

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA COM ÊNFASE EM
ODONTOPEDIATRIA

**Modelos de ciclagem de pH para indução de lesões artificiais de cárie – análise por
microrradiografia transversal.**

DAIANA BACK GOUVEA

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA COM ÊNFASE EM
ODONTOPEDIATRIA

**Modelos de ciclagem de pH para indução de lesões artificiais de cárie – análise por
microrradiografia transversal.**

Linha de Pesquisa

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica com Ênfase em Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Jonas de Almeida Rodrigues

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Gouvea, Daiana Back

Modelos de ciclagem de pH para indução de lesões artificiais de cárie - análise por microrradiografia transversal. / Daiana Back Gouvea. -- 2016.

36 f.

Orientador: Jonas de Almeida Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Cárie Dentária. 2. Técnicas In Vitro. 3. Desmineralização. 4. Remineralização. I. Rodrigues, Jonas de Almeida, orient. II. Título.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Anna Eleanor Roosevelt

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Vorni e Lucia, meus maiores exemplos de que o trabalho honesto dignifica o ser humano e lhe proporciona crescimento.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Vorni Martins Gouvea e Lucia Back Gouvea, por seu amor, seus bons exemplos e sua dedicação para me prover oportunidade de estudo e qualificação profissional.

A Felipe Conzatti Frison, por toda compreensão e companhia.

A meu orientador, Dr. Jonas de Almeida Rodrigues, por confiar no meu trabalho e me proporcionar a construção de um processo de aprendizagem que valoriza o raciocínio e a proatividade na busca pelo conhecimento.

Aos professores da disciplina de Clínica Infanto-Juvenil, Dr. Jonas de Almeida Rodrigues, Dr. Fernando Borba de Araújo, Dra. Márcia Cançado Figueiredo, Dra. Adriela Azevedo de Souza Mariath e Dr. Luciano Casagrande, bem como ao Cirurgião-Dentista Jorge Artur Michel, por todo conhecimento que pude adquirir por meio de estágio docência, aulas teóricas e atendimentos clínicos.

Aos professores da banca examinadora Dr. Rodrigo Alex Arthur, Dra. Thaís Thomé Feldens e Dra. Renata Schlesner de Oliveira por suas contribuições.

Aos queridos colegas de pós-graduação, Nicole Marchioro dos Santos, Caroline Simão Sarti, Claudia Brito Azevedo, Laís Daniela Ev, Luize Severo Martins, Gabriel Ferreira Nicoloso, Gabriela Luiza Hochscheidt e Andrea Fontoura Recchi, pela parceria e amizade que tornaram mais leves os desafios oferecidos pelas disciplinas do programa de pós-graduação. À Nicole Marchioro dos Santos, agradeço ainda por suas contribuições para o experimento apresentado nesta dissertação.

A todos os colegas de pós-graduação da área de Odontopediatria, pela parceria de trabalho.

Aos queridos pacientes que tive o prazer de atender na Faculdade de Odontologia da UFRGS, bem como a suas famílias, agradeço pela confiança em meu trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS (LABIM), pela oportunidade de uso dos equipamentos para realização dessa pesquisa. Aos professores, colegas de pós-graduação e alunos de graduação que executam seus trabalhos no LABIM, agradeço pela acolhida no laboratório, e, em especial, à bióloga Me. Luisa Mercado, pelos ensinamentos sobre técnicas laboratoriais e uso de equipamentos.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pelo uso do equipamento de microrradiografia transversal. Às professoras Dra. Ana Carolina Magalhães e Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, pela acolhida. À biomédica Me. Larissa Grizzo, por todo auxílio quanto ao uso do equipamento.

Ao Laboratório de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da UFRGS (LAMAD) e ao Laboratório de Metalurgia Física da UFRGS (LAMEF), pela oportunidade de uso dos equipamentos.

Aos alunos de iniciação científica, Julia Toniolo, Paulo Mattos, Rafaela Peixoto, Letícia Lunkes e Nicole Sonda por suas contribuições nos trabalhos que tive oportunidade de conduzir.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFRGS, pela oportunidade de realizar mestrado.

À Faculdade de Odontologia da UFRGS, por toda minha formação profissional e acadêmica.

À CAPES, por minha bolsa de estudos.

RESUMO

GOUVEA, Daiana Back. **Modelos *in vitro* para indução de lesões artificiais de cárie – análise por microrradiografia transversal**. 2016. 36f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2016.

O objetivo do estudo foi testar métodos de desenvolvimento de lesões artificiais de cárie não cavitadas em esmalte de dentes humanos, avaliando a capacidade da microrradiografia transversal (TMR) de diferenciar os efeitos de um dentifrício fluoretado e de um não fluoretado, a fim de selecionar modelos para estudos posteriores. A partir de dentes permanentes e decíduos, 20 blocos de esmalte de dentes permanentes e 15 de decíduos foram obtidos e selecionados por meio da microdureza de superfície. Na primeira etapa, amostras de dentes permanentes (n=5) foram submetidas ao modelo 1, que consistiu na indução de lesão pela imersão durante 96h em solução contendo 2,2mM de CaCl₂, 2,2mM de KH₂PO₄, 0,05M de ácido acético, tendo o pH ajustado para 4,4 com 1M de KOH e, após, a ciclos de desmineralização e remineralização (des/re) por 10 dias. Os espécimes de dentes decíduos (n=5) foram imersos durante 96h em solução contendo 2,2 mM CaCl₂, 2,2 mM NaH₂PO₄, 0,05M de ácido acético e 0,25ppmF, sendo o pH ajustado em 4,5 pela adição de 1M KOH e, após, durante 10 dias, a ciclos des/re (modelo 2). Em relação ao modelo 1, houve cavitação das lesões após os ciclos de 10 dias. Já com o modelo 2, no entanto, houve formação de lesões de subsuperfície observadas por microrradiografia transversal (TMR), sem ocorrência de cavitação. Baseado nisso, o modelo 2 foi repetido em amostras de dentes permanentes (n = 5) e lesões de subsuperfície foram obtidas. Com base nesses resultados, na segunda etapa o modelo 2 foi utilizado em amostras de esmalte de dentes permanentes (n=10) e decíduos (n=10); neste momento, porém, metade das amostras foram submetidas a tratamento com dentifrício fluoretado e as demais com dentifrício sem flúor, para observar se o TMR seria capaz de detectar diferença entre tratamentos. O resultado obtido foi a formação de lesões de subsuperfície em dentes permanentes e decíduos e o método foi capaz de diferenciar ambos os tratamentos.

Descritores: cárie dentária, técnicas *in vitro*, desmineralização, remineralização

ABSTRACT

GOUVEA, Daiana Back. **In vitro models to induce artificial caries lesions – transversal microradiography analysis**. 2016. 36f. Final Paper (Master in Dentistry) – Dentistry College, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2016.

The aim of this study was to test methods of development of non-cavitated artificial caries lesions in human teeth enamel, analyzing the ability of transversal microradiography to differentiate the effects of fluoride and non-fluoride dentifrices and select models to posterior experiments. From permanent and deciduous human teeth, 20 enamel blocks of permanent and 15 of deciduous teeth were obtained and selected by surface microhardness. In the first step, samples of permanent teeth (n = 5) were submitted to lesion induction by immersion during 96 hours in solution composed by 2.2mM CaCl₂, 2.2mM KH₂PO₄, 0.05M acetic acid, with pH 4.4 adjusted by 1M KOH, and, after this, to pH cycles of demineralization and remineralization (de/re) during 10 days (model 1). The specimens of deciduous teeth (n = 5) were immersed during 96 hours in solution composed by 2.2 mM CaCl₂, 2.2 mM NaH₂PO₄, 0.05M acetic acid and 0.25ppmF, with pH 4.5 adjusted by 1M KOH and, posterior, during 10 days, to pH cycles (model 2). Concerning the model 1, occurred cavitation of the lesion after the 10 days cycles. Model 2, however, formed subsurface lesions observed by transversal microradiography (TMR), without cavitation of the surface. Based on this result, this model was used to permanent enamel (n = 5), and was able to develop subsurface lesion. In the second step, the model 2 was applied to samples of permanent teeth enamel (n = 10) and deciduous teeth enamel (n = 10); in this moment, nevertheless, half of the samples were submitted to treatment with fluoridated dentifrice and the other with non-fluoridated dentifrice, to observe if the TMR would be able to detect difference between treatments. The result obtained was the induction of subsurface lesions in permanent and deciduous enamel, and the method was able to differentiate the treatments.

KEYWORDS: Dental caries, In vitro techniques, Demineralization, Remineralization

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 6 |
| 3 ARTIGO..... | 7 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 19 |
| REFERÊNCIAS | 20 |
| ANEXO – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética da UFRGS | 25 |

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

A cárie dentária é uma doença biofilme-dieta dependente cujo resultado é a dissolução química localizada da superfície dentária causada por eventos metabólicos ocorridos no biofilme presente nesta superfície. Isso acontece porque bactérias cariogênicas presentes no biofilme dentário são capazes de fermentar carboidratos presentes na dieta, produzindo ácido no biofilme. Esse metabolismo resulta em um desequilíbrio de pH no ambiente bucal que leva à desmineralização do tecido dentário e consequente formação de lesões de cárie. (KIDD, 2005; FEJERSKOV; KIDD, 2008)

A formação e o crescimento constantes do biofilme e consequentes ciclos de desmineralização e remineralização nos tecidos dentários são processos naturais. O impacto disso nas superfícies dentárias pode, no entanto, ser influenciado e o processo metabólico modificado, de maneira que o desenvolvimento e a progressão das lesões de cárie podem ser controlados. Remoção mecânica e modificação química do biofilme, uso de fluoretos, composição da dieta e composição salivar são aspectos que podem influenciar no controle da doença cárie. (FEJERSKOV; KIDD, 2008)

As pesquisas envolvendo a cárie dentária, no entanto, ainda seguem em busca de novas alternativas para controle da doença, inclusive em estágios iniciais. Diante desse contexto de aprimoramento do tratamento precoce, modelos *in vitro* em que lesões artificiais em esmalte são desenvolvidas apresentam importante utilidade para o pesquisador na investigação da eficácia de novos tratamentos. (ITTHAGARUN; KING; RANA, 2007; FAVRETTO et al, 2013; DE CASTRO et al, 2015; VYAYHARE; SHARMA; KULKARNI, 2015; GOPALAKRISHNAN et al, 2016; BRIDI et al, 2016) Modelos experimentais são processos que simulam a realidade relacionada a um fenômeno de interesse e permitem ao pesquisador depreender informações a respeito do mesmo. (PROSKIN, 1992 APUD BUZALAF et al., 2010) Experimentos *in vitro* para o estudo da cárie dentária podem utilizar biofilme ou substâncias inorgânicas para desenvolver lesões artificiais de cárie. Os estudos que utilizam substâncias inorgânicas promovem ciclos de pH que têm por objetivo mimetizar a dinâmica de perda e ganho mineral e mudanças de pH que ocorrem na cavidade oral. (WHITE, 1995)

Desde sua concepção, modelos de ciclos de pH proporcionam conhecimento sobre mecanismos envolvidos no estabelecimento da doença cárie e nas medidas capazes de preveni-la. (WHITE, 1995; TEN CATE, 2015) Modelos *in vitro* apresentam vantagens como alto grau de controle sobre os procedimentos e possibilidade de trabalho com pequeno tamanho amostral. Além disso, permitem avaliar variáveis de resposta de maior sensibilidade que as avaliadas em estudos clínicos, como alterações na densidade mineral ou microdureza do tecido dentário, enquanto que estudos clínicos são baseados em exames visuais-táteis e radiográficos. Esses experimentos são de particular préstimo para testar de forma rápida e pouco custosa novos produtos odontológicos, gerando hipóteses para futuros estudos clínicos. (BUZALAF et al., 2010)

Metodologias *in vitro*, no entanto, também apresentam desvantagens, tais como dificuldade em mimetizar o contato da saliva ou do fluido do biofilme com os tecidos dentais duros, uma vez que na cavidade oral as superfícies são banhadas por saliva em diferentes volumes e composições; menor tempo em que ocorrem os processos de desmineralização e remineralização nos modelos *in vitro* em relação aos mesmos na cavidade oral; utilização de substâncias compostas apenas por íons inorgânicos, de maneira que efeitos advindos da ação de componentes salivares, película adquirida e biofilme são desconsiderados; e, por fim, dificuldade em simular adequadamente o uso tópico dos produtos fluoretados – por mais que os produtos sejam aplicados diluídos em água deionizada ou saliva, modelos laboratoriais tendem a superestimar a reatividade do flúor com o tecido dentário. Modelos *in vitro*, portanto, são limitados em reproduzir completamente o ambiente bucal, mesmo que sejam usados sistemas de boca artificial, biofilme ou saliva humana. (TEN CATE, 1990; WHITE, 1995; BUZALAF et al., 2010)

Especificamente em relação aos ensaios envolvendo ciclos de pH, podemos classificá-los em modelos de remineralização (ou reversão) e modelos de desmineralização (ou progressão). Com a aplicação de modelos de reversão, objetiva-se analisar o ganho de mineral obtido por meio de tratamento com produtos fluoretados. Ao lançar mão de modelo de progressão, por sua vez, deseja-se verificar a redução na perda mineral que o tratamento empregado é capaz de induzir. Outra importante diferença entre essas classificações de modelos diz respeito ao substrato empregado – nos estudos de reversão, usualmente os substratos utilizados são tecidos dentais duros

apresentando lesões artificiais de cárie, enquanto que nos de progressão podem ser empregados tanto tecidos hígidos quanto tecidos que apresentam lesões artificiais de cárie. (WHITE, 1995)

Lesões artificiais de cárie presentes no substrato que será submetido a ciclagem de pH geralmente são produzidas por imersão da amostra em soluções ou géis subsaturados em relação à apatita do tecido dentário, com pH entre 4,4 e 5, por tempo que varia entre 16 horas e 28 dias. Diferentes modelos levam a formação de lesões de características distintas: um aspecto importante a ser observado ao eleger um modelo de indução de lesão artificial de cárie é se o método desenvolve lesões caracterizadas como lesões artificiais erosivas, também conhecidas como *erosion-like lesions*, ou lesões artificiais de subsuperfície, chamadas *caries-like lesions*. (BUZALAF et al., 2010) É desejável que modelos de cárie artificial sejam capazes de desenvolver lesões de subsuperfície, que mais se assemelham às lesões naturais de cárie. Fatores importantes para a preservação da camada superficial da lesão envolvem o grau de saturação da solução em relação à hidroxiapatita, a presença de fosfato e flúor na solução, bem como a agitação da mesma, uma vez que esta eleva o risco de dissolução da superfície. (LARSEN, 1974; THEUNS et al., 1984; BUZALAF et al., 2010)

Outro critério importante a ser observado ao eleger um modelo *in vitro* de ciclo de pH é a distribuição mineral da lesão formada. Lesões de baixo valor R (R = perda mineral integrada/profundidade) são mais semelhantes fisiologicamente a lesões naturais, já lesões de alto valor R proporcionam melhor diferenciação entre diferentes tratamentos. (LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007) Dessa maneira, modelos capazes de induzir lesões de alto valor R são métodos de eleição quando o estudo almeja distinguir a eficácia de tratamentos.

Em relação aos critérios de avaliação de perda mineral utilizados nos estudos *in vitro* envolvendo ciclos de pH, a microrradiografia transversal (TMR) é considerada padrão-ouro. (BUZALAF et al., 2010) Essa técnica é capaz de prover ao pesquisador dados como profundidade da lesão, espessura da camada de superfície, perda mineral integrada e perda mineral de acordo com a profundidade de lesão. A microdureza transversal é outro método que, por meio de cálculos, é capaz de estimar a perda mineral ocorrida na lesão artificial. Apesar de boa correlação entre resultados analisados por microrradiografia transversal e microdureza, essa metodologia avalia propriedades

físicas diferentes daquelas avaliadas pela microrradiografia transversal, uma vez que detecta a resiliência do tecido dentário, alterada por meio de perda e ganho mineral. (FEATHERSTONE et al., 1983; BUZALAF et al., 2010)

No que se refere ao substrato utilizado em estudos *in vitro* sobre controle de lesão de cárie, usualmente é empregado esmalte de dentes bovinos. Dentes bovinos trazem como vantagem maior área de superfície para manipulação - o que possibilita o preparo de amostras de espessura de esmalte mais uniforme. Além disso, há maior facilidade de obtenção em relação a dentes humanos. Lesões artificiais de cárie em esmalte bovino, no entanto, apresentam maior e mais rápida desmineralização – condição que pode ser atribuída à maior porosidade do esmalte bovino, permitindo mais rápida difusão de íons para a área desmineralizada, maior conteúdo de carbonato e diferente arranjo prismático. (LIPPERT; BUTLER; LYNCH, 2013; LIPPERT; LYNCH, 2014; LIPPERT; JUTHANI, 2015)

Observada a facilidade de obtenção de dentes bovinos para emprego na pesquisa, a maioria dos modelos de ciclo de pH foram desenvolvidos para esse substrato (PAGE, 1991; TEN CATE, 1993; TEN CATE; BUIJS; DAMEN, 1995; MAIA; SOUZA, CURY, 2003; HONG; JEONG; SONG, 2005; BRIGHENTI et al, 2006; TEN CATE; EXTERKATE; BUIJS, 2006; ALVES et al, 2007; JOINER et al, 2008; QUEIROZ et al, 2008; FRAVETTO et al, 2013; DE CASTRO et al, 2015; WIERICHS et al, 2016). Existe também grande quantidade de modelos para dentes humanos permanentes (FEATHERSTONE et al, 1988; NELSON et al, 1992; HICKS; FLAITSZ, 2000; ITTHAGARUN; WEI; WEFEL, 2000; TORRADO et al, 2004; RODRIGUES et al, 2005; CASALS et al, 2007; RANA; ITTHAGARUN, KING, 2007; STAINER-OLIVEIRA et al 2008; TODA; FEATHERSTONE, 2008; GOPALAKRISHNAN et al, 2016; BRIDI et al, 2016), mas quando buscamos por modelos para dentes humanos decíduos (ITTHAGARUN; KING; RANA, 2007; THAVEESANGPANICH et al, 2005a; THAVEESANGPANICH et al, 2005b), estes se demonstram mais escassos devido à dificuldade de obtenção dos mesmos, aliada à pequena área de superfície que contribui para maior dificuldade técnica na execução do experimento. (BUZALAF et al., 2010). Diante disso, a importância deste trabalho consiste no estabelecimento de metodologias de desenvolvimento de cárie artificial em dentes humanos para posterior

emprego em estudos que almejem o aprimoramento do controle da cárie dentária em seus estágios iniciais.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi testar modelos de ciclagem de pH para dentes humanos permanentes e decíduos para o desenvolvimento de lesões artificiais de cárie de subsuperfície, comparando o efeito obtido na progressão de cárie a partir do uso de dentifrício fluoretado e dentifrício não fluoretado, a fim de avaliar a efetividade da microrradiografia transversal (TMR) como instrumento de caracterização das lesões e avaliação de perda mineral.

3 ARTIGO

Caries-like lesions in enamel from permanent and deciduous teeth induced by different pH-cycling solutions – a TMR analysis.

Gouvea DB, dos Santos NM, Rodrigues JA

Corresponding author:
Prof. Dr. Jonas de Almeida Rodrigues
Ramiro Barcelos 2492
Porto Alegre-RS, Brazil
jorodrigues@ufrgs.br

This paper is according to Journal of Applied Oral Science instructions for submission.

ABSTRACT

The aim of this in vitro study was to test methods for development of non-cavitated artificial caries lesions in human teeth enamel, in order to establish models for posterior experiments. From permanent and deciduous human teeth, 20 enamel blocks of permanent and 15 of deciduous teeth were obtained and selected by surface microhardness. In the first step, samples of permanent teeth (n = 5) were submitted to lesion induction by immersion during 96 hours in solution composed by 2.2mM CaCl₂, 2.2mM KH₂PO₄, 0.05M acetic acid, with pH 4.4 adjusted by 1M KOH, and, after this, to pH cycles of demineralization and remineralization (de/re) during 10 days (model 1). Specimens of deciduous teeth (n = 5) were immersed during 96 hours in solution composed by 2.2 mM CaCl₂, 2.2 mM NaH₂PO₄, 0.05M acetic acid and 0.25ppmF, with pH 4.5 adjusted by 1M KOH and, posterior, during 10 days, to a cycles de/re (model 2). Model 1 produced cavitated lesions after 10 days-cycles. Model 2, however, produced subsurface lesions observed by transversal microrradiography (TMR), without surface cavitation. Therefore, model 2 was repeated for permanent enamel (n = 5), and subsurface lesions could be observed. In the second step, the model 2 was also applied to samples of permanent teeth enamel (n = 10) and deciduous teeth enamel (n = 10); in this moment, nevertheless, half of the samples were submitted to treatment with fluoridated dentifrice and the other with non-fluoridated dentifrice, to observe if the TMR would be able to detect difference between treatments. The result

obtained was the induction of subsurface lesions in permanent and deciduous enamel, and the method was able to differentiate the treatments.

KEYWORDS: Dental caries, In vitro techniques, Remineralization, Demineralization

INTRODUCTION

Models based on pH-cycling to mimic acid challenges of oral environment have provided knowledge about the establishment of dental caries and prevention methods.^{14,20} Several methodologies are described in the literature explaining different ways to develop artificial caries lesions. Different models, however, induce lesions with distinct characteristics. A relevant aspect in the choice of a caries induction model concerns the formation of a subsurface lesion, structure observed in natural caries lesions, but which is not artificially mimicked by many of the pH-cycling models, ending up in induction of surface softened lesions – also called erosion-like lesions.¹

Regarding the substrate used on *in vitro* experiments, most of studies used bovine teeth as specimens. This is reasonable taking into account the advantages of using this substrate like ease of obtaining, similarity to human tooth and greater surface area that allows the preparation of samples with a more uniform enamel thickness. It is already known, nevertheless, differences between human and bovine teeth related to porosity, carbonate content and prisms arrangement, which can explain the greater and faster demineralization observed in artificial caries lesions in bovine enamel compared with human enamel.^{7,8,9} Considering these peculiarities, experiments employing human teeth as substrate are important, but models to develop artificial caries lesions in human permanent and deciduous teeth are scarcer than methods to bovine substrate, especially to deciduous because of the difficult to obtaining and the small surface area for handling.

Concerning the mineral loss evaluation criteria used on *in vitro* studies, the transversal microradiography (TMR) is considered the gold-standard.¹ This technique is able to provide data about lesion depth, thickness of surface layer, integrated mineral loss (ΔZ) and mineral loss according to lesion depth (R). Transverse microhardness is another method that, by means of calculations, is able to estimate the mineral loss in the artificial lesion. This methodology, however, evaluates different physical properties

from those evaluated by TMR², since it detects the resilience of dental tissue, which is altered by mineral loss and gain.¹

Based on the need of studies that use human teeth as substrate and development of lesions with characteristics of natural caries lesions, the aim of this study was to test two pH-cycling models^{5,12,15} and the efficacy of TMR as evaluation instrument of mineral loss.

MATERIAL AND METHODS

Ethics

This study was approved by Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CAAE 53508216.0.0000.5347).

Step 1

Experimental Design

Enamel blocks from permanent (4mm x 4mm, n = 5) and deciduous teeth (3mm x 3mm, n = 5) were obtained and had their surface sequentially polished with 320, 600, 1200, 2000 and 4000 grit sandpapers and felt disc with diamond paste, which allowed the selection by initial surface hardness (knoop indenter, 25g load for 10s). Samples of permanent enamel showed an average surface microhardness of 346.6 (± 8.6) and samples of deciduous enamel of 355.7 (± 17.9).

A third of each enamel surface was covered by nail polish and the specimens were immersed in demineralising solution during 96 hours to develop initial artificial carious lesions. After this period, the samples had another third covered by nail polish to preserve part of the initial lesion in order to observe differences in the characteristics between progressed lesion and initial lesion. The specimens were, then, submitted to pH-cycling during 10 days. After this step, the samples were analyzed by TMR to verify the subsurface characteristic.

Methods of pH cycles

The blocks were submitted to pH-cycling during 10 days. Each pH cycle consisted into three hours of demineralization twice a day with two hours of remineralization between then, using a shaker. During the night the samples were immersed into remineralising solution. Fresh solutions were used at each cycle step. Different solutions were used for permanent (model 1) and deciduous enamel (model 2). For permanent enamel, demineralising solution was composed by 2.2mM CaCl₂, 2.2mM KH₂PO₄, 0.05M acetic acid, with pH 4.4 adjusted with 1M de KOH. The remineralising solution, on the other hand, contained 1.5mM CaCl₂, 0.9mM NaH₂PO₄, 0.15MKCl, and pH 7 adjusted with 1M KOH.^{5,12} For deciduous enamel, demineralising solution was composed by 2.2 mM CaCl₂, 2.2 mM NaH₂PO₄, 0.05 M acetic acid and 0.25ppmF - pH was adjusted with 1M KOH in 4.5. The remineralising solution contained 1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM NaH₂PO₄, 0.15M KCl and 0.25ppmF, with pH 7, adjusted by 1M KOH.¹⁵

Transverse microradiography analysis (TMR)

Specimens of deciduous teeth were transversely sectioned and hand polished until sections of an approximate thickness of 100µm have been obtained. The samples were fixed in a sample-holder with an aluminum calibration step wedge with 11 steps. The microradiography was taken using an x-ray generator (Softex, Tokyo, Japan) on a glass plate at 20 kV and 20 mA, for 20 minutes at a distance of 42 cm. The glass plate was developed during 5 minutes, rinsed in deionized water, fixed for 3 minutes in a dark room, and so rinsed in running water during 10 minutes and air-dried. The plate was, then, analyzed using a transmitted light microscope fitted with a 20x objective (Zeiss, Germany), a CCD camera (Canon, Japan), and a computer. Two photographs per specimen were taken using data-acquisition (version 2012) - initial and progressed lesions - and their surface characteristics were qualitatively analyzed using calculation software (version 2013) from Inspektor Research System bv (Amsterdam, The Netherlands).¹³ Macroscopical analysis showed that permanent teeth which underwent model 1 had their enamel surface cavitated. Therefore, model 2 was used to additional permanent enamel specimens (n=5) as described for deciduous teeth. These selected blocks showed an average surface microhardness of 344.8 (±39).

Step 2

Experimental Design

Enamel blocks from permanent (n = 10) and deciduous teeth (n = 10) were obtained and had their surface sequentially polished, which allowed the selection by initial surface hardness. Samples of permanent enamel showed an average surface hardness of 411.3 (± 22.05) and samples of deciduous enamel of 362.1 (± 28.3).

These specimens were randomly divided into 2 treatment groups: non-fluoride containing toothpaste (Curaprox Enzycal Zero) (n = 5 permanent and 5 deciduous enamel blocks) and fluoride-containing toothpaste with 1450 ppm F (Curaprox Enzycal 1450) (n = 5 permanent and 5 deciduous enamel blocks). A third of the enamel surface of each block was covered by nail polish and the specimens were immersed in demineralising solution (model 2) during 96 hours to induce initial artificial carious lesion. After this period, the samples had another third covered by nail polish to preserve part of the initial lesion in order to compare the mineral loss between progressed and initial lesion. The specimens were, then, submitted to pH cycles during 10 days (model 2) and treatment with slurry during 60 seconds twice a day, at the beginning and at the end of each day. After this step, integrated mineral loss was measured by TMR.

Transverse microradiography analysis (TMR)

The preparation of specimens and acquisition of TMR images were performed as described in step 1.

The mineral content was calculated assuming the density of the mineral to be 3.15 kg l^{-1} and 87 vol% of mineral content for the sound enamel.¹³ The integrated mineral loss (ΔZ) was calculated for initial and the progressed lesions. Treatments were then compared by calculating differences between $\Delta Z_{\text{progression}}$ and $\Delta Z_{\text{initial}}$.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 software, assuming a significance level of 5%. Variables were tested about the normality by Kolmogorov-

Smirnov's test and about homoscedasticity by Levene's test. Besides, groups were compared using independent samples t-test and paired samples t-test.

RESULTS

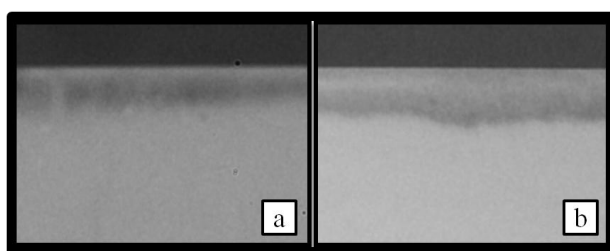
Step 1

Subsurface lesion development

Concerning the characteristic of the lesions, model 1, used to permanent enamel, was not able to induce subsurface lesions because led the samples to cavitation. However, model 2 did develop initial subsurface lesions in deciduous enamel observed by TMR (Figure 1.a).

Subsequently, regarding further pH-cycling using permanent teeth and model 2, induction of initial subsurface lesions observed by TMR (Figure 1.b).

Figure 1 – Subsurface lesion in deciduous and permanent enamel



a – Artificial subsurface lesion in deciduous enamel. **b** – Artificial subsurface lesion in permanent enamel.

Step 2

Subsurface characteristics, depth and mineral distribution (R)

Concerning lesion characteristics, model 2 induced initial subsurface lesions of an average depth of 88.4 μm (± 14.3) in permanent and 89.3 μm (± 15.8) in deciduous teeth. After pH-cycling the lesions retained the subsurface pattern, and the average depth was 136.4 μm (± 29.9) and 136.7 μm (± 35.6), respectively (Table 1). For both permanent and deciduous samples, groups treated with fluoridated or non-fluoridated dentifrices differed statistically regarding the progression of lesion depth observed after

pH-cycling (Table 1). Groups treated with non-fluoridated dentifrice presented a statistically significant increase in lesion depth (Table 1). Subsurface pattern of lesions in permanent enamel is observed in Figure 2 and in deciduous enamel in Figure 3.

Regarding the mineral distribution of the lesion expressed by R values (ΔZ /lesion depth), permanent teeth showed an average R value of 37.4 (\pm SD5.7) and deciduous of 30.1 (\pm SD11.8). These are considered high-R values¹⁰.

Table 1 – Initial and progressed lesion depths for deciduous and permanent teeth after treatments assessed by TMR

| Group | Mean lesion depth ($\mu\text{m}\pm\text{SD}$) | | Mean depth increasing ($\mu\text{m}\pm\text{SD}$) |
|----------------------|---|-----------------------------------|---|
| | Initial lesion (96 hours) | Progressed lesion (10 days) | |
| Permanent | 88.4 (14.3) | 136.4 (29.9) | |
| Permanent 0 ppm F | 78.9 (7.5) [#] | 152.2 (22.5) [#] | 73.3 (17.4)* |
| Permanent 1450 ppm F | 97.9 (13.3) ^{&} | 120.5 (29.6) ^{&} | 22.6 (40.9)* |
| Deciduous | 89.3 (15.8) | 136.7 (35.6) | |
| Deciduous 0 ppm F | 90.6 (3.6) ^{##} | 166.1 (35.9) ^{##} | 39.0 (19.5)** |
| Deciduous 1450 ppm F | 88.3 (22.1) ^{&&} | 113.1 (2.6) ^{&&} | 21.9 (9.7)** |

* Independence samples T Test ($p = 0,034$)

** Independence samples T Test ($p = 0,042$)

[#] Paired samples T Test ($p = 0,001$)

^{##} Paired samples T Test ($p = 0,030$)

[&] Paired samples T Test ($p = 0,284$)

^{&&} Paired samples T Test ($p = 0,064$)

Integrated mineral loss (ΔZ)

Average integrated mineral loss in the initial lesions ($\Delta Z_{initial}$) for deciduous teeth was 2690 (\pm SD1162.4) and for permanent teeth was 3311 (\pm SD737.3). Regarding the difference between $\Delta Z_{initial}$ and $\Delta Z_{progression}$, groups treated with 1450 ppm F presented lower integrated mineral loss, statistically significant different for permanent ($p = 0.009$) and deciduous teeth ($p = 0.000$). Groups treated with non-fluoridated dentifrice presented statistically significant increasing in mineral loss. Data concerning integrated mineral loss are presented in Table 2.

Table 2 – Integrated mineral loss for deciduous and permanent teeth after treatments assessed by TMR

| Group | ΔZ | | $\Delta Z_{\text{initial}} - \Delta Z_{\text{progression}}$ |
|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|
| | Initial lesion | Progressed lesion | |
| Permanent | 3311 (737.3) | 4939 (1325) | -1628 (1742.8) |
| Permanent 0 ppm F | 2710 (504.5) [#] | 5706 (694.2) [#] | -2996 (490.7) [*] |
| Permanent 1450 ppm F | 3912 (256.7) ^{&} | 4172 (1413.3) ^{&} | -260 (1383.7) [*] |
| Deciduous | 2690 (1162.4) | 4152.2 (2634.5) | -1462.2 (1825.3) |
| Deciduous 0 ppm F | 3375 (1469.2) ^{##} | 6685 (1584.9) ^{##} | -3310 (682.4) ^{**} |
| Deciduous 1450 ppm F | 2142 (488.7) ^{&&} | 2126 (671.2) ^{&&} | 16 (410.5) ^{**} |

* Independence samples T Test (p = 0,009)

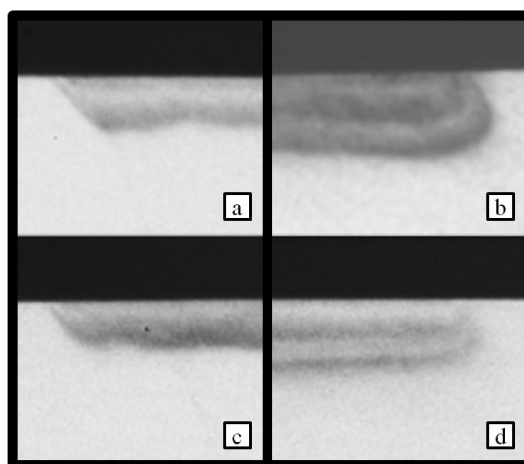
** Independence samples T Test (p = 0,000)

[#] Paired samples T Test (p = 0,000)

^{##} Paired samples T Test (p = 0,002)

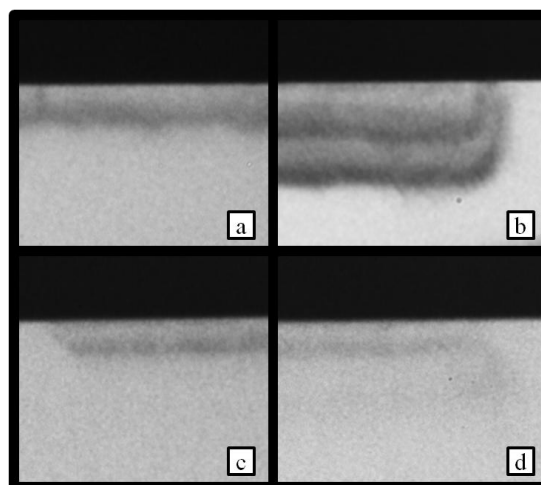
[&] Paired samples T Test (p = 0,696)

^{&&} Paired samples T Test (p = 0,935)

Figure 2 – Subsurface lesions in permanent human enamel samples

a – Initial caries lesion in permanent enamel. **b** – Sample observed in image “a” after 10 days of pH-cycling and treatment with non-fluoridated dentifrice. **c** – Initial caries lesion in permanent enamel. **d** – Sample observed in image “c” after 10 days of pH-cycling and treatment with fluoridated dentifrice.

Figure 3 – Subsurface lesions in deciduous human enamel samples



a – Initial caries lesion in deciduous enamel. **b** – Sample observed in image “a” after 10 days of pH-cycling and treatment with non-fluoridated dentifrice. **c** – Initial caries lesion in deciduous enamel. **d** – Sample observed in image “c” after 10 days of pH-cycling and treatment with fluoridated dentifrice.

DISCUSSION

This study tested two different models for artificial caries lesions development. Model 1 presented not satisfactory results because cavitation of surface occurred. Model 2, on the other hand, induced subsurface lesions, with high-R values and power to detect differences between treatments. Both methodologies^{5,15} were elected to be tested because of cost benefit and previous usage of TMR for mineral content evaluation.

Some previous studies showed good results after model 1 have been used to assess the efficacy of fluoridated products.^{5,12} In the present experiment, however, dissolution of surface was observed. These controversial results could be explained by different orbital shaker used in the study, since agitation is known to influence in the surface dissolution.¹ The absence of fluoride in the pH-cycling model solutions, nevertheless, is an aspect that also interferes with this dissolution, and models that apply demineralising and remineralising solutions containing fluoride are preferable.^{1,6,17}

Model 2, firstly published by Thaveesangpanich, et al.¹⁵ (2005), is a modification from a previous model,⁴ which is not recommended for deciduous enamel during a period longer than 7 days, because surface dissolution could be observed.¹⁶ The

modification of this model consisted in the addition of 0,25 ppm F in both demineralising and remineralising solutions to permit a pH-cycling experimental period of 10 days.¹⁵ Presence of fluoride in pH cycles solutions is already known to influence the time of experimental period.³ The increasing in experimental time is desirable because one of pointed limitations of in vitro studies related to dental caries is the greater speed of establishment of artificial caries lesions when compared with the natural process.

Due to good results achieved by using model 2 to deciduous enamel, this model was used for permanent enamel. The idea of applying a method that uses a fluoride-containing solution seemed proper, because a positive influence of fluoride content of solutions on the preservation of the lesion surface have been already reported.^{6,17} Beside, the use of the same model to permanent and deciduous enamel facilitates comparison of the results and makes easier to perform experimental periods in studies involving permanent and deciduous enamel.

Model 2 resulted in the development of subsurface lesions with high R values both in permanent and deciduous enamel. Lesions with high R values are reported to be appropriate to assess differences between treatments, because they are more responsive to differences in remineralising solutions.¹⁰ A non-fluoridated dentifrice and a dentifrice with 1450 ppm F were chosen because the efficacy of dentifrices with this latter fluoride concentration on inhibit demineralization and induce remineralization is well described in literature^{11,18,19} and the inability of the method in showing this difference would contraindicates the use of this pH-cycling model to be evaluated by TMR. The use of model 2, however, was compatible with the use of TMR as instrument to evaluate mineral loss, because groups treated with fluoridated dentifrice presented reduced mineral loss compared with groups treated without fluoride ($p < 0,05$).

CONCLUSION

From these results it can be concluded that model 2 is appropriate to study efficacy of fluoridated products on caries control for both permanent and deciduous teeth. This model was able to induce subsurface artificial caries lesion with high-R value, and is suitable to be applied in studies whose mineral loss measurement is performed by TMR.

REFERENCES

1. 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;18(4):316-34.
2. Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res.* 1983;17(5):385-91.
3. Gibbs CD, Atherton SE, Huntington E, Lynch RJ, Duckworth RM. Effect of low levels of fluoride on calcium uptake by demineralized human enamel. *Arch Oral Biol.* 1995;40(9):879-81.
4. Itthagarun A, Wei SHY, Wefel JS. The effect of different commercial dentifrices on enamel lesion progression: an in vitro pH-cycling study. *Inter Dent J.* 2000;50(1):21-8.
5. Kumar VLN, Itthagarun A, King NM. The effect of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. *Austr Dent J.* 2008;53(1):34-40.
6. Larsen JM. Chemically induced in vitro lesions in dental enamel. *Scand J Dent Res.* 1974;82(7):496-509.
7. Lippert F, Butler A, Lynch RJM. Characteristics of Methylcellulose Acid Gel Lesions Created in Human and Bovine Enamel. *Caries Res.* 2013;47(1):50-5.
8. Lippert F, Juthani K. Fluoride dose-response of human and bovine enamel artificial caries lesions under pH-cycling conditions. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):1947-54.
9. Lippert F, Lynch RJM. Comparison of Knoop and Vickers Surface Microhardness and Transverse Microradiography for the Study of Early Caries Lesion Formation in Human and Bovine Enamel. *Archives of Oral Biology.* 2014;59(7):704-10.
10. Lynch RJM, Mony U, ten Cate JM. Effect of Lesion Characteristics and Mineralising Solution Type on Enamel Remineralisation in vitro. *Caries Res.* 2007;41(4):257-62.
11. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;1.
12. Rana R, Itthagarun A, King NM. Effects of dentifrices on artificial caries like lesions: an in vitro Ph cycling study. *Inter Dent J.* 2007(4);57:243-8.

13. Salomão PM, Comar LP, Buzalaf MA, Magalhães AC. In situ remineralisation response of different artificial caries-like enamel lesions to home-care and professional fluoride treatments. *BMC Oral Health*. 2016;16(2):1-9.
14. ten Cate JM. Models and Role Models. *Caries Research*. 2015;49:3-10.
15. Thaveesangpanich P, Itthagarun A, King NM, Wefel JS. The effects of child formula toothpastes on enamel caries using two in vitro pH-cycling models. *Inter Dent J*. 2005;55(4):217-23.
16. Thaveesangpanich P, Itthagarun A, King NM, Wefel JS, Tay FR. In vitro model for evaluating the effect of child formula toothpastes on artificial caries in primary dentition enamel. *Am J Dent*. 2005;18(3):212-6.
17. Theuns HM, van Dijk JW, Driessens FC, Groeneveld A. The Influence of the Composition of Demineralizing Buffers on the Surface Layers of Artificial Carious Lesions. *Caries Res*. 1984;18(6):509-18.
18. Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H, Holm AK, Källestål C, Lagerlöf F, et al. Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontol Scand*. 2003;61(6):347-55.
19. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;1.
20. White DJ. The application of in vitro models to research on demiralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res*. 1995;9(3):175-93.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho abordou técnicas laboratoriais para desenvolvimento de lesões artificiais de cárie dentária utilizando a microrradiografia transversal como método de avaliação de características das lesões e de perda mineral. Por meio deste trabalho, conclui-se que o modelo proposto por Thaveesangpanich, P., et al. (2005) é adequado, não só para estudos que envolvem esmalte de dentes decíduos humanos – conforme proposto originalmente pelos autores –, mas também para esmalte de dentes permanentes.

Em relação à aplicação deste trabalho, o mesmo produziu um conhecimento cuja aplicabilidade se dá na utilização destas informações em estudos laboratoriais posteriores. Diante disso, o saber construído pelo experimento relatado tem ampla aplicabilidade futura em estudos que objetivam testar novos produtos fluoretados para o controle da doença cárie.

REFERÊNCIAS

ALVES, K. M. et al. *In vitro* evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res*, v. 41, p. 263-267, 2007.

BRIDI, E. C. et al. Inhibition of demineralization around the enamel dentin restoration interface after dentin pretreatment with TiF_4 and self etching adhesive systems. *Clin Oral Investig*, v. 20, no. 4, p.857-863, 2016.

BRIGHENTI, F. L. et al. *In vitro* evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res*, v. 40, p.239-244, 2006.

BUZALAF, M. A. R. et al. pH-cycling models for *in vitro* evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci*, v. 18, no. 4, p. 316-34, 2010.

CASALS, E. et al. Anticaries potential of commercial dentifrices as determined by fluoridation and remineralization efficiency. *J Contemp Dent Pract*, v.8, p. 1-10, 2007.

DE CASTRO, L. P. et al. *In vitro* effect of sodium trimetaphosphate additives to conventional toothpastes on enamel demineralization. *Clin Oral Investig*, v. 19, no. 7, p. 1683-1687, 2015.

FEATHERSTONE, J. D. B. et al. Comparison of Artificial Caries-Like Lesions by Quantitative Microradiography and Microhardness Profiles. *Caries Res*, v. 17, no. 5, p. 385-391, 1983.

FEATHERSTONE, J. D. et al. Effect of an anticalculus dentifrice on lesion progression under pH cycling conditions *in vitro*. *Caries Res*, v. 22, p. 337-341.

FERJERSKOV, O.; KIDD, E. **Dental Caries: the Disease and its Clinical Management**. 2 ed. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008.

FAVRETTO, C. O. et al. *In vitro* evaluation of the effect of mouthrinse with trimetaphosphate on enamel demineralization. *Caries Res*, v. 47, no. 5, p. 532-538, 2013.

GIBBS, C. D. et al. Effect of low levels of fluoride on calcium uptake by demineralized human enamel. *Arch Oral Biol*, v. 40, no. 9, p. 879-881, 1995.

GOPALAKRISHNAN, V. et al. Remineralizing potential of CPP-ACP applied for 1 min *in vitro*. *Eur Arch Paediatr Dent*, v. 17, no. 4, p. 231-237, 2016.

HICKS, M. J.; FLAITZ, C. M. Enamel caries formation and lesion progression with a fluoride dentifrice and a calcium-phosphate containing fluoride dentifrice: a polarized light microscopic study. *ASDC J Dent Child*, v. 67, p. 21-28, 2000.

HONG, S. J.; JEONG, S. S.; SONG, K. B. Effects of sanguinaria in fluoridecontaining dentifrices on the remineralisation of subsurface carious lesion *in vitro*. *Int Dent J*, v. 55, p. 128-132, 2005.

ITTHAGARUN, A.; WEI, S. H. Y.; WEFEL, J. S. The effect of different commercial dentifrices on enamel lesion progression: an *in vitro* pH-cycling study. *Inter Dent J*, v. 50, no. 1, p. 21-28, 2000.

ITTHAGARUN, A.; KING, N. M.; RANA, R. Effects of child formula dentifrices on artificial caries like lesions using *in vitro* pH-cycling: preliminary results. *Int Dent J*, v. 57, no. 3, p. 307-313, 2007.

JOINER, A. et al. *In vitro* cleaning, abrasion and fluoride efficacy of a new silica based whitening toothpaste containing blue covarine. *J Dent*, v. 36, p. S32-37, 2008.

KIDD, E. **Essentials of Dental Caries**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 2005.

KUMAR, V. L. N.; ITTHAGARUN, A.; KING, N. M. The effect of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an *in vitro* study. *Austr Dent J*, v. 53, no. 1, p. 34-40, 2008.

LARSEN, J. M. Chemically induced *in vitro* lesions in dental enamel. *Scand J Dent Res*, v. 82, no.7, p. 496-509, 1974.

LIPPERT, F.; BUTLER, A.; LYNCH, R. J. M. Characteristics of Methylcellulose Acid Gel Lesions Created in Human and Bovine Enamel. *Caries Res*, v. 47, no. 1, p. 50-55, 2013.

LIPPERT, F.; JUTHANI, K. Fluoride dose-response of human and bovine enamel artificial caries lesions under pH-cycling conditions. *Clin Oral Investig*, v. 19, no. 8, p. 1947-54, 2015.

LIPPERT F.; LYNCH, R. J. M. Comparison of Knoop and Vickers Surface Microhardness and Transverse Microradiography for the Study of Early Caries Lesion Formation in Human and Bovine Enamel. *Arch Oral Biol*, v. 59, no. 7, p. 704-710, 2014.

LYNCH, R. J. M.; MONY, U.; TEN CATE, J. M. Effect of Lesion Characteristics and Mineralising Solution Type on Enamel Remineralisation *in vitro*. *Caries Res*, v. 41, no. 4, p. 257-262, 2007.

MAIA, L. C.; SOUZA, I. P.; CURY, J. A. Effect of a combination of fluoride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluoride uptake *in vitro*. *Eur J Oral Sci*, V. 111, P. 68-72, 2003.

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

NELSON, D. G. et al. High resolution fluoride profiles of artificial *in vitro* lesions treated with fluoride dentifrices and mouthrinses during pH cycling conditions. *Caries Res*, v. 26, p. 254-262, 1992.

PAGE, D. J. A study of the effect of fluoride delivered from solution and dentifrices on enamel demineralization. *Caries Res*, v. 25, p. 251-255, 1991.

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

RANA, R.; ITTHAGARUN, A.; KING, N. M. Effects of dentifrices on artificial caries like lesions: an *in vitro* Ph cycling study. *Inter Dent J*, v. 57, no. 4, p. 243-248, 2007.

RODRIGUES, J. A. et al. Visual evaluation of *in vitro* cariostatic effect of restorative materials associated with dentifrices. *Braz Dent J*, v. 16, p. 112-118, 2005.

SALOMÃO, P. M. et al. *In situ* remineralisation response of different artificial caries-like enamel lesions to home-care and professional fluoride treatments. *BMC Oral Health*, v. 16, no. 2, p. 1-9, 2016.

STEINER-OLIVEIRA, C. et al. Effect of the CO₂ laser combined with fluoridated products on the inhibition of enamel demineralization. *J Contemp Dent Pract*, v. 9, p. 113-121, 2008.

TEN CATE, J. M. *In vitro* Studies on the Effects of Fluoride on De- and Remineralization. *J Dent Res*, v. 69, p. 614-619, 1990.

TEN CATE, J. M. The caries preventive effect of a fluoride dentifrice containing Triclosan and zinc citrate, a compilation of *in vitro* and *in situ* studies. *Int Dent J*, v. 43, p. 407-413, 1993.

TEN CATE, J. M. Models and Role Models. *Caries Res*, v. 49, p. 3-10, 2015.

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

TEN CATE, J. M.; EXTERKATE, R.A.; BUIJS, M.J. The relative efficacy of fluoride toothpastes assessed with pH cycling. *Caries Res*, v. 40, p. 136-141, 2006.

THAVEESANGPANICH, P. et al. The effects of child formula toothpastes on enamel caries using two *in vitro* pH-cycling models. *Inter Dent J*, v. 55, no. 4, p. 217-223, 2005.

THAVEESANGPANICH, P. et al. *In vitro* model for evaluating the effect of child formula toothpastes on artificial caries in primary dentition enamel. *Am J Dent*, v. 18, no. 3, p. 212-216, 2005.

THEUNS, H. M. et al. The Influence of the Composition of Demineralizing Buffers on the Surface Layers of Artificial Carious Lesions. *Caries Res*, v. 18, no. 6 p. 509-518, 1984.

TODA, S.; FEATHERSTONE, J. D. Effects of fluoride dentifrices on enamel lesion formation. *J Dent Res*, v. 87, p. 224-227, 2008.

TORRADO, A. et al. Remineralization potential of a new toothpaste formulation: an *in vitro* study. *J Contemp Dent Pract*, v. 5, p. 18-30, 2004.

TWETMAN, S. et al. Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontol Scand*, v. 61, no. 6, p. 347-355, 2003.

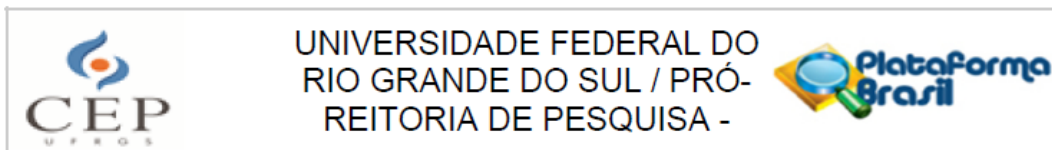
WALSH, T. et al. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;1.

VYAYHARE, S.; SHARMA, D. S.; KULKARNI, V. K. Effect of three different pastes on remineralization of initial enamel lesion: an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent*, v. 39, no. 2, p. 149-160, 2015.

WHITE, D. J. The application of *in vitro* models to research on demoralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res*, v. 9, no. 3, p. 175-193, 1995.

WIERICHS, R. J. et al. Effects of dentifrices differing in fluoride compounds on artificial enamel caries lesions in vitro. *Odontology*, v. 105, no. 1, p. 36-45, 2017.

ANEXO – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética da UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Métodos de desenvolvimento de lesões iniciais de cárie artificiais em esmalte de dentes permanentes e decíduos

Pesquisador: Jonas de Almeida Rodrigues

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 53508216.0.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.531.457

Apresentação do Projeto:

Projeto adequadamente apresentado. Nesta versão, todos os documentos que o compõe estão presentes e adequados. Por meio deste projeto, os autores propõem-se a testar métodos para o desenvolvimento da cárie, para fins de desenvolvimento de estudos futuros relacionados ao tratamento desta.

Objetivo da Pesquisa:

Testar métodos para o desenvolvimento de lesões de cárie em dentes decíduos e permanentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos deste estudo relacionam-se à doação dos dentes extraídos, condição controlada pela declaração, dos proponentes que as exodontias serão realizadas com fins terapêuticos, por sujeitos não envolvidos diretamente no projeto de pesquisa. Além disto, há declaração que a identidade dos sujeitos doadores será protegida e que não haverá qualquer restrição ao atendimento do sujeito caso ele decida não doar os dentes.

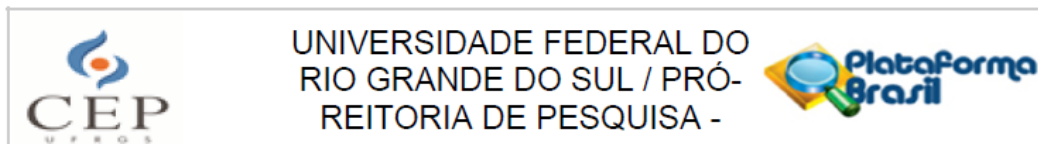
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa sobre tema relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão apresentados e todas as correções solicitadas no termo de doação de

| | | | |
|---|--------------------------------|---------------------------------------|--|
| Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro | | | |
| Bairro: Farroupilha | | CEP: 90.040-060 | |
| UF: RS | Município: PORTO ALEGRE | | |
| Telefone: (51)3308-3738 | Fax: (51)3308-4085 | E-mail: etica@propesq.ufrgs.br | |



Continuação do Parecer: 1.531.457

dentes, de assentimento do menor, do TCLE foram realizadas e estão em acordo com as diretrizes éticas.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências ou lista de inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|--------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_652902.pdf | 23/04/2016 16:34:19 | | Aceito |
| Outros | Termo_de_doacao_de_dente_deciduo.pdf | 23/04/2016 16:27:46 | Daiana Back Gouvea | Aceito |
| Outros | Termo_de_doacao_de_dente_permanente.pdf | 23/04/2016 16:27:11 | Daiana Back Gouvea | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO.pdf | 23/04/2016 16:23:49 | Daiana Back Gouvea | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termo_de_assentimento_do_menor.pdf | 23/04/2016 16:21:56 | Daiana Back Gouvea | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.pdf | 23/04/2016 16:19:57 | Daiana Back Gouvea | Aceito |
| Folha de Rosto | Jonas_Almeida_de_Rodrigues.pdf | 24/02/2016 19:08:59 | Daiana Back Gouvea | Aceito |
| Outros | PARECER_COMPESQ.pdf | 05/02/2016 12:45:22 | Daiana Back Gouvea | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

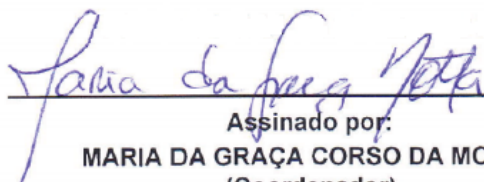


UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 1.531.457

PORTO ALEGRE, 05 de Maio de 2016


Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br