

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**DESMINERALIZAÇÃO SUBSUPERFICIAL E
RESISTÊNCIA À FRATURA DO ESMALTE NO
DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO EXTRÍNSECO**

Johnatan Meireles do Nascimento

SAPIENTIA AEDIFICAT

2022

JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO

**DESMINERALIZAÇÃO SUBSUPERFICIAL E RESISTÊNCIA À
FRATURA DO ESMALTE NO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO
EXTRÍNSECO**

**SUBSURFACE DEMINERALIZATION AND ENAMEL FRACTURE
RESISTANCE IN EXTRINSIC EROSIVE TOOTH WEAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Takeo Hara

João Pessoa

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244d Nascimento, Johnatan Meireles do.
Desmineralização subsuperficial e resistência à
fratura do esmalte no desgaste dentário erosivo
extrínseco / Johnatan Meireles do Nascimento. - João
Pessoa, 2022.
42 f. : il.

Orientação: Frederico Barbosa de Sousa.
Coorientação: Anderson Takeo Hara.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Erosão dentária. 2. Esmalte dentário. 3.
Histologia. 4. Desmineralização dental. 5.
Microtomografia de raios x. I. Sousa, Frederico Barbosa
de. II. Hara, Anderson Takeo. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314-001.4(043)

Elaborado por MAGNOLIA FELIX DE ARAUJO - CRB-15/883

Informações Complementares:

Título em outro idioma: Subsurface demineralization and enamel fracture
resistance in extrinsic erosive tooth wear

Palavras-chave em outro idioma: Tooth Erosion; Dental Enamel; Histology;
Tooth Demineralization; X-Ray Microtomography.

Área de concentração: Ciências Odontológicas

Linha de Pesquisa: Fisiopatologia dos tecidos buco-maxilo-faciais

Banca examinadora: Frederico Barbosa de Sousa (Orientador, UFPB);

Andressa Feitosa Bezerra de Oliveira (UFPB); Aline de Almeida Neves (UFRJ).

Data de defesa: 29-06-2022

Informações acadêmicas e profissionais do (a) aluno (a)

- ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6227-5646>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1336503224488139>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, fonte de amor e sustentação, quem me abençoa e me guia por todos os caminhos até aqui.

Aos meus pais, José Adailton e Mauricéa, a quem devo toda a gratidão, por todo o carinho, força e suporte em mais esta etapa. A meus irmãos Jordan e Maria Jordana, por todo o companheirismo e inspiração para ser sempre o melhor; e a toda a minha família, que compartilham comigo toda a felicidade e alegria a cada etapa conquistada!

Ao meu orientador, professor Frederico Barbosa, por todos os ensinamentos e orientações prestadas ao longo destes dois anos e meio de pós-graduação, por todo o apoio e suporte no enfrentamento de dificuldades e desenvolvimento do trabalho. Aos professores Simone Alves, Bianca Santiago e Thiago Isidro que, em um momento delicado de saúde, não mediram forças para me auxiliar com as atividades do curso necessárias.

À Ítalo Assis, por todo o companheirismo, apoio e incentivo durante todo o curso, e por nunca ter medido forças para me auxiliar no que precisei. A Leidiana Paiva, amiga e auxiliar que foi suporte durante várias etapas do desenvolvimento da pesquisa. A Bruno Gonçalo que, mesmo em outro programa, compartilhou do apoio e dificuldades enfrentadas durante o mestrado. A amigos que o PPGO me apresentou, Jannerson Xavier e Raíssa Toscano, amizades que levarei para a vida. Aos amigos do LAMIB, Basílio Rodrigues, Eugênia Andrade e Maria Luíza, pelo auxílio nas etapas da pesquisa e por todo o apoio durante o curso. À todos vocês, meu muito obrigado!

Por fim, a Universidade Federal da Paraíba, pelo apoio institucional recebido e a todo o corpo docente do PPGO pelos ensinamentos ofertados e pelo exemplo de dedicação à vida acadêmica.

RESUMO

Atualmente, os desfechos característicos do desgaste erosivo no esmalte dentário (desmineralização superficial e perda de volume) têm como base eventos restritos à superfície do esmalte, apesar deste tecido apresentar nanocanais com dimensões que permitiriam a difusão das moléculas ácidas para partes profundas do tecido e, assim, acarretariam numa desmineralização subsuperficial profunda (des-SSP) como desfecho. O objetivo do presente estudo foi de investigar a ocorrência de des-SSP, no esmalte dentário na erosão dental extrínseca e a sua influência na resistência à fratura. Para isto, blocos de esmalte (4 x 4 mm; n = 10), confeccionados a partir de 3º molares mandibulares humanos de sujeitos na faixa etária de 17 a 23 anos, padronizados quanto à concentração mineral superficial medida através de microtomografia computadorizada de raios X (microCT), foram submetidos a ciclos de desafio de desgaste erosivo com ácido cítrico a 1% e saliva artificial com mucina por 5 dias, com a superfície dividida em partes experimental (exposta ao ácido) e controle (protegida com cera resistente a ácido), formando grupos pareados. Os espécimes foram analisados através de perfilometria óptica, quantificando perda de volume (altura do batente); microCT, quantificando profundidade de lesão e $\Delta\Delta Z$ (μm X perda de concentração mineral, antes e depois do desafio erosivo); radiomicrografia digital, quantificando perda de volume mineral; e microdurômetro juntamente com medida de extensão de linha de fratura, quantificando a resistência à fratura. As análises perfilométricas (n = 10) evidenciaram uma perda de altura média de 7,29 μm ($\pm 4,1$ μm). Observou-se profundidade de lesão média de 835,39 μm ($\pm 489,39\mu\text{m}$), e um maior $\Delta\Delta Z$ na área de lesão ($p < 0,05$; magnitude de efeito G de Hedge -0,95; IC 95% -0,03/-1,88; poder > 82%). A perda de volume mineral apresentou uma média de 2,1% ($\pm 0,8\%$). A área erosão evidenciou, ainda, menor resistência à fratura ($p < 0,05$; magnitude de efeito G de Hedge 2,92; IC 95% 5,31/0,53; poder > 98%). Pode-se concluir, que as evidências observadas sugerem que a des-SSP no esmalte afetado por erosão dentária extrínseca apresentou-se bem mais profunda do que aquela acreditada atualmente, além de uma menor resistência à fratura.

Palavras-chave: Erosão dentária; Esmalte dentário; Histologia Desmineralização do Dente; Microtomografia por Raio-X.

ABSTRACT

Currently, the characteristic outcomes of erosive enamel wear (surface demineralization and volume loss) are based on events restricted to the enamel surface, although this tissue presents nanochannels with dimensions that would allow the diffusion of acid molecules to deep parts of the tissue and thus lead to deep subsurface demineralization (SSD) as an outcome. The aim of the present study was to investigate the occurrence of SSD in dental enamel in extrinsic dental erosion and its influence on the fracture resistance. For this purpose, enamel blocks (4 x 4 mm; n = 10), made from human mandibular 3rd molars of subjects aged 17 to 23 years, standardized for surface mineral concentration measured by X-ray microtomography (microCT), were subjected to cycles of erosive wear challenge with 1% citric acid and artificial saliva with mucin for 5 days, with the surface divided into experimental (exposed to acid) and control (protected with acid-resistant wax) parts, forming paired groups. Specimens were analyzed by optical profilometry, quantifying volume loss (stop height); microCT, quantifying lesion depth and $\Delta\Delta Z$ (μm X loss of mineral concentration, before and after erosive challenge); digital radiomicrography, quantifying mineral volume loss; and microdurometer together with fracture line extension measurement, quantifying fracture resistance. The profileometric analyses (n = 10) showed a mean height loss of 7.29 μm (± 4.1 μm). Mean lesion depth of 835.39 μm (± 489.39 μm) was observed, and a higher $\Delta\Delta Z$ in lesion area ($p < 0.05$; Hedge G-effect magnitude -0.95; 95% CI -0.03/-1.88; power > 82%). Mineral volume loss averaged 2.1% ($\pm 0.8\%$). The erosion area also showed lower fracture resistance ($p < 0.05$; Hedge G-effect magnitude 2.92; 95% CI 5.31/0.53; power > 98%). It can be concluded, that the observed evidence suggests that SSD in enamel affected by extrinsic dental erosion presented much deeper than that currently believed, in addition to a lower fracture resistance.

Keywords: Tooth Erosion; Dental Enamel; Histology; Tooth Demineralization; X-Ray Microtomography.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DDE - Desgaste dental erosivo

Des-SSP - Desmineralização subsuperficial profunda

JAD - Junção amelodentinária

MicroCT - Microtomografia Computadorizada de Raios-X

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Esquema de espécime exibindo proteção com cera em vermelho, e janela no terço central exposta em amarelo claro. **18**
- Figura 2** - Esquema representativo de aplicação de método de altura de três passos. Setas laranjas apontando altura das áreas controle. Linha vermelha conectando ambos os batentes. Seta dupla em vermelha evidenciando a perda de superfície..... **20**
- Figura 3** - Desenho esquemático representativo de cálculo de $\Delta\Delta Z$. Em vermelho, área exposta. Em amarelo, retas para cálculo de concentração mineral e ΔZ : CMP_0 - concentração mineral em região de área protegida pré-exposição. CME_0 - concentração mineral em região de área exposta pré-exposição. CMP_1 - concentração mineral em região de área protegida pós-exposição. CME_1 - concentração mineral em região de área exposta pós-exposição..... **21**
- Figura 4** - Esquema representativo de corte e pontos histológicos para quantificação de perda mineral. Áreas controles à direita e esquerda. Área experimental ao centro. Retângulos em cinza representando cinco pares de pontos histológicos por amostra..... **22**
- Figura 5** - Imagem representativa de C (comprimento da fissura), representando o comprimento da fissura a partir do centro da indentação..... **23**
- Figura 6** - Cortes tomográficos longitudinais bidimensionais digitais utilizando software ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos da América). **A** – Imagem antes da ciclagem de erosão-rem mineralização, evidenciando continuidade do limite superior e graus de mineralização variados subsuperficiais. **B** – Imagem após desafio erosivo, sugerindo alteração de concentração mineral no limite superior (linha vermelha) e em região abaixo de área experimental..... **25**
- Figura 7** - Cortes tomográficos longitudinais bidimensionais digitais utilizando software ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos da América). **A** – Imagem antes da ciclagem de erosão-rem mineralização, evidenciando continuidade do limite superior e graus de mineralização variados subsuperficiais. **B** – Imagem após desafio erosivo, sugerindo alteração de concentração mineral no limite superior (linha vermelha) e em região abaixo de área experimental..... **25**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição ácida de diversas bebidas (g/l).....	13
Tabela 2 - Ácidos comuns na etiologia da erosão dentária e seus tamanhos moleculares.....	14
Tabela 3 - Perda de superfície média (desvio padrão) e profundidade de lesão (desvio padrão) por perfilometria óptica.....	24
Tabela 4 - Valores de $\Delta\Delta Z$	24
Tabela 5 - Valores de resistência à fratura das áreas controle e expostas ao desafio erosivo.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
3. OBJETIVOS	16
4. METODOLOGIA	17
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
Anexo A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	34
Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido	38
Apêndice B – Termo de doação do dente humano	41

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o crescente consumo de alimentos e bebidas ácidas, como refrigerantes, sucos cítricos e bebidas esportivas, desperta uma maior atenção na investigação da associação da erosão dental e ácidos extrínsecos (1). Estima-se que, globalmente, ocorra com uma média de 30% a 50% na dentição decídua, e de 20% a 45% na dentição permanente (2). Do mesmo modo, estudos nacionais variam sua estimativa em uma prevalência de 18,4% (3) à 78,2% (4).

A partir do momento que o elemento dentário alcança a cavidade oral, ele está sujeito a algum tipo de desgaste, ainda que em uma progressão extremamente baixa. Isso permite que a estrutura permaneça com sua morfologia e função normais durante toda a vida. A partir do momento em que a taxa de progressão do desgaste ultrapassa um limiar saudável, dá-se início a um processo de desgaste que pode comprometer a dentição em qualquer fase da vida (5).

Desta maneira, quando o esmalte dentário é submetido à desafios ácidos de origem não bacteriana, sofre uma perda de mineral na superfície, criando uma camada amolecida (desmineralizada), que pode ser removida por forças mecânicas promovendo uma perda de volume, sendo o conjunto dos desfechos (desmineralização e perda de volume) chamado de desgaste dental erosivo (DDE) (5).

Assim, o DDE é definido como um processo químico-mecânico que resulta na perda progressiva de estrutura mineral da superfície dentária, na ausência de bactérias (6). Ademais, na ausência das forças mecânicas, denomina-se erosão dental a perda química de substância mineralizada da estrutura dentária devido à exposição à ácidos não bacterianos (7).

A sua etiologia é multifatorial, causada por substância intrínsecas e extrínsecas ou, ainda, a combinação de ambas. Intrinsecamente, pode ser causada por fatores relacionados ao paciente, como as características de fluxo e composição salivar, alterações gastrointestinais e vômitos frequentes (6,8). Por outro lado, de maneira extrínseca, os hábitos e a composição de dieta e bebidas, além de fatores ocupacionais, podem ser determinantes para o seu desenvolvimento (6).

Segundo o entendimento atual, acredita-se que, devido ao envolvimento de ácido fortes (mais fortes que aqueles envolvidos na etiologia da lesão cáriosa), ocorre uma dissolução intensa e rápida nas partes mais superficiais do esmalte, sendo logo neutralizados pelos íons dissolvidos. Estes, por sua vez, limitam a profundidade de penetração da desmineralização aos micrômetros mais superficiais do esmalte (9). Com base nesse pressuposto, dados disponíveis sobre a profundidade da desmineralização na superfície da lesão de DDE no esmalte são baseados no contraste da camada superficial com a camada logo subjacente do esmalte “normal”, sendo ambas subjacentes à superfície sujeitas ao desafio erosivo. Não há dados quantitativos comparando com camadas subjacentes a uma superfície não sujeita ao desafio erosivo.

Com base nas lacunas na avaliação da profundidade da desmineralização em lesões de DDE no esmalte, e a ausência de dados em modelo de erosão extrínseca, o presente trabalho se propôs a analisar, histopatologicamente, as características do amolecimento subsuperficial no esmalte dentário, bem como investigar a resistência à fratura do esmalte submetido à erosão dental extrínseca.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O esmalte dentário consiste em uma estrutura mineralizada, que reveste a coroa dentária protegendo-a contra as agressões externas. Apresenta em totalidade cerca de 93% de volume mineral, 1,5% de volume de matéria orgânica e 5,5% de volume de água (10). Esta matriz orgânica e a água livre, presentes na estrutura dos prismas do esmalte, se distribuem formando um sistema de nanocanais estreitos (11) que variam de 2 a 6nm de diâmetro, constituindo importantes vias de caminhos para o transporte de substâncias para o interior do esmalte (12).

Os minerais do esmalte são constituídos de uma forma imperfeita de um fosfato de cálcio, a hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Assim, correspondem a sólidos cristalinos formados de íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- , associados de outros íons de “impureza”, que formam cristais de aproximadamente 70nm de largura por 25nm de espessura. Alguns íons podem ser substituídos por outros íons metálicos, como sódio, potássio ou magnésio. Estes íons “impuros” substituem outros íons da estrutura do cristal de hidroxiapatita, como por exemplo a substituição de Ca^{2+} por Na^+ , Mg^{2+} e K , OH^- por F^- , e PO_4^{3-} por CO_3^{2-} , que afetam na pureza e conseqüentemente solubilidade deste tecido (11,13).

Além disso, existe um gradiente na sua constituição de acordo com a profundidade. A concentração de cálcio e fosfato diminuem gradualmente da superfície à junção amelodentinária ao mesmo tempo em que íons de impureza como o carbonato e magnésio aumentam. Ou seja, à medida que a sua profundidade aumenta, há uma diminuição na concentração mineral, o que implica em um aumento gradual no grau de porosidade e na solubilidade de sua estrutura (11,14).

A erosão do esmalte dentário pode ocorrer por meio de dois mecanismos químicos. Tanto pela ação de íons H^+ provenientes de ácidos fortes/fracos, como pela ação de agentes quelantes. Os íons H^+ são produzidos a partir da dissociação de ácidos inorgânicos (como o ácido clorídrico) em água e, ao se combinar diretamente com os íons carbonato ou fosfato dos cristais, quebram a estrutura promovendo um ataque direto à superfície. Por outro lado, os agentes quelantes representam ânions que se ligam ou complexam o cálcio, removendo-o da superfície dos cristais (13).

Diferentemente do que ocorre na cárie dentária, para a erosão dental não existe um pH crítico para seu desenvolvimento, uma vez que, na primeira, leva-se em consideração a presença dos íons contidos no fluido do biofilme dental. A substância erosiva em contato direto com a superfície do esmalte pode apresentar uma concentração maior ou menor destes íons, possibilitando a sua dissolução em um pH mais baixo ou mais alto do que o pH crítico para o processo cariioso (5). Além disso, o grau de saturação da solução é outro fator fundamental neste processo. Uma vez que a solução se encontre subsaturada, o esmalte tenderá a dissolução até alcançar um equilíbrio com a solução. Em contrapartida, uma vez que a solução se encontre supersaturada, haverá uma tendência à precipitação na estrutura, com conseqüente perda de íons da solução, até que se atinja um estado de equilíbrio (11).

Do mesmo modo, a força de um ácido depende da concentração de liberação de íons H^+ , ou seja, quanto maior a força do ácido, e conseqüentemente liberação de H^+ , maior o seu poder de dissociação. A extensão desta dissociação depende do equilíbrio entre as espécies contidas em um determinado pH, representada pelas constantes de dissociação ácida (K_a). Por outro lado, o pK_a corresponde a uma medida de afinidade do ânion dissociante em cada etapa para os íons H^+ . Sendo assim, quanto menor o valor de pK_a de um determinado ácido, maior é a sua força e capacidade de causar danos à estrutura do esmalte (11).

Uma vez exposta a estas substâncias erosivas, o esmalte sofre uma dissolução inicial superficial. A partir daí, a solução penetra-o por difusão, causando uma dissolução parcial dos cristais e desmineralizando a estrutura próxima à superfície, o que promove uma “camada amolecida”. A desmineralização na região interprismática acontece previamente à ocorrida no interior dos prismas (11).

Atualmente acredita-se que esta camada amolecida não possua mais do que alguns micrômetros de espessura (11), atingindo cerca de 9 a 12 μm do esmalte dentário em modelos de DDE de média duração (15,16). Entretanto, espessuras de até 30 μm foram relatados através de microscopia eletrônica de varredura (17), o que pode representar um amolecimento de subsuperfície em espessuras bem maiores do que as previamente relatadas, porém ainda superficiais.

Ácidos como o ácido cítrico possuem uma interação complexa com as estruturas mineralizadas do esmalte. Em contato com a água, ele se apresenta com uma mistura de íons H^+ , ânions, e moléculas não dissociadas, em concentrações que variam de acordo com o pH e K_a da solução. Desta maneira, pode atacar a superfície dos cristais por ambos os mecanismos de ação (13).

Diante disso, o conhecimento das substâncias presentes na composição dos alimentos envolvidos no DDE extrínseco torna-se fundamental, como mostrado na tabela 1, visto que além da dieta corresponder ao fator etiológico extrínseco mais importante, os fatores de comportamento alimentares vêm se alterando à medida dos anos com o aumento do consumo de refrigerantes, sucos cítricos e bebidas energéticas e esportivas.

Tabela 1 – Composição ácida de diversas bebidas (g/l).

Bebida	pH	Ác. Fosfórico	Ác. Cítrico	Ácido Málico	Outros ácidos
Suco de abacaxi	3.4 – 3.5		5.9	1.3	Salicílico: 0.16
Suco de maçã	3.0 – 3.4		0.05 – 2	7.4	Lático: 0.17 Fórmico: 0.02
Bebidas de cola	2.2 – 2.6	3.3	9		Carbônico: 4 - 6
Suco de laranja	3.4 – 3.7		7.6 – 11.9	0.1	
Vinho tinto	3.4 – 3.7		0.14		Lático: 2.4 Tartárico: 1.5
Vinho branco	3.4 – 3.7		0.14	3.5	Lático: 1.7 Tartárico: 0.3

Fonte: (FEATHERSTONE, LUSSI; 2006).

Neste contexto, é importante ressaltar que as moléculas mais envolvidas apresentam tamanhos nanométricos e, ao comparar com as dimensões dos poros do esmalte nas bainhas dos prismas, que formam o sistema de nanocanais e são as principais vias de transporte no esmalte dental (18), se constata que as bainhas são bem maiores que todas as moléculas ácidas (Tabela 2), e possibilitariam a difusão destas substâncias pelos nanocanais no esmalte dentário, promovendo alterações adicionais que apenas os desfechos superficiais atualmente estudados.

Tabela 2 – Ácidos comuns na etiologia da erosão dentária e seus tamanhos moleculares.

<i>Molécula</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Tamanho (nm)*</i>
Hidroclorídrico	HCl	0.13
Carbônico	H ₂ CO ₃	0.23
Acético	CH ₃ COOH	0.25
Fosfórico	H ₃ PO ₄	0.27
Lático	C ₃ H ₆ O ₃	0.38
Tartárico	C ₄ H ₆ O ₆	0.60
Málico	C ₄ H ₆ O ₅	0.62
Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	0.69

*Medidas de distâncias moleculares mais altas obtidas com o software Avogadro (Avogadro, versão 1.1.1), usando as mesmas forças de campo e algoritmos.

Novas metodologias vêm sendo propostas no estudo das camadas internas após desafio erosivo. Cougot et al. (2018) realizaram um estudo propondo um novo método de análise tridimensional da erosão dentária a partir de tomografia de feixe de íons focalizados associada a penetração de nitrato de prata nas porosidades do esmalte erodido, utilizando modelo de ácido ortofosfórico. Dentre os resultados apresentados, observaram-se uma penetração dos íons de nitrato de prata a uma profundidade de 12 µm após o desafio erosivo, principalmente nas regiões interprismáticas, além de um aumento da fração de porosidade interconectada (3,1% no esmalte experimental, e 0,5% no esmalte sadio), e no grau de anisotropia (0,81 no esmalte experimental, e 0,56 no esmalte sadio).

Scaramucci et al. (2015) avaliaram o potencial antierosivo de soluções contendo fluoreto de sódio e utilizando solução de ácido cítrico em dois modelos erosivos: um menos agressivo, utilizando ácido cítrico 0,3% (pH 3,8); e um mais agressivo, utilizando ácido cítrico 1% (pH 2,4). Com relação à perda de espessura superficial, os espécimes foram avaliados por meio de perfilometria. No modelo menos agressivo, observou-se perda de superfície média de 2,35 µm no esmalte, e 6,68 µm na dentina. Por outro lado, no modelo mais agressivo, observou-se perda de superfície média de 39,44 µm no esmalte, e 24,08 µm na dentina.

Roque-Torres et al. (2020) realizaram um estudo com microtomografia computadorizada (microCT) e microscopia óptica (com magnificação de 10X) no DDE, utilizando modelo de ácido cítrico à 1%, com o objetivo de comparar a perda superficial nas duas técnicas. Os autores relataram perdas de superfície de 38,38 μm para microCT, e 39,43 μm em microscopia óptica. Desta maneira, concluíram que os resultados são comparáveis, evidenciando a vantagem da análise por microCT devido à possibilidade de ser um método conservador.

Eisenburger, Shellis & Addis (2004) realizaram um estudo e apontaram resultados e limitações das técnicas atuais para avaliação do esmalte no DDE. Os autores utilizaram modelo de DDE utilizando ácido cítrico a 0,3%, com o objetivo de avaliar em microscopia eletrônica de varredura utilizando duas abordagens: uma técnica de réplica para visualização indireta da estrutura interna dos poros do esmalte amolecido e o exame direto do esmalte exposto. Além disto, no processo de transferência das amostras do ácido para água, a solução foi titulada até pH neutro e então liofilizada, para reduzir as chances de causar artefatos de reprecipitação ou de colapso das estruturas após o desafio erosivo.

A visualização interna por meio da técnica de réplica evidenciou danos até uma profundidade de 9 – 12 μm abaixo da superfície, entretanto, com uma possibilidade de sub-representação na extensão da desmineralização interprismática, uma vez que a parte desmineralizada pode não ser detectada pela técnica de replicação. Por outro lado, a observação da superfície do esmalte amolecido após o desafio erosivo resultou em feixes de cristais parcialmente dissolvidos, separados por espaços relativamente grandes, e muito mais delicados que outras imagens prévias observadas, apresentando-se mais vulnerável a forças mecânicas. Tais fatores podem acarretar em um colapso desta camada mais externa, resultando em implicações na acurácia das técnicas de medidas superficiais da camada amolecida. Além disso, os pesquisadores apontaram que o conteúdo mineral pode ser muito baixo para detecção em microradiografia e, em análises de perfilometria, pode ocorrer uma tendência da caneta penetrar a última camada, mais desmineralizada. Desta maneira, há a necessidade de implementar novos métodos de medidas da profundidade do amolecimento subsuperficial (16).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a profundidade da desmineralização subsuperficial e resistência à fratura no esmalte causada por erosão dental extrínseca.

3.2 Específicos

- a) avaliar quantitativamente a perda de espessura de esmalte por meio de perfilometria óptica;
- b) avaliar desmineralização subsuperficial no esmalte através de microtomografia computadorizada tridimensional de raios-x (microCT);
- c) avaliar perda de volume mineral através de radiomicrografia digital;
- d) avaliar resistência à fratura através de microdureza;

4. METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas

A realização desta pesquisa respeitou as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos, conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. O estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB), sendo aprovado sob o número CAAE: 42990721.8.0000.5188

4.2 Delineamento do estudo

O estudo possuiu característica quantitativa, laboratorial, transversal e experimental analítico, com técnica de observação direta (21). Conforme as recomendações para boas práticas em estudos in vitro (22), este projeto incluiu aleatorização e cegamento. Ainda, análise estatística não baseada apenas em valor de p , com magnitude de efeito e seu intervalo de confiança e poder estatístico conforme recomendações da Associação Americana de Estatística (23,24) e da Associação Europeia de Epidemiologia (23).

4.3 Local de realização do estudo

As etapas do estudo foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica (LAMIB) e no Laboratório Integrado de Biomateriais (LABIO), localizados no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em João Pessoa – PB.

4.4 Seleção dos dentes e preparo dos blocos de esmalte

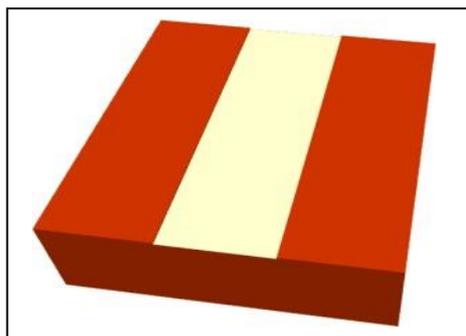
Para o seu desenvolvimento, foram obtidos terceiros molares mandibulares hígidos, a partir de doação de pacientes entre 17 e 23 anos. Esta faixa etária foi selecionada devido a susceptibilidade à desmineralização do esmalte dentário aumentar conforme com a idade do paciente (25). Os dentes foram limpos com curetas periodontais para remoção de tecido mole, higienizados com escova dental convencional e lavados com água deionizada. De cada dente foram obtidos quatro blocos de esmalte (~3 mm x 3 mm x 3 mm) do terço médio das faces vestibular e lingual, com o auxílio de um disco

diamantado dupla face montado em micromotor/peça reta sob refrigeração com jato de água, totalizando 10 blocos.

Os blocos de dentes foram fixados em cilindros confeccionados com resina acrílica quimicamente ativada (Dencrilay®, Dencril, Caieiras, Brasil), utilizando cera para enceramento progressivo (NewMax, TechNew, Rio de Janeiro, Brasil) de modo que a face com dentina estava voltada para cima. Em seguida, os espécimes foram planificados usando lixas d'água de granulação 1.200 (Buehler, Estados Unidos), em politriz, sob constante arrefecimento a água. Na sequência, os espécimes foram reposicionados com a face em esmalte voltada para cima, e planificados usando lixas d'água de granulação decrescente: 1.200, 2.400 e 4.000 (Buehler, Estados Unidos), e polidos utilizando almofadas de polimento e suspensão AP-A 5µm (Struer, Holanda) embebidas com água deionizada. No final do processo de polimento, os espécimes foram submetidos a um banho ultrassônico com água deionizada por 3 min.

Foi, ainda, realizada proteção em todas as faces da amostra utilizando a cera para enceramento progressivo (NewMax, TechNew, Rio de Janeiro, Brasil), com exceção de uma janela no terço central (1mm x 3mm) que permaneceu exposta para o desafio ácido (figura 1).

Figura 1 – Esquema de espécime exibindo proteção com cera em vermelho, e janela no terço central exposta em amarelo claro.



Fonte: próprio autor.

4.5 Critérios de inclusão e exclusão

Para garantir a maior semelhança entre as estruturas e sua integridade, os blocos foram avaliados com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica nos aumentos 10x e 40x, excluindo amostras com trincas ou fraturas, pigmentações, esmaltes fluoróticos e com malformações de desenvolvimento. Os espécimes

foram submetidos à avaliação de concentração mineral do esmalte dentário, através de microtomografia computadorizada tridimensional de raios X (microCT), para exclusão de amostras com concentração mineral fora do valor médio (2,78 g/cm³).

Foram feitas medições de concentração mineral na superfície das amostras, em cinco pontos separados por distância de 200 micrometros entre um e outro e selecionadas amostras de esmalte com concentração mineral na faixa de 2,63 a 2,99 g/cm³.

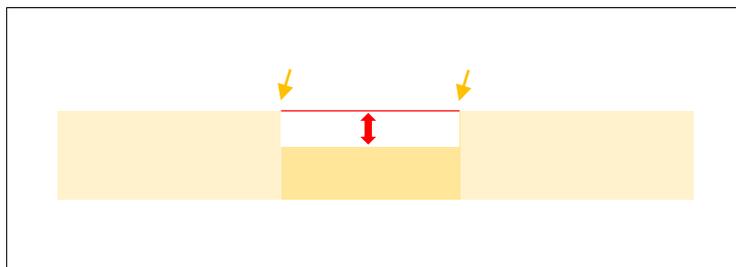
4.6 Desafio erosivo

Foi utilizada solução aquosa de ácido cítrico a 1%, com pH 2,4 (5 ml/espécime). Cada amostra passou pelo ciclo de erosão dental extrínseca: 5 min em ácido cítrico (sem agitação) + 60 min em saliva artificial com mucina (0.213 g/L de CaCl₂ – 2 H₂O; 0.738 g/L de KH₂PO₄; 1.114 g/L de KCl; 0.381 g/L de NaCl; 12 g/L de Tris e 2.2 g/L de mucina gástrica suína), sob agitação de 100 rpm, ambos à temperatura ambiente (19). Foram usados 1,5 ml de solução por mm² de área exposta da amostra. O ciclo foi repetido cinco vezes ao dia, durante cinco dias e permaneceram na saliva artificial com mucina *overnight* (sob agitação de 100 rpm, em temperatura ambiente). A solução de ácido cítrico foi substituída a cada ciclo, e a saliva artificial a cada 24 horas. Após o período de desafio ácido e antes da imersão em saliva artificial, as amostras foram lavadas com água deionizada por 10 segundos.

4.7 Avaliação da perda de superfície

Uma área de 2mm (horizontal, perpendicular a área exposta) x 1mm (vertical, paralela a área exposta) foi digitalizada com perfilômetro Proscan 2000 (Scantron Industrial Products LTD, Tauton, England) foi digitalizada. Foi utilizado sensor s38/3 com resolução de 0,100μ, 100 hertz de frequência, passos de 0,01mm (eixo x) e 0,01mm (eixo y). Foi aplicado o método altura de três passos, em que são consideradas as alturas das áreas controle (nos lados esquerdo e direito) e a altura na área central erodida.

Figura 2. Esquema representativo de aplicação de método de altura de três passos. Setas laranjas apontando altura das áreas controle. Linha vermelha conectando ambos os batentes. Seta dupla em vermelha evidenciando a perda de superfície.



Fonte: próprio autor.

4.8 Avaliação da desmineralização subsuperficial – microCT

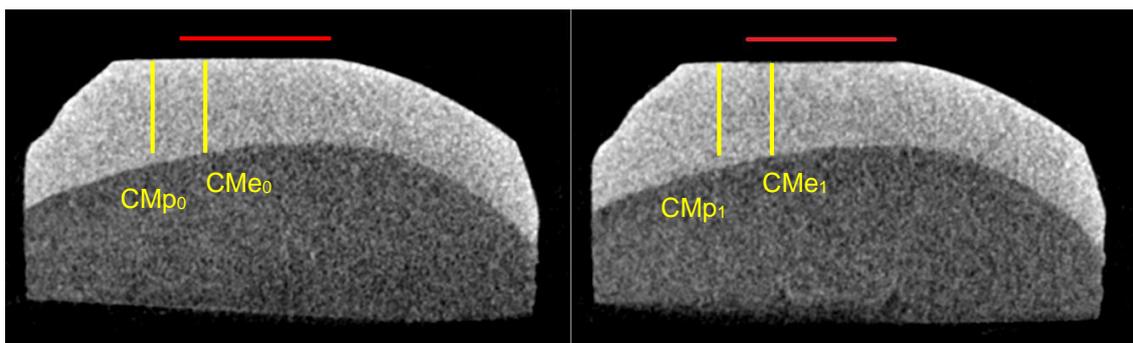
As amostras foram analisadas no microCT e obtidos dados de DeltaZ e profundidade de lesão, utilizando equipamento Skyscan 1172 (Bkuker, Estados Unidos da América), com os seguintes parâmetros para aquisição da imagem: pixel de 13,8 μm (matriz de pixels de tamanho grande), filtro de alumínio e cobre, passo de rotação de 0,4°, média de quadros de 4, movimento aleatório de 10, e 100 kV de energia, com rotação de 360°. Para a reconstrução da tomografia 3D, serão usados os seguintes parâmetros: suavização de 6, correção de endurecimento de feixe de 15% e correção de artefato de anéis de 2, utilizando 1000 cortes de imagem.

Após a aquisição das imagens, foi utilizado o software de análise de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos da América) para melhoria dos aspectos de brilho e contraste obtidos.

As análises de profundidade de lesão e $\Delta\Delta Z$ foram realizadas utilizando o software de análise de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos da América), por um examinador previamente treinado seguindo metodologia de Oliveira et al. (2020). Para tanto, uma mesma região da amostra foi analisada antes e após o desafio erosivo. Foram utilizados cortes longitudinais tomográficos digitais bidimensionais. Após identificar uma borda entre a área exposta e a área protegida no corte digital da amostra após o desafio erosivo, duas linhas longitudinais, indo da superfície do esmalte ao limite amelo-dentinário, foram traçadas, sendo uma na área exposta e outra na área protegida (Figura 3). A diferença entre as concentrações minerais (ΔZ) ao longo das duas linhas foram quantificadas antes ($\Delta Z_0 = \text{CMe}_0 - \text{CMP}_0$) e após ($\Delta Z_1 = \text{CMe}_1 - \text{CMP}_1$) o desafio erosivo. A diferença entre as duas medidas ($\Delta\Delta Z = (\Delta Z_1 - \Delta Z_0)$) foi

quantificada para cada amostra. A profundidade da desmineralização subsuperficial foi quantificada pela profundidade dos valores negativos de $\Delta\Delta Z$. O ΔZ foi calculado a partir dessa profundidade e dos valores negativos de $\Delta\Delta Z$.

Figura 3. Desenho esquemático representativo de cálculo de $\Delta\Delta Z$. Em vermelho, área exposta. Em amarelo, retas para cálculo de concentração mineral e ΔZ : CMp_0 - concentração mineral em região de área protegida pré-exposição. CMe_0 - concentração mineral em região de área exposta pré-exposição. CMp_1 - concentração mineral em região de área protegida pós-exposição. CMe_1 - concentração mineral em região de área exposta pós-exposição.



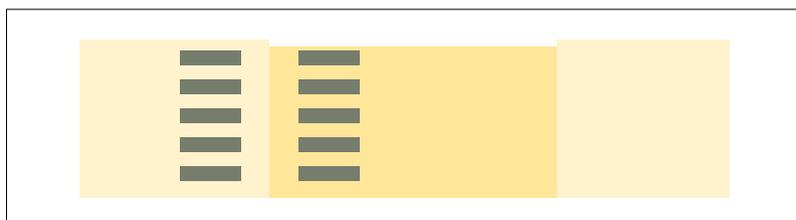
Fonte: próprio autor

4.9 Análise da média de perda de volume mineral - quantificação do valor médio da perda de volume mineral por radiomicrografia

Três amostras foram seccionadas em micrótomo de tecido duro (Silverstone), com rotação de 13.000 rpm para obter cortes não desmineralizados (espessura de 100 μm). De cada corte foi obtida uma radiomicrografia digital (equipamento OS X-ray system, Thermo-Kevex PXS5-928WB), com tubo de Tungstênio, operando a 45 kV e 45 mA e com pico de emissão de 25 keV; resolução de 1 micrômetro por pixel, juntamente com 13 folhas de alumínio com espessuras variando de 25 a 325 μm . Uma curva de calibração (coeficiente de correlação de 0,9998) entre níveis de cinza e espessura de alumínio foi obtida com as imagens digitais analisadas num software livre de análise de imagem ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos da América). Em cada amostra, foram selecionados cinco pontos histológicos (15 x 15 μm de área) subjacentes à controle e cinco pontos histológicos subjacentes à área erosionada, com distâncias da superfície do esmalte variando de 50 a 1000 μm . Em cada área, os pontos histológicos foram localizados ao longo de uma linha transversal indo da superfície do esmalte ao esmalte interno, sendo que cada linha foi colocada próxima (~100-150 μm) da

borda entre as áreas controle e experimental. Para cada ponto histológico abaixo da área controle foi selecionado um ponto histológico subjacente à área erosionada com mesma distância da superfície do esmalte. A quantificação do volume mineral do esmalte em cada ponto histológico foi realizada conforme método descrito por Medeiros et al. (2012), usando os mesmos coeficientes de atenuação linear de massa e as mesmas densidades para o mineral do esmalte e para o alumínio. A diferença entre os valores de volume mineral entre cada um dos cinco pares de pontos histológicos (um ao longo da linha subjacente à área controle e outra ao longo da linha subjacente à área erosionada) foi medida, num total de 15 pares de pontos histológicos analisados.

Figura 4. Esquema representativo de corte e pontos histológicos para quantificação de perda mineral. Áreas controles à direita e esquerda. Área experimental ao centro. Retângulos em cinza representando cinco pares de pontos histológicos por amostra.



Fonte: próprio autor.

4.10 Análise de resistência à fratura – microdureza

As amostras seccionadas foram submetidas à teste de microdureza a 60 µm de distância da junção amelodentinária, na área experimental e na área

$$HV = 2 * P * \frac{\left(\sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \right)}{D^2} = \frac{1.854 * P}{D^2}$$

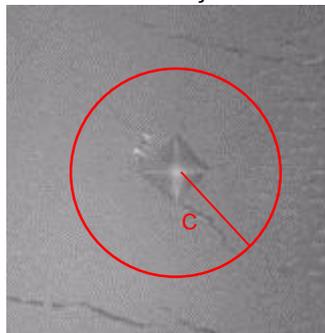
controle. Os testes foram realizados utilizando força de 0,98N, por um tempo de 5 segundos, utilizando Microdurômetro Leco LM 247 AT, com indentador Vickers (REF). A dureza de Vickers e resistência à fratura foram calculadas de acordo com as seguintes equações previamente publicadas (27,28):

Onde: HV = dureza Vickers; P = carga aplicada = 0,98 N; θ = ângulo entre faces opostas do diamante = 136°; e D = diagonal da indentação (µm).

$$K_c = 0.0154 * \left(\frac{E}{H} \right)^{1/2} * \left(\frac{P}{c^{1.5}} \right)$$

Onde: K_c = tenacidade à fratura (MPa*m^{1/2}); 0,0154 = constante de calibração; E = módulo de elasticidade (GPa) (84,1); H = dureza (GPa) = valor de dureza medido de cada entalhe foi convertido de HV para GPa e incluído na fórmula K_c ; P = carga aplicada = 0,98 N; c = comprimento da fissura (µm) a partir do centro da indentação.

Figura 5 – Imagem representativa de C (comprimento da fissura), representando o comprimento da fissura a partir do centro da indentação.



Fonte: próprio autor.

4.11 Análise estatística

Os dados foram confirmados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias, de acordo com a curtose e assimetria. Foi utilizado o teste t pareado, com nível de significância de 5% bicaudal, e computados a significância, a magnitude de efeito (G de Hedge), seu intervalo de confiança de 95% e o poder estatístico.

5. RESULTADOS

No total, 10 espécimes foram incluídos no estudo. Foi observado uma perda de superfície média de 7,29 μm (desvio padrão: 4,10 μm), evidenciando uma perda superficial da área experimental em relação a área controle, através da perfilometria óptica.

Através de análises de microCT observou-se uma profundidade média de lesão de 835,39 μm (desvio padrão: 489,39 μm), e um $\Delta\Delta Z$ aumentado nas áreas submetidas ao desafio erosivo lesão ($p < 0,05$; magnitude de efeito G de Hedge -0,95; IC 95% -0,03/-1,88; poder > 82%), sugerindo alterações subsuperficiais extensas no interior do esmalte dentário.

Tabela 3 – Perda de superfície média (desvio padrão) e profundidade de lesão (desvio padrão) por perfilometria óptica.

DESFECHO	RESULTADO
PERDA DE SUPERFÍCIE	7,29 μm (4,10 μm)
PROFUNDIDADE DE LESÃO	835,39 μm (489,39 μm)

Fonte: próprio autor.

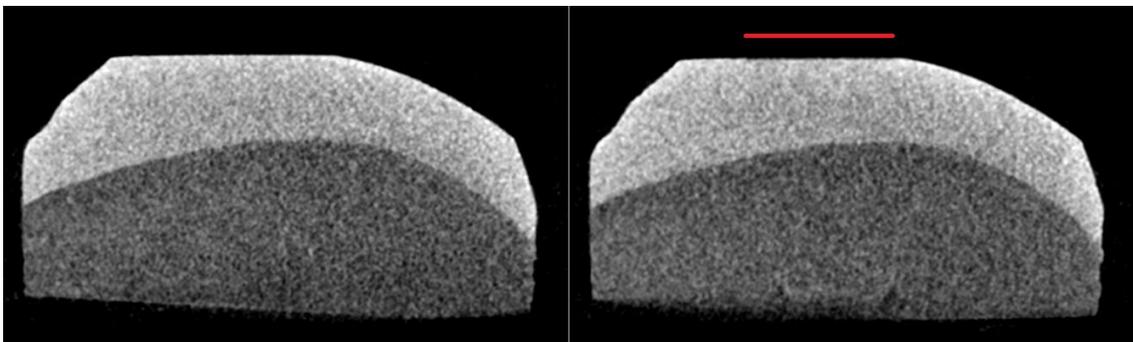
Tabela 4 – Valores de $\Delta\Delta Z$.

	$\Delta\Delta Z$ (DESVIO PADRÃO)
PRÉ EXPOSIÇÃO	-6167,78 (7207,38) $\text{g}/\text{cm}^3/\mu\text{m}$
PÓS-EXPOSIÇÃO	-9880,68 (6661,59) $\text{g}/\text{cm}^3/\mu\text{m}$

Fonte: próprio autor.

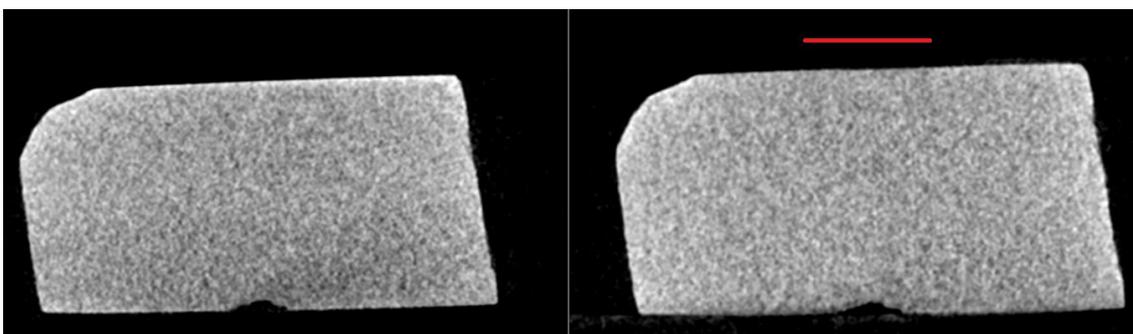
Um típico aspecto histológico da lesão de DDE no esmalte é ilustrado nas Figuras 6 e 7. Pode-se identificar a borda entre as áreas exposta e experimental, indicando o efeito do ácido na superfície. Uma linha vertical de separação entre os esmaltes internos subjacentes a cada área de superfície pode ser identificada.

Figura 6 – Cortes tomográficos longitudinais bidimensionais digitais utilizando software ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos da América). **A** – Imagem antes da ciclagem de erosão-remineralização, evidenciando continuidade do limite superior e graus de mineralização variados subsuperficiais. **B** – Imagem após desafio erosivo, sugerindo alteração de concentração mineral no limite superior (linha vermelha) e em região abaixo de área experimental.



Fonte: próprio autor

Figura 7 – Cortes tomográficos longitudinais bidimensionais digitais utilizando software ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos da América). **A** – Imagem antes da ciclagem de erosão-remineralização, evidenciando continuidade do limite superior e graus de mineralização variados subsuperficiais. **B** – Imagem após desafio erosivo, sugerindo alteração de concentração mineral no limite superior (linha vermelha) e em região abaixo de área experimental.



Fonte: próprio autor

O esmalte erodido apresentou uma perda de volume mineral média de 2,1% ($\pm 0,8\%$), com máximo de 3,3% e mínimo de 0,7%, em relação ao esmalte sadio. Do mesmo modo, a área submetida ao desafio ácido apresentou uma menor resistência à fratura (tabela 5) ($p < 0,05$; magnitude de efeito G de Hedge 2,92; IC 95% 5,31/0,53; poder $> 98\%$).

Tabela 5 – Valores de resistência à fratura das áreas controle e expostas ao desafio erosivo.

RESISTÊNCIA À FRATURA (DESVIO PADRÃO)

ÁREA CONTROLE	0,67 (0,12) MPa
ÁREA EXPOSTA	0,30 (0,05) MPa

Fonte: próprio autor

6. DISCUSSÃO

Os nossos resultados consistem nas primeiras evidências sugestivas de que as alterações causadas no esmalte dentário pelo desgaste erosivo extrínseco (por ação de ácido cítrico) podem ultrapassar àquelas observadas superficialmente. Em combinação com resultados prévios de nossa equipe de pesquisa com modelo de DDE intrínseco no esmalte (Sousa & Hara, comunicação pessoal, 2020), nossos resultados podem sinalizar a hipótese de haver uma desmineralização subsuperficial profunda, com baixa perda mineral, em modelo de DDE de média duração.

Os estudos sobre erosão dentária estão mudando de acordo com o surgimento de novas tecnologias de análises tridimensionais e, até então, estiveram focadas na investigação de profundidades das lesões, mas sem detectar as alterações que podem ocorrer nas camadas mais profundas. A análise através de microCT permite a detecção de perda de superfície, bem como a visualização e análise interna da estrutura sem danificar as amostras (20).

A literatura é ampla quanto a perdas superficiais na estrutura, entretanto, sem avaliar e quantificar as mudanças que ocorrem nas camadas subsuperficiais.

Por se tratar de uma indução de erosão in vitro, diversos são os modelos de ciclagem de erosão-rem mineralização utilizados, que podem suscitar em diferentes resultados, de acordo com as substâncias utilizadas, variando em perda de altura desde 2,38 μm (19) à 30 μm (17), dependendo da metodologia utilizada.

Em nosso trabalho, seguimos um dos protocolos propostos por Scaramucci et al. (2015), que utilizaram ácido cítrico a 1%, um dos principais envolvidos no processo de DDE, associada a uma preparação de saliva artificial com mucina, com o objetivo de simular a película adquirida do esmalte, utilizando espécimes de esmalte/dentina bovino. Aqui, observamos um batente médio de 7,29 μm , valor abaixo do relatado pelas autoras (39,44 μm), que pode ser explicado tanto pela utilização de espécimes de esmalte/dentina humano, quanto pela nossa padronização na idade dos pacientes. Oliveira et al. (2020) relata que à medida que a idade do paciente aumenta, há uma perda significativa de concentração mineral no esmalte dentário, tornando-o mais susceptível a

desmineralizações. Entretanto, ao compararmos com modelos de espécimes humanos, observamos dados consistentes com outros estudos na literatura (16).

Os resultados aqui apresentados sugerem uma desmineralização subsuperficial profunda atingindo profundidades significativamente maiores que as relatadas na literatura, alcançando resultados estatísticos que podem comprovar este fato. Embora uma perda de superfície discreta tenha sido observada, a profundidade da lesão e $\Delta\Delta Z$ observadas podem representar um amolecimento subsuperficial encontrado mesmo em perdas de volume superficiais sutis.

O volume mineral do esmalte é relatado na literatura com uma faixa relativamente ampla (88 - 98 %) (10,29), de modo que um volume mineral de 90% poderia representar tanto um esmalte não desmineralizado (originalmente com 90% de volume mineral), quanto uma perda de 8% de volume mineral, em um esmalte originalmente com 98% de volume mineral. Os dados disponíveis sobre profundidade de desmineralização em lesões de DDE no esmalte não especificam o limiar de detecção de perda de conteúdo mineral da técnica de análise. Neste contexto, a comparação entre camadas sucessivas abaixo da mesma superfície que sofreu o desafio corrosivo e a ausência de sensibilidade de detecção de perda mineral são limitações nos dados disponíveis. Em nosso estudo, a perda de volume mineral foi quantificada levando em consideração uma área controle e uma área submetida ao desafio erosivo, evidenciando uma alteração no volume da estrutura após DDE.

Nossos resultados evidenciaram uma resistência à fratura diminuída nas áreas submetidas ao DDE, o que entra em acordo com evidências científicas que demonstram uma maior susceptibilidade da síndrome do dente fraturado em pacientes que apresentam DDE (30). Sabe-se que o fosfato desempenha um papel na eluição de proteínas do esmalte dental, separando-as dos cristalitos minerais (31) e, que a remoção do componente orgânico promove uma diminuição na resistência à fratura dessa estrutura (27). Baldassarri, Margolis & Beniash (2008) apontaram que após a remoção da matéria orgânica do esmalte, os cristalitos minerais ficaram mais desnudos ao microscópio eletrônico de varredura, indicando uma separação das proteínas da superfície mineral. A desmineralização profunda no esmalte aqui apresentada promove a remoção de íons fosfato da estrutura dos cristais e sua liberação para a fase líquida dos poros

do esmalte, desta maneira, o fosfato teria promovido uma desunião das proteínas do esmalte com os cristalitos minerais, reduzindo a resistência à fratura.

Este amolecimento subsuperficial é possível provavelmente devido à penetração das moléculas envolvidas no DDE extrínseco, como o ácido cítrico (tamanho aproximado de 0,69nm – tabela 2) por meio do sistema de nanocanais presentes do esmalte dentário (que medem cerca de 2 a 6 nm de diâmetro). Além disso, levando em consideração o aumento gradual no grau de porosidade e solubilidade à medida em que a profundidade se estende a JAD (11,14), tais moléculas poderiam transportar-se para o interior do esmalte dentário promovendo a dissolução da estrutura também nas camadas mais internas. Esta teoria pode ser reforçada pela equação de Einstein de difusão (32), que prevê que a difusão para partes mais internas dos nanocanais do esmalte é mais facilitado do que em direção às paredes dos nanocanais (33), onde o ácido dissolveria os cristalitos minerais e os íons dissolvidos atuariam como tampão para neutralizar a desmineralização, facilitando assim a sua penetração.

Desta maneira, o estudo das características histopatológicas do DDE extrínseco nas camadas subsuperficiais e profundas do esmalte torna-se de fundamental relevância, visto que, a partir do melhor entendimento deste processo, novas modalidades de tratamento e prevenção podem ser desenvolvidas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que, embora alterações superficiais discretas sejam observadas, a desmineralização subsuperficial profunda na erosão dentária extrínseca pode ser bem mais profunda do que aquela acreditada atualmente, e afeta diretamente na resistência à fratura do esmalte dentário.

REFERÊNCIAS

1. Carvalho TS, Lussi A. Chapter 9: Acidic beverages and foods associated with dental erosion and erosive tooth wear. Zohoori FV, Duckworth RM, editors. *Monogr Oral Sci.* 2020;28:91–8.
2. Schlueter N, Luka B. Erosive tooth wear - A review on global prevalence and on its prevalence in risk groups. *Br Dent J [Internet]*. 2018;224(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.167>
3. Costa FCM da, Fernandes LHF, Moura EF de F, Aguiar YPC, Santos FG dos, Cavalcanti AL. Oral health habits, prevalence of dental caries and dental erosion in adolescents. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia.* 2017;65(3):202–7.
4. Santana NMS, Silva DR, Paiva PRR, Cardoso AMR, Silva ACB. Prevalência de erosão dentária e fatores associados em uma população de escolares. *Rev Odontol UNESP [Internet]*. 2018;47(3):155–60. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/rounosp/v47n3/1807-2577-rounosp-47-3-155.pdf>
5. Lussi A, Buzalaf MAR, Duangthip D, Anttonen V, Ganss C, João-Souza SH, et al. The use of fluoride for the prevention of dental erosion and erosive tooth wear in children and adolescents. *European Archives of Paediatric Dentistry [Internet]*. 2019;20(6):517–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s40368-019-00420-0>
6. Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, et al. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear—diagnosis and management. *Clin Oral Investig.* 2015;19(7):1557–61.
7. Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, et al. Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):2–6.
8. Hermont AP, Oliveira PAD, Martins CC, Paiva SM, Pordeus IA, Auad SM. Tooth erosion and eating disorders: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(11).
9. Shellis P. Etiology and Pathogenesis of Caries. In: Meyer-Lueckel H, Paris S, Ekstrand KR, editors. *Caries Management - Science and Clinical Practice.* 1st ed. Stuttgart: Thieme; 2013. p. 23–39.
10. Sousa FB, Vianna SS, Santos-Magalhães NS. A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel mineral content using polarizing microscopy. *J Microsc.* 2006;221(2):79–83.

11. Shellis RP r., Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the Chemistry of Dental Erosion. *Erosive Tooth Wear: From Diagnosis to Therapy*. 2014;25:163–79.
12. Zahradnik RT, Moreno EC. Structural features of human dental enamel as revealed by isothermal water vapour sorption. *Arch Oral Biol*. 1975;20(5–6):317–25.
13. Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the Chemistry of Dental Erosion. Vol. 20, *Monogr Oral Sci*. 2006.
14. Macena MSA, de Alencar E Silva Leite ML, de Lima Gouveia C, de Lima TAS, Athayde PAA, de Sousa FB. A comparative study on component volumes from outer to inner dental enamel in relation to enamel tufts. *Arch Oral Biol*. 2014;59(6):568–77.
15. Cougot N, Douillard T, Dalmas F, Pradelle N, Gauthier R, Sanon C, et al. Towards quantitative analysis of enamel erosion by focused ion beam tomography. *Dental Materials [Internet]*. 2018;34(11):e289–300. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.08.304>
16. Eisenburger M, Shellis RP, Addy M. Scanning electron microscopy of softened enamel. *Caries Res*. 2004;38(1):67–74.
17. Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C. Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: An in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. *Eur J Oral Sci*. 2009;117(4):427–34.
18. Shellis RP, Dibdin GH. Enamel microporosity and its functional implications. In: Teaford MF, Smith MM, Fergunson MW, editors. *Development, function and evolution of teeth*. New York: Cambridge University Press; 2000. p. 242–51.
19. Scaramucci T, Borges AB, Lippert F, Zero DT, Aoki I v., Hara AT. Anti-erosive properties of solutions containing fluoride and different film-forming agents. *J Dent*. 2015;43(4):458–65.
20. Roque-Torres GD, Kwon SR, Oyoyo U, Li Y. Measurement of erosion depth using microcomputed tomography and light microscopy. *Microsc Res Tech*. 2020;(January):1–6.
21. Marconi M de A, Lakatos EM. Lakatos, Eva Maria, and Marina de Andrade MARCONI. "Metodologia do trabalho científico: projetos de pesquisa, pesquisa bibliográfica, teses de doutorado, dissertações de mestrado, trabalhos de conclusão de curso. São Paulo: Editora Atlas. 2017.
22. Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta M. CRIS guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro

- studies in experimental dental research. *Journal of Conservative Dentistry*. 2014;17(4):301–4.
23. Wasserstein RL, Lazar NA. The ASA's Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose. *American Statistician* [Internet]. 2016;70(2):129–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00031305.2016.1154108>
 24. Wasserstein RL, Schirm AL, Lazar NA. Moving to a World Beyond “ $p < 0.05$.” *American Statistician*. 2019;73(sup1):1–19.
 25. Barreto De Oliveira RD, de Sousa FB, Algarni AA, Eckert GJ, Hara AT. Susceptibility of Dental Enamel of Different Ages to Caries-Like Lesion Development. *Caries Res*. 2020;54(5–6):475–82.
 26. de Medeiros RCG, Soares JD, de Sousa FB. Natural enamel caries in polarized light microscopy: Differences in histopathological features derived from a qualitative versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence. *J Microsc*. 2012 May;246(2):177–89.
 27. Baldassarri M, Margolis HC, Beniash E. Compositional Determinants of Mechanical Properties of Enamel. *J Dent Res* [Internet]. 2008;87(7):645–9. Available from: <http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/87/7/645/DC1>.
 28. Anstis GR, Chantikul P, Lawn BR, Marshall DB. A Critical Evaluation of Indentation Techniques for Measuring Fracture Toughness: I, Direct Crack Measurements. *Journal of the American Ceramic Society*. 1981;64(9):533–8.
 29. Angmar B, Carlström D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *Journal of Ultrastructure Research*. 1963;8(1–2):12–23.
 30. Geurtsen W, Dent M, Schwarze T, Günay H. Restorative Dentistry Diagnosis, therapy, and prevention of the cracked tooth syndrome. *Quintessence Int (Berl)*. 2003;34(6):409–17.
 31. Robinson C, Brookes SJ, Kirkham J, Bonass WA, Shore RC. Crystal growth in dental enamel: the role of amelogenins and albumin. *Adv Dent Res*. 1996;10(2).
 32. Dusenbury DB. *Living at micro scale*. Cambridge: Harvard University Press; 2009. 448 p.
 33. Wright JT, Lord V, Robinson C, Shore R. Enamel ultrastructure in pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1992;21(9):390–4.

ANEXOS

Anexo A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da desmineralização subsuperficial e efeito da infiltração de flúor por fluxo eletrocínético no esmalte no desgaste dental erosivo extrínseco

Pesquisador: JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42990721.8.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.563.868

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa de JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO do PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA da UFPB com a orientação do Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a profundidade da desmineralização subsuperficial no esmalte causada por erosão dental extrínseca e o efeito da aplicação de flúor pelo fluxo eletrocínético no processo de erosão dental extrínseca do esmalte dental.

Específicos:

Abaixo estão listados os objetivos específicos, que serão avaliados após erosão dental extrínseca precedido de três tratamentos: sem tratamento (grupo controle negativo), aplicação de verniz fluoretado (grupo referência), aplicação de solução fluoretada na superfície (grupo controle positivo) e infiltração de flúor por FEC (grupo experimental).

- avaliar quantitativamente a perda de espessura de esmalte por meio de perfilometria óptica;
- avaliar desmineralização subsuperficial no esmalte através de microtomografia computadorizada tridimensional de raios-x (microCT);
- avaliar quantitativamente profundidade de desmineralização através de microtomografia computadorizada tridimensional de raios X (microCT) com imersão em solução de Thoulet (solução

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 4.563.868

- de iodeto de potássio com índice de refração de 1,40);
- d) avaliar quantitativamente profundidade de desmineralização através de microscopia de luz polarizada com imersão em quinolina;
- e) comparar o efeito protetor da infiltração do flúor com a aplicação tópica de verniz fluoretado e um grupo controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não representar completamente a resposta do tratamento in vivo.

Benefícios: Compreender melhor a histopatologia da erosão dentária extrínseca; Investigar uma ferramenta importante para a infiltração de materiais no esmalte dentário e consequente proteção contra os desafios erosivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para o seu desenvolvimento, serão obtidos 64 terceiros molares mandibulares, a partir de doação de pacientes entre 17 e 23 anos. Esta faixa etária será selecionada uma vez que a susceptibilidade à desmineralização do esmalte dentário aumenta conforme com a idade do paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Anexados.

Recomendações:

Todos os resultados de uma pesquisa deverão ser divulgados junto aos participantes da mesma, assim como na(s) instituição(ões) onde os dados foram obtidos. ACONSELHAMOS A TODOS OS PESQUISADORES (RESPONSÁVEL/ASSOCIADO/ASSISTENTE) QUE ANTES DO ENVIO DE QUALQUER PROTOCOLO DE PESQUISA, VIA PLATAFORMA BRASIL, SEJA FEITA UMA LEITURA DA RESOLUÇÃO N. 466/12, ASSIM COMO DA NORMA OPERACIONAL N. 001/13, AMBAS DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero este projeto APROVADO.

Este é meu parecer, salvo melhor juízo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 4.563.868

Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1686995.pdf	05/02/2021 19:48:51		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_PLATAFORMA_BRASIL.pdf	05/02/2021 19:47:27	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ANUENCIA_LAMIB.pdf	05/02/2021 19:42:22	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ANUENCIA_LABIO.pdf	05/02/2021 19:42:15	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CERTIDAO_DE_HOMOLOGACAO_PP GO.pdf	05/02/2021 19:42:08	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
Outros	TERMO_DOACAO_BANCO_DE_DENTES.pdf	05/02/2021 19:41:13	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_CD.pdf	05/02/2021 19:38:30	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	05/02/2021 19:32:07	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	05/02/2021 19:32:01	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	APENDICE_A_TCLE.pdf	05/02/2021 19:31:15	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_COMPROMISSO_DO_PESQUISADOR.pdf	05/02/2021 19:27:35	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO.pdf	05/02/2021 19:26:58	JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO	Aceito

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
 Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
 UF: PB Município: JOAO PESSOA
 Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB



Continuação do Parecer: 4.563.868

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 27 de Fevereiro de 2021

Assinado por:

**Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))**

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

APÊNDICE

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido

O(A) Sr.(a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada: ANÁLISE DA DESMINERALIZAÇÃO SUBSUPERFICIAL E EFEITO DA INFILTRAÇÃO DE FLÚOR POR FLUXO ELETROCINÉTICO NO ESMALTE NO DESGASTE DENTAL EROSIVO EXTRÍNSECO, desenvolvida por **JOHNATAN MEIRELES DO NASCIMENTO**, aluno regularmente matriculado no PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do professor Drº. Frederico Barbosa de Sousa.

O objetivo geral da pesquisa é: investigar a profundidade da desmineralização subsuperficial no esmalte causada por erosão dental extrínseca e o efeito da aplicação de flúor pelo fluxo eletrocinético no processo de erosão dental extrínseca do esmalte dental. Os objetivos específicos são: a) avaliar quantitativamente a perda de espessura de esmalte por meio de perfilometria óptica; b) avaliar desmineralização subsuperficial no esmalte através de microtomografia computadorizada tridimensional de raios-x (microCT) c) avaliar quantitativamente profundidade de desmineralização através de microscopia de luz polarizada com imersão em quinolina; d) comparar o efeito protetor da infiltração do flúor com a aplicação tópica de verniz fluoretado e um grupo controle

Justifica-se o presente estudo por ser necessária uma melhor compreensão do aspecto histopatológico da lesão erosiva extrínseca no esmalte dental humano, além do desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas a serem utilizadas na sua prevenção e tratamento. A literatura sobre o tema apresenta algumas lacunas, fato que despertou real interesse em estudá-lo e divulgá-lo.

A participação do(a) sr.(a) na presente pesquisa é de fundamental importância, mas será voluntária, não lhe cabendo qualquer obrigação de fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelos pesquisadores, se não concordar com isso. Do mesmo modo, participando ou não, nenhum valor lhe será cobrado, como também não lhe será devido qualquer valor.

Caso decida não participar do estudo, ou decidir, a qualquer momento, dele desistir, nenhum prejuízo lhe será atribuído, sendo importante o esclarecimento de que os riscos da sua participação são considerados mínimos, limitados à possibilidade de eventual desconforto psicológico ao realizar a doação do dente extraído, enquanto que, em contrapartida, os benefícios obtidos com este trabalho serão importantíssimos e traduzidos em esclarecimentos para a população estudada.

Em todas as etapas da pesquisa, serão fielmente obedecidos os Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos, conforme Resolução nº. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que disciplina as pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil.

Solicita-se, ainda, a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos científicos ou divulgá-los em revistas científicas, assegurando-se que o seu nome será mantido no mais absoluto sigilo por ocasião da publicação dos resultados.

Caso a participação de vossa senhoria implique em algum tipo de despesas, as mesmas serão ressarcidas pelo pesquisador responsável, o mesmo ocorrendo caso ocorra algum dano.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Eu, _____,
declaro que fui devidamente esclarecido (a) quanto aos objetivos, justificativa, riscos e benefícios da pesquisa, e dou o meu consentimento para dela participar e para a publicação dos resultados, assim como o uso de minha imagem nos slides destinados à apresentação do trabalho final. Estou ciente de que receberei uma cópia deste documento, assinada por mim e pelo pesquisador responsável. Como trata-se de um documento em duas páginas, a primeira deverá ser rubricada tanto pelo pesquisador responsável quanto por mim.

João Pessoa-PB, ____ de _____ de 2021.

Johnatan Meireles do Nascimento
Pesquisador responsável

Participante da Pesquisa

Pesquisador Responsável: Johnatan Meireles do Nascimento

Endereço do Pesquisador Responsável: Rua José Firmino Ferreira, 800 –
Bairro Água Fria – João Pessoa-PB - CEP: 58.053-022- Fone: 99654-1273
- E-mail: johnatanmeireles@hotmail.com

E-mail do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal da Paraíba: eticaccs@ccs.ufpb.br – fone: (83)
3216-7791 – Fax: (83) 3216-7791

Endereço: Cidade Universitária – Campus I – Conj. Castelo Branco –
CCS/UFPB – João Pessoa-PB - CEP 58.051-900

OBSERVAÇÃO: No caso do pesquisado ser analfabeto, deverá ser colocado o quadrículo para colocação da impressão datiloscópica, assim como deverá ser inserido o espaço para colocação da assinatura de uma testemunha.

Johnatan Meireles do Nascimento
Pesquisador responsável



Participante da pesquisa

Apêndice B – Termo de doação do dente humano

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – PPGO
LABORATÓRIO DE MICROSCOPIA E IMAGEM BIOLÓGICA – LAMIB

TERMO DE DOAÇÃO DO DENTE HUMANO

Eu, _____
R.G. nº _____, residente na _____,
bairro _____, cidade _____, CEP _____ UF _____,
autorizo a doação do dente para o Banco de Dentes Humanos do Curso de
Odontologia da UFPB declarando que estes dentes foram extraídos por
indicação de um cirurgião dentista.

Estou ciente de que estes dentes serão utilizados para a realização de pesquisas
previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa ou em atividades
didáticas no processo de ensino-aprendizagem da Odontologia.

_____, _____ de _____, de 2021

Assinatura do responsável