radiculares desenvolvidas *in vitro*, em fragmentos radiculares de dentes bovinos, através de ciclagem de pH, por dois dias. Os valores iniciais de microdureza Knoop, para os quatro grupos estudados (n=15), variou de 39,9KHN a 40,1KHN, sendo que após o desenvolvimento das lesões, variou de 10,4 a 11,3 e após a remineralização, de 10,7 a 19,5. A carga utilizada foi 10g por 5 s, efetuando-se as medidas a 500µm da margem dos espécimes. Os autores concluíram que os substitutos salivares podem promover remineralização parcial de lesões de cárie radicular produzidas *in vitro*, sendo seus efeitos melhores do que os da saliva humana.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi avaliar a capacidade de remineralização, *in vitro*, de lesões de cárie desenvolvidas *in vivo*, com diferentes extensões e profundidades, utilizando soluções com diferentes concentrações de flúor, através de observações em microscópio eletrônico de varredura, análise de absorção de flúor e análise de microdureza.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- 4.1.1 Material e instrumental para armazenamento e identificação dos dentes
 - 20 dentes humanos cariados, recém-extraídos (Aprovação do CEP FOUSP 195/05)
 - Frascos plásticos com capacidade para 13ml e tampa hermética
 - Caneta hidrográfica para retro-projetor
 - Película radiográfica para radiografias periapicais (Agfa speed E/F dentus M2 (Agfa, Bélgica)
 - Aparelho de Raios X de 60kV e 10mA (Dabi Atlante, SP, Brasil)
 - Refrigerador compacto 120I (Cônsul, SP, Brasil)
 - Filme fotográfico Fujichrome (Fuji, Japão)
 - Máquina fotográfica (Yashica Dental Eye II, Japão)
 - Instrumento de Hollemback n° 3 (Duflex, SP, Brasil)
 - Curetas de dentina n°17 e 19 (Duflex, SP, Brasil)
 - Disco diamantado flexível Discoflex (KG Sorensen, SP, Brasil)
 - Micromotor (Kavo do Brasil, SP, Brasil) Processo FAPESP nº 99/12518-5
 - Peça de mão (Kavo do Brasil, SP, Brasil)

4.1.2 Material e instrumental para remineralização das lesões de cárie

- Esmalte de unha de cor vermelha (Risqué, Niasi, SP, Brasil)
- Faca e martelo para clivagem dos dentes
- Solução remineralizante com 1ppm de Flúor
- Solução remineralizante com 500ppm de Flúor
- Frascos com tampa hermética com capacidade para 13ml
- Estufa de cultura 502 (Orion-Fanen, SP, Brasil). Processo FAPESP n° 99/12518-5
- Pipeta automática para 10ml
- Caixas plásticas com tampa hermética com capacidade para 500ml
- 4.1.3 Material e Instrumental para observação ao MEV
 - Solução de glutaraldeído a 2% com tampão cacodilato 0,1M (molar) e pH

7,0

- Solução de cacodilato de sódio 0,05M
- Solução de tetróxido de ósmio 1,0%
- Soluções de etanol com concentrações de 30%, 50%, 70%, 80%, 90%
 95% e 100%
- Solução de HMDS (hexametildisilazano)

- Sputering para recobrimento metálico (Baltec Sput Coater, SCD 050, Alemanha)
- Suportes para espécimes cilíndricos de alumínio
- Cola Super Bonder (Henkel, EUA)
- Fita adesiva dupla face (3M, SP, Brasil)
- Caixas acrílicas com tampa para armazenamento dos espécimes
- Filme fotográfico Fuji Neopan SS 120ml ASA 100 (Fuji, Japão)
- Papel fotográfico Ilford Multigrade IV (Inglaterra)
- Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL 6100, Tokyo, Japão)

4.1.4 Material e Instrumental para testes de Microdureza

- Resina acrílica ativada quimicamente (Clássico, SP, Brasil)
- Matriz para embutimento de espécimes (Extec Corp., CTA, EUA)
- Cera utilidade (Epoxiglass, SP, Brasil)
- Politriz. Ecomet 3 (Büehler, IL, EUA)
- Lixas de carboneto de silício (Büehler, IL, EUA) de granulação 120, 600,

1200 e 4000 grit

- Água deionizada
- Lupa com aumento de 40X (Olympus SZ- PT, Japão)
- Microdurômetro (Shimadzu HMV 2T, Tokyo, Japão), com agulha tipo Knoop, câmera de alta resolução Watec-auto-iris e Software New Age Testing Instruments CAMS Testing System (EUA)

4.1.5 Material e Instrumental para análise da absorção de flúor

- Solução TISAB II ("total ionic strength adjustment buffer") lote nº 940909
 (Analyser Instrumentação Analítica)
- Eletrodo Orion Íon plus fluoride 9609BN (Orion, SP, Brasil)
- Aparelho analisador de íons Expandable Ion Analyzer EA 940
 (Analyser, SP, Brasil)
- Agitador magnético (Fanen Mod 257)
- Soluções de flúor com concentrações padronizadas de 0,05 a 2,0ppm
- Soluções de flúor com concentrações padronizadas de 100 a 1000ppm
- Becker 100ml
- Pipeta automática de 1ml
- Software Vide Cap para captação de imagens
- Software Imagelab 2000[®] (Softium) para análise de imagens
- Microscópio Fotovix (Tamron, Japão)

4.2 Métodos

4.2.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Foram utilizados 20 dentes humanos com lesões de cárie de dentina, extraídos por indicação e doados para o presente estudo, através de documento de esclarecimento de doação. Neste documento o paciente foi informado a respeito do tema e objetivos do estudo além da liberdade de doação e motivos da exodontia. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (parecer 195/05), em Anexo A.

Os dentes foram mantidos em água deionizada a 4°C, em frascos individuais até o momento do uso.

4.2.2 Seleção dos dentes e exame das lesões

O único critério de seleção das lesões foi a proximidade com a polpa dental, tendo sido utilizados dentes com lesões rasas, médias e profundas, sem comunicação com a polpa dental (MIYAUCHI; IWAKU; FUSAYAMA 1978). Todos os elementos dentais foram marcados com uma numeração equivalente à do documento de doação, possibilitando sua completa identificação. Foram realizadas duas tomadas radiográficas de cada elemento dental, no sentido vestíbulo-lingual e no sentido mésio-distal, utilizando filmes periapicais (Agfa speed E/F dentus M2), em aparelho de Raios X Dabi Atlante de 60kV e 10mA. Além das radiografias, foram realizados registros fotográficos de cada dente com lesão os quais, associados às radiografias permitiram a análise inicial das características das lesões de cárie, através do exame visual, que foram classificadas pelo grau de atividade (ativa ou inativa), pelo tipo de superfície na qual se desenvolveram (lisa ou sulcos e fóssulas), pela idade do paciente e pela proximidade com a polpa (rasa ou profunda), como mostram os Quadros 4.1 e 4.2. Todas as fotografias e radiografias foram devidamente identificadas, conforme mostram as Figuras 4.1 a 4.20. Os dentes foram então divididos aleatoriamente em dois grupos (N=10), para seguirem a seqüência do experimento. Durante a descrição do experimento e na redação de todo este trabalho, foram mantidas as denominações dos elementos dentais conforme sua identificação original, sendo que o dente nº 70 ou 70 A, 46 ou 47, tratam-se respectivamente do mesmo espécime.





Figura 4.1 – Dente nº 22 da amostra, elemento 18. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie



Figura 4.2 – Dente nº 23 da amostra, elemento 12. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie





Figura 4.3 – Dente nº 27 da amostra, elemento 18. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie


Figura 4.4 – Dente nº 28 da amostra, elemento 17. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie



Figura 4.5 – Dente nº 29 da amostra, elemento 27. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie





Figura 4.6 – Dente nº 36 da amostra, elemento 14. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie



С

Figura 4.7 – Dente nº 42 da amostra, elemento 11. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie





Figura 4.8 – Dente nº 47 da amostra, elemento 43. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie





Figura 4.9 – Dente nº 48 da amostra, elemento 44. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie







Figura 4.10 – Dente nº 57 da amostra, elemento 16. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie





Figura 4.11 – Dente nº 49 da amostra, elemento 36. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie





Figura 4.12 – Dente nº 50 da amostra, elemento 16. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie





Figura 4.13 – Dente nº 51 da amostra, elemento 31. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie





Figura 4.14 – Dente nº 59 da amostra, elemento 17. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie



Figura 4.15 – Dente nº 60 da amostra, elemento 25. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie



Figura 4.16 – Dente nº 62 da amostra, elemento 18. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie

С



Figura 4.17 – Dente nº 65 da amostra, elemento 26. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie



Figura 4.18 – Dente nº 70 ou 70A da amostra, elemento 28. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie



Figura 4.19 – Dente nº 70B da amostra, elemento 16. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie



Figura 4.20 – Dente nº 71 da amostra, elemento 28. Em A: tomada radiográfica mésio-distal; em B: tomada radiográfica vestíbulo-lingual; em C: fotografia da lesão de cárie

N° do dente	Elemento	Superfície acometida	Grau de atividade da lesão	Proximidade com a polpa	Idade do paciente
22	18	Fóssula/ sulco	Ativa	Rasa	23 anos
23	12	Superf. lisa	Ativa	Profunda	48 anos
27	18	Fóssula/ sulco	Ativa	Média	37 anos
28	17	Superf. lisa	Ativa	Profunda	23 anos
29	27	Superf. lisa	Ativa	Profunda	24 anos
36	14	Superf. lisa	Ativa	Profunda	40 anos
42	11	Superf. lisa	Ativa	Profunda	61 anos
47	43	Superf. lisa	Ativa	Profunda	46 anos
48	44	Superf. lisa	Inativa	Profunda	39 anos
57	16	Fóssula/sulco	Inativa	Rasa	-

Quadro 4.1 - Características das lesões - Grupo 1ppm

Nº do dente	Elemento	Superfície acometida	Grau de atividade da lesão	Proximidade com a polpa	Idade do paciente
49	36	Fóssula/ sulco	Ativa	Média	36 anos
50	17	Fóssula	Ativa	Rasa	91 anos
51	31	Superf. lisa	Inativa	profunda	34 anos
59	17	Superf. lisa	Ativa	Média	-
60	25	Superf. lisa	Inativa	profunda	31 anos
62	18	Superf. lisa	Ativa	profunda	46 anos
65	26	Superf. lisa	Ativa	profunda	-
70A	28	Superf. lisa	Ativa	profunda	37 anos
70B	48	Fóssula/ sulco	Inativa	Média	37 anos
71	28	Fóssula/ sulco	Inativa	Média	31 anos

Quadro 2 - Características das lesões - Grupo 500ppm

4.2.3 Preparo dos dentes para remineralização

Os dentes foram, então, manualmente limpos dos resíduos resultantes da exodontia e os 2/3 apicais de suas raízes foram removidos, sendo as coroas com o terço radicular remanescente divididas em duas partes, exatamente no centro da lesão de cárie, de modo a dividir esta ao meio, de acordo com o organograma apresentado na figura 4.21, utilizando-se, para tanto, disco flexível de diamante (Discoflex) com refrigeração. O tecido pulpar foi removido com auxílio de curetas de dentina.

A seguir, uma das partes de cada coroa dental com metade da lesão recebeu uma camada de esmalte cosmético, ácido resistente, em todas as superfícies ao redor da lesão de cárie, aproximadamente 1mm aquém desta, inclusive nas paredes da câmara pulpar, com o intuito de delimitar a área da lesão a ser submetida a processo de remineralização (Figura 4.22).



Figura 4.22 – Fragmento correspondente à metade da lesão de cárie de um dos elementos dentais, delimitada com esmalte cosmético ácido resistente



4.2.4 Preparo dos espécimes para análises ao MEV e testes de microdureza pré-remineralização

A outra parte com a segunda metade da lesão foi novamente fragmentada em 2 quartos através de clivagem guiada por um sulco previamente realizado na face externa do fragmento dental de modo a dividir novamente a lesão ao meio, seja no sentido longitudinal (paralelo ao longo eixo da raiz), seja no sentido transversal (perpendicular ao longo eixo da raiz), de acordo com o desenvolvimento da lesão de cárie presente. Um destes fragmentos de um quarto da lesão foi processado para análise ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), a fim de serem identificadas as características iniciais de cada lesão de cárie, uma vez que foram estudadas lesões em diferentes estágios de evolução. O outro fragmento de um quarto da lesão foi processado para análise inicial de microdureza (Figura 4.21).

4.2.5 Análise ao MEV pré-remineralização

Os fragmentos dentais com destino à análise por MEV foram imediatamente fixados em solução de glutaraldeído a 2% com tampão cacodilato 0.1M e pH 7.0, por 24h. A seguir foram lavados com solução de cacodilato de sódio 0,05M por 30 minutos, com três trocas de 10 minutos. Em seguida, os espécimes foram pós fixados em solução de tetróxido de ósmio 1.0%, por uma hora. Logo após foram desidratados, em banhos de etanol em concentrações crescentes de 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, 10 minutos em cada banho e então transferidos para secagem em HMDS, por 10 minutos. Uma vez secos, os fragmentos receberam uma fina camada de ouro, de aproximadamente 7nm. Antes do recobrimento metálico cada fragmento foi desenhado marcando-se a posição da lesão, obtendo-se assim um mapa com os modelos dos fragmentos e posicionamento da lesão de cárie em cada um dos espécimes, pois estas ficaram camufladas pela camada metálica. As observações se processaram imediatamente após o recobrimento metálico (até 24h após), utilizando-se um MEV JEOL 6100 (Tokyo, Japan).

O estudo ao MEV constitui-se em análise descritiva baseada em observações das características superficiais das lesões antes de serem submetidas ao processo de remineralização. As observações foram registradas através de elétron micrografias obtidas com distância focal média padronizada de 13 mm e com aumentos padronizados de 800X, 1500X e 3000X, permitido assim a comparação entre os grupos, antes e após a remineralização.

4.2.6 Análise de Microdureza pré-remineralização

Os testes iniciais de microdureza foram realizados com o outro quarto da lesão obtido antes da remineralização, conforme explica a Figura 4.22. Os espécimes foram embutidos em RAAQ, com a lesão voltada para a base da matriz utilizada para este fim e protegida com cera utilidade (Epoxiglass, Diadema, SP) que também auxiliou no posicionamento dos fragmentos, deixando assim a lesão de cárie exposta para o meio externo. Após 24h de armazenamento em meio úmido

com água deionizada, os espécimes foram lixados com lixas de papel com carboneto de silício de granulação decrescente, sob refrigeração: 120, 600, 1200 e 4000 "grit", sendo lavados com água deionizada entre as diferentes lixas. As superfícies planas e polidas foram observadas em microscópio comum para se avaliar a lisura superficial dos espécimes e para mapear previamente os pontos onde se processaram as endentações para os testes de microdureza.

Os testes de dureza foram realizados utilizando-se um Microdurômetro (Shimadzu HMV – 2T), através de uma agulha do tipo Knoop com carga de 25g por 15s (CRAIG; GEHRING; PEYTON,1959; FEATHERSTONE et al., *1983*), dotado de câmera de alta resolução Watec-auto-íris que transfere a imagem para um microcomputador através do Software New Age Testing Instruments CAMS Testing System. Este endentador caracteriza-se pela configuração piramidal cuja base não é plana, deixando uma impressão romboédrica. Para as endentações, foram escolhidas cinco áreas a partir da camada externa da lesão em direção às camadas internas, a 300µm no mínimo e 500µm no máximo, a partir da superfície da lesão, repetindo-se as endentações a cada 200µm aproximadamente, seguindo-se uma linha mais ou menos eqüidistante da superfície da lesão (Figuras 4.23).



Figura 4.23 – Esquema das endentações realizadas nas lesões de cárie, nos testes de microdureza

A dureza Knoop foi expressa em "Knoop Hardness Number" (KHN), conforme terminologia utilizada na literatura internacional, através do exame da superfície endentada imediatamente após o teste, utilizando-se câmera acoplada ao microdurômetro e um software associado que realiza as medições e processa os cálculos.

O cálculo da dureza Knoop processou-se da seguinte forma:

 $KHN = 14,229 P/d^2$, onde

"P" = carga aplicada em gramas (25grs) e

"d" = comprimento da diagonal maior na marca romboédrica, em micrômetros.

Um exemplo da marca de endentação do endentador Knoop pode ser visto na Figura 4.24.



Figura 4.24 - Imagem da marca do endentador Knoop em lesão de cárie do dente nº 71

Neste estudo, as endentações difíceis de serem lidas, pela determinação dos limites da diagonal maior no processo das medições, foram desprezadas. Nestes casos, novas endentações foram processadas em áreas vizinhas, seguindo-se sempre os mesmos critérios até se obterem cinco marcas para cada espécime. Os

dados obtidos nos testes de microdureza foram tabulados para posterior comparação entre as condições de pré e pós-remineralização. Foi adotado o nível de significância de 5% (0,05) para a aplicação dos testes utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 13.0, para a obtenção dos resultados.

4.2.7 Remineralização

Para a realização da remineralização, as metades coronárias com as lesões ácido devidamente delimitadas pelo esmalte divididas resistente foram aleatoriamente em dois grupos, variando-se а concentração de flúor: aproximadamente 1ppm e 500ppm.

O processo de remineralização foi realizado com solução aquosa dos seguintes componentes (IJIMA et al., 1993; MUKAI; LAGERWEIJ; ten CATE, 2003): 1,5mM Ca ²⁺⁺(Ca Cl₂); 0,9mMPO₄³⁻ (K₂HPO₄); 0,15M KCI; 1ppm F ou 500ppm F (Na F); em pH 7.0 a 37°C, durante 30 dias com trocas a cada 24h (ARENDS et al., 1989b). Nova solução foi preparada a cada 10 dias.

Os espécimes foram remineralizados individualmente em 10ml de solução, em frascos vedados com tampa hermética, devidamente identificados (solução final). A cada troca um frasco contendo 10ml da mesma solução sem conter nenhuma lesão foi colocado nas mesmas condições dos demais (solução inicial). Cada frasco com as soluções utilizadas foram identificados, datados e conservados para medição do conteúdo de flúor (Figura 4.25).



Figura 4.25 – Frascos contendo 10ml de solução fluoretada para imersão dos espécimes a serem remineralizados, devidamente identificados com o nº do dente e a data da imersão

Terminado o período de remineralização, este fragmento correspondente à metade da lesão foi novamente segmentado através de clivagem guiada por um sulco previamente realizado na face externa da coroa, originando dois fragmentos de um quarto de lesão, sendo que um deles foi submetido aos testes de microdureza pós-remineralização e o outro às observações ao MEV, conforme descrito na Figura 4.21.

4.2.8 Análise ao MEV pós-remineralização

Os fragmentos dentais destinados à observação sob MEV foram processados de forma idêntica à anterior. O estudo ao MEV constitui-se em análise descritiva baseada em observações das características superficiais das lesões submetidas ao processo de remineralização. As observações foram registradas através de elétron micrografias obtidas com distância focal média padronizada de 13 mm e com

aumentos padronizados de 800X, 1500X e 3000X, permitido assim a comparação entre os grupos, antes e após a remineralização.

4.2.9 Análise de microdureza pós-remineralização

O preparo dos espécimes e os testes mecânicos de microdureza após a remineralização foram realizados nas mesmas condições da análise inicial.

As médias dos valores dos testes de microdureza de ambos os grupos, pré e pós remineralização foram tabulados para a análise estatística (Apêndice 2 – Dados da Microdureza). Foi adotado o nível de significância de 5% (0,50) para a aplicação dos testes, utilizando-se do programa SPSS (Statistical Package fo Social Sciences), em sua versão 13.0, para a obtenção dos resultados.

4.2.10 Análise da absorção de flúor

O conteúdo de flúor dos 10ml da solução utilizada individualmente para a remineralização de cada lesão, assim como os 10ml de solução que não conteve nenhuma lesão, foi mensurado, a fim de se obter informação da possível quantidade de flúor incorporado pela lesão, por área superficial da mesma. Este cálculo foi realizado pela medição do conteúdo de flúor nas soluções inicial e final, através de um eletrodo seletivo (Figura 4.26), adicionando-se 1ml de solução tampão acetato TISAB II a 1ml da solução remineralizante. O eletrodo foi previamente calibrado com

soluções padrão de flúor, conforme a concentração da solução remineralizante que se desejava analisar. A concentração de flúor detectada através do eletrodo, em "milivolts" (mV), foi transformada em "ppm" através de cálculo matemático utilizando a técnica estatística da regressão inversa (NETER; WASSERMAN; KUTNER, 2005), utilizando os dados da calibração do aparelho (em mV), obtidos a partir de medições de soluções com concentrações conhecidas de flúor (em ppm), transformados em "log₁₀ ppm".



А



В

Figura 4.26 – Em A: vista geral do analisador de íons utilizado para medição do flúor em solução. Em B: vista do eletrodo em solução sobre o aparelho agitador, durante o processo da medição Subtraindo-se os valores da concentração das soluções inicial e final de cada troca diária obteve-se o grau de absorção em relação à área superficial de cada lesão. A partir destes dados construiu-se uma curva de absorção em função do tempo (HATIBOVIC-KOFMAN; SULJAK; KOCH, 1997). A área de absorção de cada lesão foi calculada através de medições das duas tomadas radiográficas dos elementos dentais cariados obtidas antes das fragmentações dentais. Utilizando-se o Software Vide Cap foi possível capturar as imagens radiográficas de cada lesão e transferi-las para o Software Image Lab que processou as medições das lesões em milímetros (Figura 4.27).



Figura 4.27 – Imagens capturadas pelo programa Vide Cap, a partir das radiografias do elemento dental e processadas pelo programa Image Lab para o cálculo da área da lesão

Desta forma, as seguintes medidas foram tomadas: Largura, Altura, Profundidade, Área (1) da tomada vestíbulo-lingual, Área (2) da tomada mésio-distal, Perímetro (1) da tomada vestíbulo-lingual e Perímetro (2) da tomada mésio-distal.

Com estes dados foi possível realizar o cálculo aproximado da área superficial de cada lesão, baseando-se na aproximação geométrica da forma das lesões de cárie com a forma de uma esfera, através da fórmula:

$$AEL = A_{esfera} \mathbf{X} AC_1 / A_1 \mathbf{X} AC_2 / A_2 \mathbf{X} PC_1 / P_1 \mathbf{X} PC_2 / P_2$$
(1)

Onde: A _{esfera} = 4 X π X r² (2)

Onde: 4 = constante;

 π = 3,141592....;

r = raio da esfera.

O raio da esfera foi calculado através da fórmula:

6

R médio = LARG + ALT + PROF (3)

Onde:

6 = constante;

LARG = largura média da lesão fornecida pelo software;

ALT = altura média da lesão fornecida pelo software;

PROF = profundidade média da lesão fornecida pelo software.

Voltando à equação (1):

$$AC_1 = \pi \mathbf{X} r_1^2$$
 (4)

Onde: $r_1 = LARG + ALT$ (5)

$$PC_2 = 2 X \pi X r_2$$
 (8)

Desta forma, baseando-se no cálculo de área de uma esfera e utilizando-se as medições obtidas através das tomadas radiográficas, foi possível obter-se a área aproximada de cada lesão através da equação (1). Como o processo de remineralização foi realizado em metades das lesões, cada valor de área obtido foi dividido por dois, a fim de obter-se o real valor da área de absorção.

5 RESULTADOS

5.1 Análise em microscopia eletrônica de varredura

5.1.1 Análise das lesões pré-remineralização

A análise das lesões pré-remineralização mostrou imagens bastante diversificadas. Nem sempre a caracterização inicial da lesão quanto à sua atividade, baseada no exame visual, coincidiu com a análise microscópica. Boa parte delas, caracterizaram-se por uma desorganização tecidual geral que sugeriu tratar-se de lesões ativas. Nestas as fibras colágenas desmineralizadas foram as estruturas mais evidentes, principalmente nas lesões profundas (Figura 5.1 A, B e C); houve redução da densidade da dentina intertubular, com formação de fendas ou buracos os quais podem também ter sido resultado de artefato de técnica (Figura 5.2). Às vezes, foi possível detectar a presença bacteriana (Figura 5.2). Quando a desorganização da dentina intertubular não era tão grande, a dentina peritubular estava menos evidente o que tornou mais difícil a identificação da posição dos túbulos dentinários (Figura 5.3).



Figura 5.1 A





Figura 5.1 C

Figura 5.1 – Elétron micrografias de varredura de lesões de cárie pré-remineralização com características de lesões ativas, onde se vêem as fibras colágenas desmineralizadas. Em A: dente nº 29 (superfície lisa). Em B: dente no. 62 (superfície lisa). Em C: dente nº. 65 (superfície lisa). Aumentos e distância focal constam das barras das imagens


Figura 5.2 – Elétron micrografia de varredura de lesão de cárie pré-remineralização, com características de lesão ativa, onde se observam fendas na dentina intertubular. A seta aponta a presença bacteriana. Dente nº. 28 (superfície lisa). Aumento e distância focal constam da barra da imagem



Figura 5.3 – Elétron micrografia de lesão de cárie pré-remineralização, com característica de lesão ativa. Dente nº 70 A (ou 70 – superfície lisa). Observa-se melhor a posição da abertura dos túbulos, entretanto não se observa a dentina peritubular. Aumento e distância focal constam da barra da imagem

Em algumas lesões em que a trama colágena estava evidente superficialmente, pela descalcificação, observou-se ao fundo o tecido dentinário mais denso e organizado, dando alguma evidência de certo grau de remineralização e estratificação nas camadas de cárie (Figura 5.4 A e B). Em um espécime, apareceram ocasionalmente fibras colágenas vistas de topo, provavelmente devido ao processo de reabsorção enzimática que leva à cavitação (Figura 5.5).



Figura 5.4 A



Figura 5.4 B

Figura 5.4 – Elétron micrografias de varredura de lesões de cárie pré-remineralização, com sinais de paralisação. As imagens mostram a trama colágena parcialmente desmineralizada em evidência, num primeiro plano e em segundo plano, as setas apontam áreas mais profundas e mineralizadas. Em A: dente nº 46 (ou 47 – superfície lisa). Em B: dente nº 27 (fóssula/sulco). Aumentos e distância focal constam das barras das imagens



Figura 5.5 – Elétron micrografia de varredura de lesão de cárie pré-remineralização com características sugestivas de lesão ativa, onde se vê a trama colágena desmineralizada, parte desta com algumas fibras vistas de topo, provavelmente em decorrência do processo de reabsorção enzimática. Dente nº 70 A (ou 70). Aumento e distância focal constam da barra da imagem

Algumas lesões apresentaram imagem com cristais de diferentes formatos que podem representar formações que se processam durante o desenvolvimento das lesões, decorrentes do processo DES-RE, provavelmente quando a reação pende para o lado RE (Figura 5.6 A e 5.6 B).



Figura 5.6 A



Figura 5.6 B

Figura 5.6 – Elétron micrografias de varredura de lesões de cárie pré-remineralização, apresentando formações minerais de diferentes formatos (setas). Em A: dente nº 42 (superfície lisa). Em B: dente nº 36 (superfície lisa). Aumentos e distância focal constam das barras das imagens

Em algumas lesões inativas foi observada a presença de bastões emergindo da abertura dos túbulos dentinários, sendo calcificações cilíndricas que se projetam da superfície (Figura 5.7 C). Em outras lesões inativas, uma camada mineral superficial com maior ou menor densidade de grânulos minerais recobria a dentina (Figura 5.7 A e B e Figura 5.8). Em um espécime em particular, a imagem pré remineralização apresentou aspecto que sugere a presença de uma camada superficial mineral mais densa, recobrindo a dentina, sugestivo de lesão inativa, conforme já foi descrito anteriormente (Figura 5.8). Lesões pequenas revelaram esclerose tubular total ou parcial, provavelmente devido às áreas observadas representarem a faixa de dentina translúcida lesão (Figura 5.9 A e B). Dependendo do corte da lesão, foi possível observar a formação calcificada do interior dos túbulos em corte longitudinal (Figura 5.9 A).











Figura 5.7 C

Figura 5.7 – Elétron micrografia de varredura de lesões de cárie pré-remineralização, com características sugestivas de lesão inativa. Presença de depósito mineral superficial em A e B, e projeções calcificadas cilíndricas emergindo da abertura dos túbulos em C. Em A dente nº 57 (fóssula/ sulco). Em B dente nº 48 (superfície lisa). Em C dente nº 70B (fóssula/ sulco). Aumentos e distância focal constam das barras das imagens



Figura 5.8 – Elétron micrografia de varredura de lesão de cárie pré-remineralização com características sugestivas de cárie inativa, onde se vê densa camada lamelar superficial sugestiva de deposição mineral. Dente nº 50 (fóssula/ sulco)



Figura 5.9 A



Figura 5.9 B

Figura 5.9 – Elétron micrografia de varredura de lesões de cárie pré-remineralização com características sugestivas de cáries inativas, onde se observa a esclerose tubular. Em A: dente n° 22 (fóssula/ sulco), vê-se túbulos esclerosados cortados longitudinalmente (setas). Em B: dente n° 70 B (fóssula/ sulco), vê-se túbulos esclerosados total ou parcialmente em cortes transversais (setas); ao centro as estruturas esféricas representam a presença bacteriana. Aumentos e distância focal constam das barras das imagens

5.1.2 Análise das lesões pós-remineralização

5.1.2.1 grupo 1ppm

O aspecto geral superficial das lesões remineralizadas com 1ppm de flúor variou na dependência das características superficiais iniciais das lesões, sendo que as áreas observadas pós remineralização não foram as mesmas das observações pré remineralização, já que se tratam de fragmentos diferentes da mesma lesão.

Nas lesões classificadas inicialmente, sob exame visual, como de cárie ativa nas quais se observou a trama colágena desmineralizada e desorganizada, observou-se, após 30 dias de remineralização em solução de 1ppm de flúor, a deposição de uma fina camada de diminutos grânulos, formando uma deposição lamelar sobre as fibras colágenas, recobrindo-as superficialmente, mas não totalmente, de modo que foi possível observarem-se espaços em que esta deposição esteve ausente, nos quais notou-se apenas a presença de grânulos em meio às fibras colágenas desmineralizadas (Figura 5.10 A, B e C).









Figura 5.10 C

 Figura 5.10 – Elétron micrografia de varredura de lesões de cárie pós-remineralização, grupo 1 ppm. Observa-se o depósito mineral superficial representado por pequenos grânulos ou por fina camada recobrindo as fibras colágenas. Em A e B: dente nº 27 (fóssula/sulco). Em C: dente nº 23 (superfície lisa). Aumentos e distância focal constam das barras das imagens

Nestas lesões remineralizadas, também não foi possível detectar-se com facilidade a posição dos túbulos dentinários que muitas vezes se apresentaram cobertos por deposição mineral superficial. Não houve redeposição mineral da dentina peritubular sendo que, em algumas lesões, a abertura dos túbulos permaneceu evidente, embora com a deposição de alguns grânulos no seu interior (Figura 5.11 A e B). Grânulos maiores, com diferentes formatos, também foram observados nas lesões remineralizadas, mas que podem ser interpretados como parte das características das lesões antes do processo de remineralização (Figuras 5.6A e 5.12).



Figura 5.11 A



Figura 5.11 B

Figura 5.11 – Elétron micrografia de varredura de lesões de cárie pós-remineralização, grupo 1ppm. A leve deposição mineral permitiu observar-se ainda a entrada dos túbulos e/ou crateras correspondentes à reabsorção enzimática. Em A e B: dente nº 28 (superfície lisa). Aumentos e distância focal constam das barras das imagens



Figura 5.12 – Elétron micrografia de varredura de lesão de cárie pós-remineralização, grupo 1 ppm. A setas indicam grânulos minerais maiores, que se sobressaem da camada de pequenos grânulos. Dente nº 42 (superfície lisa). Aumento e distância focal constam da barra da imagem

Nas lesões classificadas inicialmente sob exame visual como cárie inativa, esta camada superficial lamelar que se depositou com a remineralização, teve o aspecto um pouco mais denso, aparentemente com maior acúmulo de grânulos minerais (Figura 5.13).

Não houve reestruturação tecidual e não foi possível mensurar a espessura da camada superficial formada com a remineralização, nem a profundidade de deposição dos grânulos minerais.



Figura 5.13 – Elétron micrografia de varredura de lesão de cárie pós-remineralização, grupo 1 ppm. Observa-se aspecto sugestivo de maior deposição mineral superficial. Dente nº. 48 (superfície lisa). Aumento e distância focal constam da barra da imagem

5.1.2.2 grupo 500ppm

O aspecto geral superficial das lesões remineralizadas com a solução contendo 500ppm de flúor variou na dependência das características iniciais das lesões, assim como no grupo 1ppm, lembrando-se que as observações pré-remineralização foram realizadas em fragmentos diferentes das observações pós-remineralização.

Nas lesões originais de cárie ativa, observou-se a formação de uma deposição superficial lamelar mais espessa que a observada no grupo de 1ppm de flúor, composta por minúsculos grânulos, cobrindo a trama colágena, porém não de modo homogêneo, deixando áreas descobertas que revelaram os espaços entre as fibras colágenas desmineralizadas que assim se revelavam abaixo desta deposição superficial (Figura 5.14 A e B).



Figura 5.14 A



Figura 5.14 B

Figura 5.14 – Elétron micrografias de varredura de lesão de cárie pós-remineralização, grupo 500 ppm. Observa-se deposição lamelar mais espessa que por vezes deixa aparecer a trama colágena desmineralizada subsupeficial (setas). Em A: dente nº 65 (superfície lisa). Em B: dente nº 62 (superfície lisa). Aumentos e distância focal constam das barras das imagens

Em lesão, aparentemente ativa, em que as observações iniciais revelaram alargamento dos túbulos pela desmineralização da dentina peritubular, sem ocorrer a desorganização da dentina intertubular, observou-se, após a remineralização com a solução contendo 500ppm de flúor, que a crosta formada recobriu indistintamente toda a superfície, entretanto, sem a redeposição da dentina peritubular, deixando visível somente a posição da luz dos túbulos, sem obliterar os mesmos (Figuras 5.3 e 5.15). De modo geral, não foram observadas formações de

calcificações maiores independentes, mas sim grandes acúmulos de pequenos grânulos formando, por vezes, espessas lamelas.



Figura 5.15 – Elétron micrografia de varredura de lesão de cárie pós-remineralização, grupo 500 ppm. Observa-se deposição lamelar mais densa, entretanto sem reconstituição da dentina peritubular, sendo possível neste caso observarem-se a entrada dos túbulos. Dente nº. 70 (ou 70 A – superfície lisa)

Nas lesões inativas, a deposição lamelar formada recobriu totalmente o tecido subjacente, não evidenciando mais as saliências típicas que emergem do interior dos túbulos. O que se observou, após a remineralização, foi a superfície totalmente coberta por uma camada granular (Figura 5.16 e 5.17) que por vezes formou grossas crostas ou densas lamelas. No espécime de nº 50 o qual já apresentou nas imagens pré-remineralização uma camada superficial aparentemente de depósito mineral mais denso, após a remineralização esta camada mineral tornou-se ainda mais densa e com aspecto de aglomerados de grânulos minerais (Figura 5.17).



Figura 5.16 – Elétron micrografia de varredura de lesão de cárie pós-remineralização, grupo 500ppm. Observa-se denso depósito de grânulos superficiais, não se evidenciando as projeções calcificadas que emergem do interior dos túbulos. Dente nº. 70 B (fóssula/ sulco). Aumento e distância focal constam da barra da imagem



Figura 5.17 – Elétron micrografia de varredura de lesão de cárie pós-remineralização, grupo 500ppm. Observa-se denso aglomerado de grânulos superficiais, diferentes das demais lesões. Dente nº 50 (fóssula/ sulco). Aumento e distância focal constam da barra da imagem

Não houve reestruturação tecidual. Não foi possível mensurar a espessura da deposição superficial lamelar formada com a remineralização e nem a profundidade de penetração dos grânulos minerais a qual, aparentemente, foi mais superficial.

5.2 Análise de microdureza

Os dados obtidos nos testes de microdureza Knoop aplicados antes e após o tratamento remineralizador encontram-se no Apêndice 3. As médias dos valores de microdureza de ambos os grupos antes e após a remineralização foram tabulados para análise estatística. A comparação da microdureza entre os dois momentos estudados (pré e pós remineralização) em cada grupo foi analisado através do Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon, com o intuito de detectarmos possíveis diferenças, sendo que para o grupo 1ppm (Tabela 5.1) não houve diferenças estatisticamente significantes entre a microdureza da dentina cariada antes e após a remineralização (p= 0,959). Para o grupo 500ppm (Tabela 5.2) também não foi detectada diferença estatisticamente significante entre a microdureza antes e após a remineralização (p=0,445), apesar de ter existido um pequeno aumento numérico da dureza para este grupo. Considerando todos os elementos amostrais juntos (Tabela 5.3), o teste aplicado não detectou diferença estatisticamente significantes entre a microdureza antes e após os tratamentos remineralizadores (p=0,709). A comparação entre os dois grupos (Tabela 5.4) não detectou diferenças entre a microdureza de ambos, após o tratamento remineralizador (p=0,406).

Microdureza	Ν	Média	DP	Mediana	Sign. (p)
Momento pré	10	13,27	13,51	9,55	0.050
Momento pós	10	11,95	8,25	9,15	0,959

Tabela 5.1 – Comparação entre a microdureza pré e pós remineralização. Grupo 1ppm

Tabela 5.2 – Comparação entre a microdureza pré e pós remineralização. Grupo 500ppm

Microdureza	N	Média	DP	Mediana	Sign. (p)
Momento pré	10	13,04	10,01	12,58	0.445
Momento pós	10	15,46	9,99	13,61	0,445

Tabela 5.3 – Comparação entre a microdureza pré e pós remineralização para todos os elementos amostrais reunidos

Microdureza	N	Média	DP	Mediana	Sign. (p)
Momento pré	20	13,15	11,57	11,51	0.700
Momento pós	20	13,71	9,10	10,98	0,709

Tabela 5.4 – Comparação entre a microdureza(KHN) pré e pós remineralização entre os dois grupos experimentais

Microdureza	Grupo	Ν	Média	DP	Sign (p)
Momento pré	1ppm	10	13,27	13,51	0,705
	500ppm	10	13,04	10,01	
Momento pós	1ppm	10	11,95	8,25	0,406
	500ppm	10	15,46	9,99	

A comparação entre as lesões ativas e inativas presentes em ambos os grupos foi analisada através do Teste de Mann-Whitney (Tabela 5.5), não tendo sido detectadas diferenças estatisticamente significantes antes do tratamento remineralizador (p=0,161), nem após o tratamento remineralizador (p=0,083). Sendo que neste último caso o menor valor de "p" observado na análise pode indicar uma tendência estatística de existir diferença na comparação pré e pós remineralização para este grupo.

Tabela 5.5 – Comparação entre a microdureza(KHN) pré e pós-remineralização entre as lesões ativas e inativas, para ambos os grupos experimentais

Microdureza	Grupo	Ν	Média	DP	Sign (p)	
Momento pré	Ativa	14	9,82	6,56	0.464	
	Inativa	6	20,92	17,13	0,101	
Momento pós	Ativa	14	11,31	7,36	0.092	
	Inativa	6	19,30	10,96	0,083	

Aplicando-se a Análise de Correlação de Pearson, verificamos o nível de relacionamento entre a variável idade e as demais variáveis de interesse e verificamos que o efeito da idade não é significante na microdureza da dentina cariada frente às variações de concentração das soluções remineralizantes e nem frente aos momentos pré e pós-remineralização.

5.3 Análise de absorção de flúor

Os gráficos referentes às curvas de calibração (Figuras 5.1 a 5.18 do Apêndice B – Gráficos das curvas de calibração para medição do flúor em solução) para as medições das soluções dos grupos de 1ppm e de 500ppm indicam que esta ocorreu de modo adequado para todas as medições, pois a dispersão dos pontos com relação a uma reta foi pequena para todas as curvas.

Os dados referentes à absorção total de flúor em "ppm", por unidade de área, no período de tempo em que as lesões foram submetidas à remineralização, encontram-se na Tabelas 5.6, tanto para o grupo 1ppm quanto para o grupo 500ppm.

1	I PPM	500 PPM		
Dente / Área (mm ²)	Absorção Total (PPM)	Dente /Área (mm ²)	Absorção Total (PPM)	
22 (7,29)	-0,02	49 (6,17)	65,64	
27 (8,92)	-2,24	50 (69,58)	4,95	
28 (36,27)	0,21	51 (1,96)	61,06	
29 (53,63)	0,07	62 (4,29)	16,34	
36 (52,38)	0,08	65 (59,05)	-7,68	
42 (20,89)	-45,38	70A (58,97)	4,90	
47 (20,81)	0,20	70B (67,68)	1,87	
48 (7,54)	-0,51	71 (16,45)	46,43	
23 (10,31)	-0,01	59 (8,77)	3,04	
57 (8,15)	-47,23	60 (22,28)	22,16	

Tabela 5.6 – Absorção total de flúor por unidade de área (mm²) para cada dentepara os grupos 1ppm e 500ppm

A avaliação da relação entre a concentração de flúor da solução utilizada para a remineralização e a absorção de flúor pelo espécime foi realizada através de uma análise descritiva dos dados (BUSSAB; MORETTIN, 2004) aos quais foi ajustado um modelo de regressão linear simples (NETER; WASSERMAN; KUTNER, 2005), para avaliar se existe relação linear entre a quantidade de flúor medida na solução e a quantidade de flúor absorvida pelo espécime.

As Figuras 5.18 e 5.19 trazem os gráficos dos perfis individuais de absorção média para cada espécime em função do tempo, por unidade de área, para o grupo de 1ppm e de 500ppm de flúor.



Figura 5.18 – Gráfico de perfis Individuais da absorção de flúor (ppm) por unidade de área pelo tempo (dias), para dentes deixados em uma solução de 1ppm de flúor



Figura 5.19 – Gráfico de perfis Individuais da absorção de flúor (ppm) por unidade de área pelo tempo (dias) para dentes deixados em uma solução de 500ppm de flúor

Através dos gráficos pode-se observar que a absorção não foi constante, sendo que houve períodos em que esta foi negativa. Na Tabela 5.6, que traz a média de absorção por dente, por unidade de área, pode-se observar dois pontos discrepantes do comportamento médio dos dentes do grupo1ppm.

A tabela 5.6 mostra que, considerando todos os espécimes de cada grupo, no grupo 1ppm houve perda mineral total ao invés de ganho, no final do período de remineralização, mesmo sem considerar os espécimes que se comportaram diferente da média dos demais. Enquanto que, no grupo 500ppm houve um ganho mineral total final. O gráfico QQ-Plot referente à absorção total de flúor para cada espécime do grupo 1ppm pode ser observado na Figura 20 e o mesmo gráfico para o grupo 500ppm pode ser observado na Figura 21.



Figura 20 - QQ-Plot para a absorção total de cada dente em solução de flúor 1ppm



Figura 21 - QQ-Plot da absorção total de cada dente em solução de flúor

Estes gráficos indicam que não houve pontos discrepantes na distribuição da absorção total de flúor por unidade de área no grupo 500ppm, entretanto para o grupo 1ppm parece ter ocorrido uma certa assimetria nesta distribuição.

Supondo que as distribuições tenham seguido um padrão normal, o que não foi demonstrado pelos gráficos, um intervalo de confiança com coeficiente de confiança de 95% para a diferença de absorção média para os grupos 500ppm e 1ppm foi dada como:

IC= [5,76; 38,54].

Como a suposição de normalidade não pareceu adequada, e também, devido ao número de espécimes da amostra, foi construído um intervalo de confiança nãoparamétrico de Mann – Whitney (CONOVER, 1980), com coeficiente de confiança de 95%, para estabelecer esta diferença:

IC= [2,96; 46,94].

Sendo assim, os dois intervalos parecem indicar que a absorção média para o grupo 500ppm seja maior do que para o grupo 1ppm.

6 DISCUSSÃO

A literatura muito tem relatado a respeito da remineralização das lesões de cárie incipientes de esmalte com o uso de fluoretos, como um fato já consagrado (ARENDS, 1986; ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003; DIJKMAN; SHUTHOFF; WHITE; NELSON; FALLER, 1994; HATIBOVICK-KOFMAN; SULJACK; KOCH, 1997; HELWIG; LUSSI, 2001; LAGERWEIJ; ten CATE, 2006; LARSEN; PEARCE, 1992; MELBERG; MALLON, 1984; OSTROM et al., 1984).

Entretanto, muito ainda se especula a respeito de como se processa a remineralização das lesões de dentina (ARENDS et al., 1990; ARENDS et al., 1989b; FEATHERSTONE, 2000; HEILMAN et al., 1997; IJIMA et al., 1993; ITOTA et al., 2006; MALTZ et al., 2002; MUKAI; LAGERWEIJ; ten CATE, 2001; NYVAD; ten CATE; FEJERSKOV, 1997; TANTBIROJN et al., 2006; ten CATE; van DUINEN, 1995; WEI; KAQUELER; MASSLER, 1968). Concordamos com Fejerskov, Nyvad e Kidd (2005) que as lesões de cárie de esmalte e de dentina devam ser tratadas como duas entidades diferentes, já que são tecidos estruturalmente diferentes, embora com composição química semelhantes.

Existe um crescente interesse pelo estudo das lesões de cárie de dentina radicular pela crescente exposição das raízes dentárias devido à crescente manutenção dos dentes nas arcadas dentárias dos indivíduos, ao aumento da expectativa de vida e também ao aumento da sobrevida quando do tratamento de doenças que anteriormente eram consideradas letais e que podem provocar a hipossalivação ou xerostomia, com conseqüente aumento da atividade de cárie, como os tratamentos

radioterápicos dentre outros (WESCOTT; STARCK; SHANNON, 1975; LUZ; BIRMAN,1996).

No caso das lesões coronárias existe a preocupação com o desenvolvimento de tratamentos conservadores, simplificados e preventivos (MALTZ et al., 2002), pois facilitam a abrangência de um maior número de indivíduos em uma população, melhorando o desempenho dos programas de saúde coletiva, tornando-os mais eficientes e com menor custo / benefício.

Quando falamos da remineralização das lesões de cárie incipientes de esmalte, tratamos da reconstituição mineral tecidual, em que a cicatriz é quase imperceptível em alguns casos. Isto se deve às características de desenvolvimento das lesões de esmalte que, quando iniciais apresentam a camada superficial preservada,embora porosa, sendo que a perda mineral mais significativa se processa, inicialmente, mais subsuperficialmente (corpo da lesão). Entretanto, esta camada superficial da cárie incipiente de esmalte se apresenta porosa o suficiente para permitir a difusão de ácidos bacterianos para o seu interior (ARENDS et al., 1987). Esta resistência superficial do esmalte é influenciada pelo equilíbrio iônico intra-oral, decorrente das trocas iônicas com os fluidos bucais e fluidos da placa, e ainda pela ação dos fluoretos (KOULOURIDES, 1990). Além disto, já está estabelecido o conceito de que em cáries incipientes, os sítios se tornam relativamente resistentes ao desafio cariogênico em decorrência dos sucessivos ciclos DES-RE (desmineralizante / remineralizante) (KOULOURIDES, 1982; WHITE; NELSON; FALLER, 1994; TANTBIROJN et al., 2006).

Quando a lesão de cárie atinge a dentina, em lesões coronárias, já existe cavitação em esmalte, obviamente, mas também em dentina mesmo em estágios iniciais, pois a matriz intertubular começa a contrair ou colapsar (MARSHAL JR

1998). Além disto, a dentina protegida pelo esmalte é mais susceptível à desmineralização, por não ter sido exposta às trocas iônicas superficiais que a tornariam mais resistente (KIDD; FEJERSKOV, 2004). Também devemos considerar que algumas características teciduais da dentina facilitam a desmineralização, em comparação com o esmalte, como o maior conteúdo orgânico, menor taxa cálcio / fósforo, cristais de apatita menores e por vezes defeituosos, apresentando alto conteúdo de carbonato e outras impurezas (MARSHALL JR. 1998; FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005). Por outro lado, a disposição de alguns cristais de apatita no interior das estruturas helicoidais formadas pelas estruturas colágenas, conferem certa proteção à estas apatitas e estas ao colágeno, de forma sinérgica o que faz com que o mineral só possa ser parcialmente dissolvido pelo ácido e a matriz colágena só parcialmente digerida pela ação das enzimas, durante o ataque bacteriano da cárie (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005). Mesmo assim percebemos que a cavitação ou reabsorção em lesões de dentina se processa mais rapidamente. Estes fatos associados à ação das enzimas proteolíticas fazem com que a reabsorção ou cavitação, nas cáries de dentina, ocorra mais rapidamente do que nas de esmalte.

Sabe-se que na primeira camada de cáries de dentina, as alterações que ocorrem entre as fibras colágenas são irreversíveis. A matriz colágena intertubular contrai e colapsa logo no início do ataque ácido bacteriano (MARSHALL JR, 1998), a união dos cristais de apatita às fibras colágenas ficam destruídas (SHIMIZU *et* al., 1981) devido à alta dissolução dos cristais de apatita da dentina (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005) e as ligações cruzadas intermoleculares ficam irreversivelmente alteradas (KUBOKI; OHGUSHI; FUSAYAMA,1997). Portanto, podemos perceber que não se trata apenas de perda mineral, sendo assim a

135

remineralização não irá reconstituir as perdas teciduais, mas poderá auxiliar na paralisação da lesão.

A cicatriz de uma lesão de cárie de dentina ocorre a partir do órgão pulpar, como reposta aos estímulos agressores, mas também a partir do meio bucal através de fatores que regulam o desenvolvimento da lesão. A resposta do órgão pulpar, através da esclerose tubular, já pode ser observada mesmo antes da lesão de esmalte atingir o I.a.d. (BJORNDAL⁵ 1991 apud FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005); (KIDD; FFEJERSKOV, 2004; FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2005). Em lesões profundas, ocorre a formação da dentina terciária ou reacional que se caracteriza por apresentar túbulos irregularmente orientados e mais material orgânico do que a dentina normal, portanto pode ser mais permeável do que a primária (MJÖR, 1972). Pode ocorrer ainda, nas lesões profundas, a esclerose dos túbulos com calcificação do prolongamento dos odontoblastos, como resposta fisiológica ao estímulo agressor da cárie ou porque atuaram como matriz para a deposição do mineral dissolvido pelo processo bacteriano (JONES; BOYDE, 1987; KOULOURIDES, 1990). Fato este que pode ser observado neste estudo em certas elétron micrografias de lesões de cárie antes do processo de remineralização.

Entretanto, estudos têm demonstrado que fatores do ambiente bucal, principalmente da interface biofilme / dente, além de componentes salivares e do flúor atuam no sentido de colaborar com a cicatrização da cárie de dentina, através da remineralização, levando mesmo à paralisação das lesões, já que a cárie dental é o resultado do acúmulo de eventos que envolvem um processo dinâmico de

⁵ Bjorndal L. Carieslesionens tidligeudvikling I emlje og pulpa-dentinor-ganet. Dissertation. Copenhagen: Univ of Copen, 1991

desmineralização e remineralização (FEJERSKOV, 1997; TANTBIROJN et al., 2006).

Como a dentina radicular inicialmente se expõe ao meio bucal e às trocas iônicas com os fluidos bucais e fluidos da placa dental, incluindo o flúor, esta passa a apresentar uma certa resistência superficial ao ataque ácido bacteriano, da mesma forma que o esmalte. Sendo assim, o desenvolvimento da cárie de dentina radicular se assemelha um pouco ao da cárie de esmalte, no sentido de manter uma camada superficial mais resistente à desmineralização que se processa mais subsuperficialmente iniciais nos estágios bem do processo (LARSEN: PERACE,1992; WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995; NYVAD, ten CATE; FEJERSKOV, 1997).

Apesar de Fejerskov, Nyvad e Kidd (2005) afirmarem que quando a cárie de esmalte atinge a dentina o estágio de progressão requer tratamento operatório, entendemos que o tratamento remineralizador pode ser útil no sentido de auxiliar na paralisação das lesões, prevenindo a exposição pulpar e o envolvimento tecidual maior, nos casos em que o adiamento do tratamento restaurador se faz necessário, ou até mesmo como tratamento definitivo em lesões muito pequenas, em certos casos, já que estes sítios se tornam mais resistentes a novos desafios cariogênicos (JONES; BOYDE, 1987; KOULOURIDES, 1990; WHITE; NELSON; FALLER, 1994).

6.1 Características das lesões de cárie de dentina ao MEV

As lesões estudadas neste experimento foram bastante diversificadas quanto ao grau de progressão e extensão, conforme pode ser observado nas elétron micrografias de varredura pré remineralização e nos demais materiais de identificação das lesões uma vez que se tratam de lesões naturais, de diferentes pacientes. Nem sempre, a classificação referente à atividade de cárie baseada no exame visual coincidiu com o exame das lesões ao MEV, sendo que algumas delas classificadas como ativas sob exame visual, mostraram evidentes sinais de paralisação. Entendemos que os diferentes graus de desenvolvimento das lesões, analisadas sob microscopia eletrônica de varredura, estão relacionados com os diferentes graus de desmineralização das fibras colágenas e da dentina peritubular, além da desorganização da dentina intertubular com deterioração das fibras colágenas, conforme já relatado na literatura (FRANK; WOLFF; GUTMANN, 1964; JONES; BOYDE, 1987; KUBOKI; OHGUSHI; FUSAYAMA, 1977; SHIMIZU et al., 1981).

Relacionando o exposto na literatura com os achados nas análises de microscopia eletrônica de varredura deste estudo, entendemos que a evolução da lesão ocorre inicialmente com a desmineralização da dentina peritubular e de parte da dentina intertubular, mantendo a estrutura tecidual como mostra a lesão do dente nº 70 A pré. A partir deste ponto a evolução se processa aumentando a desmineralização da dentina intertubular intertubular com alteração estrutural desta trama, não se evidenciando mais a posição da abertura dos túbulos, como ocorre nas imagens das lesões dos dentes nº29 pré, nº62 pré e nº65 pré, evoluindo então para a

138

reabsorção enzimática das fibras colágenas quando se formam pequenas crateras como mostra a imagem da elétron micrografia da lesão do dente n°28 pré, crateras estas que unidas formam a cavitação maior. Pequena alteração da geometria superficial da dentina que pode ser também entendida como cavitação, entretanto, já pode estar presente no início da desmineralização da dentina peritubular e intertubular, através do colapso das fibras colágenas desmineralizadas (JONES; BOYDE,1987; MARSHALL JR, 1998).

As lesões de dentina podem, a qualquer destes momentos do estágio de evolução, paralisarem-se o que ocorre clinicamente quando há condições favoráveis à remineralização no ambiente bucal e, principalmente, quando há oferta de flúor (ARENDS et al., 1989b; ARENDS et al., 1990; FEATHERSTONE, 2000; FEJERSKOV, 1997; OSTRON et al., 1984; TANTBIROJN, 2006; WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995;). Analisando as imagens das elétron micrografias de varredura, observamos que sinais de paralisação foram observados nas lesões de cárie dos dentes n°57 pré, n° 48 pré e 70B pré, embora neste último caso a paralisação esteja associada também à reação pulpo-dentinária de esclerose, por tratar-se provavelmente de uma área mais profunda da lesão em que os prolongamentos dos odontoblastos apareceram projetando-se de alguns túbulos como pequenos cilindros mineralizados o que está de acordo com os relatos de Frank e Vogel (1980) e Jones e Boyde (1987).

6.2 Remineralização das lesões de cárie de dentina

Como trabalhamos com lesões não padronizadas, as respostas individuais frente ao tratamento remineralizador também foi diversificada, conforme pode ser observado principalmente nas elétron micrografias de varredura pós-remineralização e análise da absorção de flúor.

Sabe-se que os íons contidos na solução remineralizadora utilizada neste estudo são importantes elementos da remineralização, já que as apatitas do esmalte e dentina são compostas principalmente de cálcio e fósforo, e que os mesmos necessitam estar presentes em supersaturação na solução, para que a reação ocorra no sentido de formar os cristais na superfície dental e não no sentido oposto.

Sabe-se também que a presença do flúor é importante no processo de remineralização da cárie de dentina ou esmalte (ARENDS et al., 1989b; ARENDS et al., 1990; FEATHERSTONE, 2000; MELLBERG; MALLON, 1984; NYVAD; ten CATE; FEJERSKOV, 1997). O flúor pode ser incorporado ao cristal de apatita durante a formação deste o que o torna mais resistente, ou após a formação deste, sendo neste caso mais solúvel. O flúor iônico livre nos fluidos da placa ou nos fluidos entre os cristais dos tecidos dentais, por sua vez, desequilibra a reação DES-RE para o lado da RE (KOULOURIDES, 1990). Além de inibir a desmineralização e favorecer a remineralização, durante o desafio cariogênico, ele tem ação antibacteriana, reagindo com o hidrogênio livre quando cai o pH da placa, formando um composto que se difunde no interior da célula bacteriana, acidificando-a (FEATHERSTONE, 2000).

140

A escolha das concentrações de flúor nas soluções remineralizantes baseou-se na similaridade com a concentração deste íon com a água de abastecimento (1ppm) e com as soluções fluoretadas de auto-aplicação para bochechos diários (500ppm).

6.2.1 Análise ao MEV

Este estudo demonstrou que com o processo experimental de remineralização houve um acúmulo mineral superficial nas lesões, observáveis através das imagens de MEV, sendo que este acúmulo ocorreu mais em superfície do que no interior das lesões, concordando com o que demonstrou Arends et al. (1989) em estudo semelhante, com lesões de dentina desenvolvidas *in vitro*. Este acúmulo de mineral mais superficialmente do que em profundidade está relacionado com a capacidade de difusão dos fluoretos pelo interior da lesão que por sua vez depende da supersaturação dos íons flúor no meio em contato com a lesão (LARSEN; PEARCE, 1992). A análise das elétron micrografias de varredura das lesões remineralizadas sugere que nas lesões de cárie originalmente ativas as quais mostraram a trama colágena bem desmineralizada, após remineralização mostraram a deposição da camada lamelar de modo não contínuo deixando aparecer as fibras na subsuperfície. Já as lesões controladas onde havia um certo remanescente mineral, a deposição mineral formou uma camada mais densa ou ainda levou à formação de grumos, provavelmente resultante do acúmulo de grânulos minerais.

Entretanto, a formação de certos cristais como os das lesões dos dentes nº 42 pré e 36 pré, resulta muito provavelmente, de um processo de paralisação da lesão

141

em decorrência do ambiente bucal favorável, com maior oferta de cálcio, fosfato e flúor (DIJKMAN; SCHUTOFF; ARENDS, 1986; TANTBIROJN et al., 2006) e que também está relacionada a nosso ver com o grau de exposição da lesão ao meio externo, embora estas lesões tenham sido classificadas como ativas no exame visual. Observamos neste estudo, que as lesões que se encontravam mais expostas para o meio externo, que são normalmente as de superfície lisa, apresentaram-se nas análises iniciais, mais mineralizadas do que as de sulcos e fóssulas, provavelmente por estarem mais expostas ao meio bucal e, conseqüentemente, às trocas iônicas o que facilita a remineralização durante o processo DES-RE. Foi exatamente o que observamos com as lesões citadas anteriormente nos dentes nº 42 e n°36 as quais foram classificadas sob exame visual como lesões de cárie ativa, mas que na análise de MEV mostraram certo grau de mineralização. Seria difícil afirmar que tais lesões encontram-se paralisadas, mas é evidente que o ambiente bucal em que se encontravam favorecia a remineralização, dentro do processo DES-RE, a ponto de formar aquelas belas estruturas cristalinas no interior das mesmas, conforme pode ser observado nas respectivas elétron micrografias de varredura. Este comportamento provavelmente retarda o desenvolvimento da lesão, conforme se observa clinicamente nas lesões de superfície lisa, tanto em esmalte quanto em dentina.

De modo geral, pudemos observar que o padrão de remineralização ocorrido durante o experimento, variou muito entre as lesões, provavelmente em função do padrão original das mesmas, de acordo com o remanescente mineral (KAWASAKI et al., 2000; CRUZ, 2003). Se na imagem pré-remineralização a lesão de cárie original mostrou mais remanescente mineral entre as fibras colágenas a imagem pósremineralização foi um pouco diferente daquelas que mostravam o colágeno superficial totalmente desmineralizado, observando-se naquele caso um acúmulo mineral na forma de lamelas mais densas ou de grânulos minerais maiores, como pode ser observado nas lesões dos dentes de nº 42 pós e 70B pós, ou até com a formação de grandes grumos com a lesão do dente nº 50 pós.

Devemos lembrar que as observações pré e pós remineralização foram realizadas em fragmentos diferentes da mesma lesão e que procuramos sempre destacar os aspectos mais comuns de cada fragmento, já que variações nas características iniciais de cada lesão e no padrão de remineralização ocorreram também dentro de cada uma delas. Sendo assim, prevaleceu o padrão mais comum de cada observação.

Com relação à remineralização processada no experimento, o grau de deposição mineral nas lesões submetidas ao tratamento com as soluções remineralizantes foi proporcional ao nível de flúor nas soluções, uma vez que as três análises adotadas, MEV, microdureza e absorção de flúor apontaram maior efeito da solução com 500ppm de flúor do que da solução com 1ppm de flúor no processo de remineralização. No grupo 500ppm a análise de MEV demonstrou maior acúmulo superficial de grânulos minerais formando lamelas mais espessas, assim como maior absorção de flúor estatisticamente comprovada pela análise de absorção, fatos que estão de acordo com os estudos de Arends et al. (1989)b; Arends et al. (1990); Mukai; Lagerweij e ten Cate (2001).

Os depósitos minerais que se formaram sobre as lesões remineralizadas, provavelmente representam diferentes compostos fluoretados, não necessariamente a fluor-hidroxiapatita o que já foi demonstrado em estudo a respeito da remineralização de cárie incipiente de esmalte e de dentina (WHITE; NELSON; FALLER, 1994; FEATHERSTONE, 2000). Outros compostos fluorados principalmente o fluoreto de cálcio, podem se formar com mais facilidade, mas que se solubilizados, juntamente com o cálcio e fosfato dos tecidos dentais, podem se transformar em flúor-hidroxiapatita que é mais firmemente ligado aos tecidos dentais (WHITE; NELSON; FALLER, 1994; CRUZ, 2003). Portanto estas outras formações mais solúveis aumentam a resistência tecidual a novos desafios ácidos formando também uma barreira mecânica de proteção aos tecidos dentais (CRUZ, 2003).

Sendo assim, as lamelas que observamos nas imagens de MEV, sobre as lesões remineralizadas no processo experimental, mais ou menos regulares, dependendo da lesão original e da concentração de flúor a que foi exposta, são formadas muito provavelmente por acúmulo de grânulos de fluoreto de cálcio (Ca F₂), já que as estruturas encontradas estão de acordo com o relatado por Saxegaard, Valdehaugh e Rölla⁶ (1987, apud CRUZ, 2003). Estudos anteriores (IIJIMA et al., 1993; HEILMAN et al., 1997; KAWASAKI et al., 2000) demonstraram que elevados níveis de flúor em solução podem levar à hipermineralização da superfície da lesão e que esta hipermineralização também está relacionada com os níveis minerais remanescentes na lesão o que provavelmente justifique a imagem pós-remineralização do dente nº 50 que se apresentou com grande acúmulo de grumos superficiais que sugerem uniões de grânulos minerais, sendo que a lesão original já apresentava certa deposição de grânulos superficiais embora em menor intensidade.

Segundo a teoria do "Acid Atac Resistance, os cristais formados sobre lesões remineralizadas de esmalte endurecem este tecido tornando-o mais resistente a novos desafios cariogênicos (KOULOURIDES, 1990), o que também já foi

⁶ Saxegaard E, Valderhaug J, Rölla G. Deposition of fluoride on dentin and cementum after topical application of 2% Naf. In: Dentin and Dentin reactions in the oral cavity, Oxford, IRLPress, 1987, pp 199-206.
demonstrado ocorrer em dentina (HEILMAN et al., 1997; NYVAD; ten CATE; FEJERSKOV, 1997; KAWASAKI et al., 2000). Provavelmente devido à este fenômeno, vários trabalhos mais recentes, têm sido realizados estudando o padrão de remineralização dentinária sob ação de fluoretos, durante o processo DES-RE, in vitro (IIJIMA et al., 1993; NYVAD; ten CATE; FEJERSKOV, 1997; ten CATE; van DUINEN, 1995; WHITE; NELSON; FALLER, 1994), diferente deste estudo em que lesões naturais foram submetidas a um processo contínuo de remineralização, seguindo metodologia de Arends et al. (1989b), Arends et al. (1990) e Mukai, Lagerweij e ten Cate (2001). Aqueles trabalhos demonstraram que a ação do flúor durante o processo de desenvolvimento das lesões, ou seja, quando ocorrem os ciclos DES-RE, faz com que durante a desmineralização da camada superficial que se formou durante o processo RE sob ação do flúor, seja liberado mais flúor dos compostos formados, provavelmente fluoreto de cálcio (CRUZ, 2003), que migra para partes mais internas das lesões, sendo que nestas condições há possibilidade de se formarem camadas internas hipermineralizadas, mais resistentes a futuros desafios cariogênicos. Benefício semelhante foi observado por Argenta, Tabchoury e Cury (2003), durante a formação de lesões em esmalte. Embora neste estudo não tenha sido observada a ação do flúor em ciclos DES-RE, observamos, em todos os casos a formação de um depósito superficial de grânulos compatíveis com fluoreto de cálcio, formando desde delgadas lamelas até grossas crostas.

6.2.2 Absorção de flúor

O comportamento das lesões de cárie no que se refere à absorção de flúor durante o processo de remineralização aplicado neste estudo foi bastante dinâmico, ocorrendo ora a absorção ora a perda deste íon para o meio, ao longo do período em que as lesões permaneceram no meio remineralizante. Fato este que pode ser observado através dos gráficos de perfis individuais de absorção de flúor, o que pode refletir a perda ou ganho de outros minerais que fazem parte da estrutura dental, concomitantemente, como o cálcio e o fosfato OS quais podem reprecipitarem sobre a dentina sob a forma de outros compostos também. A solução permitiu uma certa dissolução dos compostos fluorados das lesões dos elementos dentais, provavelmente quando o meio era subsaturado em flúor em relação ao conteúdo da lesão, aumentando assim a concentração do flúor na solução e produzindo um valor negativo na absorção; quando a solução estava supersaturada em flúor em relação ao conteúdo da lesão, houve a absorção do íon diminuindo sua concentração em solução, produzindo valor positivo na absorção. Este comportamento foi observado nas lesões dos dentes nº 42 e nº 57, a primeira em processo de paralisação e a segunda paralisada; ambas responsáveis pelos pontos discrepantes na análise de absorção de flúor do grupo 1 ppm.

Como o estudo envolveu lesões naturais de elementos dentais provenientes de indivíduos moradores da grande São Paulo onde sabemos existir a fluoretação das águas de abastecimento há mais de três décadas, assim como em outras regiões do Brasil, com quantidade aproximada de 1ppm de flúor ou até maiores a ponto de produzirem fluorose dental, todos os elementos estudados foram beneficiados em

algum período pela ação deste íon (VIEIRA et al. 2005) que se manteve ou na própria estrutura dental, ou mais provavelmente ainda, na superfície das lesões, desenvolvimento das mesmas. durante 0 Observamos que houve um comportamento bastante diferenciado entre as lesões no que se refere à esta oscilação de perda ou ganho de flúor durante o processo, o que provavelmente se deva às diferentes origens dos elementos dentais, provenientes de diferentes indivíduos, com características socioeconômico e culturais diferentes o que leva a diferenças em hábitos alimentares, hábitos de higiene, etc. Estes fatores interferem na freqüência e na quantidade de contato com os íons flúor o que determina o conteúdo do mesmo na estrutura dental e no interior ou superfície da lesão. Daí algumas lesões perderem mais ou menos flúor para o meio remineralizante, durante o experimento. A resistência dos cristais fluorados também pode controlar este processo (KOULOURIDES, 1990; WHITE; NELSON: FALLER, 1994), mas sabemos que o cristal que mais comumente se forma é fluoreto de cálcio que é solúvel em água e na saliva, embora possa permanecer durante semanas sobre a superfície dental (CRUZ, 2003).

No que diz respeito ao efeito da concentração de flúor na solução remineralizante, os resultados deste estudo vão de encontro aos da literatura que diz que quanto maior a oferta de flúor, maior a remineralização (ARENDS et al., 1990; ITOTA et al., 2006; MELLBERG; MALLON, 1984; TANTBIROJN et al., 2006), já que foi demonstrado pelas imagens de MEV e estatisticamente pelas análises de absorção, que a solução com 500ppm de flúor resultou em maior ganho mineral do que a solução com 1ppm de flúor. Já para o grupo 1 ppm, como na água de abastecimento já existia a oferta de 1ppm de flúor, durante a formação das lesões, os elementos dentais já tinham sido de alguma forma beneficiados com a oferta de

concentração semelhante deste íon o que deve ter variado na freqüência de contato, além do benefício do flúor dos cremes dentais que apresentam cerca de 1000ppm de flúor, benefício este que também pode ter variado entre os indivíduos. Sendo assim, provavelmente, não havia uma supersaturação de fluoretos na solução de 1ppm de flúor em relação à vários elementos dentais do experimento, o que talvez possa explicar o fato de ter ocorrido até uma perda de flúor como resultado final nos elementos deste grupo experimental.

Observamos que neste grupo os elementos nº 42 e nº 57 destacaram-se bastante dos demais pelo fato de perderem mais flúor para a solução remineralizante até o final do processo. No caso do elemento 42 que originalmente pareceu ser uma lesão ativa, apresentou nas elétron micrografias de varredura alguns sinais de lesão paralisada, já que apresentou formações cristalinas grandes o que pode significar uma tendência maior para a RE durante o processo de desenvolvimento da lesão ainda na cavidade bucal; sendo assim, é provável que esta já apresentasse uma quantidade de compostos fluorados na lesão, superficial ou internamente um pouco maior, perdendo mais flúor para o meio. No caso do elemento nº 57, a lesão já apresentava originalmente aspecto de lesão paralisada onde as elétron micrografias de varredura demonstraram a presença de camada de grânulos superficiais provavelmente de depósito mineral de fluoreto de cálcio embora sem nenhuma formação cristalina maior, que também pode ter se dissolvido da mesma forma que na lesão do elemento nº 42, perdendo mais flúor para o meio

Entretanto, não há consenso sobre a concentração ideal de flúor para a remineralização das cáries de dentina (MELLBERG; MALLON, 1984; KOULOURIDES, 1990), já que a concentração do íon não é o único fator a ser

148

considerado, apesar de já ter sido demonstrado que concentrações elevadas são mais eficientes para a remineralização de lesões bem desmineralizadas (KAWASAKI et al., 2000). Estudo piloto utilizando solução remineralizante com 2000ppm de flúor demonstrou a formação sugestiva de camada mineral bastante densa, através de observações em MEV.

Já vimos que existe uma relação direta entre o nível mineral original da lesão e o grau de remineralização e que quando existe oferta de flúor durante o processo DES-RE a remineralização se processa de modo mais eficiente, em partes mais profundas da lesão, podendo se formar cristais menos solúveis. Para Dijkman, Schuthoff e Arends (1986), dependendo do ambiente bucal, a remineralização do esmalte pode se processar mesmo sem a oferta de flúor. Para Koulourides (1990), as aplicações de consultório promovem um benefício semelhante ao da água de abastecimento fluoretada com 1ppm de flúor, sendo que o autor enfatiza que não há dúvidas de que a freqüência de contato do flúor com os tecidos dentais promove uma grande proteção contra o desenvolvimento das lesões de cárie, desde que a concentração seja minimamente favorável.

A capacidade de difusão dos fluoretos para o interior dos tecidos também é um fator que controla o grau de remineralização (ARENDS et al., 1990). Segundo alguns autores, níveis elevados de flúor podem levar a uma hipermineralização e dificultar a difusão de fluoretos para o interior dos tecidos (WEI; KAQUELER; MASSLER, 1968). Entretanto, vários trabalhos têm demonstrado que esta hipermineralização favoreceria a mineralização em profundidade, uma vez que nova dissolução ácida dos fluoretos depositados tornaria o fluido da lesão supersaturado e permitiria nova difusão do íon para o interior da lesão formando novos compostos, às vezes mais resistentes, como a flúor-hidroxiapatita.

Baseados neste conceito, alguns trabalhos demonstraram a formação de bandas de remineralização mais para o interior das lesões ou a formação de uma segunda camada hipermineralizada, mais interna quando lesões е hipermineralizadas, através da oferta de flúor, foram submetidas a novo desafio cariogênico (HEILMAN et al., 1997; IIJIMA et al., 1993; WHITE; NELSON; FALLER, 1994). Poderia haver, nestes casos, uma nova redistribuição mineral para camadas mais internas das lesões e não simplesmente a perda mineral superficial (HEILMAN et al., 1997, NYVAD; ten CATE; FEJERSKOV, 1997) e isto tem um grande significado no controle das lesões de cárie de dentina, tanto coronária quanto radiculares.

6.2.3 Microdureza da dentina remineralizada

Analisando os resultados dos testes de microdureza, a literatura é clara em afirmar que estes são de fácil reprodutibilidade, entretanto, diferenças de valores podem ocorrer devido a dificuldades na leitura das marcas, decorrentes da recuperação elástica destas, especialmente quando são menores do que 100µm. No caso da dureza Knoop, esta recuperação ocorre principalmente ao longo da diagonal maior, sendo que se medidas forem tomadas imediatamente após o teste, este se torna praticamente insensível à recuperação elástica do material (FUENTES et al., 2003).

Tanto para o grupo 1 ppm quanto para o grupo 500ppm, a análise estatística dos testes de microdureza revelaram que não houve aumento estatisticamente

significante na microdureza comparando os dados pré e pós remineralização, para ambos os grupos experimentais, embora tenha sido observado um pequeno aumento numérico para o grupo 500ppm, porém sem significado estatístico. A maior absorção de flúor além da maior deposição mineral observada através das elétron micrografias de varredura detectada para o grupo 500ppm, em comparação com o grupo 1ppm, não foram suficientes, portanto, para aumentar a dureza da lesão. Entretanto, a análise estatística revelou uma tendência de diferença estatisticamente significante entre as lesões ativas e inativas, após a remineralização, sendo que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entres estes dois tipos de lesões, pré-remineralização.

Para o grupo 1ppm, observou-se numericamente até um ligeiro declínio na microdureza, considerando o grupo como um todo, o que é compatível com a análise de absorção de flúor que também mostra uma perda de flúor para o grupo como um todo, já que se somarmos o valor total de absorção de cada espécime deste grupo, obteremos um valor negativo.

Os dados das endentações mostram que os valores obtidos com os dentes, através da análise de microdureza pré-remineralização, estão compatíveis com os de Banerjee et al. (1999), que situou-se -se entre 13,64 e 37,93 KNH. Segundo os mesmos autores, estes valores se referem à camada externa da lesão, ou seja, onde existe maior desmineralização o que está de acordo com os objetivos deste experimento, sendo que a camada externa tem cerca de 1000µm até chegar a zona translúcida (BANERJEE et al., 1999) e as endentações processadas neste experimento situaram-se em média a 400µm da superfície, concordando com a metodologia de Turssi et al. (2006). Sendo assim, os testes de microdureza realizados neste estudo correspondem exatamente à camada externa da lesão, onde se processa a maior deposição mineral com a remineralização, assim como os testes pós-remineralização que seguiram os mesmos critérios. Devemos salientar que os testes pós-remineralização não correspondem exatamente às mesmas áreas pré-remineralização das lesões, já que foram realizados em fragmentos diferentes das mesmas. Para as lesões inativas a camada externa corresponderia a apenas 50µm, sendo assim os testes de microdureza realizados para estas lesões teriam se processado na camada interna das lesões, provavelmente na zona translúcida que apresenta, segundo a literatura, microdureza entre 37,93 e 55KHN, menor que a dentina sadia (BANERJEE et al., 1999; HOSOYA et al., 2000).

Comparando nossos dados com os da literatura, a maioria das endentações ocorreu exatamente na camada externa a qual parece ser a que mais se beneficia do processo de remineralização conforme descreve a literatura (KAWASAKI et al., 2000) e conforme mostrou a metodologia aqui adotada, através da deposição superficial de compostos fluorados. Nas lesões muito pequenas, cujos fragmentos foram ainda menores, a observação prévia dos espécimes em lupa, permitiu a demarcação das áreas de observação através de desenho de pontos e / ou linhas sobre a resina de inclusão em locais próximos às áreas de interesse das lesões.

Analisando os espécimes dos grupos 1ppm e 500ppm individualmente, observamos que houve pontos de endentação que indicariam perda mineral e outros que indicariam ganho mineral para o mesmo espécime, já que, segundo a literatura, a remineralização, principalmente com oferta de flúor, aumenta a microdureza da dentina cariada (PIGMAN; KOULOURIDES; NEWBRUN, 1960; SEAMAN; SHANON, 1979; SHANON; KEUPER, 1976), embora possa não voltar aos valores da dentina sadia (TURSSI et al. 2006). Esta variação pode ser justificada pelo fato da deposição mineral não se processar uniformemente em toda a superfície da lesão, já que a união do mineral à superfície se processa por epitaxia (CRUZ, 2003), ou seja sobre o mineral pré-existente, o que fez com que as áreas com maior remanescente mineral ganhassem mais mineral na superfície no processo de remineralização. A redistribuição deste mineral superficial para camadas mais internas e de modo mais homogêneo ocorreria com novos desafios cariogênicos (KAWASAKI et al., 2000).

Entretanto, mesmo a dentina sadia mostra grande variação de microdureza em um mesmo elemento dental, em função de vários fatores, como a proximidade com a polpa (SHANON; KEUPER, 1976), densidade tubular (PASHLEY; OKABE; PARHAM, 1985), além das diferenças no grau de mineralização da dentina peritubular e intertubular (MARSHALL JR, 1998) e orientação das fibras colágenas (JONES; BOYDE, 1987), pois trata-se de um tecido com grandes variações estruturais. Técnicas mais sensíveis como a nanoendentação ou até a tomografia microscópica por Raios X, já foram propostas para melhor padronizar as análises, já que o tecido tem grande variação estrutural (MARSHALL, JR, 1998).

A análise de microdureza revelou, portanto, que as concentrações de flúor utilizadas para a remineralização das lesões de cárie nesta metodologia não foram suficientes para produzir um aumento da dureza das lesões, sendo compatível com a análise de absorção de flúor. Embora, estudos prévios tenham demonstrado aumento da dureza da dentina cariada após processos de remineralização com diferentes compostos fluorados em diferentes concentrações (KIELBASSA et al., 2002; PAES LEME et al., 2003; PIGMAN; KOULOURIDES; NEWBRUN, 1960; SEAMAN; SHENON, 1979; SHANNON; KEUPER, 1976). Observamos que a literatura é um pouco controversa em avaliar o grau de desmineralização ou remineralização do esmalte e principalmente da dentina, utilizando testes de microdureza, sendo que enquanto alguns autores rejeitam a técnica para este fim (MARSHALL JR, 1998), outros fazem relação direta do ganho ou perda mineral com as análises de microdureza (FEATHERSTONE et al., 1983). Acreditamos que a relação dos testes de microdureza com o ganho ou perda mineral deve ser cuidadosa principalmente em dentina que apresenta uma variedade estrutural bastante complexa e mais ainda para a dentina cariada conforme pode ser observado nos dados obtidos neste estudo, mesmo considerando todos os cuidados metodológicos aplicados durante a realização dos testes.

6.3 Considerações gerais

Considerando os benefícios decorrentes da oferta de flúor durante o processo de desenvolvimento das lesões de cárie ou mesmo após a instalação destas, seria interessante clinicamente que nossos pacientes fossem beneficiados destes mecanismos protetores, também através da utilização de materiais fluoretados que liberem flúor, como os cimentos de ionômero de vidro e vernizes fluoretados.

Já foi demonstrado que os cimentos de ionômero de vidro endurecem a dentina em contato com o material, podendo ocorrer uma hipermineralização (ten CATE; van DUINEN, 1995), aumentando a resistência deste tecido a novo ataque bacteriano pela diminuição dos canais de difusão da dentina. Da mesma forma, liners contendo flúor são capazes de proporcionar o mesmo benefício (ITOTA et al., 2006). Sendo que a camada de esfregaço que se forma com a instrumentação da dentina e do esmalte, durante os preparos das cavidades (LUZ; GARONE NETTO; ARANA-CHAVEZ, 2001) não restringe a difusão dos íons flúor (BUCHALLA et al., 2007). Desta forma seria uma boa indicação o uso de cimentos de íonômero de vidro ou liners fluoretados como materiais de proteção pulpar e até mesmo o tratamento das paredes cavitárias com soluções fluoretadas previamente ao processo de restauração ou proteção pulpar, pois o flúor pode ser liberado para a dentina subjacente proporcionando a remineralização ou hipermineralização deste tecido. Proteção semelhante ocorre em esmalte adjacente a restaurações com cimento de íonômero de vidro, remineralizando lesões incipientes ou inibindo o desenvolvimento de novas lesões (GAMA TEIXEIRA et al., 2007; HATIBOVIC-KOFMAN; SULJAK; KOCH, 1997). Sendo que Maltz et al. (2002) demonstraram que até mesmo o selamento com óxido de zinco e eugenol tipo II foi capaz de paralisar lesões de cárie de dentina parcialmente removidas.

Entendemos que apesar de não ter ocorrido reestruturação tecidual durante a remineralização dentinária, o que já era esperado, nem o aumento da microdureza com a metodologia aplicada, pudemos observar que existiu uma tendência de a dureza dentinária aumentar, com o aumento da concentração e sabemos que o mineral superficial formado, muito provavelmente fluoreto de cálcio, pode se dissolver e migrar mais para o interior da lesão formando novos cristais mais estáveis como a flúor hidroxiapatita, perante novos desafios ácidos. Portanto é provável obter-se grandes benefícios terapêuticos com o flúor, em lesões de cáries existentes, em cavidades bucais em condições de atividade de cárie. O tratamento com este íon, que apresenta grandes efeitos na prevenção da cárie dental, tem demonstrado apresentar interessantes efeitos terapêuticos controlando o desenvolvimento de lesões existentes, não só daquelas incipientes em esmalte mas das mais desenvolvidas em dentina coronária ou radicular.

155

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia aplicada, concluímos que:

 o processo de remineralização levou à formação de um depósito mineral superficial nas lesões de cárie de dentina, observáveis através do MEV, sendo mais tênue no grupo1ppm e mais denso no grupo 500ppm;

 a absorção de flúor durante o processo de remineralização não é contínua, observando-se perda final de flúor para o grupo 1ppm e ganho de flúor para o grupo 500ppm;

 para ambos os grupos estudados, 1ppm e 500ppm, o processo de remineralização não aumentou a microdureza da superfície das lesões, embora tenha sido observado um aumento numérico da dureza para o grupo 500ppm;

 houve indícios de que concentrações maiores de flúor poderiam produzir mais efeito no processo de remineralização das lesões de cárie de dentina.

REFERÊNCIAS¹

Arends J, Ruben J, Jongebloed WL. Dentine caries in vivo. Caries Res 1989a;23:36 41.

Arends J, Christoffersen, J, Ruben J, Jongebloed WL. Remineralization of bovine dentin in vitro. Caries Res 1989b;23:309-14.

Arends J, Jongebloed W, Öggard B, Rölla G. SEM and microradiografic investigation of initial enamel caries. Scand J Dent Res 1987;96:193-201.

Arends J, Ruben JL, Cristoffersen J, Jongebloed WL, Zuidgeest TGM. Remineralization of human dentine in vitro. Caries Res 1990; 24:432-5.

Argenta RMO, Tabchoury CRM, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. Pesq Odontol Bras 2003;17(3):241-6.

Banerjee A, Sherriff M, Kidd EAM, Watson TF. A confocal microscopic study relating the autofluorescence of carious dentine to its microhardness. Br Dent J 1999;187(4):206-9.

Boyde A, Lester KS. An electron microscope study of fractured dentinal surfaces. Calc Tiss Res 1967;1:122-36.

Buchalla W, Lennon AM, Becker K, Lucket T, Attin T. Smear layer and surface state affect dentin uptake. Arch Oral Biol 2007; 18 [Epub ahead of print].

Bussab W, Morettin P. Estatística Básica. 5ª ed. São Paulo: Atual; 2004.

Clarcksson BH, Feagin FF, McCurdy SP, Sheetz JH, Speirs R. Effects of phosphoprotein moieties on the remineralization of human root caries. Caries Res 1991; 25:166-73.

Conover WJ. Pratical Nomparametric Statistics. 2^a ed. Nova York: Wiley, 1980.

¹ De acordo com Estilo Vancouver – Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Craig RG, Gehring PE, Peyton FA. Relation of structure to the microhardness of human dentin. J Dent Res 1959;38(3):624-30.

Cruz RA. Reatividade de produtos fluoretados aplicados topicamente no esmalte humano. In: Kriger L. Promoção de saúde bucal, paradigma, ciência, humanização. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2003.

Dalitz GD. The hardness of dentine related to age. Aust Dent J 1962;7:463-4.

Dijkman AG, Schuthoff J, Arends J. In vivo remineralization of plaque induced initial enamel lesions – a microradiographic investigation. Caries Res 1986;20:202-8.

Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. J Amer Dent Assoc 2000;131:887-9.

Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artifitial carieslike lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res 1983;17:385-91.

Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. Community Dent Oral Epidemiol 1997;25:5-12.

Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM. Características clínicas e histológicas da cárie dentária. In: Fejerskov O, Kidd EAM. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos; 2005.71-97.

Frank RM, Voegel JC. Ultrastructure of the human odontoblast process and its mineralisation during dental caries. Caries Res 1980;14:367-80.

Frank RM, Wolff F, Gutmann B. Microscopie electronique de la carie au niveau de la dentine humaine. Arch Oral Biol 1964;9:163-79.

Frank RM. Electron microscopy of undecalcified sections of human adult dentine. Arch Oral Biol 1959;1:29-32.

Fuentes V, Toledano M, Osorio R, Carvalho RM. Microhardness of superficial and deep sound human dentin. J Biomed Mat Res 2003;66A;850-5.

Fusayama T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. Oper Dent 1979;4:63-70

Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. Relationship between hardness, discoloration, and microbial invasion in carious dentin. J Dent Res 1966;45(4):1033-46.

Gama-Teixeira A, Simionato MRL, Elian SN, Sobral MAP, Luz MAAC. *Streptococus mutans* induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations *in vitro*. Braz Oral Res. no prelo 2007.

Grajower R, Azaz B, Bron Levi M. Microhardness of sclerotic dentin. J Dent Res 1977;56(4):44-6.

Hatibovic-Kofman S, Suljak JP, Koch AG. Remineralization of natural carious lesions with a glass ionomer cement. Swed Dent J 1997,21:11-7.

Heilman JR, Jordan TH, Warwick R, Wefel JS. Remineralization of root surfaces demineralized in solution of differing fluoride levels. Caries Res 1997;31:423-8.

Hellwig E, Lussi A. What is the optimum fluoride concentration needed for the remineralization process? Caries Res 2001;35(Suppl 1):57-9.

Hosoya Y, Marshall SJ, Watanabe LG, Marshall GW. Microhardness of carious decidous dentin. Oper Dent 2000;25(2):81-9.

lijima Y, Ruben JL, Zuidgeest TGM, Arends J. Fluoride and mineral content in hyperremineralized coronal bovine dentine in vitro after an acid challenge. Caries Res 1993;27:106-10.

Itota T, Nakabo S, Torii Y, Narukami T. Doi J, Yoshiyama M. Effect of fluoridereleasing liner on demineralized dentin. Quintessence Int 2006;37(4):273-81. Jaeger RG. Comportamento biológico da dentina cariada humana após capeamento pulpar indireto. Estudo morfológico pela microscopia de luz e eletrônica [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1988.

Jones SJ, Boyde A. Scanning microscopic observations on dental caries. Scan Microsc 1987;1(4):1991-2002.

Kawasaki K, Ruben J, Tsuda H, Huysmans MCDNJM, Takagi O. Relationship between mineral distributions in dentin lesions subsequent remineralization in vitro. Caries Res 2000; 34(5):395-403.

Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. J Dent Res 2004;83 (Spec Iss):C35-C-38.

Kielbassa AM, Munz I, Bruggmoser G, Schulte-Mönting J. Effect of demineralization and remineralization on microhardness of irradiated dentin. J Clin Dent 2002;13(3):104-10.

Koulourides T. Summary of session II: Fluoride and the caries process. J Dent Res 1990;69:558.

Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. J Dent Res 1977;56(10):1233-7.

Lagerweij MD, ten Cate JM. Acid susceptibility at various depths of ph-cycled enamel and dentine specimens. Caries Res 2006;40(1):33-7.

Larsen MJ, Pearce EIF. Some notes on the diffusion of acidic and alkaline agents into natural human caries lesions *in vitro*. Archs Oral Biol 1992;37(5):411-6.

Luz MAAC, Birman EG. Cárie em pacientes com hiposalivação: aspectos clínicos, terapêuticos e preventivos. Rev Bras Odontol 1996;53(6):27-31.

Luz MAAC, Garone Netto N. Importância do esfregaço na permeabilidade dentinária. Rev Odontol Univ São Paulo 1995;9(2):101-7.

Luz MAAC, Garone Netto N, Arana-Chavez VE. SEM study of different treatments of the smear layer on different cavity walls. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol 2001;43:46-52.

Maltz M, Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic and radiographic study of deep caries lesions after incomplete removal. Quintes Int 2002;33:151-9.

Marshall Jr GW. Dentin: microstructure and characterization. Quintes Int 1998;24(9):606-17.

Mellberg JR, Mallon DE. Acceleration of remineralization in vitro by sodium monofluorophosphate and sodium fluoride. J Dent Res 1984;63(9):1130-5.

Miyauchi H, Iwaku M, Fusayama T. Physiological recalcification of carious dentin. Bull Tokyo Med Dent Univ 1978;25:169-79.

Mjör IA. Human coronal dentine: structure and reactions. Oral Surg 1972;33(5):810-23.

Mukai Y, Lagerweij MD, ten Cate JM. Effect of a solution with high fluoride concentration on remineralization of shallow and deep root surface caries *in vitro*. Caries Res 2001;35:317-24.

Neter J, Wasserman W, Kutner M. Applied Linear Statistical Models. 5^a ed. Boston: Mc Grow Hill Irwin, 2005.

Newbrun E, Pigman W. The hardness of enamel and dentin. Austr Dent J 1960; 5(3):210-7.

Nyvad B, ten Cate JM, Fejerskov O. Arrest of root surface caries *in situ*. J Dent Res 1997;76(12):1845-53.

Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. J Dent Res 1983;62(1):7-10.

Ohgushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. J Dent Res 1975;54(5):1019-26.

Ostrom CA, Koulourides T, Retief DH, Bradley EL. Enamel fluoride uptake and acid resistance in subjects with high and low experimental cariogenicity. J Dent Res 1984;63(2):133-6.

Paes Leme AF, Tabchoury CPM, Zero DT, Cury J A . Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. Amer J Dent 2003:16(2);91-5.

Paolinelis G, Watson TF, Banerjee A. Microhardness as a predictor of sound and carious dentine removal using alumina air abrasion, Caries Res 2006;40:292-5.

Pashley D, Okabe A, Parham P. The relastionship between dentin microlhardness and tubule density. Endo Dent Traumatol 1985;1(4-6):176-9.

Pigman W, Koulourides T, Newbrun E. Fluoride action as evaluated by the artificial mouth. – Ward Pigman. J Dent Res 1960;39(6):1117.

Ratledge DK, Kidd EAM, Beighton D. A clinical and microbological study of approximal carious lesions. Caries Res 2001;35:8-11.

Seaman F, Shannon IL. Fluoride treatment and microhardness of dentin. J Prosthet Dent 1979;41(5):528-30.

Shannon IL, Keuper JB. Microhardness of human dentin: baseline values and effects of fluorides. J Mc Dent Assoc 1976;56(9):11-8.

Shimizu C, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. Carious change of dentin observed on longspan ultrathin sections. J Dent Res 1981;60(11):1826-31.

Svanberg M, Mjör IA, Orstavik D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. J Dent Res 1990;69:861-4.

Tantbirojn D, Feigal RJ, Ko CC, Versluis A. Remineralized dentin lesions induced by glass ionomer demonstrated increased resistance to subsequent acid challenge. Quintes Int 2006;37(4):273-81.

ten Cate JM, van Duinen RNB. Hipermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. J Dent Res 1995;74(6):1266-71.

ten Cate AR. Oral histology: development structure and function. 4^a ed. St. Louis: Mosby, 1994. cap.3, p.45-57.

Tronstad L. Ultrastructural observations on human coronal dentin. Scand J Dent Res 1973;81(2):101-11.

Turssi CP, Lima RQV, Faraoni-Romano J, Serra MC. Rehardening of caries-like lesions in root surfaces by saliva substitutes. Gerodontol 2006;23:226-30.

Vieira A, Hancock R, Dumitriu M, Schwartz M, Limeback H, Grynpas M. How does fluoride affect dentin microhardness and mineralization? J Dent Res 2005;84(10):951-7.

Wefel JS, Heilman JR, Jordan TH. Comparisons of in vitro root caries models. Caries Res 1995;29:204-9.

Wei SH, Kaqueler JC, Massler M. Remineralization of carious dentin. J Dent Res 1968;47(3):381-91.

Wescott WB, Starcke EN, Shannon IL. Chemical protection against postirradiation dental caries. Oral Surg 1975;40(6):709-19.

White DJ, Nelson DGA, Faller RV. Mode of action of fluoride: application of new techniques and test methods to the examination of the mechanism of action of topical fluoride. Adv Dent Res 1994;8(2):166-74.

White J, Adams GL. Microhardness and scanning electron microscopy analysis of Nd:YAG laser and acid treatment effects in dentin. Scanning Microscopy 1996;10(2):329-37.

APÊNDICE A – Dados individuais dos testes de microdureza Knoop pré e pósremineralização

Dente	Medidas pré					Medidas pós				
22	0,55	0,69	1,7	1,86	2,48	6	6,5	10,6	12,4	9,26
23	1,33	1,16	1,52	1,97	2,03	6,31	12,9	7,66	0,54	7,52
27	5,36	4,85	4,4	7,17	7,86	3,42	1,36	1,58	9,07	4,27
28	12,1	16,6	20,3	14,7	14,3	28,6	21,7	45	38,4	27,9
29	12	10,3	4,39	7,61	7,68	9,58	14,5	8,53	5,78	8,36
36	9,14	6,27	13,7	12,6	11,8	6,22	11,7	7,85	9,02	13,8
42	14,2	18,6	11,7	6,53	11,8	5,55	2,41	8,98	8,77	7,22
47	1,98	15,4	10,6	3,44	4,89	11	6,34	6,1	11,5	6,31
48	16,5	9,64	14,4	34,5	33,5	2,24	27,1	26,3	15,7	16
57	54,4	49,9	49,6	40,7	42,7	13,4	16	16,7	18,3	15,3

Tabela A1 – Grupo 1ppm

Dente	Medidas pré				Medidas pós					
49	0,3	2,83	2,24	2,41	4,67	22,2	16	11,1	7,51	4,36
50	2,99	26,8	12,9	5,1	13,8	6,54	10,9	5,88	8,2	2,99
51	35,8	28,9	25,3	30,5	30,8	28,6	21,6	36,8	46,6	37,1
59	13,4	12,8	36,1	29,9	22,8	3,11	4,74	43,9	6,14	13,1
60	19,2	24,4	15,8	23,6	21,9	11,7	27,1	21,9	12,4	18,5
62	24,2	17,6	18,6	17,8	16,9	18,4	32,8	17,3	15,7	17,5
65	11,8	10,6	13,1	13,2	15,5	14,8	16,8	9,12	11,5	12,9
70	6,12	4,5	2,64	1,93	6,62	3,47	7	6,06	5,01	6,31
70B	1,36	2,76	2,43	3,88	4,37	34,3	26,2	25,1	21,4	31,7
71	1,39	3,01	2,33	1,51	2,46	0,3	0,52	4,57	0,31	5,14

Tabela A2 – Grupo 500ppm

APÊNDICE B – Diagramas de calibração para a medição de flúor em solução



Figura B1 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o dia 29/05



Figura B2 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o Período de 01/06 a 05/06



Figura B3 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o dia 06/06



Figura B4 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de Flúor (log ppm) para o dia 07/06.



Figura B5 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 08/06 a 09/06



Figura B6 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período 12/06 a 14/06



Figura B7 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 19/06 a 20/06.



Figura B8 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 21/06 a 26/06



Figura B9 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 27/06 a 05/07



Figura B10 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 06/07 a 13/07



Figura B11 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 14/07 a 19/07



Figura B12 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 29/05 a 31/05



Figura B13 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 01/06 a 02/06.



Figura B14 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 05/06 a 07/06.



Figura B15 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 08/06 a 20/06



Figura B16 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 21/06 a 27/06.



Figura B17 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 28/06 a 03/07



Figura B18 – Diagrama de Dispersão da Voltagem da Solução (mV) pelo Logaritmo da Concentração de flúor (log ppm) para o período de 28/06 a 03/07

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO Protocolo 195/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Remineralização de lesões naturais de cárie de dentina "in vitro"*, de responsabilidade da Pesquisadora Professora Doutora **Maria Aparecida Alves de Cerqueira Luz**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 07 de dezembro de 2005

Prof.Dr. Rogério Mogueira de Oliveira Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-000 São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011)3091-0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7825