



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

LoyaneFranio Batista de Melo

**AVALIAÇÃO DO EFEITO REMINERALIZADOR DA CASEÍNA FOSFATO DE
CÁLCIO FOSFOPEPTÍDEO AMORFO - CPP-ACP NAS LESÕES INICIAIS DE
CÁRIE EM DENTES DECÍDUOS E PERMANENTES; ESTUDO “*IN VIVO*”**

**Dissertação apresentada como
requisito para a obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde
da Universidade de Brasília.**

Orientador: Professora Ana Cristina Barreto Bezerra

Brasília

2012

*Dedico meumestradoaomeumarido e
companheiro que, sempre está ao
meu lado e que, no período da
pesquisa, me ajudou
de uma forma muito especial, com
atenção e compreensão. Com
certeza, o meu sucesso é graças ao
seu apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me dado saúde e força para concluir minha pesquisa. Agradeço, também, a todos que, de alguma forma, participaram de mais essa etapa da minha vida, em especial aos professores e aos pacientes que me ajudaram a tornar o meu sonho realidade.

RESUMO

Apesar do declínio na incidência e prevalência da cárie dentária, essa doença ainda está bastante presente na população e é o maior problema de saúde bucal. Atualmente, a odontologia de mínima intervenção é o conceito utilizado para o tratamento da cárie. Esforços tem sido realizados no sentido de se obter materiais que possam paralisar as lesões cariosas o mais precocemente possível. A caseína fosfato de cálcio fosopeptídeo amorfo (CPP-ACP), composto derivado da caseína, apresenta potencial remineralizador, impedindo que a lesão cariosa avance. Esse estudo *in vivo* foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da remineralização do CPP-ACP *moussenas* lesões de mancha branca de cárie em dentes decíduos e permanentes. Dezoito crianças (idade de 4- 8 anos) com 81 lesões de mancha branca foram divididas aleatoriamente em dois protocolos de tratamento: A) grupo teste, que recebeu aplicações da *mousse* 2 vezes por semana, durante 6 semanas; B) grupo controle, que recebeu aplicações de verniz de flúor 2,26% uma vez por semana, durante 4 semanas. Todas as crianças receberam instrução de higiene bucal e recomendações quanto à escovação diária por meio do uso de escova e dentifrício fluoretado, sob supervisão de um adulto. Um examinador cego avaliou as crianças em 3 momentos distintos: exame inicial (T0), exames com 3 (T1) e 12 (T2) semanas após a primeira visita, avaliando os índice de placa visível (IPV), índice de sangramento gengival (ISG) e o ICDAS. As lesões de mancha branca foram fotografadas com uma câmera digital (Canon), as fotos foram padronizadas e um software foi utilizado para gerar dados em pixels. Esses dados foram analisados pelo teste G ajustado (Willians), qui-quadrado et-teste de Student. Os dois tratamentos resultaram em melhoras significativas na redução do tamanho da área das lesões de mancha branca, em comparação com o exame inicial. Os dentes decíduos e anteriores responderam melhor à terapia com o CPP-ACP do que os dentes permanentes e posteriores. No critério visual, o grupo teste apresentou diferença estatisticamente significante na comparação dos momentos T0 X T1 e T0 X T2. A pesquisa concluiu que a *mousse* de CPP-ACP é efetivo na remineralização de lesões iniciais de cárie em dentes decíduos e permanentes.

Palavras Chave: remineralização do esmalte, lesão de mancha branca, CPP-ACP

RESUMO INGLÊS

Despite the decline in the incidence and prevalence of dental caries, this disease is still present in the population and is the largest oral health problem. Currently, the minimum intervention in dentistry is the term used for the treatment of caries. Efforts have been made in order to obtain materials that could stop the caries lesions as early as possible. Casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate (CPP-ACP), casein-derived compound, has remineralizing potential, preventing carious lesion progression. This *in vivo* study was conducted to evaluate remineralization effects of CPP-ACP mousse on white-spot lesion in primary and permanent teeth. Eighteen children (age from 4-8) exhibiting 81 white-spot lesions sites were randomly divided into two treatments protocols: A) test group received applications of the remineralizing mousse twice a week for six weeks; B) control group received applications of a 2.26% fluoridated coating once a week for four weeks. A blind examiner evaluated the children at three different moments: baseline (T0), 3 (T1) and 12 (T2) weeks after the first visit, recorded the indices of visible plaque (IVP) and gingival bleeding (IGB) and ICDAS and photographed the lesions with a digital camera. The photos were standardized and a software was used to generate values in pixels. Data was analyzed with aid of G (Williams), chi-square and Student t-test. The two treatments resulted in significant improvements in reducing the size of the white-spot lesion area, in comparison to the baseline. The primary and anterior teeth responded better to therapy with CPP-ACP than the permanent and posterior teeth. In the visual criterion, there was statistically significant difference in the test group at the moments T0 x T1 and T0 x T2. The CPP-ACP crème is effective in remineralizing early enamel lesions of the primary and permanent teeth.

Key words: Enamel remineralization; white-spot lesion; CPP-ACP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fotografiado dente 53 padroniza, com iluminação otimizada e contraste intensificado.
- Figura 2: Fotografia inicial (T0) dente 82 do grupo teste, ICDAS código 2.
- Figura 3: Fotografia T1 do dente 82 do grupo teste, ICDAS código 0.
- Figura 4: Fotografia inicial (T0) dente 73 do grupo teste, ICDAS código 2.
- Figura 5: Fotografia (T2) dente 73 do grupo teste, ICDAS código 1.

LISTA DE TABELAS

- **Tabela 1-** Distribuição da quantidade de superfícies com lesões de mancha branca com os scores 0, 1, 2 e 3 de mancha branca utilizado pelo critério do ICDAS nos momentos T0, T1 e T2, grupo teste
- **Tabela 2-** Distribuição da quantidade de superfícies com lesões de mancha branca com os scores 0, 1, 2 e 3 de mancha branca utilizado pelo critério do ICDAS nos momentos T0, T1 e T2, grupo controle
- **Tabela 3-** Distribuição dos valores médios, desvio padrão ($\pm dp$) e comparação entre os grupos teste e controle das áreas das manchas brancas, em pixels, nos momentos T0, T1 e T2
- **Tabela 4-** Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T0 e T1 para os grupos teste e controle, de acordo com a localização do dente
- **Tabela 5 -** Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T0 e T2 para os grupos teste e controle, de acordo com a localização do dente
- **Tabela 6-** Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T1 e T2 para os grupos teste e controle, de acordo com a localização do dente
- **Tabela 7-** Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T0 e T1 para os grupos teste e controle, de acordo com o tipo do dente
- **Tabela 8-** Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T0 e T2 para os grupos teste e controle, de acordo com o tipo do dente
- **Tabela 9-** Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T1 e T2 para os grupos teste e controle, de acordo com o tipo do dente

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACP- fosfato de cálcio amorfo
- Ca- cálcio
- ceo-d- índice de dentes decíduos perdidos, obturados e cariados
- CPP- caseína fosfopeptídeo
- CPP-ACP- caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo
- ICDAS -International Caries Detection and Assessment System
- IPV- índice de placa visível
- ISG- índice de sangramento gengival
- P- fosfato
- NaF- fluoreto de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO (REVISÃO DE LITERATURA)	pg. 10
2. OBJETIVOS	pg. 14
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	pg. 14
2.2. Objetivos específicos	pg. 14
3. MÉTODOS.....	pg. 15
4. RESULTADOS.....	pg. 18
5. DISCUSSÃO.....	pg. 24
6. CONCLUSÃO	pg. 28

INTRODUÇÃO (REVISÃO DE LITERATURA)

Nos últimos anos, avanços científicos na patogênese e prevenção de doenças bucais levaram a um melhor entendimento da doença cárie, tornando a manutenção da saúde bucal mais eficiente. Apesar do declínio na incidência e prevalência da cárie dentária, a doença é ainda o principal problema de saúde bucal dos brasileiros e alguns grupos populacionais, como crianças e adolescentes, ainda são considerados de alto risco. Dados do último levantamento epidemiológico nacional demonstraram um índice de dentes decíduos perdidos, obturados e cariados (ceo-d) de 2,3 para as crianças de 5 anos e de 2,1 para aquelas com 12 anos de idade. Nesta faixa etária, 56% das crianças ainda são afetadas pela cárie dentária [1].

As estruturas mineralizadas do dente interagem constantemente com fluidos bucais e com o biofilme dental. Para que a condição de saúde seja mantida, é necessário haver um equilíbrio entre os processos de desmineralização-rem mineralização [2,3]. Quando ocorre uma alteração do equilíbrio neste processo, com predominância de desmineralização, o esmalte inicia uma perda de íons Ca, P e outros íons para o meio bucal em virtude da queda do pH (menor que 5,5). Assim inicia-se a formação da lesão de cárie que, clinicamente é diagnosticada como uma lesão de mancha branca na superfície do esmalte [4]. Esta mancha branca está localizada frequentemente onde ocorre o acúmulo de placa bacteriana, sendo os sítios mais comuns de aparecimento as margens cervicais de superfícies lisas e os sulcos, cicatrículas e fissuras oclusais. A lesão inicial de cárie pode ser ativa, apresentando-se de cor branca, superfície rugosa e opaca; ou inativa, que apesar da coloração esbranquiçada, possui aspecto liso e brilhante [2,4].

A severidade das lesões de mancha branca podem ser medidas de acordo com o critério do International Caries Detection and Assessment System (ICDAS), que é um sistema padronizado de quantificação universal de cárie que facilita a comparação entre os estudos. Esse sistema permite a classificação da cárie dentária desde um nível inicial e não cavitado até cavidades extensas, com base na avaliação visual da superfície do dente, sendo considerado também um instrumento

de diagnóstico, uma vez que representa o que acontece no momento do exame e avalia o estágio de progressão da doença. O índice é classificado em: 0- nenhuma alteração visível; 1- primeira alteração visível em esmalte, observada apenas após secagem; 2- alteração visível em esmalte, sem secagem; 3- lesão de esmalte, com quebra de estrutura e sem atingir dentina; 4- sombreamento da dentina subjacente; 5- cavidade nítida com dentina exposta; 6- cavidade extensa com dentina exposta[5].

Atualmente, para se realizar uma odontologia de mínima intervenção, é necessário enfatizar a promoção e prevenção em saúde bucal. Dentro ainda deste conceito há sempre o esforço de reduzir o risco da evolução da cárie, para que não haja formação de cavidade; porém, se a cavidade já estiver presente, devem ser utilizadas técnicas e procedimentos que preservem a estrutura dentária, ou seja, uma odontologia minimamente invasiva. Se a cárie evoluir para um estágio mais avançado, pode causar dor e, dessa forma, interferir na participação e concentração da criança na escola, podendo influenciar negativamente nas suas condições psicológicas e emocionais [6]. Sendo assim, esforços tem sido realizados no sentido de se obter materiais que possam paralisar as lesões cariosas o mais precocemente possível.

A caseína, uma proteína do leite, apresenta potencial anticariogênico [7, 8 e 9]. Quando encontrada em alta concentração possui a capacidade de estabilizar o cálcio e o fosfato da superfície do dente, tornando o gradiente destes íons alto, promovendo remineralização.

A caseína fosfopeptídeo, conhecida pela sigla CPP, se liga ao fosfato de cálcio amorfo (ACP), formando o complexo CPP-ACP (caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo). Esta ligação, entretanto, é pH-dependente, só ocorrendo quando há queda no pH bucal. A caseína fosfopeptídeo apresenta a capacidade de se ligar aos íons cálcio e ao fosfato em nanopartículas, prevenindo, dessa forma, que os cristais cresçam até um tamanho crítico e se precipitem para fora da solução. O fosfato de cálcio amorfo apresenta a capacidade de liberar íons cálcio e fosfato no biofilme dental para manter um estado supersaturado, favorecendo, desta

maneira, o processo de remineralização[10,11,12]. Portanto, o CPP-ACP funciona como um reservatório de cálcio e fosfato, aumentando a concentração desses íons livres, que ajudam a manter um estado de supersaturação em relação ao esmalte do dente [10,13 e14].

Íons de fluoreto promovem a formação da fluorapatita no esmalte na presença de íons de cálcio e fosfato durante ao processo de desmineralização, causada pelos ácidos do biofilme dental . Sendo assim, a resistência da superfície dentária ao ácido é aumentada. Para a formação de uma unidade da fluorapatita, contudo, são necessários dois íons de flúor para cada dez íons de cálcio livres e seis de fosfato, também livres. Portanto, a disponibilidade desses íons livres é o fator limitante para ocorrer a remineralização dentária [3].

Além disso, o CPP-ACP pode ainda interagir com íons fluoreto, produzindo um efeito aditivo anticariogênico, por meio da formação de uma fase amorfa estabilizada de fosfato de cálcio fluoretado. Dessa forma tem sido sugerido o acréscimo de flúor ao CPP-ACP [10, 15 e 16].

O mecanismo anticariogênico do CPP-ACP e do flúor são distintos. Enquanto o primeiro se dissocia quando há queda no pH, formando íons que atuam prevenindo a desmineralização, o flúor age formando fluorapatita e promovendo remineralização[3].

O complexo CPP-ACP tem sido utilizado em vários produtos, como em bochechos, dentifrício, mousse e gomas de mascar [3,17]. As aplicações tópicas podem ser realizadas por meio de uma mousse, cujo nome comercial é *Tooth Mousse*, desenvolvido pela *GC Corporation* (Itabashi- Ku, Tokyo- Japão).No mecanismo de prevenção à cárie com o *Tooth Mousse*, dois processos devem ser considerados: a aceleração da remineralização por meio do aumento da concentração de cálcio e fosfato dentro da lesão desmineralizada e a inibição da desmineralização no local em que a solubilidade do fosfato na superfície do esmalte é diminuída como na saliva, superfície do esmalte ou placa bacteriana, mantendo-se em estado de supersaturação com os íons cálcio e fosfato proveniente do material.*

* *European Patent Specification*, 2004, ep 1 525 878 b1.

Ensaio clínicos randomizados *in situ* demonstraram resultados positivos para remineralização do esmalte dentário após receberem o CPP-ACP, presente tanto nas gomas de mascar [18, 19, 20], como no leite bovino [21]. Da mesma forma, estudos *in vitro* reportaram maior remineralização das lesões cáries quando receberam creme dental contendo CPP-ACP [6].

Na literatura ainda são poucos os estudos *in vivo* disponíveis. Nessas pesquisas, os resultados demonstram a eficiência do CPP-ACP, tanto em creme dental [22] quanto em aplicações tópicas do produto, *Tooth Mousse*[23, 24 e 25], em remineralizar manchas brancas de cárie.

Dessa forma, por haver poucos estudos *in vivo* e pela necessidade de se fundamentar melhor a eficácia do uso de produtos baseados no CCP-ACP, a presente investigação teve por objetivo avaliar clinicamente a capacidade de remineralização da caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo em lesões de mancha branca de cárie em dentes decíduos e permanentes, *in vivo*, tendo como base a classificação do progresso da lesão de cárie por meio do índice ICDAS.

2 OBJETIVOS

Estudos *in vivo* na forma de pesquisa clínica sobre a eficácia dos nanocomplexos de CPP-ACP são escassos na literatura científica e geralmente quando realizados são desenvolvidos como pesquisas *in vitro*. Portanto, esse estudo teve por objetivo:

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar clinicamente a capacidade de remineralização da caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo, de nome comercial *Tooth Mousse*, em lesões de mancha branca de cárie em dentes decíduos e permanentes, *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a possível redução da intensidade das manchas brancas, utilizando o índice ICDAS (critério visual), uma determinação qualitativa.
- Avaliar a possível remineralização das lesões de mancha branca com 6 e 12 semanas após a aplicação do CPP-ACP, utilizando a análise das fotografias, uma determinação quantitativa.
- Avaliar se houve diferença na remineralização entre dentes anteriores e posteriores.
- Avaliar se houve diferença na remineralização entre dentes decíduos e permanentes.

3 MÉTODOS

A amostra foi composta de crianças saudáveis, com faixa etária entre 4 e 8 anos de idade, estudantes de uma creche/escola de Brasília, DF. Todos os participantes vivem em região de água fluoretada.

Um total de 114 crianças da creche, na faixa etária do estudo, foram examinadas. De acordo com a classificação do ICDAS, 0- nenhuma alteração visível; 1- primeira alteração visível em esmalte, observada apenas após secagem; 2- alteração visível em esmalte, sem secagem; 3- lesão de esmalte, com quebra de estrutura e sem atingir dentina; 4- sombreamento da dentina subjacente; 5- cavidade nítida com dentina exposta; 6- cavidade extensa com dentina exposta [5], foram realizados os critérios de inclusão/exclusão.

Os critérios de inclusão foram: as crianças portadoras de lesões iniciais de cárie, mancha branca com classificação 1 ou 2 do ICDAS, na superfície vestibular e/ou oclusal de dentes decíduos e permanentes. As crianças portadoras de cárie com classificação 3, 4, 5 ou 6 do ICDAS, com uso crônico de medicações xerostômicas ou alérgicas à proteína do leite, foram excluídas.

Um total de 28 crianças preencheram os critérios de inclusão. No entanto, somente 18 apresentaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos pais ou responsáveis, formando, assim, a amostra do estudo.

As 18 crianças da amostra foram divididas em dois grupos (teste e controle) com 9 componentes cada. A composição de cada grupo foi regida por meio de sorteio em que os nomes dos participantes estavam em uma urna e o nome dos grupos em outra. Para cada nome de participante sorteado, era sorteado também um grupo. Este método garantiu uma formação aleatória e randomizada dos grupos. Assim, cada indivíduo teve chances iguais de participar de um grupo ou de outro.

No início do estudo (T0), todas as crianças e pais ou responsáveis de ambos os grupos receberam instruções de higiene bucal e recomendações quanto à escovação diária por meio do uso de escova dental e dentífrico fluoretado, sob supervisão de um adulto. Além do tratamento proposto para as manchas brancas,

as crianças receberam todo o atendimento necessário para suprir suas necessidades odontológicas verificadas e colhidas durante a anamnese.

O grupo teste recebeu aplicação de mousse remineralizante contendo CPP-ACP (*Tooth Mousse*), duas vezes por semana, por 6 semanas. Antes da aplicação do produto foi realizada profilaxia. As aplicações foram feitas com moldeiras individuais, uma por vez, em cada arco durante 3 minutos, após profilaxia executada por profissional. Depois desse tempo, os pacientes foram instruídos a espalhar o produto pelas superfícies dos dentes com a língua, conforme as orientações do fabricante.

O grupo controle recebeu aplicação de verniz fluoretado a 2,26% (Fluorniz, S.S. White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) semanalmente, por 4 semanas. Antes da aplicação do verniz de flúor foi realizada profilaxia.

Em seguida, todas as crianças foram agendadas para avaliações de retorno de 6 (T1) e 12 semanas (T2), após a aplicação dos produtos. Nas consultas de retorno, todas as crianças receberam reforço de higiene bucal.

Um examinador cego, previamente calibrado, avaliou todas as crianças de ambos os grupos nesses três momentos da pesquisa (T0, T1, e T2), registrando os índices de placa visível (IPV), de sangramento gengival (ISG) e o ICDAS das manchas brancas de cada participante. Os dados coletados foram anotados em fichas específicas, confeccionadas para este fim (Anexo A e B). O IPV e ISG são os critérios indicados para a avaliação do estado de saúde bucal de um paciente. Os dois critérios foram utilizados de forma dicotômica.

O examinador avaliou clinicamente, no início da pesquisa (T0), todas as superfícies registrando 81 superfícies acometidas por lesões iniciais de cárie, distribuídas da seguinte forma: 41 lesões no grupo teste e 40 no grupo controle.

Todas as superfícies foram fotografadas em todos os momentos (T0, T1 e T2), com uma máquina fotográfica digital (Canon EOS Rebel T1I, Canon Inc., Nova York, Estados Unidos da América) com velocidade 1/160, diafragma regulado em F11, e ISO 400, utilizando uma lente macro (Canon EF-S 60 mm 1:2.8) com uma

distância focal de 0.2 m, iluminado artificialmente com um flash circular (Canon macro Ring Lite MR-14 EX) em ambiente com iluminação natural. As fotografias foram tiradas sempre no mesmo horário, com o paciente na mesma posição em todos os momentos, buscando-se obter imagens padronizadas. Além disso, foi ainda utilizado o programa Adobe Fireworks CS3, para padronizar por sobreposição e transparência, as fotografias das superfícies das manchas brancas em todos os momentos. Para melhorar e otimizar a iluminação das fotografias, foi utilizado o recurso efeito “auto levels.” O programa Corel Draw X5 foi utilizado para intensificar o contraste das imagens e realizar a vetorização, ou seja, evidenciar as áreas das manchas brancas. Por fim, o software Image J, gerou valores em pixels de cada superfície de mancha branca.



Figura 1: Fotografia dente 53 padronizada com iluminação otimizada e contraste intensificado.

Os dados dos IPV, ISG e ICDAS, nos 3 momentos da pesquisa (T0, T1 e T2), foram analisados estatisticamente utilizando o teste “t” de Student, para nível de significância de 5%. Para a análise comparativa das superfícies de manchas brancas entre os grupos, em todos os tempos, foram utilizados os testes: “t” de Student e qui-quadrado com correção de Yates, também a um nível de significância

de 5%. O teste G de Williams foi utilizado para a determinação da existência de diferença estatística nos dados do ICDAS.

O sigilo da criança foi garantido durante todo o estudo e posteriormente na divulgação dos resultados.

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, recebendo parecer favorável para sua execução. (CEP – FM 020/2011- UnB).

4 RESULTADOS

A amostra total foi composta de 18 crianças, que foram divididas aleatoriamente em 2 grupos: teste e controle. Durante o estudo, 2 crianças do grupo controle desistiram de participar, o que resultou em uma amostra final de 16 indivíduos.

Considerando-se o número de superfícies dentárias incluídas, no início da pesquisa (T0), um total de 41 fizeram parte do grupo teste e 40 do grupo controle. Na segunda avaliação, após 6 semanas (T1), tanto grupo teste quanto controle contaram com 40 superfícies cada. Por fim, no terceiro momento, após 12 semanas (T2), o número de superfícies avaliadas foi 33 para o grupo teste e 26 para o controle. O percentual total de perda amostral foi de 17,5% para o grupo teste e 35% para o grupo controle.

Inicialmente, a análise comparativa entre os grupos objetivou avaliar os IPV em todos os momentos (T0, T1 e T2). Os resultados não demonstraram ser significantes para nenhum momento ($p=0,3805$; $p=0,488$; $p=0,2992$). Da mesma forma, o ISG foi também comparado em todos os tempos, não demonstrando diferença estatisticamente significativa nos tempos T0, T1 e T2 ($p=0,2267$; $p=0,1993$, $p=0,455$)

Foi registrado o índice ICDAS nos 3 momentos da pesquisa. Para a determinação da existência de diferença estatística foi utilizado o Teste "G" ajustado (Williams). Os testes foram realizados para um nível de significância de 5 % ($p=0,05$). Para a comparação da amostra dentro do grupo teste, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os momentos T0x T1 e T0 x T2. No grupo controle a comparação entre os tempos não apresentou diferença estatisticamente significativa (tabelas 1 e 2) (figuras 1 - 4).

Tabela 1- Distribuição da quantidade de superfícies com lesões de mancha branca com scores 0, 1, 2 e 3 de mancha branca utilizado pelo critério do ICDAS nos momentos T0, T1 e T2, grupo teste

ICDAS	T0	T1	T2
0	0	6	7
1	10	10	14
2	38	31	18
3	0	1	1

Resultado: T0 x T1: $p=0,0343$; T0 x T2: $p= 0,0016$; T1 x T2: $p= 0,3656$.



Figura 2: Fotografia inicial (T0) dente 82 do grupo teste, ICDAS código 2.



Figura 3: Fotografia T1 do dente 82 do grupo teste, ICDAS código 0.

Tabela 2- Distribuição da quantidade de superfícies com lesões de mancha branca com scores 0, 1, 2 e 3 de mancha branca utilizado pelo critério do ICDAS nos momentos T0, T1 e T2, grupo controle

ICDAS	T0	T1	T2
0	0	2	1
1	9	8	6
2	32	31	20
3	0	0	0

Resultado: T0 x T1: $p= 0,2870$, T0 x T1: $p= 0,4805$; T1 x T2: $p= 0,9496$.



Figura 4: Fotografia inicial (T0) dente 73 do grupo teste, ICDAS código 2.

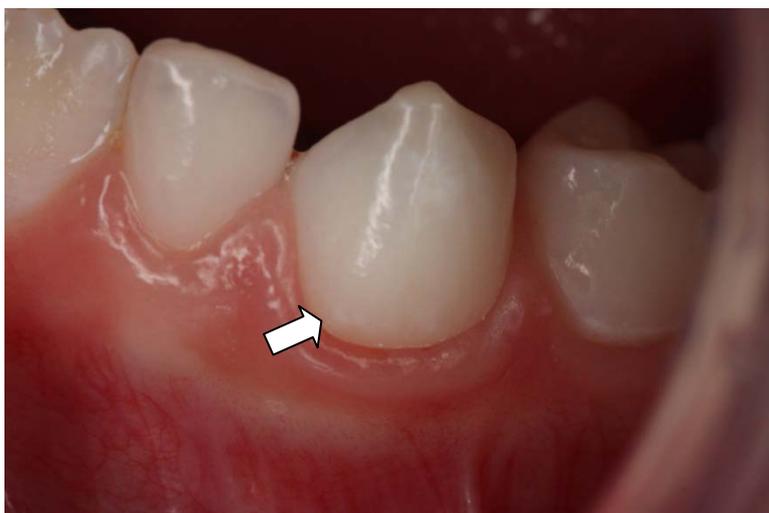


Figura 5: Fotografia (T2) dente 73 do grupo teste, ICDAS código 1.

Para avaliar o efeito remineralizador do CPP-ACP, foram realizadas fotografias das manchas brancas nos 3 momentos da pesquisa. Para cada grupo, teste e controle, foi calculado o valor médio (em pixels) referente a cada área das superfícies de mancha branca. A análise estatística, bem como os valores médios, com os respectivos desvios-padrão, em todos os tempos (T0, T1 e T2), estão disponibilizados na tabela 3.

Tabela 3-Distribuição dos valores médios, desvio padrão ($\pm dp$) e comparação entre os grupos teste e controle das áreas das manchas brancas, em pixels, nos momentos T0, T1 e T2

Grupo	T0	T 1	T 2
Teste	30,597,49 \pm 11.058,49	33.180,03 \pm 14.506,36	28.103,43 \pm 11.039,75
Controle	52.877,37 \pm 72.188,10	32.985,91 \pm 28.104,26	32.896,63 \pm 30,846,60
<i>p</i>	0,2011	0,49328	0,3544

Cada superfície dentária foi analisada individualmente em todos os tempos. Todas as superfícies que apresentaram diferença estatisticamente significativa, em cada grupo, foram divididas em posterior ou anterior, dependendo da localização do dente portador da superfície com lesão de mancha branca. Nova análise estatística foi realizada em todos os tempos, conforme reportado nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4-Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T0 e T1 para os grupos teste e controle, de acordo com a localização do dente

T0 X T1	Grupo teste	Grupo controle	
Anterior significante	25	24	p=0,8864
Posterior significante	9	13	p=0,3938
total	34	37	
	p=0,0101*	p=0,1002	

*Estatisticamente significativa considerando o nível de significância de 5%.

Tabela 5 -Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T0 e T2 para os grupos teste e controle, de acordo com a localização do dente

T0 X T2	Grupo teste	Grupo controle	
Anterior significante	22	15	p=0,3239
Posterior significante	9	6	p=0,6056
total	31	21	
	p= 0,0311*	p= 0,0809	

*Estatisticamente significativa considerando o nível de significância de 5%.

Tabela 6-Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T1 e T2 para os grupos teste e controle, de acordo com a localização do dente.

T1 X T2	Grupo teste	Grupo controle	
Anterior significante	23	18	p=0,5322
Posterior significante	9	4	p=0,2673
total	32	22	
	p=0,0216*	p=0,0056*	

*Estatisticamente significativa considerando o nível de significância de 5%.

Por fim, todas as superfícies que apresentaram diferença estatisticamente significativa de cada grupo foram divididas entre dentes decíduos e permanentes.

Os resultados da comparação analítica dos grupos, em todos os tempos, encontram-se nas tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7-Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T0 e T1 para os grupos teste e controle, de acordo com o tipo do dente

T0 X T1	Grupo teste	Grupo controle	
permanente	3	10	p=0,0961
decíduo	31	27	p=0,6936
total	34	37	
	p<0,0001*	p=0,0085	

*Estatisticamente significativa considerando o nível de significância de 5%.

Tabela 8 - Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T0 e T2 para os grupos teste e controle, de acordo com o tipo do dente

T0 X T2	Grupo teste	Grupo controle	
permanente	3	8	p=0,2278
decíduo	28	13	p=0,0288
total	31	21	
	p<0,0001*	p=0,3827	

*Estatisticamente significativa considerando o nível de significância de 5%.

Tabela 9- Distribuição e comparação da amostra entre os tempos T1 e T2 para os grupos teste e controle, de acordo com o tipo do dente

T1 X T2	Grupo teste	Grupo controle	
permanente	4	9	p=0,2673
decíduo	28	13	p=0,0288
total	32	22	
	p<0,0001*	p=0,5224	

*Estatisticamente significativa considerando o nível de significância de 5%.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para avaliar clinicamente a capacidade de remineralização da caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo em lesões de mancha branca de cárie, *in vivo*, tendo como base a classificação do progresso da lesão de cárie por meio do índice ICDAS. Compuseram a amostra dentes decíduos e permanentes de crianças com faixa etária entre 4 e 8 anos de idade.

Após exame inicial, um total de 81 superfícies com lesão de mancha branca foram incluídos na amostra. No decorrer da pesquisa, houve uma perda amostral de 17,5% para o grupo teste e de 35% para o grupo controle. Essa perda amostral aconteceu de maneira aleatória, mas refletindo diretamente sobre o grupo controle, uma vez que a maior parte das crianças desistentes foi desse grupo. A maior parte das perdas ocorreu em T2. Sendo assim, as diferenças significativas na amostra entre os grupos teste (33 lesões) e controle (26 lesões) só ocorreram nesta etapa. Estes percentuais de perda apesar de altos, não invalidam os resultados, mas devem ser analisados com cautela. [26]

A análise comparativa entre os grupos, não detectou diferença estatisticamente significativa com relação ao IPV e ao ISG. Esses dados confirmam o fato dos grupos apresentarem uma saúde bucal bastante similar refletido pelos cuidados diários e pelo controle de placa bacteriana, observado pela semelhança nos índices em todos os momentos. A literatura recomenda o uso desses índices para se avaliar a condição de saúde bucal dos pacientes, Silveira *et al.*, 2002; Toassi e Petry, 2002; Botelho *et al.* [27, 28 e 29]. Dessa forma, o resultado da aplicação do produto pode ser mais fielmente comparada entre os grupos (IPV, T0: $p=0,3805$; T1: $p=0,488$; T2: $p=0,2992$ e ISG, T0: $p=0,2267$; T1: $p=0,1993$, T2: $p=0,455$).

O ICDAS é um sistema de diagnóstico de cárie que permite a classificação da cárie dentária desde um nível inicial e não cavitado até cavidades extensas, com base na avaliação visual da superfície do dente. O índice é dividido em: 0- nenhuma alteração visível; 1- primeira alteração visível em esmalte, observada apenas após secagem; 2- alteração visível em esmalte, sem secagem; 3- lesão de esmalte, com

quebra de estrutura e sem atingir dentina; 4- sombreamento da dentina subjacente; 5- cavidade com dentina exposta; 6- cavidade extensa [5]. A análise comparativa dos dados do ICDAS dentro de cada grupo, detectou diferença estatisticamente significativa em dois momentos (T0 x T1 e T0 x T2) para o grupo teste (tabelas 1 e 2). Assim, pode-se inferir que na avaliação visual das manchas brancas, representado pelo índice ICDAS, houve uma melhora na aparência dessas manchas pelo CPP-ACP nesses dois momentos, dentro do grupo teste (figura 5 e 6). Esses resultados confirmam os achados de outros estudos prévios como Bailey *et al.*, 2009, em que as lesões tratadas com a mousse classificadas com código 2 ou 3, obtiveram um percentual 31% maior de remineralização do que as lesões tratadas com placebo [23].

Os tratamentos aplicados nos grupos teste e controle resultaram em melhoras significativas na redução do tamanho da área da mancha branca em comparação com o exame inicial, mas na comparação das áreas médias das lesões de mancha branca entre os grupos, a análise não demonstrou diferença significativa (tabela 3; T0: $p= 0,2011$; T1: $p= 0,49328$; T2: $p= 0,3544$). Os dois produtos, verniz fluoretado e *mousse*, não diferiram no controle das lesões iniciais de cárie. Contudo, não se pode afirmar, necessariamente, que os dois tratamentos são iguais. Para tanto, um teste de igualdade seria necessário com um grupo de estudo substancialmente maior. Andersson *et al.* (2007), em estudo *in vivo*, comparou aplicações tópicas diárias de creme dental contendo CPP-ACP (Topacal), por 3 meses seguidos por mais 3 meses, com dentifrício fluoretado e bochechos diários com enxaguatório bucal contendo 0,05% de fluoreto de sódio por 6 meses. Os autores constataram maior redução no grupo submetido ao CPP-ACP, com um percentual de 63% contra 25% do grupo com flúor. Zhang *et al.* (2011), em estudo *in vitro* com lesões iniciais e artificiais de esmalte em dentes decíduos, comprovou a eficiência do Tooth Mousse na remineralização das lesões iniciais de esmalte. Esses resultados são compatíveis com os encontrados nesse estudo.

O resultado da tabela 3 deve ser analisado com cautela, uma vez que as áreas das manchas brancas foram muito variadas na amostra, o que foi refletido pelo alto valor do desvio padrão. Outro fator que deve ser analisado com cautela é o possível viés de angulação das fotografias. Assim, optou-se por realizar a análise de

cada superfície de cada dente, individualmente, em todos os tempos, para que fosse observada se houve significância na remineralização das lesões de mancha branca em cada dente.

Para observar se ambos os produtos se comportaram da mesma maneira em dentes posteriores e anteriores, todas as manchas brancas que apresentaram diferença estatisticamente significativa, no decorrer do tempo, foram divididas entre anterior e posterior (tabelas 4, 5 e 6). Em todos os tempos observados, o grupo teste apresentou desempenho melhor (estatisticamente significativa) nos dentes anteriores quando comparado aos posteriores. O mesmo não foi observado com os controles. Esse fato demonstra que a remineralização das manchas brancas com o CPP-ACP foi melhor em dentes anteriores do que nos posteriores. Sugere-se que a anatomia de superfície lisa dos dentes anteriores possa ter favorecido a remineralização nesta região. E ainda pode ter ocorrido a influência da maneira como a mousse foi aplicada nas crianças, em moldeiras individuais, sendo que no espalhamento do produto pode ter ocorrido um favorecimento do contato do produto com o dente anterior. A literatura mostra fartamente, comonos estudos *in vivo* de Andersson *et al.* (2007), Bailey *et al.* (2009), Brochner *et al.* (2011) e Ferrazzano *et al.* (2011), que o CPP-ACP tem sucesso na remineralização das manchas brancas de cárie, porém não foram encontrados estudos avaliando separadamente o resultado em dentes anterior e posterior. Assim sendo, não foi possível uma comparação com outros trabalhos citados na literatura internacional utilizando essa variável. [22, 23, 24 e 25]

As manchas brancas que apresentaram diferença estatisticamente significativa, com o decorrer do tempo, também foram divididas entre dentes decíduos e permanentes para avaliar se o comportamento dos dois produtos foi igual nesses dentes (tabelas 7, 8 e 9). Em todos os tempos observados, o grupo teste apresentou desempenho melhor (estatisticamente significativa) nos dentes decíduos quando comparado aos dentes permanentes ($T_0 \times T_1 - p < 0,0001$; $T_0 \times T_2 - p < 0,0001$; $T_1 \times T_2 - p < 0,0001$). Ainda não foram realizados estudos que avaliam a remineralização separadamente em dentes decíduos e permanentes. Porém, encontra-se na literatura resultados eficientes tanto para dentes decíduos e permanentes. Zhanget *al* (2011) avaliou em seu estudo *in vitro* dentes incisivos

decíduos de crianças com 6 anos de idade e comprovou que o CPP-ACP apresenta potencial remineralizador para as lesões iniciais de cárie nesses dentes. [6]

Na análise entre os grupos, em dois momentos (T0 x T2 e T1 x T2), também houve diferença estatisticamente significativa, havendo uma melhor remineralização dos dentes decíduos do grupo teste em relação aos do grupo controle. Esses dados demonstram que a remineralização com o CPP-ACP foi mais eficiente nos dentes decíduos em relação aos dentes permanentes. Uma possível explicação para este fato é que a histologia e menor espessura de esmalte dos dentes decíduos possa ter favorecido a remineralização por meio do CPP-ACP. [30]

Existe uma boa evidência científica que a caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo pode remineralizar a superfície das lesões de esmalte como observado nos estudos de Reynolds (2008), Lijima (2003), Walker (2006) e Ferrazano (2011) [3, 18, 21 e 25]. É importante salientar que no presente estudo não foi utilizado placebo no grupo controle, uma vez que as crianças deste grupo apresentavam lesões de mancha branca que precisavam ser tratadas. A influência relativa da presença de flúor, creme dental e água fluoretada, pode ter tido ação somatória. Portanto, o mecanismo de ação no grupo teste pode ter sido resultado de uma combinação do CPP-ACP com o flúor.

Os resultados desta pesquisa, mostrando que a caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo apresenta propriedades remineralizantes de lesões iniciais de cárie, confirmam os achados de outros estudos prévios *in situ* [18, 19, 20 e 21], *in vitro* [6, 11, 16] e *in vivo* [22, 23 e 24 e 25]. Contudo, devido ao tamanho pequeno da amostra e do pouco tempo de acompanhamento do estudo, novas pesquisas são necessárias para maiores conclusões.

6 CONCLUSÃO

O CPP-ACP apresentou capacidade de remineralização clínica para as lesões de mancha branca de cárie em dentes decíduos e permanentes. O CPP-ACP reduziu a intensidade das manchas brancas, pelo critério ICDAS. Houve diferença na remineralização entre dentes anteriores e posteriores, sendo que o dente anterior apresentou uma remineralização melhor que o posterior com o CPP-ACP. Os dentes decíduos também remineralizaram melhor que os dentes permanentes com o CPP-ACP.

REFERÊNCIAS

- 1- Ministério da saúde. Levantamento epidemiológico de saúde bucal no Brasil. SB Brasil, 2010.
- 2- Maltz, M. et al. Cariologia clínica. In: Toledo, O. A. Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica. Ed Premier, São Paulo; 105-150, 2005.
- 3- Reynolds, E.C. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? Australian Dental Journal 53: 268-273, 2008.
- 4- Cate, J. M. *et al.* Interações químicas entre o dente e os fluidos orais. In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. Ed Santos, São Paulo; 49- 69, 2007.
- 5- Pitts, N. International Caries Assessment and Detection System. University of Dundee, UK; 2010 [atualizada em 2010 e último acesso 10 de fevereiro 2012]. Disponível em: <http://www.icdas.org>
- 6- Zhang, Q. *et al.* Remineralization effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate crème on artificial early enamel lesions of primary teeth. International Journal of Pediatric Dentistry 21: 374-381, 2011.
- 7- Schweigert, B.S. *et al.* Dental caries in the cotton rat. VI. The effect of the amount of protein, fat and carbohydrate in the diet on the incidence and extent of carious lesions. Journal of Nutr. 31: 439- 447, 1946.

- 8- Shaw, J.H; Ensfield, B. J; Wollman, D. H. Studies on the relation of dairy products to dental caries in caries- susceptible rats. *Journal of Nutr.* 67: 253- 273, 1959.
- 9- Rose, R.K. Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Oral Biology* 45: 569-575, 2000.
- 10- Reynolds, E.C. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Spec Care Dentistry* 18: 8-16, 1998.
- 11- Tantbirojn, D. *et al.* Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. *Journal of Dentistry* 36: 74-79, 2008.
- 12- Llana, C.; Forner, L.; Baca, P. Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. *Journal Contemp Dent Pract.*10(3): 1-9, 2009.
- 13- Reynolds, E.C., inventor. The University of Melbourne and the Victorian Dairy Industry Authority, assignees Anticariogenic phosphopeptides. US patent 5,015,628. May 14, 1991.
- 14- Adebayo, O.A.; Burrow, M.F.; Tyas, M.J. Dentine bonding after CPP-ACP paste treatment with and without conditioning. *Journal of Dentistry* 36: 1013-1024, 2008.

- 15-Reynolds, E. C. *et al.* Anticariogenicity of tryptic casein and synthetic-phosphopeptides in the rat. *Journal of Dentistry Research* 74: 1272- 1279, 1995.
- 16-Cochrane, N.J. *et al.* Enamel subsurface lesion remineralization with casein phosphopeptide stabilized solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Research* 42: 88-97, 2008.
- 17-Reynolds, E.C. *et al.* Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *Journal Dentistry Research* 82(3): 206- 11, 2003.
- 18-Lijima, Y. *et al.* Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide- amorphous calcium phosphate. *Caries Research* 38: 551- 556, 2004.
- 19-Schen, P. *et al.* Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide- amorphous calcium phosphate. *Journal Dentistry Research* 80: 2066-2070, 2001.
- 20-Cochrane, N. J. *et al.* Remineralization by chewing sugar-free gums in a randomized, controlled in situ trial including dietary intake and gauze to promote plaque formation. *Caries Research* 46 (2): 147:155, 2012.
- 21-Walker, G. *et al.* Increased remineralization of tooth enamel by milk containing added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of Dairy Research* 73: 74-78, 2006.

- 22- Andersson, A. *et al.* Effect of a dental cream containing amorphous calcium phosphate complexes on white spot lesion regression assessed by a laser fluorescence. *Oral Health Prevention Dentistry* 5: 229-233, 2007
- 23- Bailey, D.L. *et al.* Regression of post-orthodontic lesions by a remineralizing cream. *Journal Dentistry Research* 88(12): 1148-1153, 2009.
- 24- Brochner, A. *et al.* Treatment of post-orthodontic white spot lesions with casein phosphopeptide-stabilised amorphous calcium phosphate. *Clinical Oral Invest* 15: 369-373, 2010.
- 25- Ferrazzano, G. F. In vivo remineralizing effect of GC tooth mousse on early dental enamel lesions: SEM analysis. *International dental journal* 61 (4): 210, 2011.
- 26- Gomes, V. E. *et al.* Concentração de chumbo, defeitos de esmalte e cárie em dentes decíduos. *Revista de saúde pública* 38 (5), São Paulo, 2004.
- 27- Silveira, J. L. G. C. *et al.* Avaliação da redução do índice de placa visível e do índice de sangramento gengival em uma prática de promoção de saúde bucal com crianças. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 16 (2): 169-174, 2002.
- 28- Toassi, R. F. C; Petry, P. C. Motivação no controle do biofilme dental e sangramento gengival em escolares. *Revista de Saúde Pública* 36 (5): 634-7, 2002.
- 29- Botelho, K. *et al.*, Condição clínica dos primeiros molares permanentes: de crianças entre 6 e 8 anos de idade. *Odontol. Clín.Cient.* 10(2): 167-171, 2011.

30-Araújo, F. B. *et al.*, A estrutura da dentina do dente decíduo e sua importância clínica. *Revis. Bras. Odontol.* 52(3): 37-43, 1995.

ANEXOS

Anexo A- Ficha de Placa Visível e Ficha de Sangramento Gengival

Ficha número: _____

NOME: _____

DATA NASCIMENTO: _____

ÍNDICE: _____	DATA: ____/____/____
8 7 6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7 8	
ÍNDICE: _____	DATA: ____/____/____
8 7 6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7 8	
ÍNDICE: _____	DATA: ____/____/____
8 7 6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7 8	

Anexo C- Documento de aprovação do comitê de ética em pesquisa de seres humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília


 UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
 FACULDADE DE MEDICINA
 Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

CEP - FM
Nº _____

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Recebemos

EM. 02 / 06 / 11

Donis

Assinatura Matrícula

Registro de Projeto: CEP-FM 020/2011.

Título: "Avaliação do efeito remineralizador da caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo – CPP – ACP – nas lesões iniciais de cárie em dentes decíduos e permanentes, estudo in vivo".

Pesquisador Responsável: Loyane Franio Batista.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 17/03/2011.

Parecer do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 30/03/2011.

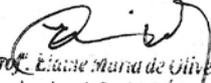
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 25/05/2011.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 25/05/2011, conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para 30 de novembro de 2011.

Brasília, 26 de Maio de 2011.


Profa. Eliane Maria de Oliveira Alvé:
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 Faculdade de Medicina-UNB

