

# Desenvolvimento de lesões de cárie em dentina em um modelo de biofilme simplificado *in vitro*: um estudo piloto

*Development of dentin caries lesions in an in vitro simplified biofilm model: a pilot study*

Thais Piccolo CARVALHO<sup>a</sup>, Tamires Timm MASKE<sup>a</sup>, Cácia SIGNORI<sup>a</sup>, Katielle Valente BRAUNER<sup>a</sup>,  
Elenara Ferreira de OLIVEIRA<sup>a</sup>, Maximiliano Sérgio CENCI<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Odontologia, UFPel – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

## Resumo

**Introdução:** Modelos laboratoriais de biofilmes vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de simular o ambiente bucal e o processo de formação da cárie dental. **Objetivo:** Estabelecer e padronizar um modelo de biofilme *in vitro* para o desenvolvimento de lesões de cárie em dentina. **Material e método:** Doze discos padronizados de dentina bovina foram divididos em três tempos experimentais: 4, 7 e 10 dias. As amostras de cada tempo experimental foram inoculadas com *Streptococcus mutans* UA 159 em meio de cultura BHI com 1% de sacarose e cultivadas em anaerobiose. As variáveis de resposta foram a perda de dureza integrada ( $\Delta S$ ) dos discos de dentina e dureza do substrato em diferentes profundidades. Os dados de  $\Delta S$  foram analisados através de ANOVA seguido do teste Tukey, ambos com significância de 5%, e os dados de dureza de profundidade de lesão analisados descritivamente. **Resultado:** Houve maior perda mineral aos 10 dias de crescimento microbiológico quando comparados aos 4 dias ( $p = 0,034$ ), no entanto não houve diferença entre 7 e 10 dias ( $p = 0,853$ ). O grupo de 4 dias mostrou perda de dureza em regiões mais superficiais (10-40 $\mu$ m); e o grupo de 10 dias mostrou desmineralização em áreas mais profundas, até 150  $\mu$ m. **Conclusão:** O modelo proposto mostrou-se capaz de desenvolver lesões de cárie artificiais em dentina. Em 7 dias, as lesões subsuperficiais de dentina foram adequadas para estudos de des-remineralização.

**Descritores:** Placa dentária; cárie dentária; desmineralização; dentina.

## Abstract

**Introduction:** Oral laboratory biofilm models have been developed to reproduce the oral environment and the process of caries lesion formation *in vitro*. **Objective:** To establish and standardize an *in vitro* biofilm model for the development of caries lesions in dentin. **Material and method:** Twelve standardized bovine dentin discs were assigned into three experimental times: 4, 7, and 10 days. Samples of each experimental period were inoculated with *Streptococcus mutans* UA 159 in a BHI culture medium with 1% sucrose, and cultured under anaerobic conditions. The integrated hardness loss ( $\Delta S$ ) of dentin discs and the hardness of the substrate at different depths were considered as response variables. The  $\Delta S$  data were analysed by ANOVA followed by Tukey's test, both with significance level of 5%, and the data of hardness at different depths were analysed descriptively. **Result:** There was a higher hardness loss after 10 days of microbial growth when compared to 4 days ( $p = 0.034$ ), however, there was no difference between 7 and 10 days ( $p = 0.853$ ). The 4-day group showed loss of hardness of the surface layers (10-40 $\mu$ m) and the 10-day group showed demineralization in the deeper area around 150 $\mu$ m. **Conclusion:** The proposed model was able to develop artificial caries lesions in dentin. In 7 days, the dentin sub superficial lesions were suitable to des-remineralisation studies.

**Descriptors:** Dental plaque; dental caries; demineralization; dentin.

## INTRODUÇÃO

A cárie dentária ocorre quando há um desequilíbrio na relação físico-química entre o substrato dentário e o biofilme cariogênico formado sobre essa estrutura, resultando na sua destruição<sup>1</sup>. A etiologia da doença está relacionada principalmente à interação de fatores determinantes como dieta rica em sacarose, microbiota bucal e higiene bucal inadequada<sup>2</sup>. Nos últimos anos, especial ênfase tem sido dada aos aspectos comportamentais da doença e

em especial ao hábito de consumo de carboidratos fermentáveis<sup>3</sup> e principalmente sacarose, o principal causador da doença cárie. Estudos mostram que a redução na ingestão de sacarose conduz ao menor aparecimento da doença cárie<sup>4,5</sup>.

Modelos laboratoriais de biofilmes vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de simular *in vitro* o ambiente bucal<sup>6-10</sup>, devido à dificuldade de investigação do biofilme *in vivo*, limitação de



quantidade amostral, complexidade do ambiente bucal e a questões éticas relacionadas com estudos envolvendo cárie dentária em seres humanos<sup>8,10</sup>. E embora estudos *in situ* possam ser utilizados como uma ponte entre estudos *in vitro* e *in vivo*, através do uso de dispositivos intraorais que viabilizam a remoção das amostras em períodos de tempo predeterminados, o acesso às características do biofilme e perfil de desmineralização também possuem limitações como custos, tempo e dependência da colaboração do paciente. Estudos *in vitro* permitem a realização de investigações em ambientes controlados, com menor variabilidade<sup>11</sup>. Além disso, estudos *in vitro* são precursores de estudos *in vivo*, além de permitirem a confirmação de achados clínicos<sup>12</sup>. Ainda, dentro desse contexto, os modelos microbiológicos parecem se aproximar mais do processo de formação da cárie dental e da mimetização da morfologia das lesões<sup>13</sup>.

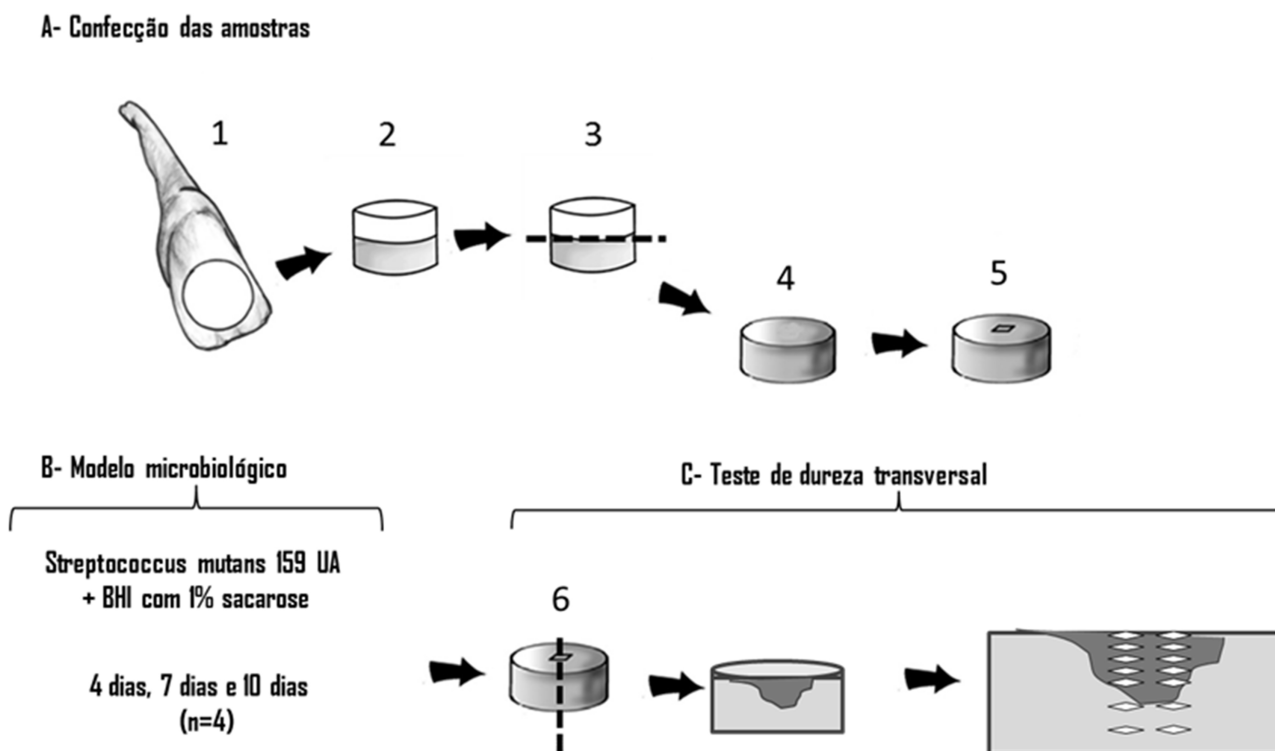
A utilização de modelos de biofilme em monocultura como, por exemplo, de *Streptococcus mutans* tem sido útil no estudo de variáveis específicas dentro da complexidade da doença cárie dentária<sup>14,15</sup>. Além disso, modelos desse tipo permitem respostas rápidas para avaliação do efeito antimicrobiano ou anticariogênico de substâncias ainda em testes iniciais<sup>16</sup>. Diversos métodos microbiológicos de monocultura foram descritos<sup>14,15</sup>, porém poucos padronizam os seus resultados para uma condição cariogênica específica. Tratamentos preventivos para a cárie dentária com a utilização de diferentes tipos de materiais vêm sendo amplamente estudados<sup>1</sup> e nesse contexto a padronização de modelos simplificados ou complexos que desenvolvam lesões de cárie em laboratório parece ser útil para investigações acerca do efeito desses materiais.

Ainda, a maior parte dos estudos publicados na literatura sobre a indução de lesões em dentina reportam o uso de diferentes protocolos, sendo baseados normalmente na imersão em ácido ou ciclagem de pH<sup>13</sup>. O presente estudo baseia-se no uso de microrganismos para a indução das lesões, que simulam de forma mais próxima da real os eventos que ocorrem na cavidade oral, em comparação aos modelos anteriormente citados, e permite a interação entre substrato e bactéria. A partir disso, o presente estudo objetivou padronizar o desenvolvimento de lesões de cárie em dentina em um modelo de biofilme de monocultura simplificado (*Streptococcus mutans*), para auxiliar em estudos de desmineralização e remineralização. A hipótese testada foi de que o modelo de biofilme proposto permitiria o desenvolvimento de lesões artificiais de dentina.

## MATERIAL E MÉTODO

### Delineamento Experimental

Biofilmes de monocultura (*Streptococcus mutans* UA 159) foram crescidos sobre 12 discos de dentina bovina, os quais foram alocados em três grupos (n = 4) de acordo com o tempo de incubação: 4, 7 e 10 dias. Todos os grupos experimentais foram expostos ao desafio cariogênico constante através da imersão em caldo BHI (Brain Heart Infusion) inoculados com *Streptococcus mutans* UA 159, enriquecidos com sacarose a 1% e incubados em atmosfera de anaerobiose a 37 °C. Após cada tempo experimental, analisaram-se as amostras através do teste de dureza transversal para obtenção dos dados de  $\Delta S$  e dados de dureza em relação às profundidades de indentação (Figura 1).



**Figura 1.** Delineamento experimental do estudo; (A) *Confeção da amostra*: 1 e 2 - Obtenção do disco padronizado a partir do dente bovino; 3 e 4 - Corte na junção amelodentinária e obtenção de discos de dentina; 5 - Cobertura com esmalte de unha cosmético, exceto janela superior de 2 mm<sup>2</sup>; (B) *Modelo microbiológico*: Crescimentos de biofilme de *S. mutans* em BHI com 1% de sacarose pelos tempos experimentais de 4, 7 e 10 dias; (C) *Corte transversal das amostras e posicionamento das indentações para leituras de dureza*.

## Preparo dos Espécimes

Doze dentes incisivos bovinos irrompidos e livres de falhas foram selecionados para o estudo e seccionados com auxílio de uma furadeira de bancada ao nível do terço médio para obtenção de discos padronizados (4 mm de diâmetro). Através de uma cortadeira de precisão, os mesmos foram seccionados transversalmente ao nível da junção amelodentinária, separando-se assim os discos de dentina. Os discos obtidos foram polidos e padronizados com a espessura de 1,5 mm. A dureza superficial dos discos selecionados foi de  $65,07 \pm 3,6$  (kgf/mm<sup>2</sup>). Cada disco teve a superfície totalmente recoberta por esmalte de unha cosmético, exceto a porção superior, na qual uma janela de 2 mm<sup>2</sup> de dentina permaneceu exposta. Os espécimes foram autoclavados e mantidos em atmosfera úmida (4 °C) até o uso<sup>9</sup>.

## Processo de Indução de Cárie

As amostras foram dispostas em tubos Falcon codificados contendo 1 mL de BHI inoculado com *Streptococcus mutans* 159 UA e enriquecido com sacarose 1% ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL). Os espécimes foram incubados em jarras de anaerobiose sob temperatura de 37 °C por até 4, 7 ou 10 dias. A renovação do meio foi realizada a cada 24 h, e o pH de cada meio de cultura descartado foi verificado para cada grupo ( $4,13 \pm 0,25$ ).

## Análise da Perda de Dureza

Após o período experimental de cada grupo, os discos de dentina foram coletados do tubo Falcon e delicadamente limpos com escova dental de cerdas macias. As amostras foram seccionadas de forma perpendicular ao centro da superfície de dentina exposta, usando uma cortadeira de precisão. Todo o processo ocorreu sob refrigeração. As metades de cada amostra foram embutidas em tubos de policloreto de vinila (PVC) com auxílio de resina epóxi e polidas com lixas d'água de 600, 1.200, 1.500 e 2.000, através da utilização de uma politriz. O ensaio de microdureza transversal foi realizado através de um microdurômetro (Future-Tech FM) com indentação do tipo Knoop, com 5 gramas de carga por 5 segundos. Foram realizadas 14 indentações, divididas em 2 colunas com distância de 100 µm entre elas, iniciadas a partir da superfície externa da lesão (Figura 1), segundo as profundidades de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 µm. A perda mineral integrada foi calculada através da subtração do perfil de dureza desmineralizado (Knoop Hardness Number, kgf/mm<sup>2</sup>) a partir do perfil hígido de cada amostra, como previamente descrito<sup>17</sup>.

## Análise Estatística

Os dados de perda de dureza integrada foram analisados de acordo com os pressupostos de homogeneidade e normalidade<sup>18</sup> e comparados por meio de Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste Tukey, utilizando-se o programa estatístico SPSS V.20 (IBM, USA), ambos com significância de 5%.

## RESULTADO

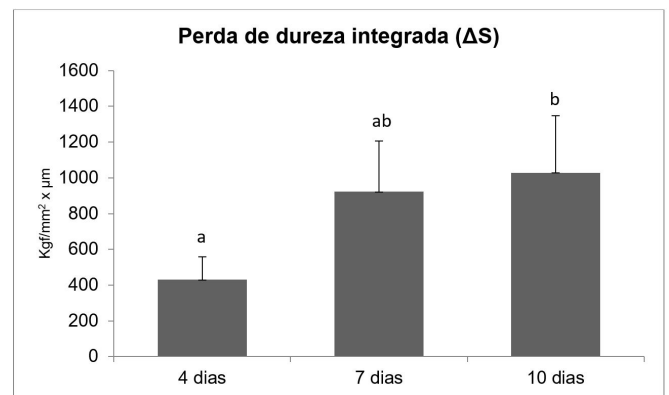
Os dados de perda de dureza integrada estão na Figura 2. Observou-se maior perda de dureza integrada para os tempos experimentais de 7 e 10 dias e não houve diferença entre esses

dois períodos ( $p = 0,853$ ). Foram encontradas diferenças entre os tempos de 4 e 10 dias ( $p = 0,034$ ).

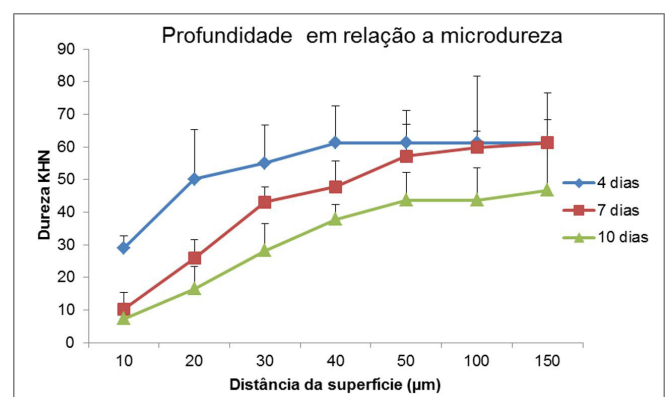
Analisando-se os dados brutos de perda de dureza em relação à profundidade de indentação pôde-se observar, considerando todas as profundidades avaliadas, que a perda de dureza em dentina parece aumentar conforme o número de dias, ou seja, parece ser crescente do grupo 4 dias para os grupos 7 e 10 dias. A perda de dureza encontrada nos grupos 7 e 10 dias estendeu-se desde a superfície da lesão até a profundidade de 40-100 µm, conforme pode-se analisar na Figura 3. No entanto, o grupo experimental de 10 dias demonstrou perda de dureza além dessa profundidade, alcançando a totalidade da profundidade mensurada no espécime.

## DISCUSSÃO

O presente estudo estabeleceu um modelo de monocultura que permite o desenvolvimento de cárie em dentina *in vitro* de forma padronizada, sendo útil em estudos voltados a desmineralização e remineralização. Inúmeros são os modelos para o desenvolvimento de cárie *in vitro*, entre os quais destacam-se os modelos de géis acidificados, ciclagem de pH<sup>13</sup> e modelos microbiológicos de microcosmos, consórcios e de monocultura, como o modelo usado no presente estudo<sup>19-21</sup>. Dentre os modelos vigentes, modelos microbiológicos são aqueles que melhor mimetizam o processo de cárie natural<sup>13</sup>. Modelos de biofilme simplificados que utilizam



**Figura 2.** Perda de dureza integrada ( $\Delta S$  = média + desvio-padrão) para cada tempo experimental *in vitro*. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Relação do teste de microdureza Knoop em relação à profundidade de indentação na lesão cáriosa induzida *in vitro*.

uma só espécie bacteriana parecem ser úteis em casos em que seja necessária uma análise rápida dos resultados, e com baixo custo de implementação, quando comparados aos modelos mais complexos, tais como de microcosmos ou de consórcios de bactérias<sup>19</sup>.

O modelo de biofilme escolhido mostrou-se adequado para desenvolver lesões artificiais de dentina e, portanto, a hipótese deste estudo foi aceita. A condição cariogênica estabelecida proporcionou perda de dureza integrada para todos os tempos experimentais. Ao fim do primeiro tempo experimental observou-se uma menor desmineralização, principalmente localizada nas áreas mais superficiais (até 40 µm), o que vai ao encontro de estudos com modelos microbiológicos previamente descritos na literatura<sup>13,22</sup>. Aos 7 dias observou-se perda de dureza em profundidade até aproximadamente 100 µm, caracterizando o desenvolvimento de lesão artificial de cárie, uma vez que a partir dessa profundidade foram observados valores de dureza correspondentes a superfícies híidas (~60 kgf/mm<sup>2</sup>). Após 10 dias de experimento foi possível observar lesões mais profundas, alcançando 150 µm. Como foram observadas áreas pontuais de erosão superficial nessas amostras, a leitura até profundidades maiores foi descontinuada.

Conforme discutido acima, sugere-se que o tempo mais adequado para estudos de des- e remineralização corresponde a 7 dias, uma vez que ao fim desse tempo experimental obteve-se perda de dureza integrada semelhante a dos 10 dias, porém com menor profundidade de lesão. Além disso, esse tempo experimental não demonstrou a presença de lesões de erosão superficial. A partir dessa condição cariogênica torna-se possível induzir lesões subsuperficiais de dentina padronizadas *in vitro* e, a partir disso, realizar estudos de ganho e perda mineral, assim como outros já executados para avaliar o efeito preventivo de agentes contendo flúor<sup>23,24</sup> e outros tratamentos<sup>25</sup>, porém em um ambiente mais semelhante ao que ocorre na cavidade oral.

Embora os resultados obtidos neste estudo tenham ido ao encontro da hipótese inicial proposta, os autores reconhecem a presença de limitações, como o número de amostras por grupo,

como também as inerentes ao modelo simplificado usado, por esse não possuir a capacidade de mimetizar todos os aspectos da cavidade oral e do processo cárie, como ocorre em modelos complexos com utilização de inóculos de microcosmos. Outra limitação do estudo é a descontinuação da análise em profundidades maiores que 150 µm no grupo experimental de 10 dias. Esse fato levou a uma subestimação dos valores de perda mineral para o respectivo tempo experimental. No entanto, o modelo simplificado apresentado ainda parece ser mais representativo que modelos de desenvolvimento de cárie artificiais que utilizam somente géis ácidos ou ciclagem de pH<sup>8,20</sup>.

Como prospectos futuros a pesquisas relacionadas à utilização desse modelo destacam-se as possibilidades de investigação de materiais dentários com propriedades antimicrobianas ou anticariogênicas (efeito remineralizador), com relação à possibilidade de adesão microbiana e seu envelhecimento, e, principalmente, de estudos de remineralização e desmineralização envolvendo o substrato dentinário previamente desmineralizado.

## CONCLUSÃO

O modelo microbiano investigado mostrou-se adequado para o desenvolvimento de lesões artificiais de dentina, sendo uma ferramenta útil para estudos no campo da cariologia. Dentre os tempos experimentais analisados, o período de 7 dias mostrou-se apropriado para desenvolvimento de lesões subsuperficiais simuladas *in vitro*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Carmem Lúcia Machado Lopes, técnica do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pelotas, pelo suporte aos experimentos descritos nesse manuscrito.

## REFERÊNCIAS

1. Maske TT, van de Sande FH, Arthur RA, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. *In vitro* biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*. 2017 Sep;33(8):661-75. PMID:28792234. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2017.1354248>.
2. Zero DT, Fontana M, Martinez-Mier EA, Ferreira-Zandona A, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, et al. The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries: scientific advances in the United States. *J Am Dent Assoc*. 2009 Sep;140(Suppl 1):25S-34S. PMID:19723928. <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2009.0355>.
3. Sheiham A, James WP. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. *J Dent Res*. 2015 Oct;94(10):1341-7. PMID:26261186. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034515590377>.
4. Moynihan P. Sugars and dental caries: evidence for setting a recommended threshold for intake. *Adv Nutr*. 2016 Jan;7(1):149-56. PMID:26773022. <http://dx.doi.org/10.3945/an.115.009365>.
5. Moynihan PJ, Kelly SA. Effect on caries of restricting sugars intake: systematic review to inform WHO guidelines. *J Dent Res*. 2014 Jan;93(1):8-18. PMID:24323509. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034513508954>.
6. Campos PH, Sanabe ME, Rodrigues JA, Duarte DA, Santos MT, Guare RO, et al. Different bacterial models for *in vitro* induction of non-cavitated enamel caries-like lesions: Microhardness and polarized light microscopy analyses. *Microsc Res Tech*. 2015 Jun;78(6):444-51. PMID:25783414. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22493>.
7. Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, et al. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J Appl Microbiol*. 2012 Dec;113(6):1540-53. PMID:22925110. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05439.x>.

8. Tang G, Yip H-K, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent*. 2003 Mar;31(3):161-71. PMID:12726700. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712\(03\)00009-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712(03)00009-5).
9. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An *in vitro* biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling*. 2011 Oct;27(9):1057-63. PMID:22044385. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2011.625473>.
10. Wong L, Sissions CH. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol*. 2001 Jun;46(6):477-86. PMID:11311195. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9969\(01\)00016-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9969(01)00016-4).
11. Botelho JN, Villegas-Salinas M, Troncoso-Gajardo P, Giacaman RA, Cury JA. Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm: caries model. *Braz Oral Res*. 2016 May;30(1):1-8. PMID:27223133. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0052>.
12. Fernández CE, Tenuta LM, Cury JA. Validation of a cariogenic biofilm model to evaluate the effect of fluoride on enamel and root dentine demineralization. *PLoS One*. 2016 Jan;11(1):e0146478. PMID:26731743. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146478>.
13. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: a hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009 Dec;54(12):1111-7. PMID:19878926. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.09.007>.
14. Giacaman RA, Campos P, Munoz-Sandoval C, Castro RJ. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Arch Oral Biol*. 2013 Sep;58(9):1116-22. PMID:23631998. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.03.005>.
15. Muñoz-Sandoval C, Muñoz-Cifuentes MJ, Giacaman RA, Ccahuana-Vasquez RA, Cury JA. Effect of bovine milk on *Streptococcus mutans* biofilm cariogenic properties and enamel and dentin demineralization. *Pediatr Dent*. 2012 Nov-Dec;34(7):e197-201. PMID:23265155.
16. Cavalcanti YW, Bertolini MM, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Tenuta LM, Cury JA. A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. *Biofouling*. 2014;30(5):579-88. PMID:24730462. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2014.905547>.
17. Sousa RP, Zanin IC, Lima JP, Vasconcelos SM, Melo MA, Beltrao HC, et al. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *J Dent*. 2009 Jan;37(1):44-51. PMID:19026481. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2008.08.009>.
18. Box GE, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building*. New York: Wiley; 1978.
19. McBain AJ. Chapter 4: *in vitro* biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol*. 2009;69:99-132. PMID:19729092. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)69004-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(09)69004-3).
20. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res*. 1997 Apr;11(1):110-26. PMID:9524448. <http://dx.doi.org/10.1177/08959374970110010201>.
21. Steiner-Oliveira C, Rodrigues LKA, Zanin ICJ, Carvalho CL, Kamiya RU, Hara AT, et al. An *in vitro* microbial model associated with sucrose to produce dentin caries lesions. *Cent Eur J Biol*. 2011 Jun;6(3):414-21. <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-011-0011-2>.
22. Maske TT, Nascimento CN, van de Sande FH, Azevedo MS, Oliveira EF, Cenci MS. The effect of non-restorative treatments on the progression of artificial dentine caries lesions underneath enamel. *Rev Odonto Ciênc*. 2015 Jun;29(2):40-5. <http://dx.doi.org/10.15448/1980-6523.2014.2.12753>.
23. Preston KP, Smith PW, Higham SM. The influence of varying fluoride concentrations on *in vitro* remineralisation of artificial dentinal lesions with differing lesion morphologies. *Arch Oral Biol*. 2008 Jan;53(1):20-6. PMID:17920030. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.08.001>.
24. Okuyama K, Nakata T, Pereira PN, Kawamoto C, Komatsu H, Sano H. Prevention of artificial caries: effect of bonding agent, resin composite and topical fluoride application. *Oper Dent*. 2006 Jan-Feb;31(1):135-42. PMID:16536205. [http://dx.doi.org/10.2341/0361-7734\(2006\)31\[135:PO ACEO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2341/0361-7734(2006)31[135:PO ACEO]2.0.CO;2).
25. Tantbirojn D, Feigal RJ, Ko CC, Versluis A. Remineralized dentin lesions induced by glass ionomer demonstrate increased resistance to subsequent acid challenge. *Quintessence Int*. 2006 Apr;37(4):273-81. PMID:16594358.

## CONFLITOS DE INTERESSE

---

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## \*AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

---

Maximiliano Sérgio Cenci, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia Restauradora, UFPel – Universidade Federal de Pelotas, Rua Gonçalves Chaves, 457, Sala 505, 96015-560 Pelotas - RS, Brasil, e-mail: cencims@gmail.com

Recebido: Julho 17, 2017  
Aprovado: Janeiro 24, 2018