



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**ANDREA MASELLI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS  
SOBRE A DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO E PROGRESSÃO  
DA LESÃO DE CÁRIE RADICULAR: estudo "*in vitro*"**

2017

**ANDREA MASELLI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE A  
DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO E PROGRESSÃO DA LESÃO DE CÁRIE  
RADICULAR: estudo “*in vitro*”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área de Dentística.

Orientador: Prof. Adj. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

Co-orientadora: Profa. Adj. Ana Carolina Magalhães

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Masseli, Andrea

Avaliação do efeito de diferentes tratamentos sobre a degradação do colágeno e progressão da lesão de cárie radicular: estudo "in vitro" / Andrea Masseli. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.  
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientador: Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

Coorientador: Ana Carolina Magalhães

1. Dentina. 2. Colágeno. 3. Flúor. 4. Laser. 5. Clorexidina. I. Gonçalves, Sérgio Eduardo de Paiva, orient. II. Magalhães, Ana Carolina, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Adj. Sergio Eduardo de Paiva Gonçalves** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Adj. Alessandra Buhler Borges**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Graziela Ribeiro**

Universidade de Odontologia de Braz Cubas

Mogi das Cruzes

São José dos Campos, 12 de dezembro de 2017.

## DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida, por iluminar meu caminho, dando-me paz e serenidade.

Aos meus Pais, Antonio Maselli e Vittória L. Giordano Maselli, pelo exemplo de vida e por nunca medirem esforços para me proporcionar o melhor. Por me fazerem acreditar que o esforço sempre nos dá recompensas e pela formação com valores inestimáveis, sem os quais não teria alcançado esta etapa profissional.

À minha filha Pietra Maselli Tescari, por me fazer acordar todos os dias e querer ser uma pessoa melhor.

Ao meu amado marido, Sergio Tescari Jr., não tenho nem palavras para expressar a minha gratidão à você e o quanto o seu amor e seu apoio foram importantes pra mim, sem você não teria conseguido.

## AGRADECIMENTOS

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Adj. Estevão Tomomitsu Kimpara.*

*Ao meu orientador Prof. Adj. Sergio Eduardo de Paiva Gonçalves, pela dedicação, pela amizade e pela paciência.*

*À Profa. Adj. Ana Carolina Magalhães, pela determinação à pesquisa e o imenso auxílio em todas as fases da realização deste trabalho. Pela solicitude, paciência e cooperação no desenvolvimento deste trabalho.*

*A Universidade de São Paulo – USP. Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB, por permitir a execução da parte experimental deste estudo.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do coordenador Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges.*

*Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora.*

*Ao Prof. Dr. Wagner Oliveira, pelo convívio fraterno, pela amizade e dedicação.*

*Ao Prof. Titular. Sigmar de Mello Rode, pela amizade e toda sua colaboração.*

*Aos Profs. Drs. Eduardo Bresciani e Graziela Ribeiro, membros do meu exame de qualificação de mestrado.*

*Ao meu querido amigo Wilson Afonso Jr, pela sua amizade e por estar sempre ao meu lado em todas as horas que eu mais precisei de ajuda.*

*Ao meu grande amigo Ricardo Brayner, pela sua valiosa amizade e por todo seu apoio e*

*ajuda em todos esses anos.*

*À minha amiga Lorena C. Bogado Escobar, por toda sua ajuda e principalmente por sua amizade.*

*Ao meu amigo Pablo Benitez por todos os seus ensinamentos fotográficos.*

*Ao meu querido amigo Odair Bim, pela sua amizade e pela imensa ajuda no desenvolvimento da minha dissertação.*

*As minhas queridas companheiras Ayla Correia, Lucélia Gonçalves e Tânia Mara da Silva, pela amizade e ajuda.*

*A Aline Silva Braga, pela grande ajuda na execução da parte experimental do meu trabalho.*

*Aos colegas de pós-graduação, os quais eu tive o grande prazer de conhecer e conviver: Ana Luiza, Mariene Mailart, Maurício Yugo, Rafael Rocha, Sheila Mondragón.*

*Aos pós-graduandos das áreas de Endodontia e Prótese, pelo acolhimento e amizade durante as disciplinas cursadas nestas áreas e pelo convívio diário.*

*Aos meus amigos queridos do COAT pela convivência durante todos esses anos.*

*Às funcionárias Josi e Fernanda por toda solicitude e cooperação.*

*A Todos os Funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.*

*A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.*

*“ Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”. Steve Jobs*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Características da dentina sadia.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Cárie Dental.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Métodos Preventivos de cárie .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.1 Clorexidina .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3.2 Flúor.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.3 Laser de Nd: YAG .....</b>	<b>35</b>
<b>3. PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Delineamento Experimental.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Preparo das Amostras .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3 Desmineralização dos Espécimes .....</b>	<b>45</b>
<b>4.4 Divisão dos Grupos.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5 Desafio da colagenase .....</b>	<b>47</b>
<b>4.6 Ensaio da Hidroxiprolina .....</b>	<b>48</b>
<b>4.7 Amostras Adicionais .....</b>	<b>51</b>
<b>4.8 Microradiografia Transversal .....</b>	<b>51</b>
<b>4.9 Preparo e irradiação das amostras .....</b>	<b>52</b>
<b>4.10 Planejamento Estatístico .....</b>	<b>55</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Teste da Hidroxiprolina.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2 Microradiografia Transversal .....</b>	<b>56</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>68</b>

**ANEXO A – Certificado Comitê de Ética..... 78**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de divisão dos grupos.....	41
Figura 2 – Processo de desmineralização.....	42
Figura 3 – Preparo das Amostras .....	43
Figura 4 - Amostras posicionadas para realização do acabamento e polimento da superfície .....	44
Figura 5 – Politriz Metalografica.....	45
Figura 6 – Espécimes preparados.....	46
Figura 7 – Aplicação de flúor neutro .....	44
Figura 8 – Equipamento de laser Nd YAG <i>laser</i> .....	47
Figura 9 – Amostras Armazenadas individualmente.....	48
Figura 10 – Coleta e diluição das soluções .....	49
Figura 11 – Reagentes .....	50
Figura 12 – Placa de 96 poços .....	50
Figura 13 - Amostras fixadas no porta amostras previamente à inserção no cassete, o qual foi colocado dentro do gerador de raio X (Softex, Japão) .....	53
Figura 14 – Placa de vidro sensibilizada pelo raio-x ( 20 kv e 20mA) .....	53
Figura 15 - Captura da imagem para análise (Inspektor Research System bv, Holanda) .....	54
Figura 16 - Software utilizado para análise da microrradiografia na superfície da amostra .....	54
Figura 17 - Gráfico da concentração de hidroxiprolina .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perda mineral integrada ( $\Delta Z$ , %min. $\mu\text{m}$ ) da dentina após diferentes condições experimentais.....	57
Tabela 2 - Profundidade da lesão (LD, $\mu\text{m}$ ) da dentina após diferentes condições experimentais.....	58

Maselli A. Avaliação do efeito de diferentes tratamentos sobre a degradação do colágeno e progressão da lesão de cárie radicular: estudo “*in vitro*” [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

## RESUMO

A mensuração da degradação de colágeno radicular é um importante parâmetro para avaliar a progressão de cáries na dentina ou a eficácia de métodos terapêuticos na prevenção de lesões não cariosas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação do colágeno da dentina radicular frente a métodos de prevenção de cárie, utilizando o teste da Hidroxiprolina e a microrradiografia. Foram obtidos 40 blocos de dentina radicular com aproximadamente 1,5 mm de profundidade x 6 mm de diâmetro, a partir de incisivos bovinos, os quais foram submetidos ao processo de desmineralização artificial em tampão acetato (pH=5), a fim de induzir a formação de uma lesão cariada. Em seguida as amostras foram submetidas aos tratamentos preventivos de cárie radicular: 1) Clorexidina 0,12% 1 min, 2) Flúor neutro 2% 1 min, 3) Nd: YAG Laser- 60 mJ 10 s e 4) Água Deionizada (controle) 1 min. Após os tratamentos as amostras foram expostas à degradação pela enzima colagenase (Tipo VII, Produto No. C0773, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por um período de 5 dias. Ao final do desafio da colagenase, a solução contendo a enzima foi coletada para ser submetida ao teste da hidroxiprolina, para a mensuração da quantidade de colágeno degradado por meio de colorimetria em espectrofotômetro. Em seguida as mesmas amostras foram submetidas à mais 2 dias de desmineralização. Em complemento ao ensaio da hidroxiprolina as amostras foram expostas à microrradiografia transversal para visualização e medição da área degradada. Uma análise descritiva dos dados obtidos foi realizada de modo a determinar o teste estatístico a ser aplicado. A análise de variância (ANOVA) para a HYP revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos empregados ( $p > 0,05$ ). Os dados obtidos na microrradiografia foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis e teste de comparações múltiplas, Dunn. Os dados de repetição, comparações entre a desmineralização inicial (5 dias) e a segunda desmineralização (2 dias), foi realizado individualmente em cada grupo por teste T de medidas repetidas ou Wilcoxon. Houve diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ). Dos tratamentos empregados, a clorexidina e o flúor foram eficazes na prevenção da progressão da cárie radicular.

Palavras-chave: Dentina. Desmineralização. Degradação de Colágeno. Hidroxiprolina. Cárie radicular.

MASELLI A. *Evaluation of different treatments on the collagen degradation and progression of dentin caries "in vitro" study.* São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2017.

## ABSTRACT

Quantification of collagen degradation is an important parameter to evaluate dentin caries progression of caries prevention aid. The aim of this study was to evaluate root collagen degradation against preventive methods by using the hydroxyproline assay and microradiography technique. Forty root dentin blocks were obtained with 1,5x6 mm (depth x diameter) from bovine incisors, which were submitted to artificial demineralization process by acetate buffer (PH=5), in order to induce a carious lesion. Then, the samples were submitted to preventive therapeutic treatment of root caries: 1) Chlorhexidine 0,12% 1 min, 2) Fluoride 2% 1 min, 3) Nd:YAG Laser - 60 mJ 10s, 4) Deionized Water (control) 1 min. After that, the samples were exposed to degradation by the collagenase enzyme (Type VII, Product No. C0773, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 5 days. Following the collagenase challenge, the enzyme solution was collected for assaying hydroxyproline released from collagen matrix, where it is possible to measure the amount of degraded collagen by colorimetry in a spectrophotometer. Soon after, the same samples were submitted to a further 2 days of demineralization process. In addition to the hydroxyproline assay the samples were exposed to the transverse microradiography for a visualization of the degraded area. Soon after the colorimetric test the same samples were submitted to further two days of demineralization. A descriptive analysis of the data will be performed to determine the statistical test to be applied. ANOVA test revealed that there was no difference between the treatments ( $p>0,05$ ). The microradiography data were submitted to the Kruskal Wallis test and multiple comparison test, Dunn. The repetition data, comparisons between the initial (5 days) and the second (2 days) demineralization, were performed individually in each group by repeated measures T-test or Wilcoxon ( $p<0,0001$ ). Among the proposed treatments, chlorhexidine and fluoride were effective in preventing root caries progression.

**Keywords:** Dentin. Demineralization. Collagen-degradation. Hydroxyproline. Root Caries.

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve uma redução na incidência de cárie dentária em países desenvolvidos. No entanto, houve um aumento na prevalência de cárie radicular, atribuído ao aumento da expectativa de vida da população, e consequentemente, à permanência dos dentes na cavidade oral por mais tempo (Petersson, Bratthall, 1996).

A cárie dentária é uma doença infecciosa causada por certas bactérias (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacilli*) presentes na cavidade bucal. Em processos cariosos, essas bactérias produzem ácidos que se difundem através dos tecidos dentários calcificados, diminuindo o pH local para abaixo de 5,5, levando à dissolução dos cristais de apatita (Chaussain-Miller et al., 2006).

A lesão pode iniciar no esmalte ou cemento, e eventualmente, progride para a dentina subjacente. Depois que parte mineral da dentina é dissolvida, a matriz orgânica da dentina é exposta à degradação por enzimas derivadas do hospedeiro ou das bactérias. É fato que a collagenase bacteriana não resiste à queda para um pH extremamente ácido (pH 4,3), sugerindo que a contribuição dessas enzimas para a degradação da matriz pode ser menos importante, e que enzimas proteolíticas derivadas do hospedeiro, como as MMPs dentinárias e salivares, podem ter um papel mais importante na degradação da matriz orgânica da dentina (Tjaderhane et al., 1998). Sendo assim, o processo da cárie não se restringe à dissolução físico-química de componentes minerais por ácidos bacterianos. A deposição mineral e dispersão dentro da matriz de colágeno podem ser regidos pela condição da mesma (Balooch et al., 2008; Bertassoni, Marshall, 2009).

Basicamente, o esmalte do dente permanente é composto por uma parte mineral, na forma de cristais de hidróxiapatita ou flúorapatita, organizados em prismas. Quando o pH está menor do que 4,5, os cristais de apatita são facilmente dissolvidos pelos ácidos, gerando uma lesão superficial (Buzalaf et al., 2010). Diferentemente do esmalte, a dentina permanente contém 47% de componentes inorgânicos (apatita), 33% de componentes orgânicos (colágeno) e 20% de água. Estudos demonstram que a desmineralização da dentina é primeiramente aparente

na interface inter e peritubular da dentina (Meurman et al., 1991; Kinney et al., 1995).

No entanto, a dentina é um tecido mineralizado à base de colágeno constituído por cristais de apatita inorgânicos incorporados numa matriz extracelular. O colágeno tipo I é o componente principal da matriz extracelular da dentina representando até 90% do material orgânico (Linde, 1984).

Inicialmente, quando há exposição da dentina aos ácidos, os minerais presentes na dentina peritubular/intertubular são liberados, ocorrendo aumento do diâmetro dos túbulos (Meurman et al., 1991) e exposição da camada superficial da matriz de colágeno da dentina desmineralizada. Assim, é possível que essa camada superficial de matriz de colágeno proteja a camada subjacente de dentina mineralizada contra forças mecânicas e de desgaste, ou seja, o processo de desmineralização da dentina diminui à medida que a quantidade de colágeno não degradado aumenta, uma vez que é atribuída à matriz de colágeno a capacidade de prevenir a difusão iônica através da dentina (Klont, ten Cate, 1991; Kleter et al., 1994).

Além disso, a matriz de colágeno pode ser degradada mecânica e bioquimicamente, o que levaria à progressão patológica da lesão na dentina. A modificação dessa matriz por agentes ou métodos terapêuticos deve ser considerada a fim de aumentar a sua estabilidade e resistência à degradação (Noriko et al., 2013).

Observa-se na literatura que a irradiação com laser Nd:YAG pode tornar os tecidos dentais mais ácido-resistentes, evitando ou retardando o desenvolvimento de lesões cáries primárias ou secundárias (Castellan et al., 2010). O Laser Nd:YAG é capaz de formar uma camada de dentina derretida, denominada de "*melting*", caracterizada pela obliteração dos túbulos dentinários (Liu et al., 1997). Assim como, a associação do flúor contendo dessensibilizantes com a irradiação com o Nd:YAG laser podem induzir a oclusão dos túbulos dentinários (Hsu et al., 2006).

O flúor por sua vez desacelera o processo de degradação da matriz de colágeno (Brackett et al., 2015). Porém, existe a necessidade de se manter o nível de flúor na cavidade oral ao longo do dia para obter o máximo benefício na prevenção da cárie (Whelton, O'Mullane, 2001).

Já a clorexidina é largamente usada para prevenir a degradação de colágeno inibindo as MMPs (Islam et al., 2016). Sendo um dos anti-microbianos

mais comumente utilizado no controle de cárie e doença periodontal. Sua popularidade não é só devido ao seu amplo espectro antimicrobiano, o qual inclui bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas também devido a sua retenção no meio bucal, fazendo com que seu efeito antimicrobiano seja prolongado (Fitzgerald et al., 1989).

Para tal, mensurar a quantidade de colágeno degradado e a perda mineral em uma lesão de cárie, seria de grande valia para avaliar a eficácia de tratamentos preventivos de cárie radicular. O teste da Hidroxiprolina é capaz de mensurar a quantidade de colágeno degradado (Islam et al., 2016). A Hidroxiprolina é um aminoácido não essencial constituinte de proteínas e derivados da prolina, e constituindo 10% da molécula de colágeno. A determinação da concentração de hidroxiprolina é um procedimento frequentemente utilizado porque 90% da dentina desmineralizada consiste em colágeno Tipo I, o qual possui 10% de hidroxiprolina em massa, enquanto outras proteínas contém muito pouco ou nada deste aminoácido (Bornstein, Sage, 1980).

A Microradiografia transversal é considerada uma técnica padrão ouro para mensurar diferenças no conteúdo mineral da superfície de uma lesão dental (Magalhães et al., 2016).

Em virtude do exposto, a identificação do método mais efetivo na prevenção do processo da cárie radicular, pode representar uma real contribuição para a redução dos índices da lesão cariosa radicular na prática diária.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Para a melhor compreensão dos complexos mecanismos que envolvem a análise da degradação do colágeno dentinário, a compilação dos dados bibliográficos será apresentada em tópicos: **características da dentina sadia:** morfologia e características ultra-estruturais mais relevantes; **cárie dental:** mecanismo de formação e desenvolvimento da cárie dentária e mais especificamente da cárie radicular; **métodos preventivos de cárie:** como os pesquisadores tem procurado solucionar o problema.

### 2.1 Características da dentina sadia

A observação da dentina não descalcificada em dentes humanos, realizada por Frank (1959), por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), revelou que na pré-dentina e na dentina próxima à polpa, os processos odontoblásticos são extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, os quais preenchem o lúmen dos túbulos dentinários. Na dentina central e externa os processos odontoblásticos assumem a forma tubular, sendo que a dentina peritubular circunda a projeção citoplasmática e a parte tubular do processo odontoblástico. O alto grau de absorção de elétrons da dentina peritubular associado à áreas seletivas de difração de elétrons revelou a presença de apatita nesta área, mostrando que a dentina peritubular é mais calcificada que a dentina intertubular. Essa dentina por sua vez, consiste de uma matriz fibrilar formada por elementos inorgânicos, os quais são facilmente destruídos com o processo histológico de descalcificação (Frank, 1959).

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

algumas amostras. Várias conformações fibrilares foram encontradas associadas às paredes tubulares, as quais, apresentaram uma lisura superficial com aparência similar à dentina peritubular.

Mjor (1972) descreveu a estrutura da dentina e suas características 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. O 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, tais como atrição, cárie, erosão, aplicação de  $\text{Ca(OH)}_2$ , observados *in vivo*, além de desmineralização e preparo cavitário, observados *in vitro* (Mjor, 1972).

O estudo da dentina coronária incisal de dentes humanos, realizado por (Tronstad, 1973), através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), 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 entre 50 nm e 0.7  $\mu\text{m}$ , nas quais foram identificadas as ligações 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 identificada. Uma quantidade variável de dentina secundária foi observada nos cornos pulpares dos dentes jovens.

Em 1976, Garberoglio & Brännström examinaram em microscopia eletrônica de varredura, a estrutura da dentina a variadas distâncias da polpa, que foram classificadas como superficial, média e profunda. Os autores procuraram determinar o número e o diâmetro dos túbulos dentinários, conforme estas três profundidades pré-determinadas. Concluíram que, em média, a dentina superficial apresenta um número de 20 mil túbulos/ $\text{mm}^2$ , com cerca de 0,9  $\mu\text{m}$  de diâmetro; a dentina média,

29 mil túbulos/mm<sup>2</sup> com cerca de 1,2 µm de diâmetro; e a dentina profunda, 45 mil túbulos/mm<sup>2</sup> com 2,5 µm de diâmetro. Portanto, o número e o diâmetro dos túbulos dentinários aumentam na medida em que nos aproximamos do órgão pulpar.

Pashley (1996) descreveu a dentina como um composto biológico poroso composto de partículas de cristal de apatita em uma matriz de colágeno (Pashley, 1996).

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 menores 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 et al., 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 em forma de lâminas, com secções transversais que variam de 3 a 30 nm, com 50 nm de comprimento, o que resulta em uma maior proporção superfície/volume tornando-os mais reativos. Isto faz com que a dentina apresente íons contaminantes que não sejam cálcio, fosfato e hidroxila, mais do que o esmalte (Fejerskov et al., 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 parcialmente digerida pela ação das enzimas, durante o ataque bacteriano no processo da cárie (Fejerskov et al., 2005).

Sendo assim, o desenvolvimento do dente humano explica algumas características estruturais da dentina. Perdigão (2010), relatou que a dentina produzida até a completa formação da raiz dentária, é identificada como dentina primária e engloba a matriz dentinária pulpar circundante. A formação da dentina é mais lenta na raiz do que na coroa dos dentes. Fisiologicamente, a dentina secundária é formada depois da total formação da raiz. A aparência da matriz da dentina primária, indica uma estrutura tubular regular. Enquanto que a secundária pode ser menos tubular, e ter as mesmas características morfológicas da dentina primária (Perdigão, 2010).

A fase orgânica da dentina tem cerca de 90% de colágeno (principalmente o do tipo I com pequenas quantidades dos tipos III e V) com inclusões fracionais de proteínas não colagênicas e lipídeos da matriz. O colágeno do tipo I atua como um arcabouço que acomoda uma grande proporção (aproximadamente 56%) do mineral nos orifícios e poros das fibrilas. As proteínas não colagênicas da matriz ocupam o espaço entre as fibrilas colágenas e acumulam-se ao longo da periferia dos túbulos dentinários, estas proteínas regulam a deposição de minerais e podem atuar como inibidoras, promotoras e/ou estabilizadoras, dependendo de sua localização (Fejerskov, Kidd, 2011).

Segundo Nanci (2013) devido à forma da cadeia estrutural de colágeno e sua relação com os cristalitos de apatita parece haver um sinergismo, ou mútua proteção, entre esses dois componentes uma vez que a fase mineral só pode ser parcialmente dissolvida durante o ataque ácido, enquanto a matriz não pode ser digerida pela ação enzimática das proteinases da matriz, visto que esta superfície é protegida pelos cristalitos de apatita. Essa composição estrutural geral da dentina e do cimento resulta em diferenças importantes na forma como os microorganismos interagem com a dentina e as superfícies radiculares no desenvolvimento da lesão cáries em relação ao processo no esmalte. Além dos eventos químicos no mineral, haverá também a necessidade de uma atividade proteolítica grande por parte dos

microorganismos para remover a matriz colagenosa durante o progresso do processo carioso.

## 2.2 Cárie Dental

O maior desafio patológico para a dentina é a cárie. Análises radiográficas, microscopia comum e microscopia eletrônica revelaram que a cárie na dentina apresenta cristais inorgânicos no interior dos túbulos 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 grandes cristais romboédricos de fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 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. Vahl et al. em 1964, 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.

Ogushi 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.

No entanto, 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 e colaboradores (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.

Entretanto, alterações bioquímicas 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.

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 o autor, 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 (Fusayama, 1979).

Frank e Voegel (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 periodontoblásticos, 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.

Com a finalidade de estudar as alterações das camadas de cárie de dentina em comparação com a dentina sadia, Shimizu e colaboradores realizaram estudos com microscopia eletrônica de cortes ultrafinos (0,1  $\mu\text{m}$ ) 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 torna-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 (Shimizu et al., 1981).

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 e colaboradores (1987), realizaram estudo da cárie de esmalte analisando fragmentos submetidos ao desafio cariogênico, *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.

Um importante estudo da dentina cariada, foi realizado por Jones e Boyde (1987) utilizando várias técnicas de microscopia eletrônica. Análises ao Mev demonstraram ausência de dentina peritubular, redução da densidade da dentina intertubular, conformação 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. 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, a formação de dentina secundária (reacional) abaixo da dentina primária cariada em que se vê áreas sem túbulos ou com disposição muito irregular, 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. 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.

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-pulpareas aos estímulos transmitidos pela lesão de esmalte (Bjorndal, 1991).

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).

Lesões de cárie radicular desenvolvidas artificialmente por diferentes métodos químicos foram avaliadas através de microscopia de luz polarizada e através de microradiografias 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 (Wefel et al., 1995).

Segundo Fejerskov (1997), a cárie dental 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. 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 preventivos.

Sendo assim, 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 (Marshall, 1998).

Outro fator relevante é a presença de enzimas dentinárias, as MMPs, que foram identificadas nas lesões de cárie tanto na forma latente, quanto na forma ativa. Com a queda do pH na presença de ácidos, as formas latentes destas enzimas tornam-se ativadas (Tjaderhane et al., 1998).

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 et al., 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 possibilidade 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.

É relevante citar que as MMPs são enzimas endógenas dependentes de zinco e cálcio, capazes de degradar quase todos os componentes da matriz extra celular. Em humanos, a família das MMPs possui 23 membros, classificadas em 6 grupos baseados na especificidade do substrato e homologia (Visse, Nagase, 2003).

Segundo Kidd e Fejerskov (2004), a lesão de cárie é decorrente do processo de alterações substanciais de pH no interior do biofilme dental. O resultado destas

alterações de pH pode ser visível inicialmente (1ª 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 dentífrico fluoretado, 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 observar 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. Já 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 do biofilme pela escovação dental com dentífrico fluoretado (Kidd, Fejerskov, 2004).

Já no esmalte, podemos observar que mesmo estando sadio ele é poroso, e por esta razão os estímulos do meio bucal atingem o 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 (Bardow

et al., 2005).

Porém a cárie de esmalte e a de dentina são descritas como duas entidades diferentes. Esta posição é explicável pelo fato dos tecidos apresentarem características diferentes, 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. 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. 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 et al., 2005).

A cárie dental é um processo dinâmico que compreende episódios intermitentes de desmineralização e remineralização. Em pH baixo, quando o micro-ambiente 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).

Atualmente, muito se investiga a respeito da presença da camada orgânica que resta após a desmineralização presente na dentina, a qual pode ser afetada por enzimas do próprio hospedeiro, as MMPs. Estas estão presentes tanto na saliva quanto nos tecidos dentários duros. As MMPs compreendem um grupo de enzimas capazes de degradar quase todas as proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno desnaturado (Hannas et al., 2007).

A colagenase MMP-8 e as gelatinases MMP-2 e -9 são as principais enzimas relacionadas à degradação da matriz de colágeno na dentina (Mazzoni et al., 2007; Sulkala et al., 2007; Mazzoni et al., 2009).

Mais recentemente, outra importante família de proteases, as cisteínas catepsinas, foram encontradas na dentina (Tersariol et al., 2010; Nascimento et al., 2011).

As cisteínas catepsinas podem também participar no desenvolvimento da cárie dentinária, elas têm uma atividade diferente para cada compartimento da cárie, dependendo da localização e atividade da lesão (Vidal et al., 2014).

Similar às MMPs, as catepsinas também participam da degradação da matriz extra-celular, tanto no processo fisiológico como no patológico. O aumento significativo da atividade das cisteínas catepsinas no processo da cárie de dentina, com aumento da profundidade em direção à polpa, indica que o odontoblasto ou a cisteína catepsina derivada da polpa, podem ser importantes para acelerar a lesão de cárie (Mazzoni et al., 2015).

### **2.3 Métodos Preventivos de cárie**

Nas últimas décadas, com o maior conhecimento do processo etiológico da cárie, houve a adoção de medidas preventivas com consequente diminuição na incidência e prevalência da cárie. No aspecto preventivo, as práticas de higiene bucal, controle da dieta e principalmente o uso do flúor, por meio de métodos de

fluoretação da água, dentifrícios, enxaguatórios bucais e aplicação tópica profissional, tem resultado em um declínio importante no surgimento de lesões de cárie. Assim, tratamentos que impeçam a instalação ou a progressão de lesões incipientes de cárie têm uma importância fundamental para manutenção desses baixos índices.

### 2.3.1 Clorexidina

A clorexidina (CHX) é caracterizada por ser um poderoso anti-séptico de amplo espectro no controle de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Davies et al., 1954) e na Odontologia, tornou-se comum em 1970, quando começou a ser utilizada para controlar a formação do biofilme (Schiott et al., 1970).

A eficácia na inibição das proteases (CT-B, CT-K e CT-L), é dependente das interações tridimensionais entre a CHX e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo destas enzimas. Fato este que pode ser explicado pelas diferentes características estruturais das enzimas. A principal característica que distingue a CT-B das outras enzimas é a presença da alça de oclusão, que bloqueia o sítio ativo da enzima, dificultando a ligação da CHX, o que significa uma menor afinidade entre o inibidor e a enzima. É importante considerar que a CHX age como um inibidor enzimático inespecífico e, portanto, atua sobre diferentes classes de proteases (Musil et al., 1991; Nagler et al., 1997).

O sucesso da CHX foi creditado principalmente à sua capacidade de inibir a atividade proteolítica das MMPs. Foi observado que 0,002% é a concentração mínima de clorexidina que inibe completamente a atividade da MMP- 9 e 0,0001% é a concentração mínima que inibe completamente a atividade da MMP- 9; essa inibição dá-se pela ação de quelação do cátion (Gendron et al., 1999).

Segundo Martin e colaboradores (2000), além de ser um anti-séptico comumente usado na periodontia, a clorexidina é usada atualmente como um inibidor de protease. As MMPs são uma classe de endopeptidases zinco e cálcio dependentes, capazes de degradar os componentes da matriz extra-celular (Martin-De Las Heras et al., 2000).

Não obstante, deve-se enfatizar as concentrações utilizadas da clorexidina na prevenção da cárie radicular, uma concentração a 0,12% encontrada em soluções de bochecho pode ser eficaz e clinicamente aceitável (Demeule et al., 2000). Porém alguns pacientes relataram alteração no paladar (Matthijs, Adriaens, 2002).

A atividade colagenolítica e gelatinolítica da dentina pode ser superada pelos inibidores de proteases, indicando que a inibição das MMPs deve preservar a integridade da camada híbrida, sendo assim, a aplicação *in vivo* da clorexidina melhora a integridade da camada híbrida (Pashley et al., 2004).

Segundo a revisão sistemática de Slot e colaboradores (2011), existem vários parâmetros de avaliação entre as concentrações e o tempo de aplicação da clorexidina para prevenir cárie, fato que dificultou a comparação entre os resultados.

De acordo com Baca e colaboradores (2012), a eficácia da CHX está relacionada à concentração e frequência de aplicação; utilizaram concentrações de CHX 0,2% e 2% com 1 min de aplicação, e obtiveram resultados mais positivos com CHX 2% no seu efeito antimicrobiano.

Contudo, a atividade antibacteriana da clorexidina tem sido estudada com a utilização de diferentes modelos de investigação. No entanto, a concentração mínima de clorexidina necessária para eliminar a bactéria presente no biofilme é muito maior (10-100 vezes) do que a concentração necessária para eliminar uma bactéria em suspensão. Teoricamente, a inibição da cárie por um agente antimicrobiano pode ser alcançada pela inibição da produção de ácidos e da formação da placa dental. Assim, este estudo relatou que a clorexidina teve uma alta supressão na atividade cariogênica das bactérias *Streptococcus* e *Lactobacilos* e a supressão foi menor sobre a atividade da bactéria *Actinomyces* (May et al., 2013).

Tem sido demonstrado que a clorexidina é um antimicrobiano muito utilizado e possui um amplo espectro de atividade contra bactérias orais. Esta apresenta um efeito único na inibição da placa dental, principalmente devido à sua substantividade e sua propriedade antimicrobiana. Mesmo antes de ser testada como potencial inibidor de metaloproteínase, a clorexidina foi primeiramente utilizada em adesão dental como desinfetante dentinário, previamente à aplicação dos adesivos dentais (Perdigão et al., 2013).

No entanto a clorexidina apresenta alguns efeitos adversos em seu uso

prolongado, como por exemplo manchamento do esmalte e comprometimento do paladar. Kouadio e colaboradores (2017) testaram alguns protocolos in vitro para investigar o manchamento do esmalte dental com o uso da clorexidina como bochecho, e relataram que o uso da clorexidina numa concentração a 0,12% e por um tempo de 2 min de aplicação, não promoveu o manchamento do esmalte.

### 2.3.2 Flúor

O alto conteúdo mineral observado na zona superficial de uma lesão radicular pode refletir uma redeposição seletiva de minerais nessa região, pois tem sido mostrado que o tamanho dos cristais de apatita na zona superficial é significativamente maior que no cemento normal. Além disso, tem sido mostrado que mesmo as superfícies radiculares não irrompidas, que se tornam expostas ao ambiente oral por recessão gengival ou cirurgia periodontal podem sofrer modificações minerais substanciais em função da atividade metabólica nos biofilmes, apresentando aumento de tamanho e empacotamento dos cristais (maior área superficial, menor área reativa, menor solubilidade) que as superfícies de cemento normal quando esse não foi exposto á cavidade oral. Isso reflete uma captação e redeposição substancial dos minerais nos cristais que estão parcialmente dissolvidos. Assim, a permeabilidade e a reatividade das superfícies radiculares podem mudar tornando-se menos suscetíveis aos futuros desafios cariogênicos (Tohda et al., 1996).

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).

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 (CO<sub>2</sub>) para remoção da cárie e tratamento preventivo dos tecidos.

O termo flúor é o termo genérico para definir as formas: química iônica (fluoreto ou íon flúor), ionizável (mineralizada, na forma de monofluorofosfato de sódio-MFP) e não ionizável (ligado covalentemente) do elemento flúor. Esse tem sido usado de modo tópico sob forma de géis, espumas, bochechos, dentifrícios e vernizes fluoretados. O flúor de uso tópico atua diminuindo a solubilidade dos tecidos bucais ao ser incorporado à hidroxiapatita formando apatita fluoretada, promovendo a remineralização por estar presente nos fluidos bucais alterando o pH crítico no desafio cariogênico. Sendo assim, ele não impede o aparecimento da lesão e sim paralisa a lesão inicial. Seu efeito é parcial, pois em alguns casos não impede completamente o desenvolvimento de lesões de cárie, além de ser necessária sua presença constante no ambiente bucal. Quando os tecidos duros dentais são expostos ao flúor iônico, esse pode ser adsorvido sob duas formas: cristais do tipo fluoreto de cálcio (CaF<sub>2</sub>) ou sob a forma de fluorapatita – Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>F<sub>2</sub> e fluoridroxapatita (FHA ou apatita fluoretada ou fluorapatita carbonada - Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH) F ) (Baratieri, 2001).

Segundo Marthaler (2004) as ações do flúor tornam-se mais potencializadas na dentina, pois essa é mais reativa que o esmalte devido à fonte disponível de cálcio, na forma de apatita carbonatada, e fosfato de cálcio amorfo, os quais, ao serem solubilizados, reagem com o flúor e reprecipitam como fluoreto de cálcio. Isso é importante clinicamente tanto através de uma ação mecânica dos cristais de fluoreto, reduzindo a sensibilidade dentinária, como para a redução da progressão da cárie na dentina que talvez seja maior e mais rápida do que a observada no

esmalte.

Além disso, os aspectos histopatológicos das lesões de cárie radicular, mostram que a perda mineral ocorre numa zona superficial, relativamente bem mineralizada, que exhibe com frequência um conteúdo mineral maior que o da dentina não afetada. Semelhante às lesões no esmalte, essa zona varia em espessura e conteúdo mineral dependendo do desafio cariogênico do biofilme microbiano (Arnold et al., 2007).

Os mecanismos de atuação do flúor são três principais: 1) inibição da desmineralização, por meio da formação de cristais do tipo fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) que se depositam sobre a superfície dental e disponibilizam o íon fluoreto durante o processo de desmineralização e remineralização, o que muda o pH crítico; 2) potencialização da remineralização, com a formação de apatita fluoretada ou fluorapatita sobre as superfícies remineralizadas; 3) inibição do metabolismo bacteriano após sua difusão para o interior da bactéria, como moléculas de ácido fluorídrico que depois de dissociado inibe a atividade de enzimas essenciais para a bactéria (Gangler et al., 2009).

Tenuta e Cury (2010) observaram que após sua formação através da aplicação tópica, o fluoreto de cálcio age como fonte temporária de flúor a partir da qual esse íon é gradualmente liberado na saliva. Esse efeito preventivo dura tanto quanto o flúor liberado for capaz de manter sua concentração aumentada nas redondezas, ou seja, por um tempo de 30 a 40 minutos e depois volta ao normal. Através da própria ação dos fluidos bucais que estão insaturados para esse sal, o fluoreto de cálcio é dissolvido, tendo seu efeito perdido com o decorrer do tempo, em taxas variadas. Para saturar a saliva com fluoreto de cálcio, a concentração de flúor teria que ser aumentada 100 vezes, do fisiológico 0,02 - 0,05 ppm para 3 - 7 ppm, o que seria tóxico. O fluoreto de cálcio situado nas superfícies abertas e expostas desaparece em um dia, enquanto que nos sítios protegidos, na placa e nas superfícies rugosas, como nas lesões cariosas ativas, o sal sobrevive por dias e semanas. Após a dissolução do fluoreto de cálcio, todos os traços químicos do tratamento tópico terão desaparecido; no entanto, seus efeitos têm sido observados nos meses seguintes: incidência reduzida de cáries. Desse modo, as aplicações tópicas devem ser constantes e frequentes para se garantir a manutenção do efeito de controle da cárie.

Segundo Fejerskov e Kidd (2011) o cristal tipo fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) é o responsável pelo potencial cariostático dos produtos de aplicação tópica. Por meio de sua lenta dissolução e prolongada retenção, atua como um reservatório de flúor mantendo-o constante no meio para interferir com a posterior progressão da cárie. É importante ressaltar que o  $\text{CaF}_2$  não é formado apenas em superfícies sadias do esmalte. O fluoreto de cálcio mais importante é aquele que se precipita no biofilme, película, nas porosidades do tecido duro dentário e em outras áreas inacessíveis à ação mecânica da saliva e sujeitas à estagnação, pois em tais áreas a concentração de cálcio iônico livre é alta e uma formação considerável de glóbulos pode ser obtida.

Os mesmos autores ainda relatam que o fluoreto de cálcio é produzido na forma de glóbulos esféricos, compostos por cristais misturados ao fosfato e proteínas salivares, espalhados sobre a superfície dental. Sua formação acontece quando a concentração de flúor banhando o esmalte está acima de 100 ppm, situação que ocorre quando os dentes recebem tratamento tópico ou são expostos ao dentífrico fluoretado contendo fluoreto de sódio (NaF). Uma maior concentração e um pH ácido (3,5) potencializam sua formação pois o flúor fosfato acidulado (FFA) é mais reativo que o neutro, entretanto há limite para uma alta concentração e um baixo pH. Há uma tendência de formar mais fluoreto de cálcio em função do tempo de aplicação e da frequência, mas dentro do intervalo de aplicação de 1-4 minutos não há diferença de efeito. Esses fatores explicam a eficiência do uso diário de dentífrico fluoretado, pois apesar da menor concentração de flúor nesse (1000-1100 ppm) e portanto, pouco  $\text{CaF}_2$  formado, várias escovações diárias tendem a compensar a maior quantidade formada através da aplicação tópica profissional (12.300 ppm com pouca frequência). Ainda, forma-se mais fluoreto quando da reação de qualquer tipo tópico no tecido dental com lesão do que no íntegro, o que tem uma importante implicação clínica pois o fluoreto de cálcio formado dentro da lesão reduz a sua posterior progressão (Fejerskov, Kidd, 2011).

### 2.3.3 Laser de Nd: YAG

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido feitos, os quais apontam a

irradiação *laser* como um método alternativo e eficaz para prevenção da cárie. Os primeiros estudos que demonstraram o aumento da resistência à desmineralização do esmalte dental irradiado foi com o laser de rubi (de comprimento de onda de 693 nm), na década de 60 (Sognnaes, Stern, 1965).

Entretanto em estudos posteriores, os mesmos autores relataram um aumento da permeabilidade do esmalte, além de superaquecimento da superfície e do tecido pulpar, contraindicando o uso desse *laser* (Stern et al., 1966).

Kantola (1972) relata que estudos sobre os efeitos dos *lasers* tem se concentrado no aumento da resistência à cárie através da redução da velocidade de desmineralização da subsuperfície de esmalte e dentina, contudo se desconhece as exatas razões que levam à inibição da formação de lesões cariosas com a utilização de lasers.

O laser de Nd: YAG tem sido estudado como potencial equipamento para prevenção de cárie no esmalte desde a década de 1980, quando foi demonstrado seu potencial para provocar a fusão do esmalte dental e torná-lo mais resistente à dissolução ácida. Entretanto, nos primeiros estudos foram usadas altas densidades de energia causando danos aos tecidos. Esse é um laser de corpo sólido formado por um cristal de Ítrio-alumínio-granada dopado com o metal raro neodímio, de onde vem seu nome Nd: YAG. No comprimento de onda de emissão em 1,064  $\mu\text{m}$  o feixe de radiação emitido não é visível, sendo então usado como luz guia um laser visível, como, por exemplo os lasers de He-Ne ou diodo. Estudos tem indicado esse laser para prevenção da cárie no esmalte se associado ao flúor, pois tem sido reportado que possibilita a criação de espaços microscópicos pela perda de substâncias orgânicas, os quais serviriam como depósito de íons flúor liberados pelo flúor fosfato acidulado (Yamamoto, Sato, 1980).

Tagomori e Morioka (1989) utilizaram o laser de Nd: YAG para promover remineralização em lesões artificiais de cárie. A densidade de energia aplicada foi de 40 J/cm<sup>2</sup>, e observaram que a remineralização se processou desde o fundo da área da lesão artificial de cárie até sua superfície, fatos medidos por técnicas de microrradiografias, teste de microdureza e microscópio eletrônico de varredura (MEV). Em um estudo clínico os mesmos autores avaliaram o resultado da irradiação com o laser de Nd:YAG sobre superfícies de cárie incipientes, cobertas com pigmentos fotoabsorvedores, associado ao flúor fosfato acidulado (FFA) e

relataram que não foi observado nenhum aumento visível da lesão após 24 meses do tratamento.

Em relação à dentina, observa-se ocorrência de inibição do processo de desmineralização através da formação de zonas de recristalização, fusão e derretimento deste tecido em virtude da utilização de altas densidades de energia (Nammour et al., 1992).

Os relatos da literatura McCormack et al., (1995), Featherstone et al., (1998) e Kantorowitz et al., (1998) têm demonstrado que a irradiação do esmalte dental com *lasers* tem promovido redução significativa da perda mineral.

A irradiação do laser Nd: YAG é absorvida pelas estruturas minerais, como os fosfatos e carbonatos da hidroxiapatita, desarranjando a grade cristalina, promovendo assim o derretimento e recristalização da estrutura dentinária com conseqüente redução da permeabilidade (Anic et al., 1998; Takeda et al., 1998).

Gonçalves e colaboradores (1999), utilizam o laser de Nd:YAG pela capacidade de fusão e ressolidificação do substrato, neste processo ocorre a transformação da hidroxiapatita em B-fosfato tricálcico, mais resistente à dissolução, aumentando a resistência à cárie pela redução da velocidade de desmineralização.

A irradiação *laser* pode ser usada para aumentar o conteúdo mineral relativo da dentina pela remoção de proteínas e da água intrínseca desse tecido. Pesquisadores têm avaliado o aumento da resistência à desmineralização da dentina irradiada com diversos equipamentos de *lasers*. Os resultados tem mostrado a ocorrência de fusão e derretimento desse tecido com zonas de recristalização que levaria a inibição do processo de desmineralização e à obliteração dos túbulos dentinários. As exatas razões para a inibição de lesões de cárie na dentina irradiada também são ainda desconhecidas e várias hipóteses têm sido formuladas. Uma delas sugere que há mudanças cristalográficas na dentina irradiada com crescimento no tamanho dos cristalitos e formação de um tecido com maior grau de cristalinidade, com cristais estruturalmente modificados e semelhantes à estrutura cristalina da hidroxiapatita do esmalte normal. Além disso, a formação de uma camada de selamento superficial dos túbulos dentinários reduziria a difusão dos ácidos para a dentina sadia, o que diminuiria a extensão da lesão de cárie. No entanto, considerando que o conteúdo mineral da dentina é muito menor que do esmalte e ela possui características estruturais diferentes, a densidade de energia

necessária para modificá-la positivamente em relação à resistência ácida parece ser menor do que a utilizada para o esmalte (Rodrigues et al., 2004).

O efeito preventivo do *laser* de alta intensidade ocorre quando o tecido absorve a energia irradiada e promove um efeito térmico localizado, o que geralmente é conseguido quando há emissão na região espectral no Infravermelho. Esse efeito provoca modificações químico-estruturais nos tecidos duros dentais que dependem da temperatura superficial atingida. A matriz orgânica do esmalte e da dentina é eliminada com temperaturas inferiores a 350 °C, entretanto a desnaturação de proteína é observada após a temperatura atingir os 45 °C. Os constituintes da matriz mineral são mais estáveis termicamente. No entanto, a eliminação de carbonato começa a ser observada após aquecimento a 100 °C, sendo quase totalmente eliminado após aquecimento a 1100 °C. Entre 100 °C e 650 °C ocorre oxidação de fosfato e formação de pirofosfatos, entretanto o fosfato não apresenta grandes variações na sua concentração, condição observada somente após a fusão da hidroxiapatita, em aproximadamente 1280 °C. A formação de novas estruturas cristalográficas, tais como fosfato de tricálcico na fase  $\alpha$  e  $\beta$  e fosfato tetracálcico ocorre a temperaturas acima de 1100 °C. Esse aumento de temperatura vai depender de fatores do *laser* tais como comprimento de onda, potência, modo de emissão (contínuo ou pulsado), duração do pulso, energia por pulso, taxa de repetição, densidade de energia (ou fluência), diâmetro do feixe e características do feixe e da propriedades ópticas e térmicas do tecido, com destaque para o índice de refração, o coeficiente de absorção ( $\mu_a$ ) e o coeficiente de espalhamento ( $\mu_s$ ). Assim, dependendo dessas características citadas, a irradiação *laser* poderá ser absorvida, espalhada, refletida ou transmitida para o interior do tecido irradiado. Para que os efeitos promovidos pelos *lasers* de alta intensidade não causem danos térmicos no próprio tecido irradiado, assim como no tecido pulpar e periodontal adjacentes, é necessário que sejam empregados comprimentos de onda absorvidos pela estrutura do tecido duro dental, composta principalmente por cristais de hidroxiapatita, proteínas e água. Quanto maior o coeficiente de absorção de um comprimento de onda, maior é seu potencial para causar o aquecimento do tecido. Além disso, o coeficiente de absorção é inversamente proporcional à penetração da luz *laser* no tecido (Lei de Beer-Lambert), sendo que quanto mais a radiação é absorvida, menor é a sua profundidade de penetração (Bachmann et al., 2005).

É importante citar que o laser Nd:YAG associado ao flúor tem demonstrado que pode promover uma maior absorção de íons fluoreto na dentina irradiada comparada com a não irradiada, contudo o efeito sobre a resistência à desmineralização ainda não está claro (Glauche et al., 2005).

Já o emprego do laser CO2 associado com flúor pode proporcionar um efeito sinérgico de inibição da desmineralização, pois pode proporcionar a incorporação do flúor dentro da estrutura cristalina (Gao et al., 2006).

A irradiação da dentina também pode aumentar a concentração mineral da mesma através da remoção preferencial da água e proteínas inerentes a este tecido. O emprego de *laser* pode promover a recristalização da dentina, o crescimento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita e a formação de uma dentina de maior grau de cristalinidade, estruturalmente modificada, que se assemelha à estrutura cristalina da hidroxiapatita do esmalte normal (Magalhães et al., 2008).

Segundo Cakar et al. (2008), a utilização do laser diminuiu o fluído dentinário pela evaporação das camadas superficiais.

O laser Nd: YAG, com comprimento de onda 1064 nm, apresenta capacidade de promover redução microbiana, remoção da camada de smear, fusão e recristalização do tecido dentinário (Franzen et al., 2011; Maden et al., 2013).

### 3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos preventivos de cárie (clorexidina 0,12%, Flúor neutro 2% e laser de Nd:YAG 60mJ), sobre a degradação de colágeno e progressão da lesão de cárie radicular, através da utilização do ensaio da hidroxiprolina e da microradiografia transversal.

As hipóteses de nulidade testadas foram:

H01: Os tratamentos preventivos não produzirão efeitos significativos no bloqueio da degradação do colágeno frente ao teste da hidroxiprolina.

H02: Os tratamentos preventivos não produzirão efeitos significativos na perda mineral integrada e na profundidade da lesão de cárie radicular frente à microradiografia transversal.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo animais (CEPa) do Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT/UNESP, Campus de São José dos Campos.

### 4.1 Delineamento Experimental

Neste estudo foram obtidas 40 amostras de discos de dentina de dentes bovinos (Kato et al., 2010), divididas aleatoriamente em 4 grupos de acordo com a aplicação dos seguintes tratamentos: clorexidina 0,12%, flúor neutro a 2% e Nd: YAG laser e água (controle), conforme fluxograma abaixo.

Figura 1- Fluxograma de divisão dos grupos



Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras de dentina passaram por processos de desmineralização e em seguida os grupos foram submetidos à degradação do colágeno desmineralizado pela ação da enzima *Clostridium histolyticum*, de acordo com as divisões de áreas das amostras, descritas a seguir.

As amostras foram divididas em 4 áreas, a fim de se obter vários controles na mesma amostra: 2 áreas híginas; 1 área desmineralizada a qual recebeu aplicação dos agentes e foi submetida ao desafio da collagenase; 1 área desmineralizada, a qual recebeu aplicação dos tratamentos, foi submetida ao desafio da collagenase e à mais um processo de desmineralização conforme descrito no esquema abaixo.

Figura 2 – Esquema das etapas as quais as amostras foram submetidas



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.2 Preparo das Amostras

As raízes de 40 incisivos bovinos foram seccionadas a 2 mm da junção amelo-cementária, com auxílio de um disco diamantado (Dremel – Campinas, SP, Brasil) adaptado em torno de alta rotação (Nevoni – Duque de Caxias, RJ, Brasil).

Foram obtidos 40 espécimes de dentina radicular com aproximadamente 1,5 mm de espessura x 6 mm de diâmetro, a partir de incisivos bovinos, com o auxílio de uma broca tipo trefina com 6 mm de diâmetro interno e com a extremidade revestida por diamante para cortes de amostras circulares adaptada ao equipamento específico para obtenção de amostras circulares (Micro Mill – Washington, EUA) (Figura 3).

Figura 3 – Preparo das amostras



Legenda: a) dente bovino; b) separação coroa-raiz; c) amostra cortada; d) equipamento para corte de amostras circulares.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espécimes circulares obtidos das raízes foram posicionados em dispositivos metálicos para polimento (Figura 4), assim a dentina mais interna foi planificada em uma Politriz Metalográfica com o uso de uma lixa de carbeto de silício de granulação 80 (Extec. Corp. Erios, SP, Brasil), em baixa velocidade, durante período de até 15 s, apenas para planificação da dentina interna (Figura 5). A seguir, foram utilizadas lixas de carbeto de silício de granulação 120 por 5 s, para desgaste de toda dentina externa remanescente em politriz metalográfica, em baixa velocidade. Para finalizar, foram utilizadas lixas 600 e 1200 (Extec. Corp. Erios, SP, Brasil) em alta velocidade até a superfície da dentina apresentar aspecto vítreo, durante 30 e 60 s, respectivamente. Entre as trocas de lixas, os espécimes foram lavados em cuba ultra-sônica (Sanders Medical, MG, Brasil) durante 2 min, com água deionizada (200 mL), a fim de impedir interferência dos grãos na lisura do tecido. Para o polimento final, foi utilizado um disco de feltro (Extec. Corp. Erios, SP, Brasil) umedecido em solução de diamante de 1  $\mu\text{m}$  (Extec. Corp. Erios, SP, Brasil), durante 60 s. Após o último polimento, os blocos retornaram à cuba ultra-sônica durante 10min.

Figura 4 – Amostra posicionada para realização do acabamento e polimento da superfície



Legenda: a) amostra posicionada na matriz metálica para polimento; b) amostra polida.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 - Politriz Metalográfica

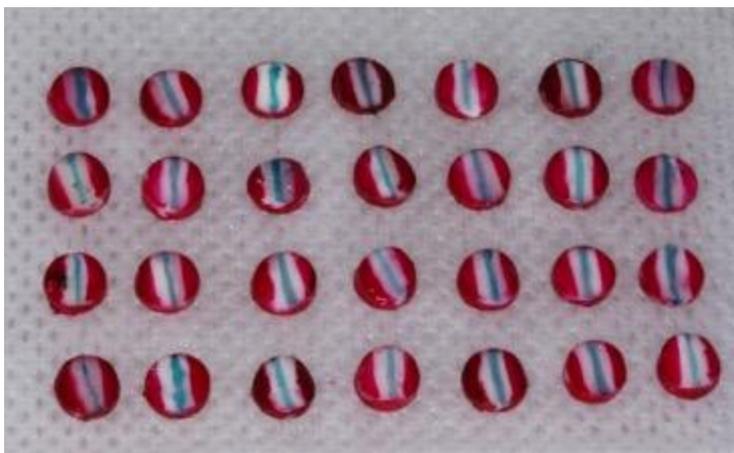


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 Desmineralização dos Espécimes

Para a indução artificial de lesões cáries na dentina, utilizou-se uma solução tampão de acetato a 50 mM contendo 2.2 mM  $\text{CaCl}_2$  e 2,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , em pH 5,0 (Queiroz, 2004; Buzalaf et al., 2010). A verificação do pH foi realizada com o pHmetro DM-20 (Digimed – São Paulo, SP, Brasil). Previamente ao desafio ácido, a base e dois terços das 40 amostras, correspondente à dentina, foi impermeabilizada com esmalte de unha vermelho e um terço da amostra não foi protegida com o esmalte (Risque, Niasi, Taboão da Serra), área controle (sem exposição à desmineralização). Em seguida, as 40 amostras foram armazenados individualmente em frascos plásticos com 30 mL de solução desmineralizadora por 5 dias a 37° C (Comar et al., 2012). Após este período, mais um terço dos espécimes foi protegido com esmalte de unha azul (Risque, Niasi, Taboão da Serra), para obter uma área controle de desmineralização do espécime; e ao final do processo de desmineralização os espécimes foram abundantemente lavados com água deionizada para serem submetidos aos agentes preventivos de cárie conforme figura 6.

Figura 6- Espécimes preparados



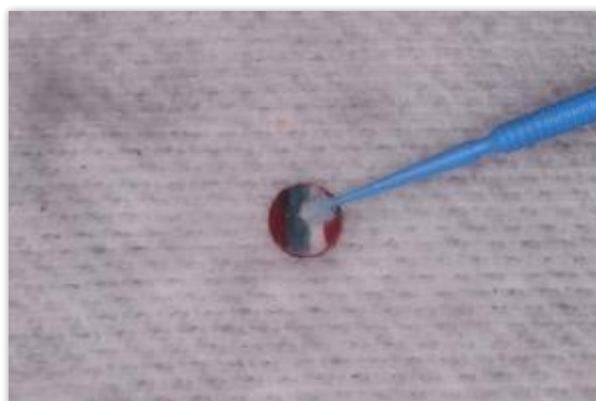
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4 Divisão dos Grupos

Os espécimes de dentina desmineralizados (n=40) foram divididos em 4 grupos, de acordo com o tratamento empregado:

- Grupo 1 - As amostras receberam a aplicação de clorexidina 0,12% (Fórmula e Ação – SP, Brasil) com pincel aplicador (Microbrush KG) por 1 minuto.
- Grupo 2 - As amostras receberam a aplicação de flúor neutro a 2% (Fórmula e Ação SP, Brasil) com pincel aplicador (Microbrush KG) por 1 minuto.

Figura 7 – Aplicação de flúor neutro e clorexidina



Fonte: Elaborada pelo autor.

- Grupo 3 - As amostras foram irradiadas pelo Nd: YAG *laser* (Neodymium: Yttrium- Aluminium- Garnet) Pulse Master 600 IQ (American Dental Technologies, EUA), com comprimento de onda de 1064nm e fibra óptica de 400µm de diâmetro. Utilizou-se a frequência de 10 Hz, 100 µs com a variação dos parâmetros de energia de 60 mJ/pulso. A irradiação laser foi realizada na forma não-contato, 48 J/cm<sup>2</sup> por 10 segundos (Chiga et al., 2016). Durante a irradiação, a ponta da fibra do laser foi posicionada a 90°, perpendicular à superfície da amostra, a uma distância de 1 mm da superfície.

- Grupo 4 – As amostras do grupo controle receberam a aplicação de água deionizada com pincel aplicador (Microbrush KG) por 1 minuto (Figura 8).

Figura 8 – Equipamento de laser Nd: YAG *laser*



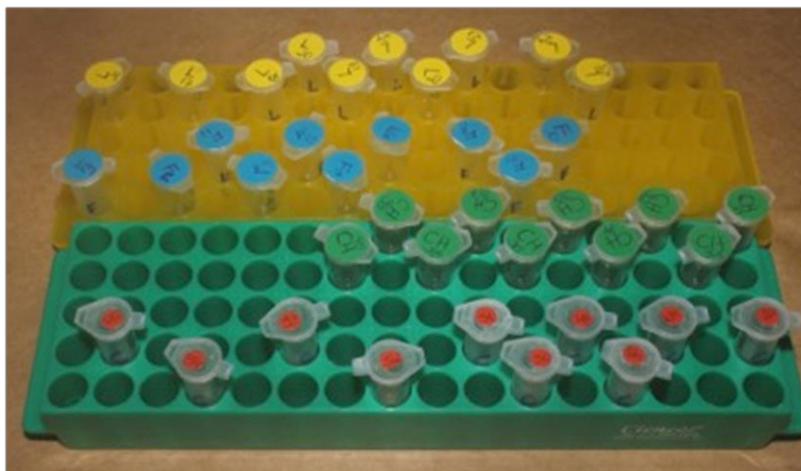
Legenda: a) vista lateral laser Nd: YAG; b) ponta do laser no ato da aplicação.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.5 Desafio da collagenase

Após a aplicação dos agentes cada grupo foi submetido à degradação do colágeno desmineralizado pela ação de 100 U/ml da enzima *Clostridium histolyticum* (Type VII, Product No. C0773, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na saliva artificial contendo HEPES a 20 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,70 mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O a 0,20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 4 mM, KCl a 30 mM, NaN<sub>3</sub> a 0,30 mM e EDTA-free cocktail de inibidores de protease (Complete TM cocktail de inibidor de protease, Roche, EUA). Foram pipetados 0,50

ml de solução de colagenase por amostra e foram armazenadas individualmente em tubos (Eppendorf – São Paulo, SP, Brasil), as quais permaneceram sobre a superfície da dentina, durante 5 dias, a 37 °C , conforme figura 9 (Kato et al., 2012).

Figura 9 – Amostras Armazenadas individualmente



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6 Ensaio da Hidroxiprolina

O colágeno é sintetizado intracelularmente em pequenas porções e exportado para fora da célula, onde, através da atuação de enzimas polimerizantes, é definido com a estrutura própria de colágeno, em hélice-tripla. Cada uma destas 3 "fitas" de proteínas são formadas quase inteiramente por glicina (que representa 1/3 da seqüência), prolina e lisina, como por mais dois aminoácidos que são modificados após serem colocados pelos ribossomos: a hidroxiprolina e a hidroxilisina. O conteúdo de hidroxiprolina pode ser determinado em procedimentos colorimétricos, nos quais a amostra é hidrolisada em ácido, filtrado e diluído. A hidroxiprolina é oxidada com cloramina-T. Depois da diluição com DMAB (4-dimethylaminobenzaldehyde), uma coloração vermelho-púrpura é obtida, a qual pode ser mensurada colorimetricamente a (Woessner, 1961; Walter et al., 2008).

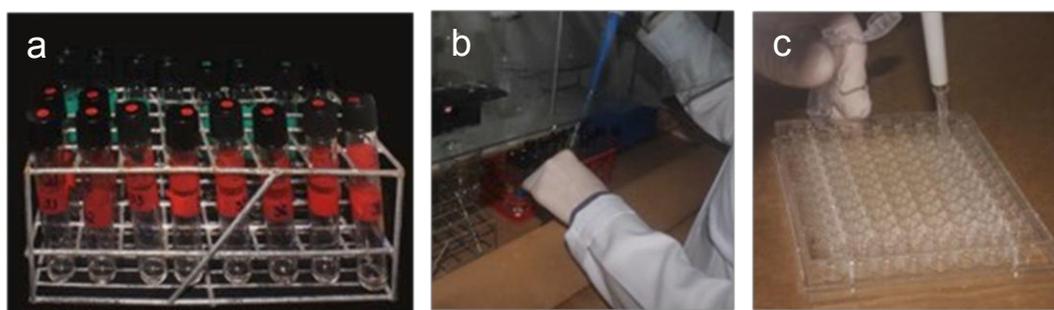
Portanto, com o objetivo de determinar a quantidade de colágeno degradado na dentina, foi mensurado o conteúdo de hidroxiprolina (Jamall et al., 1981; Reddy e

Enwemeka, 1996), conforme descrito abaixo:

1) Após o desafio da colagenase, as soluções foram coletadas para serem submetidas ao teste da hidroxiprolina utilizando o método Cloramina-T.

2) Foram diluídos 10  $\mu\text{L}$  de 1 mg/ml de solução padrão de hidroxiprolina em 90 $\mu\text{L}$  de água para preparar uma solução padrão de 0,1 mg/ml. Foram adicionados 0; 2; 4; 6; 8 e 10  $\mu\text{L}$  de 0,1 mg/ml da solução padrão de hidroxiprolina em uma placa de 96 poços, gerando 0 (vazio), 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1,0  $\mu\text{g/ml}$  poços padrão.

Figura 10 – Coleta e diluição das soluções



Legenda: a) Soluções coletadas b) Diluição da solução c) Solução padrão na placa de 96 poços.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

3) Em 100  $\mu\text{L}$  de amostra, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico concentrado (HCl ~ 12M) e hidrolisados a 120 °C (autoclave) por 3 h. Foram adicionados 5 mg de carvão ativado, misturados e centrifugados à 13.000 x g por 2 min. Foram transferidos 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante para uma placa de 96 poços.

4) Foram adicionados 6  $\mu\text{L}$  de concentrado de cloramina T a 94  $\mu\text{L}$  de tampão de oxidação, para o preparo da solução reagente. Foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  desta solução reagente (cloramina T/tampão de oxidação) em cada poço das placas de 96 poços contendo as amostras e incubados em temperatura ambiente por 5 min.

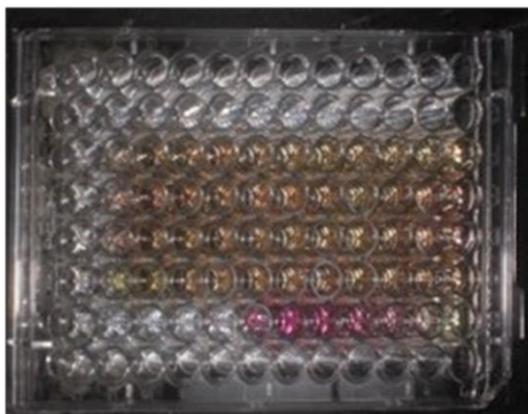
Figura 11 – Reagentes



Legenda: a) DMAB b) Cloramina T/Tampão de Oxidação c) Reagentes preparados.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

5) Na sequência, foram acrescentados 100  $\mu$ L de reagente diluído DMAB (50  $\mu$ L DMAB e ácido perclórico/isopropanol) para cada amostra e poço padrão, e incubados por 90 min a 60°C. A absorbância foi mensurada em 560 nm (A360) utilizando um leitor de microplaca.

Figura 12 – Placa de 96 poços



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.7 Amostras Adicionais

Foram confeccionadas 10 amostras adicionais, as quais foram submetidas ao processo de desmineralização por um período de 5 dias 37 °C (tampão de acetato a 50 mM contendo 2,2 mM CaCl<sub>2</sub> e 2,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, em pH 5). Previamente ao desafio ácido, a base e dois terços das 10 amostras, foram impermeabilizadas com esmalte de unha vermelho e um terço da amostra não foi protegida com o esmalte (Risque, Niasi, Taboão da Serra), e apenas este terço foi exposto ao desafio ácido. Essas amostras não foram submetidas aos tratamentos preventivos e ao desafio da colagenase, pois foram utilizadas como um controle em relação à remoção da matriz orgânica desmineralizada (MOD).

#### 4.8 Microradiografia Transversal

A microradiografia transversal é uma técnica capaz de mensurar a perda mineral integrada ( $\Delta Z$ ) e a profundidade da lesão de cárie, e permite a visualização da área degradada (Salomão et al., 2016). Além de ser um método considerado padrão ouro para mensurar diferenças no conteúdo mineral da superfície de uma lesão dental (Magalhães et al., 2009; Restrepo et al., 2015).

O  $\Delta Z$  (%vol. $\mu$ m) é o produto da diferença entre a porcentagem de volume mineral da dentina sadia (50%) e porcentagem de volume mineral da dentina desmineralizada e a profundidade da lesão ( $\mu$ m). O valor de R corresponde a média de perda mineral (%vol). A profundidade da lesão é definida pela distância da superfície (Id, 0% vol min) até a profundidade em que a dentina volta a apresentar um conteúdo mineral igual ou maior que 95% do conteúdo mineral da dentina hígida ( $\mu$ m), equivalente a 47,5% (Arends, Ten Bosch, 1992).

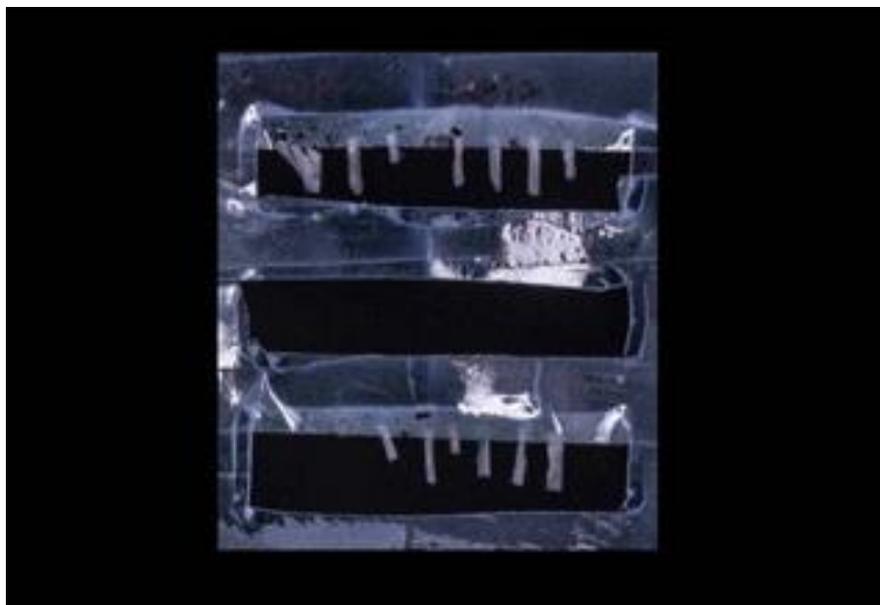
#### 4.9 Preparo e irradiação das amostras

As amostras de dentina foram cortadas perpendicularmente à proteção com esmalte de unha e longitudinalmente para análise por microradiografia transversal (TMR). Metade da amostra foi adicionalmente seccionada longitudinalmente no centro da superfície, por meio de um aparelho de corte de precisão (Buehler, EUA), e as duas partes foram polidas manualmente com lixas de granulação 600 (Extec, EUA), possibilitando a obtenção de vários fragmentos com a espessura aproximada de 100-120  $\mu\text{m}$ . Este corte possibilitou a obtenção de espécimes com as áreas protegida (hígida) e desmineralizada.

As amostras foram coladas com fita adesiva no porta-amostra (em torno de 30-40 amostras/porta-amostra), contendo o padrão de alumínio com diferentes espessuras, as quais geram diferentes gradações de cinza ("stepwedge"). O porta amostra foi inserido no cassete, juntamente à placa de vidro em ambiente escuro, sendo o cassete envolvido em um saco preto e inserido dentro do gerador de raio X (Softex, Japão). Dessa forma, a placa de vidro é sensibilizada pelo raio-x (20 kv e 20 mA) por 13 min. Após cada exposição, a placa de vidro foi revelada, fixada em ambiente escuro a 20 °C e lavada.

A análise da imagem foi realizada utilizando microscópio (Zeiss, Alemanha) com câmera CCD (Canon, Japão) e acessórios acoplado a um computador com software 2012 para captura e 2006 para a análise (Inspektor Research System bv, Holanda) (Figura 16). A perda mineral ( $\Delta Z$ ) e profundidade da lesão ( $\mu\text{m}$ ) foram calculadas a partir de valores de cinza de microradiografias padrão usando a fórmula de Angmar et al. (1963).

Figura 13 – Amostras fixadas no porta amostras previamente à inserção no cassete, o qual foi colocado dentro do gerador de raio X (Softex, Japão)



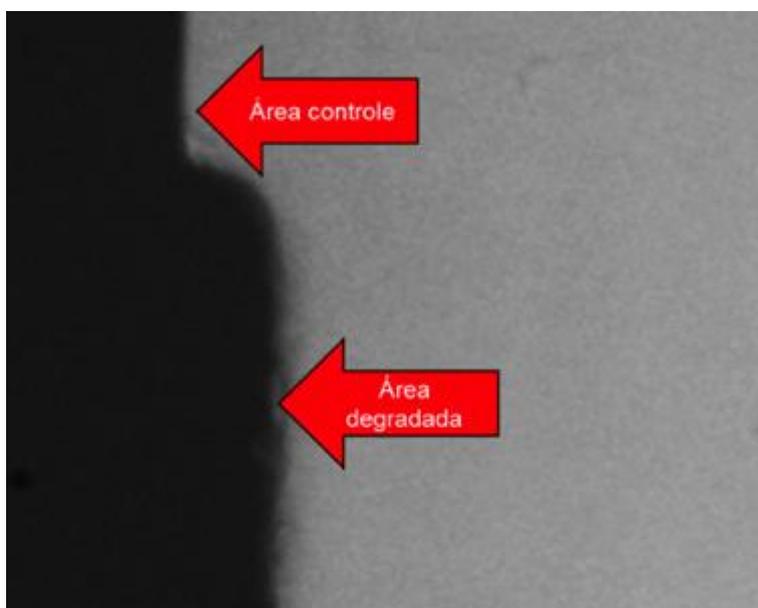
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Placa de vidro sensibilizada pelo raio-x ( 20 kv e 20mA)



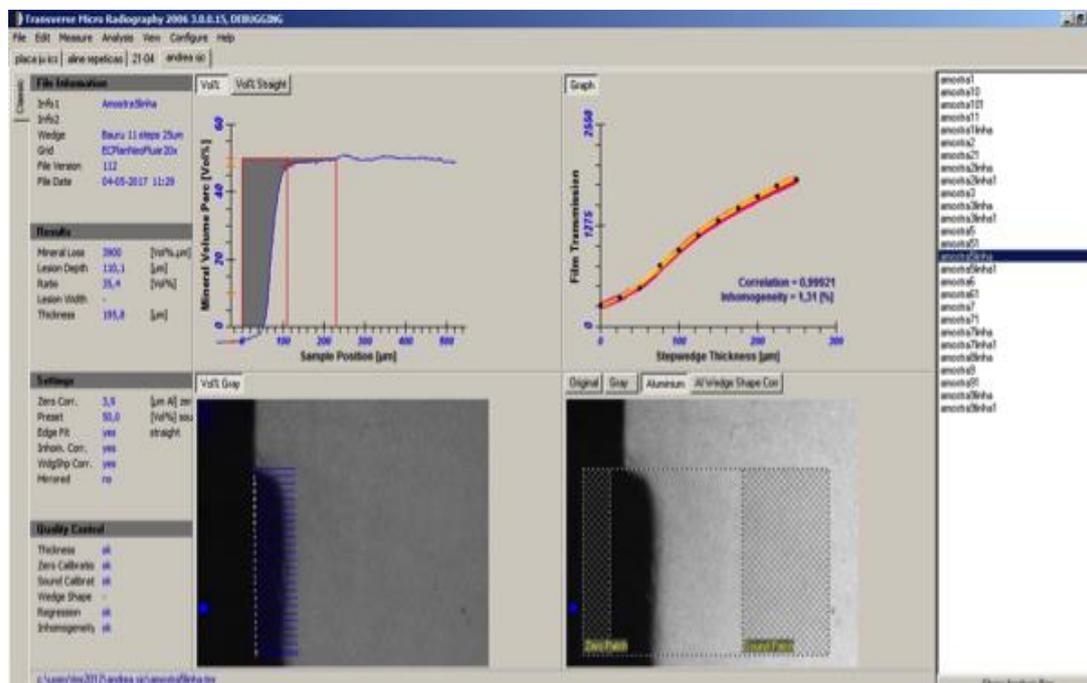
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Captura da imagem para análise (Inspektor Research System bv, Holanda)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Software utilizado para análise da microradiografia na superfície da amostra



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.10 Planejamento Estatístico

Para o teste da Hidroxiprolina, as hipóteses de distribuição normal e de igualdade de variância foram testadas para todas as variáveis através dos testes de Kolmogorov Smirnov e Bartlett respectivamente ( $\alpha = 0,05$ ). O fator em estudo foi o Tratamento em 3 níveis (flúor, clorexedina e laser de Nd:YAG). A variável resposta foi a concentração de hidroxiprolina ( $\mu\text{g/ml}$ ), analisada através do teste ANOVA um fator ( $\alpha = 0,05$ ).

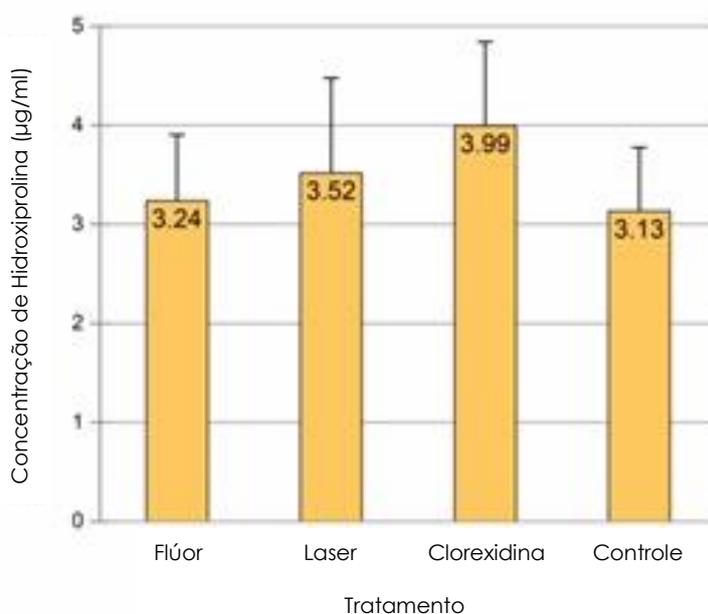
Para a Microradiografia Transversal a variável resposta foi a perda mineral integrada ( $\Delta Z \text{ \%min}/\mu\text{m}$ ) e a profundidade da lesão ( $\mu\text{m}$ ). Foi uma análise de variância de medidas repetidas, considerando os fatores tipo de tratamento e o tempo, este último sendo o fator de repetição. Como os dados não apresentaram distribuição normal, a análise estatística foi realizada de forma dividida. Os dados iniciais foram analisados pelo teste ANOVA a 1 fator, sem diferenças estatísticas. Os dados após 2 dias de desmineralização não apresentaram distribuição normal e foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis e teste de comparações múltiplas, Dunn. Os dados de repetição, comparações entre a desmineralização inicial (5 dias) e a segunda desmineralização (2 dias), foi realizado individualmente em cada grupo por teste T de medidas repetidas ou Wilcoxon, dependendo da distribuição dos dados, se normal ou não normal, respectivamente.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Teste da Hidroxiprolina

Não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,09$ ) entre as médias de concentração de hidroxiprolina nos grupos CHX ( $3,99 \pm 0,85$ ), F ( $3,24 \pm 0,66$ ), Laser ( $3,52 \pm 0,96$ ) e Controle ( $3,13 \pm 0,64$ ).

Figura 17 – Gráfico da concentração de hidroxiprolina



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.2 Microradiografia Transversal

As tabelas 1 e 2 mostram os resultados da MRT para dentina em diferentes condições experimentais. Cinco dias de desmineralização produziram uma lesão com uma perda mineral de 2485 % min.µm e uma lesão com profundidade de 114 µm. A remoção da matriz orgânica não aumentou a desmineralização

independentemente do tratamento, o que era esperado, visto que o protocolo é capaz de remover apenas o colágeno desprotegido e não o conteúdo mineral.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças entre os tratamentos em relação à perda mineral, outros 2 dias de desafio de desmineralização induziram a progressão da perda mineral nas amostras do grupo controle (com e sem matriz orgânica desmineralizada: MOD) e do grupo do laser (com e sem MOD), enquanto que nos outros grupos a perda mineral não progrediu. Este resultado mostra que os tratamentos da dentina sem MOD com flúor e clorexidina são capazes de proteger melhor a dentina contra a progressão da perda mineral comparado com a dentina com MOD (Tabela 1).

Tabela 1 - Perda mineral integrada ( $\Delta Z$ , % min.  $\mu\text{m}$ ) da dentina após diferentes condições experimentais

	<b>Flúor (sem MOD)</b>	<b>Laser (sem MOD)</b>	<b>CHX (sem MOD)</b>	<b>Controle (sem MOD)</b>	<b>Controle (com MOD)</b>	
<b>Desmin 5d + tratamento (colagenase)</b>	2967.5 $\pm$ 496.6	2746.5 $\pm$ 463.1	2819.5 $\pm$ 435.6	2804.4 $\pm$ 287.4	2485.0 $\pm$ 699.6	ANOVA $p=0.2957$
<b>Desmin 5d + tratamento (colagenase)+ Demin 2d</b>	3072.0 $\pm$ 446.7	3196.5 $\pm$ 457.5	2952.0 $\pm$ 737.6	3546.0 $\pm$ 259.5	3114.0 $\pm$ 602.9	ANOVA $p=0.1457$
<b>t test (dentro do mesmo tratamento)</b>	$p=0.5954$	$p=0.0423$	$p=0.6307$	$p<0.0001$	$p=0.0229$	
<b>Aumento da perda mineral (sim/não)</b>	<b>não</b>	<b>sim</b>	<b>não</b>	<b>sim</b>	<b>sim</b>	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação à profundidade da lesão, houveram diferenças significativas entre os grupos após mais 2 dias de desmineralização. A clorexidina foi o único tratamento capaz de mostrar menor profundidade da lesão do que o controle, enquanto os outros tratamentos não diferiram dos controles. Quando os resultados foram comparados dentro do mesmo grupo, não houve progressão significativa na profundidade da lesão, exceto para o controle sem MOD comparado ao controle com MOD, mostrando que a presença de MOD pode reduzir a progressão da

profundidade da lesão. Por outro lado, o grupo da clorexidina mostrou uma diminuição da profundidade da lesão, o que pode ser devido a precipitação na superfície (Tabela 2).

Tabela 2 - Profundidade da lesão (LD,  $\mu\text{m}$ ) da dentina após diferentes condições experimentais

	<b>Flúor (sem MOD)</b>	<b>Laser (sem MOD)</b>	<b>CHX (sem MOD)</b>	<b>Controle (sem MOD)</b>	<b>Controle (com MOD)</b>	
<b>Desmin 5d + tratamento (colagenase)</b>	125.2 $\pm$ 47.1	121.6 $\pm$ 41.9	106.8 $\pm$ 32.9	150.1 $\pm$ 53.9	113.9 $\pm$ 41.6	ANOVA p=0.2005
<b>Desmin 5 d + tratamento (colagenase) + Demin 2 d<sup>‡</sup></b>	102.0 $\pm$ 20.6ab	98.2 $\pm$ 18.0ab	78.3 $\pm$ 17.2a	171.0 $\pm$ 70.4b	128.6 $\pm$ 43.7b	Kruskal- Wallis/Dunn (p<0.0001)
<b>t test ou Wilxocon* (dentro do mesmo tratamento)</b>	p=0.4316*	p=0.2324*	p=0.0250	p=0.3527 p=0.0300 <sup>§</sup>	p=0.1535	
<b>Aumento da profundidade da lesão (sim/não)<sup>§</sup></b>	<b>não</b>	<b>não</b>	<b>Dimuição</b>	<b>Sim (comparado com MOD)</b>	<b>não</b>	

<sup>‡</sup> Letras diferentes mostram diferenças significantes entre os groups.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 6 DISCUSSÃO

Em virtude do aumento da prevalência das lesões de cárie radicular pela maior longevidade dos elementos dentais, métodos que promovam o controle da progressão da doença tem grande relevância clínica na atualidade. Assim, esse trabalho buscou alternativas clínicas viáveis de aplicação de agentes preventivos da progressão da doença cárie, através de possíveis mudanças químicas e/ou físicas geradas no substrato. Flúor (2 %), Laser Nd:YAG / 60 mJ e Clorexidina (0,12 %) foram utilizados como agentes de controle da progressão da cárie radicular, em protocolos considerados viáveis para aplicação clínica, no tangente à concentração e tempo de aplicação.

O flúor e a clorexidina representam, no atual contexto das pesquisas e das aplicações clínicas, os meios mais utilizados na prevenção da instalação e progressão de lesões cariosas, pois interferem no equilíbrio dinâmico da interface dente/fluidos orais (equilíbrio DES/RE) (Tagomori, Morioka 1989; Ganss et al., 2004; May et al., 2013; Bizhang et al., 2015).

Os modelos de estudo *in vitro* são utilizados com frequência em pesquisas de cárie dental para avaliar a inibição da desmineralização e da remineralização, utilizando geralmente esmalte e dentina de dentes humanos, extraídos por diversas razões terapêuticas. No entanto, modelos animais substitutivos do dente humano, como por exemplo os dentes bovinos, são utilizados nas pesquisas com fidedignidade de resultados, por possuírem estrutura morfológica similar, além de contornar as dificuldades de obtenção de dentes humanos pelos aspectos éticos envolvidos. Assim, neste estudo optou-se pela utilização de dentina radicular bovina (Chaussain-Miller et al., 2006; Magalhães et al., 2009; Kato et al., 2011).

Para a indução da lesão artificial inicial de cárie foi utilizado no presente estudo o modelo de desmineralização de Queiroz (2004). Esse modelo foi também utilizado por Kato et al. 2012 e Magalhães et al. 2009, que atestaram ser este um modelo capaz de promover mudanças químicas na dentina, principalmente em sua matriz inorgânica, levando à exposição da matriz orgânica, simulando o processo de desmineralização que ocorre *in vivo*. Adicionalmente Magalhães e colaboradores (2009), pontuaram que diferentes protocolos de desmineralização podem influenciar

no resultado do tratamento remineralizador, pois promovem diferenças nas características físicas e mecânicas no tecido desmineralizado, como a sua característica de distribuição mineral e dureza, e para mensurar essas mudanças no tecido os autores utilizaram a técnica da microradiografia transversal e de dureza transversal. Os protocolos de desmineralização utilizados foram: gel MC (8 % gel metilcelulose + 0.1 M ácido láctico, pH 4.6, 14 dias); gel PA (20 g/L ácido poliacrílico + 0.1 M ácido láctico, com 500 mg/L hidroxiapatita, pH 4.8, 16 h); MHDP (50 mM ácido láctico + cálcio, fosfato e metil difosfanato, pH 5.0, 6 dias); Tampão (50 mM ácido acético + cálcio, fosfato and flúor, pH 5.0, 16h). E o protocolo que proporcionou uma lesão com maior perda mineral e maior profundidade foi o MHDP, pois o PH e o grau de saturação, influenciam predominantemente na taxa de desmineralização e conseqüentemente no tempo do experimento. Esses representam fatores bastante relevantes para o presente estudo na escolha do protocolo de desmineralização, visto que também utilizou-se a microradigrafia transversal para avaliação de perda mineral e profundidade da lesão.

Após a desmineralização inicial, as amostras foram tratadas com os diferentes agentes de proteção: flúor, clorexidina e laser de Nd:YAG. Esses tratamentos foram eleitos por diversos motivos. O flúor, tratamento preventivo de cárie já consagrado na literatura, foi utilizado no presente estudo por sua capacidade de inibir a desmineralização e aumentar a remineralização da dentina (Featherstone ,2000; Gangler et al., 2009; Arnold et al., 2007).

A concentração de flúor utilizada foi de 2% por 1min, a fim de simular um protocolo clínico viável (Gangler et al., 2009; Tenuta e Cury 2010). Apesar de alguns protocolos utilizarem um tempo de 4 min de aplicação, relatos demonstram que não existem diferenças nos efeitos proporcionados pelo tempo de aplicação no intervalo entre 1 e 4 min (Marthaler, 2004; Fejerskov, Kidd 2011). A concentração, no entanto, se mostra uma variável importante no efeito do flúor, uma vez que se elevadas, podem potencializar o efeito tampão da matriz orgânica de dentina no controle da desmineralização. No entanto, a concentração ideal de flúor para aplicação na prevenção de cárie radicular ainda não está completamente definida na literatura, sendo estimada pelos resultados em cáries envolvendo esmalte (Tohda et al., Fejerskov, 1997; Featherstone, 2000; Ganss et al., 2004; Tenuta e Cury,2010).

Considerou-se no presente estudo, a utilização do laser de Nd:YAG pela

capacidade de fusão e ressolidificação do substrato (Yamamoto, Sato, 1989; McCormack et al., 1995, Featherstone et al., 1998; Gonçalves et al., 1999). Neste processo ocorre a transformação da hidroxiapatita em B-fosfato tricálcico, mais resistente à dissolução, aumentando a resistência à cárie pela redução da velocidade de desmineralização. Este fato é relevante pois, como relatado na literatura, a dentina exposta é mais susceptível à cárie do que o esmalte, e o laser pode aumentar o conteúdo mineral relativo da dentina pela remoção de proteínas (Tagomori, Morioka 1989; McCormack et al., 1995; Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Rodrigues et al., 2004; Magalhães et al., 2008). Assim, para obtenção dos efeitos desejados do laser, a correta seleção dos parâmetros é fundamental (Anic et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Takeda et al., 1998). A densidade de energia, a energia, a potência, a frequência e o contato ou não da fibra óptica com o substrato, com certeza são os responsáveis pela grande variabilidade de resultados encontrados na literatura. Por isso os parâmetros selecionados para este estudo foram: 60mJ de energia, 48J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia, 10Hz de frequência, 100 µs e a forma de não contato (Bachmann et al., 2005; Franzen et al., 2011; Maden et al., 2013; Chiga et al., 2016).

O terceiro e último tratamento eleito para o presente estudo foi a clorexidina (CHX). Considerado como o padrão ouro para manutenção da integridade do colágeno dentinário por promover a redução de sua auto-degradação pela inibição da atividade das proteases do próprio hospedeiro (Davies et al., 1954; Schiott et al., 1970; May et al., 2013; Bizhang et al., 2015), a clorexidina exibe ainda amplo espectro bactericida (Schiott et al., 1970, Martin et al., 2000). De acordo com Baca e colaboradores (2012), a eficácia da CHX está relacionada à concentração e frequência de aplicação; eles utilizaram concentrações de CHX 0,2 % e 2 % com 1 min de aplicação, e obtiveram resultados mais positivos com CHX 2 % no efeito antimicrobiano. Por isso, neste estudo procurou-se um equilíbrio entre concentração e frequência, a fim de se evitarem efeitos colaterais como manchamento ou comprometimento do paladar (Matthijs, Adriaens, 2002; Slot et al., 2012).

Tem sido demonstrado, que o manchamento generalizado dos dentes pode ocorrer quando a CHX é utilizada em altas concentrações e por um período de tempo prolongado. Segundo a literatura, aplicações de clorexidina 0,12 % em intervalos de tempo entre 1 e 2 min não são capazes de causar manchamento dos

dentos (Ellingsen et al., 1982; Demeule et al., 2000; Kouadio et al., 2017). Além disso, May e colaboradores (2013) observaram que a absorção da CHX pelas bactérias é extremamente rápida atingindo seu efeito máximo em 20s. Sendo assim, neste presente estudo optou-se pela concentração de 0,12 % e pelo tempo de 1 min de aplicação.

A atividade colagenolítica após a desmineralização da dentina radicular foi proporcionada pelo armazenamento dos espécimes em solução contendo colagenase, também utilizada por Kato et al. (2012) e Islam et al. (2016). Essa metodologia simula a ação bacteriana de degradação durante o processo cariioso, onde após a desmineralização em pH ácido, a matriz orgânica é exposta à hidrólise, acelerada pela atividade enzimática de MMPs, cisteínas e catepsinas (Perdigão, 2010; Mazzoni et al., 2015). A colagenase é capaz de promover a degradação “*in vitro*”, liberando aminoácidos essenciais constituintes do colágeno na solução de armazenamento, que podem ser detectados por métodos colorimétricos. Dentre esses aminoácidos está a hidroxiprolina. O teste da hidroxiprolina também utilizado por Woessner (1961), Jamall et al. (1981), Kato et al. (2012) e Islam et al. (2016), assim como neste estudo, para avaliar a degradação de colágeno de uma forma quantitativa, afinal 90% da massa mineral da dentina desmineralizada consiste em colágeno do tipo I, o qual contém cerca de 10 % de HYP, enquanto outras proteínas contém pouco ou nada deste aminoácido (Bornstein, Sage, 1980; Brackett et al., 2015), mostrando-se um recurso bastante promissor na detecção da quantidade de colágeno degradado.

A colagenase utilizada foi *C. histolyticum*, seguindo o protocolo de Kato et al. (2012) e Islam et al. (2016), a fim de degradar a matriz orgânica através da hidrólise das regiões helicoidais das triplas hélices das fibras de colágeno, sob condições *in vitro* simuladoras das condições fisiológicas. Caso os tratamentos utilizados neste estudo fossem capazes de inibir a colagenase bacteriana, a camada orgânica seria preservada da degradação. Adicionalmente ao desafio da colagenase as amostras foram submetidas à mais dois dias de desmineralização, pois teoricamente essas amostras estariam menos protegidas devido à remoção do colágeno, e assim verificar se houve ou não a progressão da lesão.

Os resultados obtidos no presente estudo com o ensaio da HYP não foram capazes de detectar uma diferença significativa entre os tratamentos preventivos e o

grupo controle sem tratamento, ou seja, aparentemente os tratamentos preventivos não foram eficazes na inibição da degradação do colágeno radicular pela mensuração da HYP. Esse dado contrasta com a literatura em questão. Reddy e Enwemeka (1996) utilizaram o ensaio da HYP e obtiveram resultados positivos na avaliação de colágeno degradado em vários tecidos biológicos, provando com seus resultados que o método é efetivo em tecidos de diferentes origens.

Kato e colaboradores (2012) utilizaram amostras de dentina de dentes bovinos com uma área tratada de 1.0 x 0.5 cm utilizando  $\text{FeSO}_4$  (1mM), clorexidina (0,0012 %), EGCG (400 $\mu\text{M}$ ), NaF (1.23 %) e obtiveram resultados significativos com o teste da HYP observando redução da degradação da matriz orgânica desmineralizada. Além disso, as concentrações, formas de aplicação e tempos empregados para os tratamentos preventivos também foram diferentes, e da mesma forma, podem não ter sido suficientes para gerar os efeitos esperados nas condições do experimento.

Walter e colaboradores (2008) também utilizaram o método da HYP, na avaliação da degradação de colágeno em dentina radicular utilizando tratamentos para promover a estabilidade da matriz de colágeno e prevenir a cárie radicular, e também não obtiveram diferenças significativas entre os grupos, em relação à quantidade de HYP liberada, como no presente estudo. No entanto, os autores complementaram a análise com microscopia confocal para visualizar a progressão da lesão, observando um aumento da profundidade da lesão nos grupos controle. Sendo assim, é importante salientar que outras formas de avaliação devam ser utilizadas para complementar a análise da progressão da cárie.

Assim avaliou-se no presente estudo a progressão da cárie por meio da microradiografia transversal, pois esta técnica pode medir a perda mineral integrada e a profundidade da lesão, além de permitir a visualização da área degradada (Salomão et al., 2016). Magalhães e colaboradores (2009), também optaram pela microradiografia transversal, por ser considerado o padrão ouro para determinação das diferenças no conteúdo mineral da superfície de uma lesão dental.

Restrepo e colaboradores (2015), também utilizaram flúor e CHX como tratamentos preventivos de cárie, e optaram pela MRT para avaliar a perda mineral da lesão, pois métodos convencionais como as análises radiográficas, não são capazes de quantificar perda ou ganho mineral em processos de desmineralização e

remineralização respectivamente. Então neste contexto a MRT mostrou-se adequada para as avaliações pretendidas e confirmada nos resultados obtidos.

Procurou-se comparar no presente estudo a perda mineral integrada e a profundidade da lesão de cárie, em amostras com matriz orgânica desmineralizada (MOD) e em amostras sem matriz orgânica desmineralizada. As amostras com MOD não foram submetidas ao desafio da colagenase e nem aos tratamentos preventivos, assim avaliou-se apenas um processo de desmineralização e obteve-se resultados comparativos entre as lesões.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, observou-se que a irradiação da dentina cariada com laser de Nd:YAG não promoveu modificações químicas adicionais, quando comparadas ao grupo que recebeu a aplicação da clorexidina (CHX). Chiga e colaboradores (2016) utilizaram um protocolo de aplicação do laser de Nd:YAG semelhante ao presente estudo, em relação a frequência, tempo e potência; porém utilizou a aplicação do laser com contato, fator que pode ter interferido nos resultados adquiridos. Ainda neste estudo os autores associaram flúor e laser de Nd:YAG e compararam à aplicação do flúor apenas, e concluíram que a irradiação com laser associado ao flúor promove resultados mais satisfatórios em relação à obliteração dos túbulos dentinários reduzindo a difusão dos ácidos para a dentina o que diminui a extensão da lesão de cárie. A associação do flúor ao laser poderia ter sido bastante interessante no presente estudo, pois poderia ter impedido a degradação da matriz orgânica desmineralizada (MOD), visto que o flúor pode ser incorporado dentro da estrutura cristalina quando associado ao laser (Rodrigues et al., 2004, Gao et al., 2006). Além disso, a camada de matriz orgânica de dentina desmineralizada exibe uma capacidade tampão que poderia prevenir a desmineralização em áreas de dentina mais profunda na presença de alta quantidade de flúor e o laser pode levar o flúor para essa camada de dentina mais profunda (Ganss et al., 2004).

Outra possibilidade a ser considerada em relação à aplicação do laser no presente estudo, seria a utilização de fortoabsorvedores, que poderiam gerar uma ação superficial de fusão mais intensa, sem elevar a temperatura, influenciando na relação tempo/ potência, e talvez proporcionando resultados positivos no controle da progressão da lesão. Cunha e colaboradores (2017) utilizaram um protocolo de aplicação de 1.0 W, 100 mJ/pulso, 85 J/cm<sup>2</sup> e 4 aplicações de 10s com intervalo de

10 s entre as mesmas; e associaram um fotoabsorvedor escuro a fim de proteger a polpa e a dentina de injúrias causadas pelo aquecimento provocado pelo laser, pois os fotoabsorvedores além de promover esta proteção fazem com que o laser atinja seu pico de absorção na presença dos mesmos (Bachmann, Zezell, 2005).

A hipótese de nulidade levantada foi que os tratamentos preventivos não produziram efeitos significativos na perda mineral integrada e na profundidade da lesão de cárie radicular, mas os resultados mostraram que não, e observou-se uma menor progressão da cárie no grupo que recebeu a aplicação tópica por 1 min de CHX (0,12 %) em relação aos outros grupos (Tabelas 1 e 2). Verificou-se que a literatura apresenta vários trabalhos com resultados positivos do efeito da CHX na inibição da cárie radicular, alcançada pela inibição da produção de ácidos e da formação da placa dental (Demeule et al., 2000; May et al., 2013; Kouadio et al., 2017), porém não apresenta dados suficientes em relação ao efeito da CHX na inibição da progressão da cárie radicular. Portanto mais estudos devem ser sugeridos para verificar a ação da CHX na progressão da lesão.

Já o flúor mostrou-se não efetivo na prevenção da progressão da cárie radicular em relação a perda mineral, porém apresentou a profundidade da lesão diminuída, de acordo com os resultados obtidos na microradiografia transversal (MRT), conforme tabelas 1 e 2. Esses resultados podem estar relacionados ao fato de que os tratamentos com flúor podem resultar em respostas diferenciadas dependendo do estágio de desenvolvimento das lesões, sendo assim o flúor exerceria um efeito cariostático na superfície mineral diminuindo a profundidade da lesão (Fejerskov, 1997; Featherstone, 2000).

Observou-se que a remoção da MOD não aumentou a desmineralização independentemente do tratamento, visto que o protocolo proposto foi capaz de remover apenas o colágeno desprotegido e não o conteúdo mineral (Magalhães et al., 2009; Comar et al., 2012).

Apesar de não terem sido encontradas diferenças entre os tratamentos em relação à perda mineral, outros 2 dias de desafio de desmineralização induziram a progressão da perda mineral nas amostras do grupo controle. Este resultado mostrou que os tratamentos da dentina sem MOD com flúor e clorexidina são capazes de proteger melhor a dentina contra a progressão da perda mineral comparado com a dentina com MOD (Buzalaf et al., 2010).

Em relação à profundidade da lesão, houveram diferenças significativas entre os grupos após mais 2 dias de desmineralização. A clorexidina foi o único tratamento capaz de mostrar menor profundidade da lesão em relação ao grupo controle, enquanto os outros tratamentos não diferiram dos controles.

Entendemos que apesar de não ter ocorrido liberação significativa de HYP após os tratamentos aplicados, pudemos observar com a técnica da microradiografia transversal que existiu uma tendência de preservação do conteúdo mineral da lesão. Portanto é provável obter-se benefícios terapêuticos com tratamentos preventivos em lesões de cáries existentes, em cavidades bucais em condições de atividade de cárie. Porém, o tratamento mais indicado, assim como concentrações, associações de tratamentos, tempo de aplicação ou até mesmo a área da amostra a ser submetida aos desafios bacterianos e processos desmineralizadores, devem ainda ser revistas e investigadas.

Considerando os benefícios já conhecidos decorrentes da utilização do flúor, clorexidina e laser 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. Sendo assim mais estudos são necessários para o desenvolvimento de protocolos clínicos.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e condições do estudo é possível concluir que:

- a) Os tratamentos preventivos não mostraram efeitos significativos no bloqueio da degradação do colágeno frente ao teste da hidroxiprolina;
- b) Os tratamentos preventivos clorexidina e flúor mostraram efeitos significativos na perda mineral integrada e na profundidade da lesão, no entanto, somente a clorexidina foi efetiva na inibição da progressão da lesão de cárie radicular quando utilizada a análise da microradiografia transversal.

## REFERÊNCIAS\*

- Anic I, Segovic S, Katanec D, Prskalo K, Najzar-Fleger D. Scanning electron microscopic study of dentin lased with argon, CO<sub>2</sub>, and Nd:YAG laser. *J Endod*. 1998 Feb;24(2):77-81. doi: 10.1016/S0099-2399(98)80081-2. Pubmed PMID: 9641135.
- Arends J, Jongebloed W, Ogaard B, Rolla G. SEM and microradiographic investigation of initial enamel caries. *Scand J Dent Res*. 1987 Jun;95(3):193-201. Pubmed PMID: 3474760.
- Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res*. 1992 Apr;71 Spec No:924-8.
- Arnold WH, Bietau V, Renner PO, Gaengler P. Micromorphological and micronanalytical characterization of stagnating and progressing root caries lesions. *Arch Oral Biol*. 2007 Jun;52(6):591-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.11.008. Pubmed PMID: 17181998.
- Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J Endod*. 2012 Jul; 38(7):927-30. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.003. Epub 2012 May 15.
- Bachmann L, Diebolder R, Hibst R, Zezell DM. Changes in chemical composition and collagen structure of dentine tissue after erbium laser irradiation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2005 Sep;61(11-12):2634-9. doi: 10.1016/j.saa.2004.09.026. Pubmed PMID: 16043057.
- Balooch M, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization. *J Struct Biol*. 2008 Jun;162(3):404-10. doi: 10.1016/j.jsb.2008.02.010. Pubmed PMID: 18467127.
- Bardow A, Hofer E, Nyvad B, ten Cate JM, Kirkeby S, Moe D, et al. Effect of saliva composition on experimental root caries. *Caries Res*. 2005 Jan-Feb;39(1):71-7. doi: 10.1159/000081660. Pubmed PMID: 15591738.
- Bertassoni LE, Marshall GW. Papain-gel degrades intact nonmineralized type I collagen fibrils. *Scanning*. 2009 Nov-Dec;31(6):253-8. doi: 10.1002/sca.20171. Pubmed PMID: 20205185.
- Bizhang M, Kaleta-Kragt S, Singh-Hüsgen P, Altenburger MJ, Zimmer S. Effect of 10% fluoride on the remineralization of dentin in situ. *J Appl Oral Sci*. 2015 Nov-Dec;23(6):562-70. doi: 10.1590/1678-775720150239.
- Bjorndal A. [A slice of the same pie--the normal and the abnormal]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 1991 Dec 10;111(30):3608-9. Pubmed PMID: 1838210.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Bnerjee A, Boyde A. Autofluorescence and mineral content of carious dentine: scanning optical and backscattered electron microscopic studies. *Caries Res.* 1998;32(3):219-26.

Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:957-1003. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.004521. Pubmed PMID: 6157354.

Boyde A, Lester KS. An electron microscope study of fractured dentinal surfaces. *Calcif Tissue Res.* 1967;1(2):122-36. Pubmed PMID: 6070054.

Brackett MG, Agee KA, Brackett WW, Key WO, Sabatini C, Kato MT, et al. Effect of Sodium Fluoride on the endogenous MMP Activity of Dentin Matrices. *J Nat Sci.* 2015 Jun;1(6). pii: e118. Pubmed PMID: 26052548.

Buzalaf MA, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem AC. pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci.* 2010 Jul-Aug;18(4):316-34. Pubmed PMID: 20835565.

Cakar G, Kuru B, Ipci SD, Aksoy ZM, Okar I, Yilmaz S. Effect of Er:YAG and CO2 lasers with and without sodium fluoride gel on dentinal tubules: a scanning electron microscope examination. *Photomed Laser Surg.* 2008 Dec;26(6):565-71. 10.1089/pho.2007.2211. Pubmed PMID: 19099386.

Castellan CS, Pereira PN, Viana G, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Solubility study of phytochemical cross-linking agents on dentin stiffness. *Journal of dentistry.* 2010 May;38(5):431-6. doi: 10.1016/j.jdent.2010.02.002. Pubmed PMID: 20171257.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006 Jan;85(1):22-32. Pubmed PMID: 16373676.

Chiga S, Toro CV, Lepri TP, Turssi CP, Colucci V, Corona SA. Combined effect of fluoride varnish to Er:YAG or Nd:YAG laser on permeability of eroded root dentine. *Arch Oral Biol.* 2016 Apr; 64:24-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.12.006. Pubmed PMID: 26752225.

Comar LP, Wiegand A, Moron BM, Rios D, Buzalaf MA, Buchalla W, et al. In situ effect of sodium fluoride or titanium tetrafluoride varnish and solution on carious demineralization of enamel. *Eur J Oral Sci.* 2012 Aug;120(4):342-8. doi: 10.1111/j.1600-0722.2012.00968.x. Epub 2012 Jun 25.

Cunha SR, Garófalo AS, Scaramucci T, Zezell, DM, Aranha ACC. The association between Nd:YAG laser and desensitizing dentifrices for the treatment of dentin hypersensitivity. *Lasers Med Sci.* 2017 May;32(4):873-880. doi: 10.1007/s10103-017-2187-9. Epub 2017 Mar 14.

Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother.* 1954 Jun;9(2):192-6. Pubmed PMID: 13172429.

Demeule M, Brossard M, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Biochim Biophys Acta. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 16;1478(1):51-60.

Ellingsen JE, Rolla G, Eriksen HM. Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. *J Clin Periodontol.* 1982 Jul;9(4):317-22.

Featherstone JD. Caries detection and prevention with laser energy. *Dent Clin North Am.* 2000 Oct;44(4):955-69, ix. Pubmed PMID: 11048282.

Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO2 laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res.* 1998 Jun;77(6):1397-403. doi: 10.1177/00220345980770060401. Pubmed PMID: 9649168.

Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997 Feb;25(1):5-12. Pubmed PMID: 9088687.

Fitzgerald KA, Davies A, Russell AD. Uptake of <sup>14</sup>C-chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin. *FEMS Microbiol Lett.* 1989 Aug;51(3):327-32. Pubmed PMID: 2511066.

Frank RM. Electron microscopy of undecalcified sections of human adult dentine. *Arch Oral Biol.* 1959 Aug;1:29-32. Pubmed PMID: 13824530.

Frank RM, Voegel JC. Ultrastructure of the human odontoblast process and its mineralisation during dental caries. *Caries Res.* 1980;14(6):367-80. Pubmed PMID: 6933008.

Franzen R, Gutknecht N, Falken S, Heussen N, Meister J. Bactericidal effect of a Nd:YAG laser on *Enterococcus faecalis* at pulse durations of 15 and 25 ms in dentine depths of 500 and 1,000  $\mu\text{m}$ . *Lasers Med Sci.* 2011 Jan;26(1):95-101. doi: 10.1007/s10103-010-0826-5. Pubmed PMID: 20809081.

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.

Fejerskov O, Kidd EAM. *Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.* São Paulo: Santos, 2011.

Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent.* 1979 Spring;4(2):63-70. Pubmed PMID: 296808.

Gangler P, Kremniczky T, Arnold WH. In vitro effect of fluoride oral hygiene tablets on artificial caries lesion formation and remineralization in human enamel. *BMC Oral Health*. 2009 Oct 2;9:25. doi: 10.1186/1472-6831-9-25. Pubmed PMID: 19799785.

Gao XL, Pan JS, Hsu CY. Laser-fluoride effect on root demineralization. *J Dent Res*. 2006 Oct;85(10):919-23. doi: 10.1177/154405910608501009. Pubmed PMID: 16998132.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976;21(6):355-62.

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 May;6(3):437-9. Pubmed PMID: 10225852.

Glauche CE, de Freitas PM, Vieira ND Jr, Marques JL. Qualitative microanalysis of ions and ultrastructural changes in dentin exposed to laser irradiation and to metal salts solution. *Lasers Surg Med*. 2005 Apr;36(4):334-9. doi: 10.1002/lsm.20153. Pubmed PMID: 15786483.

Gonçalves SEP, de Araújo MAM, Damião AJ. Dentin bond strength: influence of laser irradiation, acid etching, and hypermineralization. *J Clin Laser Med Surg*. 1999 Apr;17(2):77-85.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007 Feb;65(1):1-13. doi: 10.1080/00016350600963640. Pubmed PMID: 17354089.

Hsu PJ, Chen JH, Chuang FH, Roan RT. The combined occluding effects of fluoride-containing dentin desensitizer and Nd-Yag laser irradiation on human dentinal tubules: an in vitro study. *Kaohsiung J Med Sci*. 2006 Jan;22(1):24-9. doi: 10.1016/S1607-551X(09)70216-5. Pubmed PMID: 16570565.

Islam MS, Khunkar SJ, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Comparative study of demineralized collagen degradation determined by hydroxyproline assay and microscopic depth measurement. *J Dent*. 2016 Apr;47:94-7. doi: 10.1016/j.jdent.2016.01.001. Epub 2016 Jan 7. Pubmed PMID: 26773460.

Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*. 1981 Mar 15;112(1):70-5.

Jones SJ, Boyde A. Scanning microscopic observations on dental caries. *Scanning Microsc*. 1987 Dec;1(4):1991-2002. Pubmed PMID: 3433076.

Kantola S. Laser-induced effects on tooth structure. IV. A study of changes in the calcium and phosphorus contents in dentine by electron probe microanalysis. *Acta Odontol Scand*. 1972 Oct;30(4):463-74. Pubmed PMID: 4510922.

Kantorowitz Z, Featherstone JD, Fried D. Caries prevention by CO2 laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc.* 1998 May;129(5):585-91. Pubmed PMID: 9601171.

Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.* 2011;45(5):429-34. doi: 10.1159/000330525. Epub 2011 Jan 27.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhaes AC, Pereira JC, et al. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res.* 2012 Dec; 91(12):1119-23. doi: 10.1177/0022034512455801. Pubmed PMID: 23023765.

Kidd EA, 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 No C:C35-8. Pubmed PMID: 15286119.

Kinney JH, Balooch M, Haupt DL Jr, Marshall SJ, Marshall GW Jr. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res.* 1995 May;74(5):1179-84. doi: 10.1177/00220345950740050601. Pubmed PMID: 7790595.

Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res.* 1994 Sep;73(9):1523-9. Pubmed PMID: 7929987.

Klont B, ten Cate JM. Susceptibility of the collagenous matrix from bovine incisor roots to proteolysis after in vitro lesion formation. *Caries Res.* 1991;25(1):46-50. Pubmed PMID: 1649003.

Kouadio AA, Struillou X, Bories C, Bouler JM, Badran Z, Soueidan A. An in vitro analysis model for investigating the staining effect of various chlorhexidine-based mouthwashes. *J Clin Exp Dent.* 2017 Mar 1;9(3):e410-e416. doi: 10.4317/jced.53375. eCollection 2017 Mar.

Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. *J Dent Res.* 1977 Oct;56(10):1233-7. doi: 10.1177/00220345770560102301 Pubmed PMID: 272387.

Larsen MJ, Pearce EI. Some notes on the diffusion of acidic and alkaline agents into natural human caries lesions in vitro. *Arch Oral Biol.* 1992;37(5):411-6. Pubmed PMID: 1610309.

Liu HC, Lin CP, Lan WH. Sealing depth of Nd:YAG laser on human dentinal tubules. *Journal of endodontics.* 1997 Nov;23(11):691-3. doi: 10.1016/S0099-2399(97)80403-7. Pubmed PMID: 9587310.

Maden M, Gorgul G, Sultan MN, Akca G, Er O. Determination of the effect of Nd:YAG laser irradiation through dentinal tubules on several oral pathogens. *Lasers Med Sci.* 2013 Jan;28(1):281-6. doi: 10.1007/s10103-012-1150-z. Epub 2012 Jul 6.

Magalhaes AC, Rios D, Machado MA, Da Silva SM, Lizarelli Rde F, Bagnato VS, et al. Effect of Nd:YAG irradiation and fluoride application on dentine resistance to erosion in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2008 Dec;26(6):559-63. doi: 10.1089/pho.2007.2231. Pubmed PMID: 19025402.

Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int.* 2002 Feb;33(2):151-9. Pubmed PMID: 11890029.

Marshall DW. 1998 National Registry of Radiation Protection Technologists Arthur F. Humm, Jr., Memorial Award. Norman R. Sunderland. 43rd Annual Meeting of the Health Physics Society, Minneapolis, MN 12-16 July 1998. *Health Phys.* 1998 Dec;75(6):568-9. Pubmed PMID: 9827501.

Marshall GW Jr, Wu-Magidi IC, Watanabe LG, Inai N, Balooch M, Kinney JH, et al. Effect of citric acid concentration on dentin demineralization, dehydration, and rehydration: atomic force microscopy study. *J Biomed Mater Res.* 1998 Dec 15;42(4):500-7. Pubmed PMID: 9827672.

Marthaler TM. Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res.* 2004 May-Jun;38(3):173-81. doi: 10.1159/000077752. Pubmed PMID: 15153686.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000 Sep;45(9):757-65. Pubmed PMID: 10869489.

Matthijs S, Adriaens PA. Chlorhexidine varnishes: a review. *J Clin Periodontol.* 2002 Jan; 29(1):1-8.

May L Mei, Chun H Chu, Edward CM Lo, Lakshman P Samaranayake. Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013 Jul; 18(4): e557–e563. doi:10.4317/medoral.18768.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res.* 2007 May;86(5):436-40. 10.1177/154405910708600509 Pubmed PMID: 17452564.

Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Mar 1;88(3):697-703. doi: 10.1002/jbm.a.31920. Pubmed PMID: 18335530.

- Mazzoni A, Tjaderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015 Feb;94(2):241-51. doi: 10.1177/0022034514562833. Pubmed PMID: 25535202.
- McCormack SM, Fried D, Featherstone JD, Glana RE, Seka W. Scanning electron microscope observations of CO<sub>2</sub> laser effects on dental enamel. *J Dent Res*. 1995 Oct;74(10):1702-8. doi: 10.1177/00220345950740101201. Pubmed PMID: 7499594.
- Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res*. 1991 Dec;99(6):457-62. Pubmed PMID: 1763281.
- Mjor IA. Human coronal dentine: structure and reactions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972 May;33(5):810-23. Pubmed PMID: 4552855.
- Musil D, Zucic D, Turk D, Engh RA, Mayr I, Huber R, et al. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J*. 1991 Sep;10(9):2321-30. Pubmed PMID: 1868826.
- Nagler DK, Storer AC, Portaro FC, Carmona E, Juliano L, Menard R. Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry*. 1997 Oct 14;36(41):12608-15. doi: 10.1021/bi971264+. Pubmed PMID: 9376367.
- Nammour S, Renneboog-Squilbin C, Nyssen-Behets C. Increased resistance to artificial caries-like lesions in dentin treated with CO<sub>2</sub> laser. *Caries Res*. 1992;26(3):170-5. Pubmed PMID: 1628290.
- Nancy A. *Ten Cate Histologia oral*. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil; 2013.
- Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res*. 2011 Apr;90(4):506-11. doi: 10.1177/0022034510391906. Pubmed PMID: 21248362.
- Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res*. 1983 Jan;62(1):7-10. doi: 10.1177/00220345830620011701. Pubmed PMID: 6571859.
- Ogushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res*. 1975 Sep-Oct;54(5):1019-26. doi: 10.1177/00220345750540050301. Pubmed PMID: 1058852.
- Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(2):104-33. Pubmed PMID: 8875027.
- Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004 Mar;83(3):216-21. doi: 10.1177/154405910408300306. Pubmed PMID: 14981122.

- Perdigao J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater.* 2010 Feb;26(2):e24-37. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.149. Pubmed PMID: 20005565.
- Perdigao J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent.* 2013 Aug;25(4):219-41. doi: 10.1111/jerd.12016. Pubmed PMID: 23910180.
- Petersson GH, Bratthall D. The caries decline: a review of reviews. *European journal of oral sciences.* 1996 Aug;104(4 ( Pt 2)):436-43. Pubmed PMID: 8930595.
- Queiroz CS. Modelos de estudo in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. Piracicaba: UNICAMP; 2004.
- Ratledge DK, Kidd EA, Beighton D. A clinical and microbiological study of approximal carious lesions. Part 2: efficacy of caries removal following tunnel and class II cavity preparations. *Caries Res.* 2001 Jan-Feb;35(1):8-11. doi: 10.1159/000047424. Pubmed PMID: 11125190.
- Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem.* 1996 Jun;29(3):225-9.
- Restrepo M, Bussaneli DG, Jeremias F, Cordeiro RC, Magalhães AC, Palomari Spolidorio DM, Santos-Pinto L. Control of white spot lesion adjacent to orthodontic bracket with use of fluoride varnish or chlorhexidine gel. *ScientificWorldJournal.* 2015;2015:218452. doi: 10.1155/2015/218452. Epub 2015 Apr 20.
- Rodrigues LK, Nobre dos Santos M, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. *J Dent.* 2004 Sep;32(7):531-40. doi: 10.1016/j.jdent.2004.04.004. Pubmed PMID: 15304298.
- Salomão PMA, Comar LP, Buzalaf MAR, Magalhães AC. In situ remineralisation response of different artificial caries-like enamel lesions to home-care and professional fluoride treatments. *BMC Oral Health.* 2016 Jan 8;16:2. doi: 10.1186/s12903-016-0160-9.
- Schiott CR, Loe H, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Periodontal Res.* 1970;5(2):84-9. Pubmed PMID: 4254173.
- Shimizu C, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. Carious change of dentin observed on longspan ultrathin sections. *J Dent Res.* 1981 Nov;60(11):1826-31. doi: 10.1177/00220345810600110101. Pubmed PMID: 6169750.
- Slot DE, Vaandrager NC, Van Loveren C, Van Palenstein Helderma WH, Van der Weijden GA. The effect of chlorhexidine varnish on root caries: a systematic review. *Caries Res.* 2011;45(2):162-73. doi: 10.1159/000327374. Epub 2011 Apr 27. PMID: 21525751.

Sognaes RF, Stern RH. Laser effect on resistance of human dental enamel to demineralization in vitro. *J South Calif State Dent Assoc.* 1965 Aug;33(8):328-9. Pubmed PMID: 14318770.

Stern RH, Sognaes RF, Goodman F. Laser effect on in vitro enamel permeability and solubility. *J Am Dent Assoc.* 1966 Oct;73(4):838-43. Pubmed PMID: 5223452.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007 Feb;52(2):121-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.08.009. Pubmed PMID: 17045563.

Tagomori S, Morioka T. Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. *Caries Res.* 1989;23(4):225-31. Pubmed PMID: 2790854.

Takeda FH, Harashima T, Kimura Y, Matsumoto K. Comparative study about the removal of smear layer by three types of laser devices. *J Clin Laser Med Surg.* 1998 Apr;16(2):117-22. doi: 10.1089/clm.1998.16.117. Pubmed PMID: 9663103.

Tantbirojn D, Feigal RJ, Ko CC, Versluis A. Remineralized dentin lesions induced by glass ionomer demonstrate increased resistance to subsequent acid challenge. *Quintessence Int.* 2006 Apr;37(4):273-81. Pubmed PMID: 16594358.

Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res.* 2010;24 Suppl 1:9-17. Pubmed PMID: 20857070.

Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010 Mar;36(3):475-81. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.034. Pubmed PMID: 20171366.

Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998 Aug;77(8):1622-9. doi: 10.1177/00220345980770081001. Pubmed PMID: 9719036.

Tohda H, Fejerskov O, Yanagisawa T. Transmission electron microscopy of cementum crystals correlated with Ca and F distribution in normal and carious human root surfaces. *J Dent Res.* 1996 Mar;75(3):949-54. doi: 10.1177/00220345960750031301. Pubmed PMID: 8675807.

Tronstad L. Scanning electron microscopy of attrited dentinal surfaces and subadjacent dentin in human teeth. *Scand J Dent Res.* 1973;81(2):112-22. Pubmed PMID: 4513438.

Vahl J, Hoehling HJ, Frank RM. [Electron Diffraction of Rhombohedral Crystals in Carious Dentin]. *Arch Oral Biol.* 1964 May-Jun; 9:315-20. Pubmed PMID: 14170647.

Vidal CM, Tjaderhane L, Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D, Nader HB, et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J Dent Res*. 2014 Mar;93(3):269-74. doi: 10.1177/0022034513516979. Pubmed PMID: 24356440.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 02;92(8):827-39. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D. Pubmed PMID: 12730128.

Walter R, Miguez PA, Arnold RR, PNR Pereira, Duarte WR, Yamauchi M. Effects of natural cross-linkers on the stability of dentin collagen and the inhibition of root caries in vitro. *Caries Res*. 2008 Aug;42(4):263–8. doi: 10.1159/000135671.

Wefel JS, Heilman JR, Jordan TH. Comparisons of in vitro root caries models. *Caries Res*. 1995;29(3):204-9. Pubmed PMID: 7621496.

Whelton H, O'Mullane D. The use of combinations of caries preventive procedures. *J Dent Educ*. 2001 Oct;65(10):1110-3. Pubmed PMID: 11699986.

Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*. 1961 May; 93:440-7.

Yamamoto H, Sato K. Prevention of dental caries by acousto-optically Q-switched Nd: YAG laser irradiation. *J Dent Res*. 1980 Feb;59(2):137. doi: 10.1177/00220345800590020801. Pubmed PMID: 6927995.

Zezell DM, Bachmann L. Estrutura e composição do esmalte e da dentina: tratamento térmico e irradiação com lasers emissores no infravermelho. 1 ed. São Paulo: Editoria Livraria da Física; 2005.

**ANEXO A – Certificado Comitê de Ética**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia



CEUA - Comissão de Ética no  
Uso de Animais

São José dos Campos, 17 de outubro de 2017

Ofício nº 06/2017-CEUA-ICT-SJC-UNESP

O protocolo intitulado "Avaliação do efeito de diferentes agentes sobre a degradação do colágeno e progressão da lesão de cárie radicular: Estudo "in vitro"", de sua responsabilidade tendo como orientador o Prof. Dr. Sergio Eduardo de Paiva Gonçalves, do Departamento de Odontologia deste Instituto, não necessita ser analisado por esta CEUA, devido a pesquisa em tela não envolver a utilização de vertebrados e sim o uso de dentes bovinos, como substrato comercialmente disponível, de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 – Lei "Arouca

Atenciosamente

Prof.ª Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**  
Coordenadora

**ANDREA MASELLI**

Aluna de Pós-Graduação Nível Mestrado do Programa  
De Odontologia Restauradora do ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP  
Do ICT-CSJC-UNESP