



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0720604-6 B1

(22) Data do Depósito: 21/12/2007

(45) Data de Concessão: 17/07/2018



(54) Título: COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 49/00

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2006 GB 06 25678.8

(73) Titular(es): CALCIVIS LIMITED

(72) Inventor(es): EMMA PERFECT; CHRIS LONGBOTTOM

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO".

[001] A presente invenção refere-se a uma composição para a detecção de desmineralização dentária. Mais especificamente, a invenção diz respeito a uma composição compreendendo um complexo capaz de produzir uma característica de sinal óptico da presença de íons livres, os usos farmacêuticos de uma tal composição, e métodos e um kit para a detecção de desmineralização ativa nas superfícies do dente usando uma tal composição.

[002] Esmalte do dente contém cristais grandes de apatita, que formam uma estrutura firmemente condensada; porém espaços intercristalinos minúsculos ou poros que são enchidos com água e material orgânico separam os cristais. A forma de apatita encontrada nos dentes é hidroxiapatita, a unidade de repetição menor desta é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6.2(\text{OH})$. Os componentes do cristal podem ser substituídos. Substituintes conhecidos incluem estrôncio, bário, chumbo, sódio, potássio e magnésio para cálcio; os halogênios (F, Cl, I, Br) para hidróxido e carbonato; e fosfato de hidrogênio para fosfato. Destas substituições fluoreto e carbonato são relatados serem os mais importantes, com fluoreto prevenindo/reparando as cáries e carbonato aumentando a suscetibilidade às cáries. Muitos outros íons tais como zinco, estanho e ferro são também supostamente encontrados no esmalte da superfície. O

material orgânico (1% em peso, 2% em volume) encontrados no esmalte completamente formado consiste principalmente em enamelinas (massa de 50–70 kDa), mas também contém lipídios de peso molecular baixo, e alguns carboidratos e ácidos orgânicos tais como citrato e lactato. Enamelinas podem ser detectadas por análise de imunotintamento.

[003] Muitos problemas dentais resultam da desmineralização dentária.

[004] Desmineralização é um processo subjacente envolvido no desenvolvimento de cárie dentária, erosão do dente e hipersensibilidade dentinária. Desmineralização de um ou mais dos tecidos duros dentais causa uma perda da integridade do dente. Os minerais estão em geral presentes nos tecidos duros dentais em um estado mineralizado e a desmineralização envolve a liberação de íons livres.

[005] Lesões de cárie dentária danificam a estrutura dos dentes. A doença de cáries dentárias pode levar a dor, infecção, mau hálito, gostos ruins e perda de dente. Em casos severos, a infecção pode esparramar para os tecidos macios circunvizinhos, que pode resultar em morte. Fatores que induzem cáries incluem bactérias, que se juntam ao redor dos dentes em uma massa pegajosa conhecida como placa, e alimento e bebida ingeridos. As bactérias associadas à desmineralização prematura são *Streptococcus mutans*, enquanto lactobacilus parecem estar relacionados à

progressão da lesão. Estas bactérias convertem açúcares em alimento/bebida em ácidos, tal como ácido láctico, através de fermentação, e, se deixados em contato com os dentes, estes ácidos causam desmineralização. Esta remoção de mineral da superfície de cristal dos dentes torna a estrutura mais porosa e suscetível ao ataque. À medida que os poros aumentam em tamanho, o ácido pode penetrar mais profundamente no tecido e dissolver os minerais da subsuperfície. A desmineralização é seguida eventualmente pela desintegração do material orgânico. Se isto for permitido progredir, o conteúdo mineral é perdido na proporção que o material orgânico macio deixado para trás desintegra-se formando uma cavidade ou quebra a integridade da superfície do dente. A presença do biofilme de placa na superfície é essencial se as cáries forem progredir.

[006] Tecnologias existem para determinar a localização e extensão (profundidade e/ou volume da perda mineral) das lesões de cáries. Identificação das regiões de desmineralização é correntemente usada por clínicos para detectar cáries e outros problemas dentais. Isto pode envolver exame visual por um clínico, radiografia ou tecnologias do estado da técnica tais como DIAGNOdent (número de patente US4290433). Empregar inspeção visual para detectar cáries conta com a habilidade do assessor e mais importantemente a extensão da desmineralização/erosão.

Frequentemente dano significativo terá ocorrido até que as cáries sejam desse modo detectadas. Análise de raio X pode revelar a presença de cáries invisíveis ao olho, porém avaliação contínua é necessária para determinar a atividade das cáries. Tecnologias do estado da técnica que podem auxiliar na diagnose das cáries incluem iluminação de fibra óptica com luz ou laser. DIAGNOdent (US4290433) e Fluorescência Quantitativa Induzida por Luz (QLF) (US4290433) envolve iluminar a superfície do dente com luz de laser vermelha (633 nm) ou luz azul de intensidade alta respectivamente e depois analisar a fluorescência emitida. A natureza da fluorescência emitida pode ser correlatada com o grau de desmineralização no dente. Outros métodos tais como o detector ultrassônico de cáries (UCD) empregam ondas ultrassônicas (US2007238996) para criar uma imagem do dente onde o nível de refletância é proporcional à densidade do tecido; ou espectroscopia de Raman (US2005283058) que é sensível à orientação mineral e cristal pra caracterizar a superfície do esmalte.

[007] Erosão dental é uma perda progressiva da espessura do tecido duro incrementalmente da superfície do dente e é frequentemente causada por bebidas/alimentos acídicos (que podem ou não ser açucarados), que causa desmineralização e pode levar à exposição da dentina. Erosão pode também ser acelerada por escovagem dos dentes do esmalte

enfraquecido por ácido (ou dentina), levando à remoção completa do esmalte e exposição consequente da dentina. Especificamente, a erosão refere-se aos processos não-bacterianos que causam perda progressiva do tecido dental duro. Erosão dentária ocorre quando o esmalte em seus dentes desgastado pelo ácido. Usualmente o cálcio contido na saliva ajudará a remineralizar (ou fortalecer) seus dentes após você consumir quantidades pequenas de ácido, mas a presença de muito ácido em sua boca não permite a remineralização. O ácido pode vir de muitas fontes, incluindo bebidas carbonatadas. Todas bebidas "efervescentes" contêm ácido e podem dissolver o esmalte muito rapidamente. Aumentando a quantidade consumida leva a dano aumentado como manter a bebida na boca durante tempos mais longos. Suco de fruta puro contém ácido e, portanto age de um modo similar às bebidas carbonatadas. Bulimia e refluxo ácido podem contribuir para a erosão dos dentes devido à exposição dos dentes aos ácidos estomacais.

[008] Há vários sinais de erosão dos dentes, variando de seus estágios prematuros (sensibilidade, descoloração, dentes arredondados) a estágios posteriores, mais severos (rachaduras, sensibilidade severa, escavação). Desgaste do esmalte protetor leva à exposição aumentada dos terminais nervosos na polpa dental que leva à dor quando você consome alimentos quentes, frios, ou doces e bebidas.

O paciente pode, portanto, frequentemente apresentar sensibilidade. Sensibilidade severa pode desenvolver-se à medida que mais esmalte é desgastado e os dentes ficam cada vez mais sensíveis. Pacientes podem também apresentar dentes descoloridos, visto que eles podem ficar ligeiramente amarelos quando a dentina fica exposta. Dentes podem ter um aspecto arredondado ou "jateado" como resultado da erosão. Os dentes frontais podem parecer ligeiramente transparentes próximo das bordas de mordida. Descoloração avançada pode resultar - os dentes podem ficar mais amarelos à medida que mais dentina é exposta por causa da perda do esmalte do dente. Rachaduras pequenas e aspereza podem aparecer nas bordas dos dentes, e escavação pode ocorrer como pequenos entalhes que podem surgir na superfície de mastigação dos dentes. Enchimentos também poderiam parecer estar subindo para fora do dente. Se a erosão dentária puder ser identificada cedo, então tratamento pode ser aplicado e os dentes protegidos. Por exemplo, áreas problemáticas podem ser vedadas para impedir mais desmineralização. Detecção e diagnose precoce são, portanto, supremas.

[009] Hipersensibilidade dentinária é a dor que surge da dentina exposta, tipicamente em resposta aos estímulos externos (e que não pode ser explicada por qualquer outra forma de doença dental). Os túbulos dentinários abertos expostos conduzem diretamente aos tecidos da polpa que

incluem os nervos dentro deles. Quando o cimento cobrindo a dentina da raiz não está mais presente (devido à erosão ou abrasão) após a gengiva retroceder, os túbulos são expostos e sensibilidade e dor podem ocorrer. Em casos de hipersensibilidade, a dentina tem até 8 vezes mais túbulos abertos na superfície da dentina e o diâmetro dos túbulos é mais amplo que quando nenhuma dor está presente. Isto provê uma área maior da superfície disponível para desmineralização, tal como através de bebidas acídicas e também leva à liberação de mais cálcio seguindo aplicação de tais produtos.

[0010] Como mencionado acima, o desenvolvimento de cáries, erosão ou hipersensibilidade são causados por uma perda da integridade do dente mediante desmineralização de um ou mais dos tecidos duros dentais. Hidroxiapatita, o componente principal do esmalte, fica solúvel quando exposto a ambientes acídicos. Os dentes estão sob ataque constante de seu ambiente externo. Bactérias da placa sobre a superfície dos dentes produzem ácidos e após refeições ou lanches açucarados, pode dramaticamente aumentar a acidez da placa. Durante a exposição a qualquer ambiente ácido, as porções do conteúdo de material inorgânico na superfície dos dentes dissolvem e podem permanecer dissolvidas durante mais de 2 horas. Ácido pode penetrar nos poros microscópicos criados por esta desmineralização da superfície e uma camada

de subsuperfície desmineralizada dentro do dente pode ser criada parcialmente à medida que a camada da superfície remineraliza-se como a acidez da placa retorna para níveis mais baixos. Períodos oscilantes de desmineralização e remineralização são, portanto, uma característica "normal" para a superfície dos dentes na presença da placa.

[0011] Dentina e cimento são mais suscetíveis a desmineralização de ácido que esmalte, como eles têm um conteúdo mineral inferior. O processo de cáries é uma dinâmica que começa na superfície de um dente, mas devido aos processos de desmineralização-remineralização complexos relacionados a gradientes de concentração de minerais no fluido dentro do dente e da placa, a superfície torna-se mais altamente mineralizada que a região da subsuperfície. Substituição ocorre facilmente na estrutura inorgânica do esmalte, e assim desmineralização também resulta na liberação de muitos íons diferentes. Este fator é especialmente importante para detecção prematura, como a superfície do esmalte é a localização de absorção inicial e é também primeiríssimo ponto de ataque de ácido.

[0012] Substituintes comuns incluem sódio, magnésio, fluoreto e carbonato. Magnésio e carbonato podem penetrar no esmalte e alterar a estrutura de cristal da apatita de forma que a torna mais solúvel; portanto estes íons são preferencialmente perdidos da subsuperfície sob ataque

ácido. Concentrações mais altas de zinco, chumbo, estanho e ferro são também encontradas no esmalte da superfície comparado com as camadas mais profundas. Análise de lesões de cáries no esmalte usualmente mostra níveis altos de fluoreto junto com níveis apreciáveis de magnésio, que acredita-se ser devido à absorção rápida destes íons pelas camadas recentemente expostas de apatita.

[0013] Embora algumas tecnologias existam para determinar a localização e extensão (profundidade e/ou volume de perda mineral) de lesões das cáries, um inconveniente principal destes métodos é que elas não tratam a natureza do processo de cáries, isto é, se elas são ativas ou inativas em qualquer um ponto específico no tempo. Lesões de cáries inativas podem não requerer tratamento, enquanto que lesões de cáries ativas (por definição) indicarão desmineralização contínua. Também seria benéfico ter informação sobre desmineralização tão cedo quanto possível. Frequentemente, as cáries ativas permanecerão não-detectadas até tarde no processo e dano significativo foi feito à integridade do dente. Às vezes é apenas quando o paciente começa a sentir dor que um raio X é usado para confirmar a presença de cáries. Correntemente, a natureza ativa das cáries pode apenas ser determinada avaliando o progresso da lesão de cáries com o passar do tempo, tipicamente durante um período de mais que um ano no caso de radiografia (raios

X). Se cáries, erosão dos dentes ou dentes hipersensíveis puder ser identificados cedo, então o tratamento pode ser aplicado e os dentes protegidos. Por exemplo, áreas problemáticas podem ser vedadas para impedir mais desmineralização. Detecção e diagnose precoces são, portanto, de extrema importância. Também, é preferível que a informação acerca da atividade seja capturada em um exame.

[0014] Diagnose inicial de cáries envolve inspeção de todas superfícies dos dentes visíveis, frequentemente usando um explorador dental, ou palito metálico, e espelho, iluminadas por uma fonte luminosa. Em alguns casos, o sinal de uma lesão de cárie ou de desmineralização do esmalte é o surgimento de uma mancha branca calcária na superfície de um dente. Porém uma tal mancha não é sempre visível.

[0015] Uma técnica comum para diagnosticar cáries prematuras é soprar ar ao longo da superfície suspeita. A perda resultante de umidade da superfície altera as propriedades ópticas do esmalte desmineralizado, permitindo visualização de uma lesão de mancha branca indicativa de cáries prematuras. Como continua a desmineralizar-se, as cáries podem se ficar marrons e eventualmente podem desenvolver-se em uma cavidade. Lesões de cáries grandes são frequentemente visível a olho nu. Porém, lesões menores podem ser muito difíceis de identificar. Uma vez uma cavidade se forma, a estrutura dentária perdida não pode ser regenerada.

O processo antes deste ponto é potencialmente reversível, portanto é essencial identificar cáries o mais cedo possível.

[0016] Tecnologias do estado da técnica que podem auxiliar na diagnose das cáries incluem iluminação de fibra óptica com luz ou laser. Diagnodent é uma tecnologia abrangida pela patente US 6.769.911, por meio da qual uma ferramenta contendo um elemento de sonda e uma fonte luminosa vermelha integrada induz fluorescência na região cariada bactericamente infetada de um dente, que após passar por um filtro apropriado, é medida pelo dispositivo. Porém, este método não fornece nenhuma indicação sobre se as cáries são ativas ou inativas.

[0017] Tinturas, incluindo tinturas fluorescentes, têm também sido usadas para identificar a localização de bactéria e presença de ácido nos dentes como um método de detectar a decadência do dente. Porém, estas tinturas tendem a ser tóxicas e assim são impróprias para análise dentro-da-boca. Além disso, esmalte é autofluorescente e assim fluorescência de fundo pode ser proibitivamente alta.

[0018] Erosão é detectada através de inspeção visual, como para detecção de cáries. Sinais e sintomas que indicam erosão incluem transparência aumentada dos incisivos, enchimentos elevados dos dentes circunvizinhos, e desgaste em superfícies de não-mordida. Isso tudo leva tempo de desenvolver para um grau visível, e o dano já terá

sido feito. Seria desejável ter um método para testar a desmineralização como resultado de erosão, por várias razões. Por exemplo, certos alimentos ou bebidas poderiam ser aplicados aos dentes, seguidos pela composição reveladora. A composição reveladora emitiria um sinal detectável se íons estivessem sendo emitidos como resultado do alimento ou bebida em contato com o dente. Um fabricante para determinar o quanto potencialmente prejudicial um produto comestível poderia ser para os dentes poderia usar este teste, ou medir os produtos alimentícios ou bebida padrões, ou no desenvolvimento de produtos amigáveis para os dentes (baixo potencial para causar erosão) ou produtos de prevenção de erosão tais como pastas de dentes e selantes. Um clínico dental pode também usar a composição reveladora para determinar a suscetibilidade de um paciente à erosão e como determinado por composição de dente e saliva.

[0019] Hipersensibilidade dentinária será relatada pelo paciente e será investigada por um dentista. Ferramentas de diagnóstico úteis são a seringa de ar/água, explorador dental, testagem de percussão, testes de força de mordida, e outros testes térmicos tais como um cubo de gelo e avaliação de oclusão. Porém, estes métodos, com base no relatório do paciente, são subjetivos e faltam precisão.

[0020] É um objetivo da invenção mitigar problemas tais como aqueles descritos acima.

[0021] De acordo com um primeiro aspecto da invenção, é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo um complexo capaz de produzir uma característica de sinal óptico da presença de íons livres.

[0022] De acordo com um segundo aspecto da invenção, é fornecida uma composição para o uso na detecção de cáries dentárias ativas e/ou desmineralização dentária ativa devido à erosão, compreendendo um complexo capaz de produzir uma característica de sinal óptico da presença de íons livres.

[0023] O complexo para detecção pode ser uma tintura, quelante de íon sintético tal como um complexo de EDTA-repórter ou um macrociclo tal como um complexo de éter de coroa-repórter, uma proteína ou complexo de proteína-repórter, complexo de polímero impresso molecular-repórter ou sonda molecular tal como junção de Holliday. Um ou uma combinação destes complexos pode ser usada, por exemplo, se íons diferentes forem para ser detectados.

[0024] Os íons a ser detectados podem compreender íons de cálcio, íons de magnésio, íons de fosfato, íons de carbonato, íons de potássio, íons de estrôncio, íons de fluoreto, íons de cobre, íons de cloreto, íons de zinco, íons de chumbo, íons de estanho, íons de ferro ou material orgânico tal como enamelinas. Detecção de diferentes íons pode ajudar a determinar a localização da desmineralização e sua profundidade nos tecidos duros dentais, porque, como

descrito aqui, diferentes íons podem estar presentes em diferentes tecidos duros dentais.

[0025] A composição pode também compreender um aditivo farmacêuticamente aceitável e o aditivo é preferivelmente um bactericida ou um agente bacteriostático.

[0026] A composição pode compreender um excipiente farmacêuticamente aceitável e o excipiente é preferivelmente um aditivo de aroma ou de coloração.

[0027] É preferido que a composição seja em uma forma de dosagem farmacêuticamente aceitável e a composição é preferivelmente um líquido, um pó ou um gel. A composição pode compreender de 1 ng/ml a 10 mg/ml de complexo, ou qualquer concentração que dê uma razão de sinal para ruído significativamente alta.

[0028] A composição pode compreender uma proteína ou um complexo de proteínas. Um tal complexo pode sofrer uma alteração conformacional na ligação dos íons livres que leva a um sinal óptico sendo gerado.

[0029] É preferido que a proteína ou complexo de proteínas compreenda equorina, obelina, clitina, mitrocomina, halistaurina, fialidina, mnemiopsina, simplectina, gr-bolinopsina, caseína, calsequestrina, calexcitina, cisteína protease de ligação de cálcio, calmodulina e outra berovina de proteínsor de mão de EF (MEF-hand proteínsor berovin). A pessoa versada na técnica estaria

atenta às outras proteínas ou complexos de proteínas que são funcionalmente similares e que poderiam ser selecionadas sem esforço impróprio.

[0030] É preferido que a proteína ou complexo de proteínas compreenda fusões em tandem de proteínas fluorescentes e proteínas ligadoras de íons tais como calmodulina, um peptídeo ligador de calmodulina (M13), e uma proteína fluorescente de emissão de luz verde ou amarela melhorada.

[0031] Como uma alternativa, o complexo pode apresentar fluorescência em um comprimento de onda característico indicativo da presença de íons.

[0032] A composição pode compreender tanto uma proteína ou complexo de proteínas que produz um sinal óptico na ligação com íons livres, quanto uma proteína ou complexo de proteínas que apresentam fluorescência em um comprimento de onda característico indicativo da presença de íons.

[0033] Estes podem ser modificados, por exemplo alterando a sequência de DNA do gene, por acetilação, etoxycarbonilação, modificação de fluorescamina ou marcação com fluoresceína ou mediante criação de proteínas quiméricas tais como uma GFP-equorina (US2003175807) para intensificar o sinal, prolongar a duração do sinal ou alterar seus espectros de emissão. Proteínas e complexos de proteínas com função similar, tais como aqueles sofrendo uma alteração de

conformação na ligação de um íon que leva a um sinal óptico podem também ser usados.

[0034] A proteína ou complexo de proteínas preferivelmente compreende uma proteína recombinante (expressada em uma pureza alta). A proteína ou complexo de proteína-proteína pode ser administrado em uma solução livre do íon específico para reduzir o sinal de base. Isto pode ser alcançado usando um quelante de íon.

[0035] Preferivelmente, a composição será opticamente transparente. Isto permitirá a composição transmitir luz emitida sob contato do repórter sensível a íon com os íons livres. Aditivos podem também ser adicionados para alterar o sinal, por exemplo, um gel para estender o comprimento do tempo que o sinal detectável permanece detectável, tampões para otimizar a reação ou substrato modificado para impedir sinal luminoso imediato, mas que pode ser desencadeado depois tal como o sistema de Enduren para coelenterato luciferases.

[0036] O sinal óptico produzido pela composição em exposição aos íons livres pode ser detectado por um espectrofotômetro, dispositivo acoplado à carga (CCD), semicondutor de metal-óxido complementar CMOS, câmera digital, câmera intensificada, câmera intraoral, videoscópio, filme fotográfico, dispositivo de fibra óptica,

detector fotométrico, fotomultiplicador, sistema microeletromecânico (MEMS) ou visualmente a olho.

[0037] De acordo com um terceiro aspecto da invenção, é fornecido o uso de uma composição farmacêutica como descrita acima para a fabricação de uma preparação para a detecção de cárie dentária. Cáries dentárias ativas podem ser diferenciadas de cárie dentária inativas, com base na presença de desmineralização, que a composição pode ser usada, portanto, na fabricação de uma preparação para o uso na diferenciação entre cáries dentárias ativas e inativas.

[0038] De acordo com um quarto aspecto da invenção, é fornecido o uso de uma composição farmacêutica como descrita acima para a fabricação de uma preparação para a detecção de desmineralização dentária ativa devido à erosão.

[0039] De acordo com um quinto aspecto da invenção, é fornecido o uso de uma composição farmacêutica como descrita acima para a fabricação de uma preparação para a detecção de sítios de desmineralização da dentina relacionados à hipersensibilidade dentinária.

[0040] De acordo com um sexto aspecto da invenção, é provido um método para a detecção de desmineralização dentária ativa, compreendendo as etapas de expor um dente a uma composição como mais acima descrito; e detectar o sinal óptico resultante.

[0041] O método pode incluir a etapa adicional de marcar as regiões do dente ou modelo de dente para permitir identificação de regiões particulares do dente ou modelo de dente. Pode ser difícil assegurar que a mesma área de um dente ou modelo de dente possa ser monitorada e auxiliar análise futura tal como ao comparar dados de técnicas diferentes ou monitorar a progressão de uma doença ou tratamento com o passar do tempo. Uma tal marca pode ser feita com tintura, lápis ou prendendo uma grade, tal como aquela feita de fio de cobre, ao dente, tal como com esmalte de unha.

[0042] O método pode também compreender a etapa de expor o dente a uma solução sensibilizadora antes da exposição com a composição. A solução sensibilizadora pode ser uma solução acídica ou uma açucarada (onde a placa estiver presente). Isto pode permitir a suscetibilidade do dente à erosão ser determinada. Isto poderia ser usado para avaliar a suscetibilidade de um indivíduo à erosão de dente. Este método poderia também ser usado para avaliar as propriedades erosivas dentais de produtos alimentícios e de bebida.

[0043] O método pode também compreender a etapa de permitir um período de tempo passar entre aplicar a solução sensibilizadora e aplicar a composição de detecção. Isto é para permitir a saliva na boca se construir, e permite o

usuário avaliar o efeito protetor da saliva. Este período de tempo pode ser, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 segundos, mas pode ser qualquer outro tempo julgado necessário para permitir a saliva retornar para seu volume normal e composição na boca, por exemplo, um minuto, dois minutos ou até cinco minutos podem ser requeridos. O comprimento de tempo requerido dependerá do volume e do fluxo de saliva no paciente individual e poderá ser facilmente determinado pela pessoa versada na técnica.

[0044] O sinal óptico pode ser detectado por meio de um espectrofotômetro, dispositivo acoplado à carga (CCD), semicondutor de metal-óxido complementar CMOS, câmera digital, câmera intensificada, câmera intraoral, videoscópio, filme fotográfico, dispositivo de fibra óptica, detector fotométrico, fotomultiplicador, fotodiodo de avalanche, arranjo sensível à luz, sistema microeletromecânico (MEMS) ou visualmente a olho.

[0045] De acordo com uma sétima modalidade da invenção, é provido um kit para uso na detecção de desmineralização, compreendendo uma composição compreendendo um complexo sensível a íon, meios para aplicar a composição e uma unidade de detector. O kit pode também incluir uma solução sensibilizadora acídica ou açucarada. O kit pode também incluir um marcador tal como uma grade para marcar

áreas de interesse em um dente ou modelo de dente. O kit poderia ser comprado, por várias razões. Um dentista pode querer ter um kit de teste comercialmente disponível conveniente para o uso na avaliação da suscetibilidade de um paciente à erosão. Um teste de uso doméstico de suscetibilidade à erosão poderia ser usado por um consumidor que poderia depois decidir que medidas preventivas a tomar. Fabricantes de produtos alimentícios e de bebida poderiam comprar o teste se as propriedades corrosivas de dente de seus produtos forem de interesse.

[0046] Desse modo, a invenção busca fornecer uma composição e um método usando uma tal composição para a detecção de íons livres em aplicações dentais.

[0047] A invenção será também descrita por via de exemplo apenas e com referência às figuras em anexo, em que:

[0048] Figura 1 é uma representação esquemática de FRET em indicadores cameleon;

[0049] Figura 2 mostra dentes pré-molares extraídos com 'janelas' mascaradas marcadas na superfície destes;

[0050] Figura 3 mostra imagens de dentes extraídos seguindo aplicação de gel ácido e gel revelador;

[0051] Figuras 4 e 5 demonstram o uso de um programa de análise de imagem ImageJ para determinar a brilhância da área tratada com gel ácido e gel revelador;

[0052] Figura 6 demonstra o uso de obelina como uma composição reveladora;

[0053] Figuras 7a a 7b mostram os resultados de experimentos realizados na raiz de um dente com umas cáries;

[0054] Figuras 8a e 8b mostram os resultados de experimentos realizados na dentina em um dente;

[0055] Figuras 9a a 9b mostram os resultados de experimentos realizados em relação à identificação de cavidade;

[0056] Figuras 10a a 10b mostram os resultados de outros experimentos realizados em relação à identificação de cavidade;

[0057] Figuras 11a a 11b mostram os resultados de outros experimentos realizados em relação à identificação de cáries;

[0058] Figura 12 mostra imagens de molares decíduos com lesões em cavidade (A). Figura 12a e c mostram imagens dos dentes na luz e Figura 12b e 12d mostram imagem monocromática seguindo aplicação de gel revelador;

[0059] Figura 13A mostra um incisivo (decíduo) com uma lesão grande de cáries (conhecida como síndrome de mamadeira), a imagem do dente tirada na luz;

[0060] Figura 13B imagem monocromática de um incisivo (decíduo) com uma lesão grande de cáries (conhecida

como síndrome de mamadeira) seguindo aplicação de gel revelador;

[0061] Figura 14A é uma imagem que mostra a superfície lisa de um molar (decíduo), a imagem do dente na luz;

[0062] Figura 14B é uma imagem monocromática que mostra a superfície lisa de um molar (decíduo) seguindo aplicação de gel revelador;

[0063] Figura 15A e 15B mostram imagens da superfície oclusal de molar (permanente). Figura 15A mostra uma imagem do dente na luz. Figura 15B mostra uma imagem monocromática seguindo aplicação de gel revelador;

[0064] Figura 16A é uma imagem de um molar (decíduo) tirada na luz;

[0065] Figura 16B mostra uma imagem monocromática seguindo aplicação de gel revelador;

[0066] Figura 16C é uma representação gráfica da luz gerada ao longo de uma lesão;

[0067] Figura 17A mostra um raio X de molares permanentes;

[0068] Figura 17B mostra molares permanentes cuja superfície mesial foi também investigada com raio X depois gel revelador;

[0069] Figura 18A mostra uma imagem de um dente que tinha sido enxaguado em água deionizada e removido antes de ser avaliado;

[0070] Figura 18B mostra um dente que tinha sido enxaguado e avaliado em saliva;

[0071] Figura 18C mostra um dente que tinha sido enxaguado em saliva mas removido antes de ser avaliado;

[0072] Figura 18D mostra um dente que tinha sido incubado em saliva, removido, e enxaguado em água deionizada antes de ser avaliado;

[0073] Figura 19A mostra cálculo supragengival seguindo adição de solução reveladora;

[0074] Figura 19B mostra cálculo subgengival e imageado seguindo adição de solução reveladora;

[0075] Figura 20A mostra uma imagem do dente na luz seguindo aplicação de gel revelador; caixa indica área de cálculo;

[0076] Figura 20B mostra uma imagem monocromática seguindo aplicação de gel revelador; caixa indica área de cálculo;

[0077] Figura 21A mostra imagens da superfície oclusal de molar (permanente) na luz antes da aplicação de gel revelador;

[0078] Figura 21B imagem monocromática da superfície oclusal de molar (permanente) seguindo aplicação de gel revelador;

[0079] Figuras 22a a 22c mostram os resultados de experimentos realizados em relação à erosão e hipersensibilidade dentais;

[0080] Figuras 23a a 23c mostram os resultados de outros experimentos realizados em relação à erosão e hipersensibilidade dentais;

[0081] Figuras 24a a 24c mostram os resultados de ainda outros experimentos realizados em relação à erosão e hipersensibilidade dentais;

[0082] Figuras 25a a 25c mostram os resultados de experimentos realizados usando dentes causticados com ácido;

[0083] Figuras 26a a 26d mostram os resultados de outros experimentos realizados usando dentes causticados com ácido;

[0084] Figuras 27A e 27B são gráficos que mostram o efeito protetor da saliva no esmalte tratado com ácido comparado à água deionizada;

[0085] Figura 28 é um gráfico que mostra os efeitos das soluções de pH divergente em níveis diferentes de desmineralização, quando medido por uma alteração em brilhância, com soluções de pH inferior gerando mais desmineralização (mais brilhância); e

[0086] Figura 29 é um gráfico indicando que o efeito de comestíveis na desmineralização dos dentes pode ser determinado usando a composição reveladora e método de ensaio da invenção.

[0087] No contexto da invenção, um "complexo sensível a íon" significa um complexo capaz de produzir uma característica de sinal óptico da presença de íons livres liberados como resultado da desmineralização. O complexo pode ser uma tintura, quelante de íon sintético tal como um complexo de EDTA-repórter ou um macrociclo tal como um complexo de éter de coroa-repórter, uma proteína ou complexo de proteína-repórter, complexo de polímero impresso molecular-repórter ou junção de Holliday que pode ser modificada para aumentar a sensibilidade aos íons para melhorar a resistência de sinal, prolongar o sinal, melhorar sinal para barulho, melhorar a resposta espectral. Proteína recombinante ou modificada pode também ser usada.

[0088] A invenção diz respeito ao novo uso farmacêutico de uma ou uma combinação de tinturas sensíveis a íons, quelantes de íons sintéticos tais como uns complexos de EDTA-repórter ou macrociclos tais como uns complexos de éter de coroa-repórter, complexos de proteínas ou proteína-repórter, complexos de polímero impresso molecular-repórter ou sondas moleculares tais como junções de Holliday como repórteres na detecção de desmineralização dental. Como

debatido acima, a presença de íons livres na superfície do dente indica a presença de desmineralização. Estes repórteres podem ser usados para detectar a presença de íons livres nos dentes, desse modo ajudando a detectar problemas dentais específicos.

[0089] Na presença de íons livres, um sinal óptico é emitido do repórter sensível a íon. Os espectros, intensidade ou duração do sinal são proporcionais à quantidade de íons livres. Tecidos diferentes têm quantidades e tipos diferentes de íons disponíveis e assim a resposta para os repórteres sensíveis a íons variará entre os tecidos. No processo de erosão dental, a dentina pode ser exposta eventualmente. No processo de hipersensibilidade dentinária, o cimento é removido e a dentina da raiz é exposta. Dentina e cimento são menos mineralizados que o esmalte e desse modo respondem diretamente aos repórteres sensíveis a íons. Estas características desmineralizadas de dentes podem ser identificadas por áreas tendo sinais ópticos mais intensos.

[0090] Na presença de cáries ativas, os íons livres continuarão sendo liberados à medida que o dente é desmineralizado pelo ambiente ácido e bactéria. A localização e intensidade deste sinal permitem determinar a localização das cáries ativas.

[0091] A composição pode conter um ou mais dos seguintes: tintura, quelante de íon sintético tal como um complexo de EDTA-repórter ou um macrociclo tal como um complexo de éter de coroa-repórter, uma proteína ou complexo de proteína-repórter, complexo de polímero impresso molecular-repórter ou sonda molecular tal como junção de Holliday. A proteína ou complexo de proteínas pode incluir íon fotoproteínas sensíveis, proteínas fluorescentes sensíveis a íons, ou complexos de proteínas detectáveis por fluorescência, bioluminescência, quimiluminescência ou transferência de energia por ressonância de fluorescência (BRET, CRET ou FRET), anticorpos marcados que reconhecem material orgânico, por exemplo, enamelinas. O quelante de íon sintético ou complexos de proteínas podem incorporar uma metade de fluorescência que é extinguida na ligação iônica, ou complexos de proteínas incorporando uma metade de fluorescência e extintor, o último sendo removido na ligação do íon causando uma liberação de luz.

[0092] Íons diferentes podem ser detectados usando complexos diferentes. Magnésio é detectado com tinturas fluorescentes tais como Mag-Fura-2 e Mag-Fura-5. Elas poderiam ser usadas para medir magnésio *in situ* (excitação 340-380 nm, emissão 500-510 nm). Preferivelmente as tinturas não são tóxicas.

[0093] Várias tinturas são sensíveis a cálcio mas podem ser muito tóxicas para usar na boca. Fura-2, Calcium Green-1, Fluo-3, Indo-1 e cSNARF-1 são todas tinturas fluorescentes que ligam ao cálcio intracelular livre. Indo-1 e cSNARF-1 são tinturas de emissão dual. Tinturas de ligação de cálcio fluorescentes usadas para detectar e medir cálcio livre podem ser úteis como uma alternativa para fotoproteínas luminescentes. Além disso, estas tinturas podem ser usadas em um método novo para medição simultânea de Cálcio e Estrôncio em saliva se usadas junto com Halistaurina. Fura-2, Calcium Green-1, Indo-1 e seus derivados de éster de acetometila foram usados em camundongos (*in vivo*) para monitorar a atividade neuronal. Rhod-2 é também uma tintura sensível a cálcio embora seja menos sensível que Fluo-3. Os comprimentos de onda mais longos de excitações e emissões de Rhod-2 (~556/576nm) tornam o indicador útil para experimentos em células e tecidos que têm níveis altos de autofluorescência e para experimentos onde outra tintura fluorescente de comprimentos de onda mais curtos for usada ao mesmo tempo. Como esmalte é conhecido fluorescer, tal comprimento de onda de emissão longo seria uma vantagem significativa.

[0094] Detecção de fluoreto pode ser alcançada com tinturas fluorescentes. Níveis altos de fluoreto são em geral encontrados em lesões de cáries, acreditado ser devido à

absorção alta do íon em sítios de desmineralização. Houve e continuada sendo grande investigação em sistemas fluorescentes sensíveis a fluoreto para aplicações industriais e médicas. Um tal complexo é Zr(IV)-EDTA-oxina que exhibe uma diminuição na fluorescência sob ligação com fluoreto. Sensores de fluoreto que exibem um aumento em fluorescência na presença de fluoreto foram também relatados; estes incluem compostos de ácido borônico e derivados de naftaleno de tioureído. Os compostos de ácido borônico são hoje em dia relativamente insensíveis (nível de detecção 50 - 70 mM), porém acredita-se que com as modificações apropriadas seletividade de fluoreto poderia ser bem adaptada a qualquer faixa de concentração desejada. Os derivados de naftaleno de tioureído novos exibem um aumento de 40 vezes em fluorescência na presença de fluoreto, e têm uma seletividade muito alta para fluoreto em outros halogênios. Alternativamente, Tae-Hyun Kim e Timothy M. Swager (2003, Chem. Int. Ed. Angewandte 42, 4803-4806) descreve um sistema por meio do qual a clivagem de uma ligação de Si-O através de fluoreto leva à formação de uma molécula de cumarina altamente fluorescente.

[0095] Detecção de potássio pode ser com uma tintura fluorescente tal como SBFI, que é sensível a potássio e sódio (excitação 340-380 nm, emissão 510 nm). Potássio está ligado à hipersensibilidade dental e possivelmente cáries.

Alternativamente, uma fotoproteína, derivada de lula okinawana (*Symplectoteuthis oualaniensis*) é sensível a potássio e pode ser usada (US2004191884).

[0096] Onde a composição incluir uma proteína ou complexo de proteína, ela pode produzir um sinal óptico na ligação com íons livres. Uma tal proteína ou complexo de proteínas pode ser modificado, por exemplo alterando a sequência de DNA do gene, por acetilação, etoxycarbonilação, modificação de fluorescamina ou marcação com fluoresceína ou por criação de proteínas quiméricas tais como uma GFP-equorina (US2003175807) para intensificar o sinal, prolongar a duração do sinal ou alterar seus espectros de emissão. Proteínas e complexos de proteínas com função similar, tais como aquelas sofrendo de uma alteração de conformação na ligação ao íon ou material orgânico que leva a um sinal óptico podem também ser usadas.

[0097] Exemplos de tal proteína ou complexos de proteínas são fotoproteínas. Fotoproteínas são complexos de enzima-substrato estáveis que consistem em cadeia(s) de polipeptídeo e um substrato pré-ativado com oxigênio, tal como 2-hidroperoxicoelenterazina, que é firmemente mas não-covalentemente ligado com a proteína. Bioluminescência pode ser desencadeada, por exemplo, por Ca^{2+} e resulta da descarboxilação do substrato ligado com a proteína. Outra fotoproteína que pode ser de uso de acordo com a invenção é

halistaurina. Halistaurina pode ser usada para detectar estrôncio, que é acreditado substituir uma fração pequena do cálcio no cristal de hidroxiapatita durante a mineralização. Deficiência em estrôncio está ligada à cárie dentária ("*Strontium and dental caries*" Nutr Rev 1983;41:342-344). Detecção de estrôncio pode ser com uma fotoproteína tal como halistaurina. Gamas extensivas de valores de estrôncio em dentes (por exemplo 66 - 564 ppm) foi relatado de diferentes áreas nos EUA.

[0098] Outro exemplo de uma fotoproteína é equorina que ocorre naturalmente na água-viva bioluminescente, *Aequorea victoria* ou pode ser expressada recombinantemente. Equorina é uma proteína capaz de armazenar uma quantidade grande de energia que é liberada na presença de cálcio. Apoequorina interage com seu substrato coelenterazina para formar um complexo relativamente estável que é ativado por cálcio. A ligação de dois íons de cálcio à equorina causa alterações conformacionais da proteína, resultando na abertura da proteína e decomposição de peróxido de coelenterazina para coelenteramida e CO₂, acompanhado por emissão de um sinal óptico ou luz. Mais descrição de equorina pode ser encontrada em Shimomura et al (1978) *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A* 75, 2611-2615; Head et al (2000) *Nature* 405, 372-376; e Shimomura (2005) *Journal of Microscopy* 217, 3-15.

[0099] Outros exemplos de fotoproteínas incluem obelina, clitina, mitrocomina, halistaurina, fialidina, mnemiopsina, simplectina, gr-bolinopsina e berovina. Estas fotoproteínas mostram homologia de sequência alta e contêm três sítios de ligação de cálcio de "mão de EF". Mais descrição destas fotoproteínas pode ser encontrada em Prasher et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126 (1985); Inouye et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985), p. 3154-3158; Prasher et al, *Biochemistry* 26 (1987), págs. 1326-1332; Inouye et al, *FEBS Lett.* 315 (1993), págs. 343-346; T. F. Fagan et al, *FEBS Lett.* 333 (1993), págs. 301-305; Illarionov et al, *Dokl. Akad. Nauk* 326 (1992), págs. 911-913; Illarionov et al, *Gene* 153 (1995), págs. 273-274; Shimomura et al (1985), *Biochem J.* 15 de junho; 228(3):745-9; Ward et al (1974) *Biochemistry*. 26 de março; 13(7):1500-10. Mais descrição do modo de ação destas proteínas pode ser encontrada em Markova et al, *Biochemistry* 41 (2002), págs. 2227-2236; Charbonneau et al, *Biochemistry* 24 (1985), págs. 6762-6771; Tsuji et al, *Photochem. Photobiol.* 62 (1995), págs. 657-661.

[00100] A composição pode compreender um quelante de íon sintético tal como um complexo de EDTA-repórter ou um macrociclo tal como um complexo de éter de coroa-repórter. Há muitos exemplos destes, que ligam a íons e complexos com repórteres foram feitos. Por exemplo, união de um fluoróforo

e receptores seletivos usando transferência de elétron fotoinduzida para cálcio usando BAPTA como descrito em John F. Callan, A. Prasanna de Silvaa e Nathan D. McClenaghanv (2004) Chem. Commun. 2048-2049. Também a patente US 5409835 descreve compostos fluorescentes de sonda heterocíclica de ligação de cálcio para determinar a concentração de íons de cálcio nas amostras.

[00101] A composição pode compreender um complexo que fluoresce em um comprimento de onda característico indicativo da presença de íons. Tais complexos fluorescentes respondem aos íons alterando a intensidade ou cor da luz. Estes complexos podem ser proteínas ou complexos de proteínas.

[00102] Exemplos preferidos de proteínas fluorescentes incluem proteínas ou indicadores de camaleon. Cameleons são uma classe nova de indicadores para concentrações de íons de cálcio em células vivas que operam através de uma alteração conformacional que resulta em "Transferência Energia por Ressonância de Föster" (FRET ou "Transferência Energia por Ressonância de Fluorescência") na presença de íons de cálcio. Figura 1 mostra uma representação esquemática de FRET em indicadores de camaleon. Mais especificamente, FRET envolve a transfira não-radioativa de energia de excitação e fluoróforo doador excitado para um fluoróforo aceitante no estado aterrado por meio de

interações de dipolo-dipolo de faixa longa intermolecular (10-100 Å). Indicadores de camaleon consistem em uma proteína artificial modificada da proteína fluorescente verde (GFP). A estrutura molecular de camaleon é modelada como um produto de fusão entre duas proteínas fluorescentes (tendo características de excitação e emissão divergentes), calmodulina (CaM), e o domínio de ligação de calmodulina da miosina cinase de cadeia leve (M13). Calmodulina é capaz de ligação com íons de cálcio livres e a cadeia de M13 pode ligar com a calmodulina após tiver ligado os íons de cálcio. Os genes destas quatro proteínas são linearmente unidos, e os genes de fusão são expressados em uma variedade de células. Quando a calmodulina ligar o cálcio livre, altera-se em estrutura, reunindo muito próximo as duas proteínas fluorescentes e resulta em FRET. Desse modo, em vez da proteína fluorescente ciano emitir luz azul, esta luz é transferida para a proteína fluorescente amarela, resultando na fluorescência amarela. Mais descrição dos indicadores de camaleon pode ser encontrada em Miyawaki et al (1997) *Nature* 388 (6645):882; Miyawaki et al, *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 96: 2135-2140 (1999).

[00103] Um outro exemplo de proteína fluorescente é Pericam, que é uma forma modificada de GFP. A interação induzida por Ca^{2+} entre CaM e o peptídeo ligador M13 da pericam leva a alterações nas características de

fluorescência de (cp)YFP circularmente permutadas como descritas em Nagai et al, PNAS 98 (6): 3197 (2001).

[00104] Um outro exemplo de um método fluorescente é a sonda de Camgaroo em que a ligação de cálcio interage com calmodulina causando uma alteração conformacional da proteína e um aumento na fluorescência da proteína fluorescente amarela e induz um aumento na fluorescência (como revisado em Rudiger Rudolf, Marco Mongillo, Rosario Rizzuto & Tullio Pozzan *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 579-586).

[00105] Um outro exemplo de um método fluorescente são as fotoproteínas fluorescentes quiméricas, por exemplo, GFP-equorina (tais como US2003175807) em que a molécula fluorescente é covalentemente ligada com uma fotoproteína e há uma transferência da energia por Transferência de Energia por ressonância quimiluminescente (CRET).

[00106] Estes exemplos servem para ilustrar o uso dos complexos de proteínas-repórter na detecção de íons. As proteínas envolvidas podem ser qualquer número que ligam, ou alteram a conformação na ligação de um íon particular. Para cálcio, estas poderia ser caseína, calsequestrina, calexcitina, cisteína protease de ligação de cálcio, calmodulina e outras proteínas de mão de EF. Os repórteres podem ser tinturas ou proteínas fluorescentes ou luminescentes.

[00107] A composição pode compreender um complexo incorporando uma sonda molecular tal como sonda Scorpion, sonda de Taqman, junção de Holliday ou sonda linear. Fluorescência ou luminescência podem ocorrer no íon que liga à sonda. Exemplos preferidos de sondas moleculares são junções de Holliday. Estas são junções móveis formadas entre quatro filamentos de DNA. Elas são usualmente usadas para detecção de sequências de DNA específicas, porém, íons de metal são conhecidos representar um papel importante na determinação da conformação da junção ligando a sítios particulares (Thorpe J. H., Gale B. C., Teixeira S. C. e Cardin C. J. (2003) J Mol Biol. 2003 14 de março;327(1):97-109). Portanto, estas junções poderiam ser usadas para detectar a presença de íons tais como sódio, cálcio e estrôncio.

[00108] Vários métodos podem ser usados juntamente. Por exemplo, quelantes podem ser usados para sequestrar um íon, deixando outro para ligar a uma fotoproteína. Desse modo, a fotoproteína halistaurina liga cálcio e estrôncio. Estrôncio pode ser uma medida boa de doença e o cálcio, que do contrário mascararia a quantidade de estrôncio presente, poderia ser sequestrado antes da fotoproteína ser adicionada ao dente, deixando a fotoproteína responder apenas ao estrôncio. Agentes sequestrantes de cálcio poderiam ser com base em proteína (calmodulina, calciclina) ou com base em

químicas (BAPTA, EGTA). BAPTA (ácido 1,2-bis(o-aminofenóxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético) é um quelante cálcio-específico, e compostos com base em BAPTA estão entre o mais populares para medir Ca^{2+} intracelular livre.

[00109] Fotoproteínas e proteínas fluorescentes podem ser usadas junto usando Transferência de Energia por Ressonância Bioluminescência (BRET) em que o sinal óptico produzido de uma fotoproteína é transferido para uma proteína fluorescente em proximidade íntima, e a fluorescência da proteína fluorescente é depois medida. Desta maneira, a cor do sinal pode ser alterada ou a duração do sinal aumentada para melhorar o imageamento. Um dos problemas com o imageamento de tinturas fluorescentes em dentes é que frequentemente há situações onde não é prático usar uma fonte luminosa de intensidade alta devido à autofluorescência alta intrínseca dos dentes. Um possível benefício de usar BRET é que pode ser usada para a excitação de uma sonda fluorescente que fica colocalizada em uma área específica onde cálcio está presente.

[00110] A composição pode ser usada para análises de dentro-da-boca, por exemplo, para detectar a presença de cáries ativas; e análises de fora-da-boca, tais como em um laboratório para o estudo de cáries artificialmente induzidas, desenvolvimento de alimentos amigáveis ao dente novos e formulações e estudo da erosividade dos comestíveis.

Análises fora-da-boca usando a composição podem ser também realizadas usando um modelo de dente, tais como modelos de seções de hidroxiapatita ou de esmalte.

[00111] A composição pode ser usada por exemplo pelos dentistas e higienistas dentais para detecção prematura de desmineralização ativa, determinação do melhor tratamento, para monitorar um problema ou tratamento com o passar do tempo, e identificar indivíduos que podem ser suscetíveis a certos problemas dentais (por exemplo erosão ou hipersensibilidade); por investigadores de laboratório para o desenvolvimento de produtos novos (por exemplo pastas de dentes, bebidas); ou para o mercado de cuidado de casa para detecção e avaliação de doença dental ativa (por exemplo na forma de um líquido para limpeza bucal ou tabletes reveladores).

[00112] Nenhum método de uma única etapa para a detecção de cáries ativas está correntemente disponível. Cáries ativas tendem a produzir íons livres devido à desmineralização continuada; cáries inativas produzirão poucos, se houver, íons livres, devido à ausência de desmineralização. Desmineralização pode ser detectada medindo o sinal óptico produzido seguindo aplicação de repórteres sensíveis a íons, isto pode ser comparado às cáries não-ativas onde há pequenas ou nenhuma desmineralização.

[00113] Repórteres sensíveis a íons podem, portanto, fornecer uma medida de um-tempo da natureza ativa das cáries, e elimina a necessidade por várias visitas ao dentista.

[00114] Repórteres sensíveis a íons podem ser também usados para determinar a suscetibilidade de um indivíduo à doença dental, por exemplo, erosão dental. Neste caso, uma solução suavemente corrosiva, por exemplo, ácido fraco, poderia ser adicionada aos dentes e a resposta dos dentes conforme medida por um sinal emitido pela composição de detecção indicaria a extensão da desmineralização e probabilidade de encontrar problemas com erosão no futuro.

[00115] O método para a detecção de desmineralização dentária ativa pode opcionalmente incluir as etapas de remover a saliva da superfície do dente, e onde apropriado removendo a placa (se presente), depois expondo a superfície do dente sob investigação a uma composição como descrita acima e detectando o sinal óptico resultante.

[00116] O método pode também compreender a etapa de expor o dente a uma solução sensibilizadora, tal como uma solução açucarada ou acídica, antes da exposição com a composição de proteína. As soluções de sensibilização imitam os efeitos de desmineralização para detectar hipersensibilidade e erosão e podem ser usadas para avaliar a extensão de um problema particular. Por exemplo, uma solução ácida pode ser usada para identificar as áreas da

dentina (por exemplo, de erosão do dente) ou exposição de raiz (por exemplo, de gengiva retrocedendo). Isto é porque partes particulares do dente responderão mais fortemente às soluções ácidas que outras partes e assim podem ser identificadas. Por exemplo, devido à extensão inferior da mineralização dentro de dentina e cimento, comparado ao esmalte, adição de uma solução sensibilizadora causará a liberação de mais cálcio da dentina e cimento que o esmalte. Sob aplicação do repórter sensível a íon, as regiões da dentina (correspondendo às regiões de erosão da dentina ou hipersensibilidade) ficarão mais luminosas, isto é, com um sinal óptico mais forte, que as regiões do esmalte assim indicando a extensão do problema. Isto pode melhorar a precisão dos resultados.

[00117] Soluções de sensibilização podem ser também usadas para avaliar a suscetibilidade de um indivíduo por uma condição particular. Aqueles indivíduos mais suscetíveis à erosão de dente mostrarão mais desmineralização e assim uma maior resposta. Estrutura e composição do esmalte são menos importantes na avaliação da suscetibilidade à erosão dental que da saliva. Composição salival, volume, composição e fluxo representam um papel importante em determinar a suscetibilidade à erosão de um indivíduo. A tecnologia da invenção pode ser capaz de determinar a resistência do esmalte dentário ao desafio de ácido incluindo a proteção

dada pela saliva do indivíduo (em particular a película salival). Um tal teste quantitativo pode ser benéfico aos dentistas e higienistas dentais para determinar a suscetibilidade do paciente e monitorar os fornecedores de tratamento e de pasta de dente e cientistas de alimento que querem entender que efeito as alterações das formulações têm no nível de desmineralização. Adicionalmente este teste será útil na promoção de novos revestimentos de prevenção de erosão. Portanto, uma versão alternativa do teste para desmineralização devido à erosão pode envolver esperar por um período de tempo, por exemplo menos que 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 segundos após exposição à solução corrosiva de forma que a saliva podem acumular-se na boca, e depois testar a extensão da desmineralização com a composição de detecção. O período de tempo poderia ser estendido conforme necessário até 1, 2 ou 5 minutos para a saliva acumular-se novamente.

[00118] O sinal óptico resultante pode ser detectado usando um espectrofotômetro, dispositivo acoplado à carga (CCD), semicondutor de metal-óxido complementar (CMOS), câmera digital, câmera intensificada, filme fotográfico, dispositivo de fibra óptica, detector fotométrico, fotomultiplicador, sistema microeletromecânico (MEMS) ou visualmente a olho. Para teste de laboratório, por exemplo

no desenvolvimento de bebidas amigáveis ao dente, o processo pode usar uma câmera, luminômetro ou fluorômetro para automatização e processamento alto das amostras.

[00119] Software pode ser usado para analisar a intensidade da luz, a localização da luz e a duração da luz produzida. Ele pode ser usado para intensificar o sinal e fornecer uma sobreposição "sobreposta" em uma imagem dos dentes para permitir os dentistas alvejar exatamente os sítios e auxiliar no monitoramento das alterações no momento ou após o tratamento.

[00120] Desse modo, a presente invenção também permite a avaliação do potencial para mais erosão, como também hipersensibilidade dentinária (através da desmineralização que causa outra abertura dos túbulos dentinários expostos), determinando a quantidade de cálcio livre. Desse modo, o método permite a identificação de pacientes mais suscetíveis à erosão dentária, como também dentes hipersensíveis. Isto permitiria adotar medidas preventivas para aqueles indivíduos que são propensos à erosão e pode também permitir testes com base em laboratório para investigar novas pastas de dente para hipersensibilidade, ou analisar produtos alimentícios e de bebida para suas propriedades corrosivas de dente.

[00121] Os experimentos a seguir foram realizados usando uma técnica de luminescência com base em imagem e a

proteína sensível a íon equorina. Todo o trabalho foi realizado usando dentes humanos extraídos. Na boca, uma variedade de métodos de aplicação poderia ser usada. Por exemplo, poderia haver um dispositivo de veículo para a composição reveladora. Este pode ser um bocal tal como uma bandeja dental. Uma vantagem de usar um dispositivo de veículo é que mantém a saliva longe do dente e da composição reveladora. A bandeja pode ser não-personalizada, isto é, apenas ter forma e tamanho aproximados da boca da pessoa, ou personalizada, isto é, usar os dentes de uma pessoa como um modelo para fazer a bandeja. A bandeja agiria como uma interface entre a composição reveladora e o detector. Preferivelmente o dispositivo de veículo é opticamente claro. A composição reveladora pode ser adicionada ao dispositivo de veículo antes de ser colocada na boca de um paciente ou injetada ao dispositivo de veículo quando na boca. Alternativamente uma tira da composição reveladora pode ser usada. Esta seria parecida às tiras de branqueamento de dente conhecidas na técnica anterior que são aplicadas à área de interesse. Tiras de branqueamento convencionais compreendem uma tira de plástico flexível revestida com um gel de branqueamento dental de viscosidade moderada e viscosidade relativamente baixa no lado da tira faceando os dentes do usuário. Alternativamente a composição reveladora

poderia ser pulverizada sobre os dentes ou aplicada em um líquido para limpeza bucal.

[00122] Uma solução de equorina foi preparada como segue. Equorina recombinante foi expressada em *E. coli* usando a sequência de gene originalmente de *Aequorea Victoria*, complexada com o substrato coelenterazina, e liofilizada. A preparação de matéria-prima seca continha aproximadamente 1% p/p de equorina em manitol (Prolume (RTM)). Para fazer uma solução de equorina de trabalho para aplicação aos dentes, a preparação de equorina de matéria-prima seca foi dissolvida em uma concentração de 1 mg/ml p/v em água purificada livre de cálcio. Alternativamente 1 mg/ml p/v de equorina foi preparada em 1% gel Akucell 3625 com 1 mM EDTA. Quando os íons de cálcio forem adicionados a esta solução de equorina ou gel, um lampejo azul é emitido.

[00123] As amostras foram colocadas em uma caixa escura em um estágio de altura ajustável e as imagens foram registradas usando um dispositivo acoplado à carga de luz baixa ou CCD (câmera de CCD termoeletricamente esfriada de Starlight Xpress HX-9 (RTM) equipada com uma macrolente Tamron (RTM)). Na maioria dos casos, interpolação de pixels de hardware de 2x2 foi usado para aumentar a sensibilidade de detecção e reduzir os tempos de exposição. As imagens foram salvas como arquivos TIF. As imagens à luz do dia foram capturadas com a abertura da porta de caixa escura a

luz ambiente iluminar as amostras, e capturadas usando 10/100^a segunda exposição e interpolação 2x2. As imagens escuras foram tiradas com a porta da caixa escura fechada, e usando um tempo de exposição de 1 ou 2 minutos, com interpolação de pixels de 2x2.

[00124] Imagens em escala de cinzas (256 níveis) foram abertas na Imagem J e (se necessário) o contraste ajustado para aumentar a clareza da imagem, antes de ser inserido ao documento Microsoft Word (RTM). Para imagens produzidas para os mesmos experimentos, os mesmos ajustes foram feitos em cada imagem. As imagens resultantes podem ser usadas para mapear a luminescência, correspondendo à presença de cálcio na amostra. As regiões mais escuras (pretas) indicam as regiões de luz mais baixa e as regiões mais claras (brancas) indicam as regiões de luz crescente.

EXPERIMENTO A: DESMINERALIZAÇÃO DENTÁRIA USANDO GEL ÁCIDO

[00125] Um método padrão usado na indústria para imitar a geração de cáries ativas no laboratório é criar regiões de desmineralização usando soluções ou géis de ácido (por exemplo, referência Amaechi et al.: Arch Oral Biol 1998; 43: 619-628). Temos experimentos similares realizados para determinar se o nosso material revelador pode ser usado para identificar regiões de desmineralização.

[00126] Gel de carboximetilcelulose (3% p/v Akucell 1985) foi preparado em pH 4,7 ou pH 6,4 (usando 0,1 M de ácido láctico, neutralizado com 5 M de hidróxido de potássio). Esta faixa de pH foi escolhida uma vez que esmalte dissolve-se a um pH crítico de aproximadamente 5,4. 'Janelas' de aproximadamente 4x4 mm foram criadas nas superfícies lisas dos dentes pré-molares extraídos usando esmalte de unha, Figura 2. As janelas são de tamanho similar (uma vez que o tamanho é conhecido afetar a extensão da perda mineral). Gel (ou pH 4,7 ou 6,4) foi aplicado à janela e o dente incubado em um ambiente hidratado e 37°C por 5, 10, 14 ou 21 dias. 5 dentes de réplica foram usados em cada ponto de tempo e pH. Além disso, 15 dentes foram incubados durante 14 dias em qualquer gel de pH 4,7, avaliados, depois incubados com gel de pH 4,7 ou pH 6,4 durante um adicional de 5 dias antes de serem reavaliados. Isto permite determinação se a desmineralização pode ser detida neutralizando o gel.

[00127] Após incubação, o gel foi limpo esfregando suavemente a superfície do dente com tecido e a superfície enxaguada com água deionizada. O dente foi imageado com uma câmera Sony HX9 usando interpolação 2x2 e o tempo de captura da imagem de 10 ms na luz. 0,2 cm³ em 1 mg/cm³ de equorina em 1% de gel Akucell 3625 (gel revelador) preparado com 1 mM de EDTA foi transferido para o dente com um pipetador

automático. Uma imagem de 1 minuto com interpolação 2x2 foi tirada imediatamente na escuridão.

[00128] As imagens do exemplo são mostradas na figura 3. O contraste das imagens foi alterado para melhorar a apresentação e exatamente os mesmos ajustes foram aplicados em todas as imagens. Imagem J foi usada para determinar a brilhância da área dentro das janelas, Figuras 4 e 5.

[00129] Os resultados mostram claramente que aqueles dentes incubados com gel em pH 4,7 mostraram níveis mais altos de luz, isto é, liberação de cálcio livre e desmineralização que aqueles incubados com gel em pH 6,4. Também, a emissão de luz foi reduzida quando os dentes foram incubados primeiro em gel ácido e depois transferidos para gel neutro, quando comparados aos dentes transferidos de gel ácido para gel ácido.

[00130] Estes resultados fornecem evidência robusta que fotoproteínas sensível a cálcio tais como equorina podem detectar áreas de desmineralização. Significativamente, a desmineralização pôde ser detectada após apenas 5 dias. Iso é mais adiantado que as outras técnicas descreveram na literatura publicada, fornecendo evidência que este método proverá dados para desmineralização muito antecipado.

EXPERIMENTO B: USO DE MATERIAIS REVELADORES
ALTERNATIVOS

[00131] Há vários materiais que podem ser usados para identificar regiões de desmineralização mediante determinação da liberação de íon. Exemplo A usou a fotoproteína equorina. Outros materiais podem ser também usados.

[00132] Figura 6 mostra como obelina (uma fotoproteína sensível a cálcio) pode ser também usada. Um dente extraído foi incubado em 1% de ácido cítrico durante 2 minutos. Ácido é conhecido causar desmineralização do esmalte. O dente foi removido, enxaguado em água deionizada depois ensaiado. O dente foi imageado com uma câmera Sony HX9 usando interpolação 2x2 e tempo de captura de imagem de 10 ms na luz. 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de equorina ou 50 ug/ml de obelina em 1% de gel Akucell 3625 (gel revelador) preparado com 1 mM de EDTA foi transferido para o dente com pipetador automático. Uma imagem de 1 minuto com interpolação 2x2 foi tirada imediatamente na escuridão. Para melhorar a apresentação, o contraste da imagem foi ajustado usando a Imagem J; o mesmo ajuste foi feito em ambas as imagens. Figura 6A mostra luz gerada do gel de equorina e 6B do gel de obelina. Resultados indicam como vários repórteres diferentes podem ser usados para indicar a presença de íons livres e desmineralização.

EXPERIMENTO C. EXPOSIÇÃO DE RAÍZES

[00133] Um dente extraído foi imergido em equorina para testar se todas as áreas do dente responderam da mesma maneira à solução de equorina. O dente foi escovado ligeiramente com água purificada livre de cálcio e colocado em uma placa Petri de 3 cm de diâmetro em uma caixa escura. Uma imagem à luz do dia foi adquirida usando a câmera de CCD.

[00134] 5 ml de 1 mg/ml de solução de equorina foram pipetados diretamente sobre a superfície do dente. Uma imagem foi imediatamente adquirida, usando uma exposição de 2 minutos, com interpolação 2x2. A raiz do mesmo dente foi depois 'mascarada' com látex líquido (CopyDex (RTM)) e a solução de equorina adicionada novamente e a imagem tirada como antes. Os resultados estão mostrados nas Figuras 7a e 7b.

[00135] Figuras 7a e 7b são imagens de um dente após exposição à equorina, e uma raiz de dente mascarada com CopyDex (RTM) antes da exposição à equorina, respectivamente. Na figura 7A, as áreas mais claras (maior luminescência) correspondem à raiz e na figura 7B, há uma ausência de luz da área da raiz que foi mascarada. A emissão de luz é ligeiramente diferente devido à reorientação do dente seguir o mascaramento. Seta indica a presença de cáries na coroa do dente tão evidentes quanto uma mancha branca e confirmadas por um clínico dental.

[00136] Resultados indicam que a raiz do dente reage mais fortemente à equorina que a coroa, indicando uma quantidade muito mais alta de cálcio livre na raiz. Isto é acreditado ser por causa da mineralização inferior dos tecidos da raiz (dentina e cimento) que o esmalte da coroa. Um ensaio sensível a cálcio, tal como o método descrito aqui, usando equorina, pode ser usado para identificar tecido de raiz exposto, por exemplo como parte de uma investigação dos mecanismos de hipersensibilidade. Alternativamente, as raízes podem ser mascaradas, por exemplo com CopyDex (RTM), antes da adição da equorina permitindo investigação da coroa sem interferência da raiz.

EXPERIMENTO D: EXPOSIÇÃO DA DENTINA

[00137] Géis ou soluções reveladores que identificam a desmineralização devido à liberação de íon podem ser também usados para detectar e avaliar a extensão e localização da desmineralização resultante de erosão (e indiretamente hipersensibilidade).

[00138] Quando as coroas dos dentes ficarem lascadas - isto é, perderem algum do esmalte, a dentina do dente pode ficar exposta. Similarmente quando os dentes ficarem corroídos, por exemplo através de ácido, a dentina pode ficar exposta. Neste experimento um dente lascado foi usado para investigar se dentina exposta pode ser identificada usando um ensaio de repórter sensível a íon. Um dente extraído foi

escovado ligeiramente com água purificada livre de cálcio. Uma porção do esmalte lascou-se no processo, expondo a dentina subjacente. A raiz do dente foi 'mascarada' com látex líquido (CopyDex (RTM)). O dente foi colocado em uma placa Petri de 3 cm em uma caixa escura. Uma imagem à luz do dia foi adquirida. 4 ml de 1 mg/ml de solução de equorina foram diretamente pipetados sobre a superfície do dente. Uma imagem foi imediatamente adquirida em escuridão completa, usando uma exposição de 2 minutos, com interpolação de pixels de 2x2. Os resultados estão mostrados nas Figuras 8a e 8b.

[00139] Figura 8a é uma imagem à luz do dia de um dente e figura 8b é uma imagem de um dente após exposição à equorina. Área circulada mostra a região da fatia. Seta indica a região de raiz não completamente coberta por CopyDex (RTM).

[00140] Resultados indicam que muita luz foi produzida de equorina em contato com a área do dente recentemente lascada. Isto indica que a dentina exposta reage com equorina para produzir luz. Um ensaio de repórter sensível a íon, por exemplo um usando equorina, pôde ser usado para identificar as regiões onde a dentina fica exposta portanto, por exemplo, após erosão de dente.

EXPERIMENTO E: IDENTIFICAÇÃO DE CAVIDADE

[00141] Um dente extraído foi identificado ter uma cavidade por um clínico dental treinado. A raiz do dente foi

mascarada usando CopyDex (RTM). O dente foi escovado ligeiramente com água purificada livre de cálcio e colocado em uma placa Petri de 3 cm em uma caixa escura. Uma imagem à luz do dia foi adquirida usando uma câmera de CCD.

[00142] 5 ml de 1 mg/ml de solução de equorina foi diretamente pipetada sobre a superfície do dente. Uma imagem foi imediatamente adquirida em escuridão completa, usando uma exposição de 2 minutos, com interpolação de pixels de 2x2. Os resultados estão mostrados nas Figuras 9a a 9b e 10a a 10b.

[00143] Figuras 9a a 9b são (a) uma imagem de um dente decíduo (ou 'de leite') na luz, e (b) uma imagem monocromática. Seguindo o processamento da imagem, as regiões inferiores de luz aparecem em preto, com cinza e branco indicando as regiões de luz crescente. A seta indica a cavidade identificada pelo clínico dental.

[00144] Figuras 10a a 10b são uma imagem de um dente permanente na luz, e uma imagem monocromática respectivamente. Seguindo processamento da imagem, as regiões inferiores de luz aparecem em preto, com cinza e branco indicando as regiões de luz crescente. A seta indica a cavidade identificada pelo clínico dental.

[00145] A composição de acordo com a presente invenção responde aos íons livres mediante emissão de luz e a intensidade do sinal óptico é uma medida da quantidade de

íons livres presentes. A duração da luz emitida indica a natureza dos íons liberados, por exemplo um brilho mais longo pode indicar uma liberação ininterrupta de íons ou que liberaram dos tecidos mais profundos. Partes diferentes do dente respondem diferentemente à proteína sensível a íon por causa da natureza química dos íons livres presentes, por exemplo dentina responde mais que o esmalte por causa da quantidade de mineralização. Isto pode ser usado para identificar cáries dentárias ativas, erosão ativa, dentina exposta após a gengiva retroceder, etc.

[00146] A localização do sinal óptico indicará a localização do problema, por exemplo as cáries ativas. O tamanho da área de superfície de luz indica a extensão do problema, por exemplo a área de superfície das cáries ativas. A duração do brilho pode indicar o grau do problema, por exemplo a extensão do efeito do desafio com ácido (isto é, a suscetibilidade individual de um dente/paciente às cáries ou erosão) ou o tipo de tecido afetado. Cáries ativas podem ser distinguidas de cáries inativas pela intensidade, duração ou cor do sinal óptico produzido. Em cáries ativas, desmineralização é contínua então mais cálcio está presente e mais sinal é produzido. Uma lesão totalmente inativa produzirá apenas níveis de sinal de 'fundo'. Uma lesão parcialmente ativa mostrará áreas de atividade e inatividade, isto é, áreas com e sem sinal.

[00147] Desse modo, as áreas de desmineralização podem ser detectadas usando complexos sensíveis a íons antes da formação de lesão de cáries clinicamente visíveis de forma que o tratamento, por exemplo, aplicação de fluoreto, pode ser aplicado para impedir outro progresso do processo de decadência.

EXPERIMENTO F: IDENTIFICAÇÃO DE CÁRIES I

[00148] Estudos de laboratório podem ser usados para criar cáries artificiais, usando soluções de ácido. Preferivelmente, dentes extraídos da boca e com cáries são usados para testar o método. Estes terão cáries naturalmente geradas e forneceram um mimico melhor dos dentes na boca.

[00149] Um dente extraído foi identificado ter cáries por um clínico dental treinado, após identificar uma região 'branca' sob uma luz luminosa. Isto indica uma área de desmineralização e é um método tradicional de identificar cáries.

[00150] A raiz do dente foi mascarada usando CopyDex (RTM). O dente foi escovado ligeiramente com água purificada livre de cálcio e colocado em uma placa Petri de 3 cm em uma caixa escura. Uma imagem à luz do dia foi adquirida usando uma câmera de CCD.

[00151] 5 ml de 1 mg/ml de solução de equorina foram diretamente pipetados sobre a superfície do dente. Uma imagem foi imediatamente adquirida em escuridão completa, usando

uma exposição de 2 minutos, com interpolação de pixéis de 2x2.

[00152] Figuras 11a a 11b são uma imagem à luz do dia de um dente na luz, e uma imagem em escala de cinzas, respectivamente. Seguindo processamento da imagem, as regiões inferiores de luz aparecem em preto, com cinza e branco indicando as regiões de luz crescente. A seta indica cáries identificadas pelo clínico dental usando métodos tradicionais.

[00153] Como mostram as imagens, a região 'branca' identificada por um clínico dental treinado ser uma lesão de cáries (ativa quando o dente foi extraído) é identificada como uma área mais luminosa no ensaio de equorina. Isto indica que o ensaio de equorina pode substituir os métodos tradicionais 'por visão'.

EXPERIMENTO G: IDENTIFICAÇÃO DE CÁRIES, AVALIAÇÃO DE DENTES RECENTEMENTE EXTRAÍDOS

[00154] Os dentes que tinham sido extraídos por razões ortodônticas ou outras foram obtidos imediatamente após extração. Nenhuma informação do paciente foi disponível, embora alguns dos dentes tenham sido prognosticados por um dentista ter cáries ativas devido à idade (foi uma clínica para menores) e condição dos dentes.

[00155] Imediatamente após a extração, os dentes foram enxaguados com água deionizada para remover alguns do

sangue aderente e material biológico. Os dentes foram imediatamente ensaiados com gel revelador.

[00156] O efeito de escovar os dentes extraídos em água deionizada foi determinado comparando a saída de luz dos dentes escovados e não-escovados com lesões em cavidade; Figura 12. Efeito limitado foi observado e assim o restante dos dentes foi escovado, como consideramos este método melhor mimetizar as ações de um paciente ao visitar um dentista.

[00157] Um dentista avaliou os dentes quanto a lesões de cáries e marcou que lado do dente olhar com lápis. Este lado foi colocado no lugar mais alto em uma placa petri e o dente foi imageado com uma câmera Sony HX9 usando interpolação 2x2 e tempo de captura de imagem de 10 ms na luz. 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de equorina em 1% de gel Akucell 3625 (gel revelador) preparado com 1 mM de EDTA foi transferido para o dente com pipetador automático. Uma interpolação 2x2 de imagem 1 minuto foi tirada imediatamente na escuridão.

[00158] Imagem J foi usada para alterar o contraste das imagens, embora diferenças sejam facilmente visíveis sem modificação da imagem, isto foi realizado para melhor apresentar os dados. Regiões inferiores de luz aparecem em preto, com cinza e branco indicando as regiões de luz crescente. Os resultados estão mostrados na Figura 13-16.

[00159] Dentes foram depois submetidos a raio x para determinar se as regiões de desmineralização ativa identificadas no ensaio de fotoproteína foram visível por métodos tradicionais. Embora os raios X sejam usados para monitorar cáries de progressão da lesão que foram detectadas com o gel revelador não foram visíveis por raio X, Figura 17. Isto indica a utilidade neste método para identificação prematura das lesões de cáries.

EXPERIMENTO H: AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS

[00160] Interferências potenciais através de outros produtos, por exemplo pasta de dente foi investigada, porque se luz for produzida em resposta a estas então este ensaio poderia ser problemático para uso dentro-da-boca.

[00161] Saliva: dentes extraídos foram enxaguados em água deionizada ou saliva (agrupados de 8 indivíduos). Antes da adição da solução reveladora, os dentes imageados foram extraídos com uma câmera Sony HX9 usando interpolação 2x2 e tempo de captura de imagem de 10 ms na luz. 5 cm³ de 1 mg/ml de equorina em água deionizada foi depois adicionado (solução reveladora) e imageados durante 2 minutos, interpolação 2x2 na escuridão. Os dentes foram imageados em saliva, removidos da saliva ou removidos e enxaguados em água deionizada, Figura 18. Resultados indicam que a saliva contém quantidades significativas de cálcio. Porém, fornecendo o dente não é em volumes de saliva que não deveria interferir com a análise.

Até mesmo na boca o volume de saliva será mínimo e assim não é esperado que a saliva seja um problema para a análise.

EXPERIMENTO H2 - CÁLCULO

[00162] Cálculo foi obtido raspando os dentes no curso de um tratamento dental e foi fornecido como flocos suspensos em água. Tanto subgingival como supragingival foram avaliados. As amostras foram filtradas antes do uso com um filtro de membrana Millipore e retentor, sob vácuo e lavadas com água deionizada. 5 cm³ de 1 mg/ml de equorina em água deionizada foram adicionados e as amostras imageadas durante 1 minuto, interpolação 2x2. Figura 19a e 19b. Contraste foi ajustado usando a Imagem J para melhorar a apresentação, o mesmo ajuste foi aplicado em ambas as amostras.

[00163] O efeito do cálculo *in situ* foi também investigado. 5 cm³ de 1 mg/cm³ de equorina em água deionizada foram adicionados e as amostras imageadas durante 2 minutos, interpolação 2x2, Figura 20.

EXPERIMENTO H3 - ENCHIMENTO DE RESINA

[00164] Um dente com um enchimento de resina foi avaliado. O dente foi imageado com uma câmera Sony HX9 usando interpolação 2x2 e tempo de captura de imagem de 10 ms na luz. 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de equorina em 1% gel Akucell 3625 (gel revelador) preparado com 1 mM de EDTA foi transferido para o dente com um pipetador automático. Uma interpolação

de imagem 2x2 de 1 minuto foi levada imediatamente na escuridão, Figura 21.

[00165] Resultados indicam que quantidades pequenas de luz foram obtidas mas são provavelmente muito baixas para interferir com o ensaio. De fato regiões inferiores de luz em um dente podem fornecer uma indicação da presença de cálculo.

EXPERIMENTO H4 - PASTA DE DENTE

[00166] Os dentes foram escovados com água deionizada, ou pasta de dente e água deionizada antes de serem avaliados com 2 cm³ de 1 mg/cm³ de equorina em água deionizada. Nenhuma luz extra foi visível das superfícies tratadas com pasta de dente cujos controles indicando a pasta de dente não deveria interferir com o ensaio (dados não mostrados).

EXPERIMENTO I: EROSÃO E HIPERSENSIBILIDADE DENTAIS

[00167] Refrigerantes carbonatados contêm níveis altos de ácido e são conhecidos ser uma causa da erosão de dente e podem exacerbar a hipersensibilidade dentinária. Vários dentes extraídos foram incubados nestas bebidas e equorina foi usada para avaliar seus efeitos. Isto foi empreendido com uma vista para desenvolver um ensaio para erosão dental (e indiretamente, hipersensibilidade) ou um método de identificar os indivíduos suscetíveis.

[00168] Dentes extraídos foram escovados ligeiramente com água purificada livre de cálcio e escova de dente e colocados em uma placa Petri de 3 cm em uma caixa escura. Uma imagem à luz do dia foi adquirida usando uma câmera de CCD. 5 ml de 1 mg/ml de solução de equorina foram diretamente pipetados sobre a superfície do dente. Uma imagem foi imediatamente adquirida em escuridão completa, usando uma exposição de 2 minutos, com interpolação de pixels de 2x2.

[00169] Os dentes foram depois enxaguados com água purificada livre de cálcio antes de serem imergidos em Cola, Irn Bru (RTM) ou 1% de ácido cítrico durante 10 minutos. Os dentes foram depois enxaguados com água purificada livre de cálcio depois 5 ml de solução de equorina foram adicionados, e os dentes imageados como antes. O pH das soluções foi também avaliado (com um medidor de pH Hydrus 300 (RTM)). Todos foram acídicos: Cola: pH 2,38; Irn Bru (RTM) pH 2,82; ácido cítrico pH 2,17. Os resultados estão mostrados nas Figuras 22a a 22c, 23a a 23c e 24a a 24c.

[00170] Figuras 22a a 22c ilustram o efeito de uma imersão de 10 minutos em Cola. Figura 22a é uma imagem à luz do dia de um dente sem equorina adicionada; Figura 22b é uma imagem de um dente na escuridão após adição de equorina, sem qualquer outro tratamento; e Figura 22c é uma imagem de um dente na escuridão após adição de equorina e seguindo uma incubação de 10 minutos em Cola.

[00171] Figuras 23a a 23c ilustram o efeito de uma imersão de 10 minutos em Irn Bru (RTM). Figura 23a é uma imagem à luz do dia de um dente sem equorina adicionada; Figura 23b é uma imagem de um dente na escuridão após adição de equorina, sem qualquer outro tratamento; e Figura 23c é uma imagem de um dente na escuridão após adição de equorina e seguindo uma incubação de 10 minutos em Irn Bru (RTM).

[00172] Figuras 24a a 24c ilustram o efeito de uma imersão de 10 minutos em 1% de ácido cítrico. Figura 24a é uma imagem à luz do dia sem equorina adicionada; Figura 24b é uma imagem de um dente na escuridão após adição de equorina, sem qualquer outro tratamento; e Figura 24c é uma imagem de um dente na escuridão após adição de equorina e seguindo uma incubação de 10 minutos em 1% de ácido cítrico.

[00173] Beber bebidas carbonatadas é conhecido causar erosão do dente. Resultados aqui mostram que incubação com bebidas carbonatadas açucaradas ou solução ácida, cálcio livre é liberado dos dentes, que pode ser detectado com equorina. Isto foi mais pronunciado na raiz. Proteínas sensíveis a íons, tais como equorina, podem, portanto, ser usadas para indicar áreas de liberação de cálcio e assim indicar áreas de desmineralização e por sua vez dano de dente tal como erosão ou probabilidade de hipersensibilidade aumentada.

[00174] Em dentes hipersensíveis, a dentina tem mais túbulos abertos na superfície da dentina (até 8 vezes) e o diâmetro do túbulo é mais amplo. Isto provê uma área de superfície maior disponível para desmineralização, por exemplo através de bebidas ácidas, e também conduzirá à liberação de mais cálcio seguindo aplicação de tais produtos. Isto será observado como uma região mais luminosa, como visto nas figuras 22 a 24.

EXPERIMENTO J: DENTES CAUSTICADOS COM ÁCIDO

[00175] Gel de impressão dental é usado para enrugar a superfície do dente de forma que, por exemplo, selantes para fissura possam ser prendidos firmemente. O gel de impressão é uma preparação ácida que caustica-se em uma profundidade limitada em uma área localizada.

[00176] Os dentes extraídos foram ligeiramente escovados com água purificada livre de cálcio e escova de dente. Uma marcação pequena (4x4 mm) foi aplicada ao dente, e fixada no lugar pintando na área inteira da marcação e superfície circunvizinha do dente com esmalte de unha. Este foi deixado secar-se depois a marcação foi descascada, dando uma área exposta de 4x4 mm circundada com verniz. Esta delimitou a área à qual o gel de impressão dental (Ultradent Products Inc) foi aplicado. Gel de impressão foi deixado durante 5 minutos antes de ser removido esfregando com um

chumaço de algodão, e enxaguado com chumaços de lã de algodão úmidos.

[00177] 5 ml de 1 mg/ml de solução de equorina foram diretamente pipetados sobre a superfície do dente. Uma imagem foi imediatamente adquirida em escuridão completa, usando uma exposição de 2 minutos, com interpolação de pixéis de 2x2. Uma segunda imagem foi imediatamente depois adquirida, usando uma exposição de 2 minutos. Os resultados estão mostrados nas Figuras 25a a 25c.

[00178] Figuras 25a a 25c são uma imagem à luz do dia, sem equorina adicionada; uma imagem monocromática após adição de equorina, com exposição de 2 minutos; e uma imagem monocromática após adição de equorina, com exposição de 2 minutos sequencial. A seta esquerda indica esmalte de unha, o asterisco indica a área à qual o gel de impressão foi aplicado.

[00179] Quando equorina foi adicionada a um dente que tinha sido causticado com gel de impressão dental houve um lampejo luminoso, visível a olho. A segunda exposição resultou em menos emissão de luz que a primeira exposição. Isto indica que o gel libera cálcio de apenas uma área localizada, esta está imediatamente disponível para reação com equorina, consequentemente o lampejo, com cálcio de pequena 'subsuperfície' sendo liberado para emissão de luz ser prolongada.

[00180] Este é diferente do efeito observado com ácido cítrico onde a emissão de luz continuou durante algum tempo. Como mostrado nas figuras 26a a 26d, o método como descrito no Experimento E foi realizado com uma segunda imagem, exposição de 5 min, e adquirida 15 minutos após a equorina ter sido adicionada. Parece que o ácido cítrico causa desmineralização mais extensiva.

[00181] Figuras 26a a 26d ilustram o efeito de uma imersão de 10 minutos em 1% de ácido cítrico. Figura 26a é uma imagem à luz do dia, sem equorina adicionada; Figura 26b é uma imagem de um dente na escuridão após adição de equorina, sem qualquer tratamento adicional; Figura 26c é uma imagem de um dente na escuridão após adição de equorina e seguindo uma incubação de 10 minutos em 1% de ácido cítrico, exposição de 2 minutos ocorrida imediatamente após a adição de equorina; Figura 26d é uma imagem de um dente na escuridão após adição de equorina e seguindo uma incubação de 10 minutos em 1% de ácido cítrico, exposição de 5 minutos ocorrida após 15 minutos da adição de equorina.

EXPERIMENTO K: AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE UM PACIENTE À EROSÃO

[00182] Pessoas diferentes têm uma suscetibilidade diferente à erosão e hipersensibilidade. Isto é conhecido ser em parte devido a tratamentos tais como fluorose e posicionamento dos dentes embora seja em geral considerado

que o fator mais importante que influencia a prevenção da erosão dental seja a saliva (taxa de fluxo, composição, tamponação e capacidade de remineralização).

[00183] A composição reveladora pode ser usada para identificar nível de desmineralização causada por erosão ácido de pacientes enxaguando os dentes primeiro em uma solução ácida. Isto proverá informação sobre a suscetibilidade do próprio dente à erosão. Também, reavaliando a emissão de luz após adição de saliva aos dentes, o papel da saliva de um paciente individual pode ser determinado. Os ensaios podem ser executados em dentes extraídos ou na boca.

[00184] Para avaliação da desmineralização, o dente foi imageado com uma câmera Sony HX9 usando interpolação 2x2 e tempo de captura de imagem de 10 ms na luz. 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de equorina em 1% de gel Akucell 3625 (gel revelador) preparado com 1 mM de EDTA foi transferido ao dente com pipetador automático. Uma imagem de 1 m com interpolação 2x2 foi triada imediatamente na escuridão. Imagem J foi usada para determinar a brilhância das áreas da coroa e da raiz. Um Glowell™ (G2 azul, formato de 96 poços) foi incluído para assegurar a uniformidade do equipamento de medição de luz. Importantemente, a equorina não é sensível a pH e emissão de luz é similar ao longo de uma faixa vasta de pH. Os dentes extraídos foram avaliados como acima (em triplicata). Os

dentes foram incubados em 1% de ácido cítrico durante 2 minutos, removidos, enxaguados em água deionizada, avaliados, depois incubados em água deionizada ou saliva por 30 s e depois reavaliados.

[00185] Figuras 27a e 27b mostram como a saliva tem um efeito protetor maior no esmalte tratado com ácido que água deionizada, resultando em uma maior redução na emissão de luz. Menos diferença foi observada na superfície de raiz. Junto com o Experimento L, que provê evidência para a natureza quantitativa do ensaio, isto sugere que um ensaio similar por meio do qual os dentes de um paciente são enxaguados com solução ácida, emissão de luz avaliada com uma solução reveladora de desmineralização e o efeito protetor de saliva determinado mediante reavaliação após contato com a saliva fornecerá um método para determinar a suscetibilidade de um paciente à erosão. Isto ajudará na diagnose clínica, decidindo sobre o tratamento apropriado e fornecendo evidência para como o estilo de vida afeta os dentes de um paciente.

EXPERIMENTO L: AVALIAÇÃO DO EROSIVIDADE DOS COMESTÍVEIS

[00186] Comestíveis diferentes são conhecidos causar níveis diferentes de erosão (por exemplo Hemingway et al., British Dental Journal (2006); 201, 439). Isto é em parte devido ao pH dos comestíveis, e em parte devido à concentração de cálcio.

[00187] Por exemplo, refrigerantes carbonatados contêm níveis altos de ácido e são conhecidos ser uma causa da erosão do dente e pode exacerbar a hipersensibilidade dentinária.

[00188] Solução reveladora e método de ensaio podem ser usados para desenvolver um ensaio para erosão dental (e indiretamente, hipersensibilidade). Este pode ser usado para identificar a extensão da desmineralização causada por comestíveis, assim provando um fator de risco dos alimentos. Ele pode ser usado para determinar a eficácia do consumidor e produtos clínicos tais como pastas de dentes, líquidos para limpeza bucal, selantes, agentes de branqueamento. Ele pode ser também usado no desenvolvimento e identificação de comestíveis que causam menos desmineralização e são portanto mais complacentes para com os dentes.

[00189] Em dentes hipersensíveis, a dentina tem mais túbulos abertos na superfície da dentina (até 8 vezes) e o diâmetro do túbulo é mais amplo. Isto provê uma maior área de superfície disponível para desmineralização, por exemplo através de bebidas acídicas, e também levará à liberação de mais cálcio seguindo aplicação de tais produtos. Isto será observado como uma região mais luminosa.

[00190] Linhas foram traçadas ao longo dos dentes decíduos extraídos com esmalte de unha para delimitar as superfícies da coroa e da raiz. Os dentes extraídos foram

incubados em soluções de vários pHs. Estas foram várias diluições de ácido cítrico, bicarbonato de sódio, solução salina tamponada de fosfato ou água deionizada. O pH das soluções foi também avaliado (com um medidor de pH Hydrus 300 (RTM)).

[00191] Incubações foram durante 2 minutos, após incubação os dentes foram removidos, enxaguados em água deionizada depois ensaiados. O dente foi imageado com uma câmera Sony HX9 usando interpolação 2x2 e tempo de captura de imagem de 10 ms na luz. 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de equorina em 1% de gel Akucell 3625 (gel revelador) foi preparado com 1 mM de EDTA e transferido ao dente com pipetador automático. Uma imagem de 1 m com interpolação 2x2 foi tirada imediatamente na escuridão. Imagem J foi usada para determinar a brilhância das áreas da coroa e da raiz. Glowell™ (G2 azul, formato 96 poços) foi incluído para assegurar a uniformidade do equipamento de medição de luz. Experimentos foram executados em triplicata; as médias são mostradas.

[00192] Figura 28 ilustra como soluções de pH divergente levaram a níveis diferentes de desmineralização, quando medido por brilhância, com soluções de pH inferior gerando mais desmineralização (mais brilhância). Como mostrado, a raiz foi mais suscetível que a coroa, com mais desmineralização em pH 4, que equipara bem com a literatura

disponível, indicando que o esmalte desmineraliza-se em um pH crítico de 5,5, enquanto que o tecido da raiz, que não é protegido por esmalte desmineraliza-se em um pH crítico de 6,2. Este experimento indica que o ensaio é quantitativo e pode ser usado para avaliar desmineralização resultante de erosão. Géis ou soluções reveladores, que identificam a desmineralização devido à liberação de íons, podem ser usados para indicar dano dentário tal como erosão ou probabilidade aumentada de hipersensibilidade.

[00193] Figura 29 ilustra como o efeito dos comestíveis sobre a desmineralização dos dentes pode ser determinada usando esta composição reveladora e método de ensaio. Método de ensaio foi como descrito. Resultados indicam que o pH dos comestíveis tem um grande efeito nos dentes. Novamente a superfície da raiz parece mais suscetível ao pH. Os resultados não só foram dependentes do pH dos alimentos, mas outros fatores parecem estar envolvidos. Assim, as bebidas dietéticas coca-cola (RTM) e ribena really light (RTM) produziram menos luz que pode ser esperado de seus pHs.

[00194] Géis ou soluções reveladoras, que identificam desmineralização devido à liberação de íons quando usados em um ensaio tal como este, podem ser usados para determinar os fatores de risco de matérias-primas de alimentos diferentes nos dentes ou como uma ferramenta no desenvolvimento de novas

matérias-primas de alimentos e produtos de consumidor e clínicos tais como pastas de dentes, líquidos para limpeza bucal, selantes, agentes de branqueamento. Adição de outras etapas, tais como incorporação de uma lavagem de saliva como mostrado no Experimento G, pode ser também útil para mimetizar nas condições da boca.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica intraoral para detectar caries dentárias ativas e/ou desmineralização ativa de dentes devida(s) a erosão, **caracterizada pelo** fato de compreender um complexo de proteína ou proteína que produz um sinal óptico luminescente característico na presença de íons de cálcio livres, em que a proteína ou complexo proteico compreende equorina, obelina, clitina, mitrocomina, halistaurina, fialidina, mnemiopsina, simplectina, gr-bolinopsina, caseína, calsequestrina, calexcitina, cisteína, protease de ligação de cálcio, calmodulina e outras proteínas contendo o motivo de mão de EF, berovina ou misturas dessas, além de um aditivo farmacêuticamente aceitável.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o aditivo é um agente terapêuticamente ativo.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada pelo** fato de que o agente terapêuticamente ativo é um agente bactericida ou bacteriostático.

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada pelo** fato de compreender ainda um excipiente farmacêuticamente aceitável.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada pelo** fato de que o excipiente

farmaceuticamente aceitável é um aditivo de aroma ou de coloração.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a composição é um líquido, um pó, uma substância moldável ou um gel.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o complexo de proteína ou proteína compreende fusões em tandem de uma proteína fluorescente, calmodulina e um peptídeo de ligação a calmodulina (M13).

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o complexo de proteína, ou proteína, compreende uma proteína recombinante.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizada pelo** fato de ser transparente opticamente.

10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada pelo** fato de que o sinal óptico é detectado por um espectrofotômetro, dispositivo acoplado a carga (CCD), CMOS semicondutor de óxido de metal complementar, câmera digital, câmera intensificada, câmera intraoral, videoscópio, filme fotográfico, dispositivo óptico, detector fotométrico, fotomultiplicador, sistema micro-eletro-mecânico (MEMS) ou visualmente, por olho.

11. Uso de uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado pelo** fato de

ser no fabrico de uma preparação para utilização na detecção de cáries dentárias.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo** fato de ser no fabrico de uma preparação para utilização na diferenciação entre cáries dentárias ativas e inativas.

13. Uso de uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 **caracterizado pelo** fato de ser para o fabrico de uma preparação para uso na detecção da desmineralização dentária devido à erosão.

14. Uso de uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 **caracterizado pelo** fato de ser para o fabrico de uma preparação para a detecção de locais de desmineralização da dentina relacionados com a hipersensibilidade da dentina.

15. Kit para uso na detecção de desmineralização **caracterizado pelo** fato de compreender:

uma composição conforme definida na reivindicação 1 compreendendo um complexo de proteína ou proteína, em que o complexo de proteína ou proteína compreende aequorina, obelina, ciantin, mitrocomina, halistaurina, fialidina, mnemiopsina, sinplectina, gr-bolinopsina, caseína, calsequestrina, calexcitina, cisteína protease de ligação ao cálcio, calmodulina e outras proteínas contendo o motivo mão de EF, berovina ou misturas das mesmas;

meios para a aplicação da composição; e

um detector.

16. Kit, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de compreender ainda uma solução de sensibilização acídica ou açucarada.

17. Kit, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de compreender ainda um marcador tal como uma grade para marcar áreas de interesse num dente ou modelo de dente.

FRET em Indicadores de íons de cálcio Cameleon

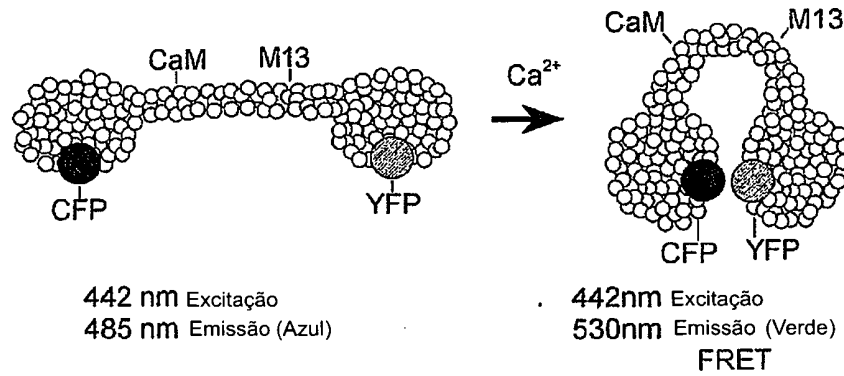


FIG. 1



FIG. 2

Figura 2 mostra uma imagem exemplar de um dente com uma 'janela' como demarcada por esmalte de unha e à qual o gel foi aplicado, Imagem tirada na luz

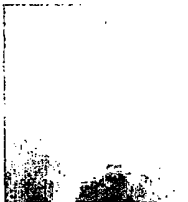
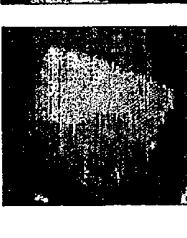
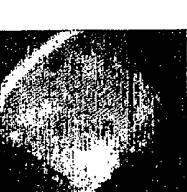
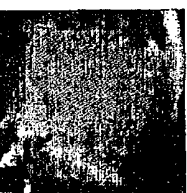
Imagens de luz da janela após incubação em gel e aplicação de equorina					Gel aplicado ao dente
					pH 4.7
					pH 6.1

FIG. 3

Figura 3 ilustra imagens mostrando a emissão de luz da janela, seguindo incubação em gel (ou pH 4,7 ou 6,4), exaure e adição do gel revelador. As áreas mais brilhantes indicam regiões de mais luz e correspondem às regiões onde cálcio livre está presente.

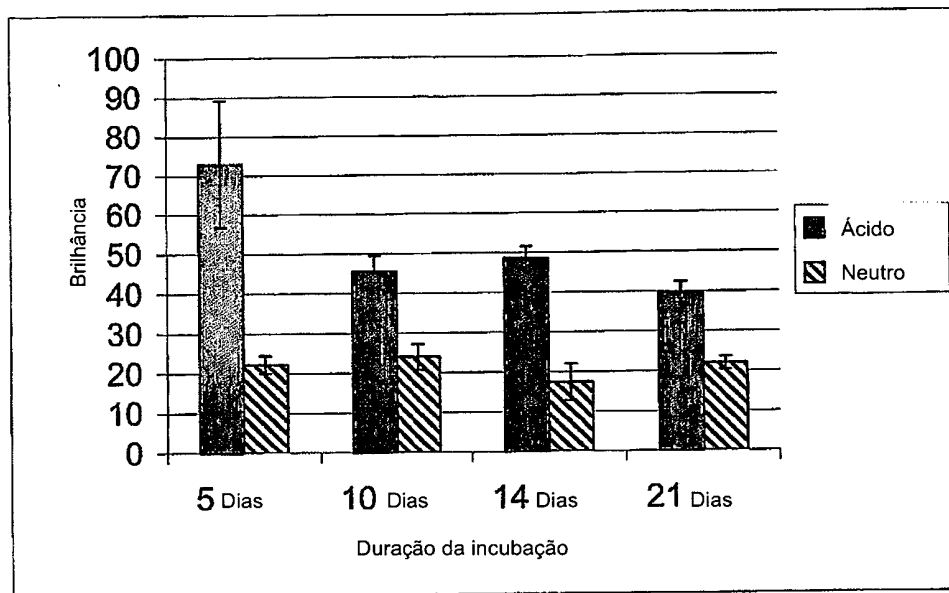


FIG. 4

Figura 4 mostra um gráfico descrevendo a emissão de luz de dentes tratados com gel ácido ou neutro. pH ácido 4,67; pH de controle 6,4. "Brilância" foi determinada usando a função de "perfil de diagrama" de ImagemJ

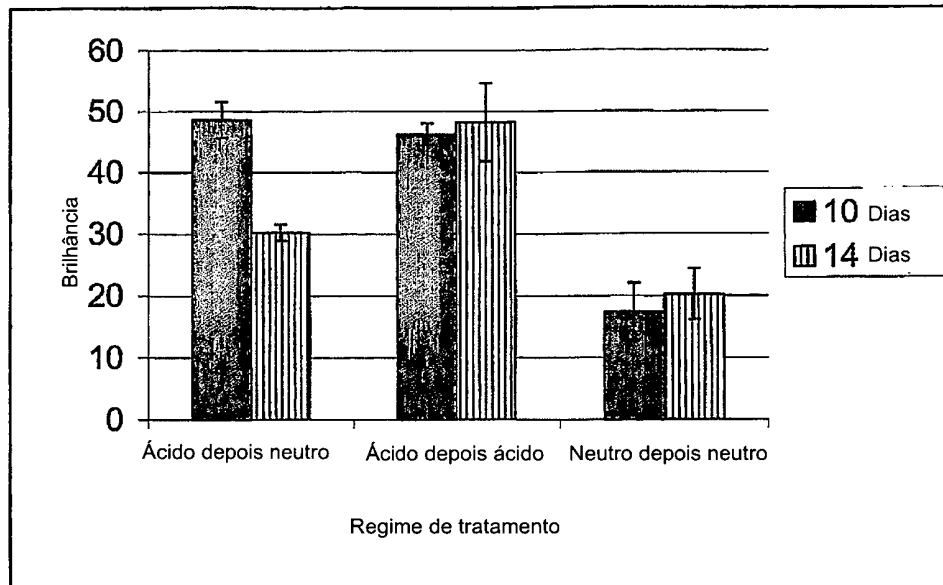


FIG. 5

Figura 5 mostra um gráfico descrevendo a emissão de luz de dentes tratados com gel ácido ou neutro. Os dentes foram primeiro incubados em gel (pH ácido 4,67 ou pH neutro 6,4) durante 14 dias antes da brilância ter sido avaliada e os dentes foram transferidos para um novo gel com pH 4,67 ou 6,4. 'Brilância' foi determinada usando a função de "perfil de diagrama" de ImagemJ.

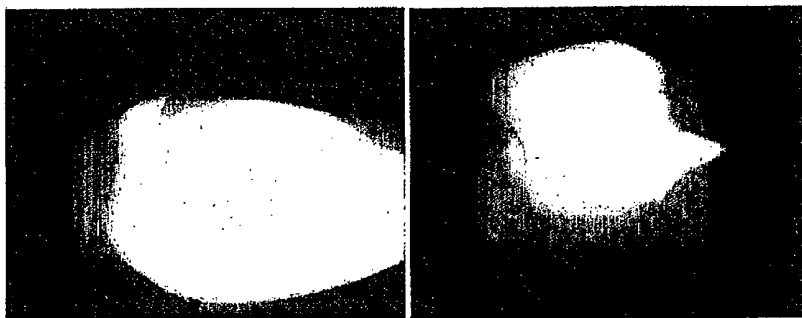


FIG. 6A

FIG. 6B

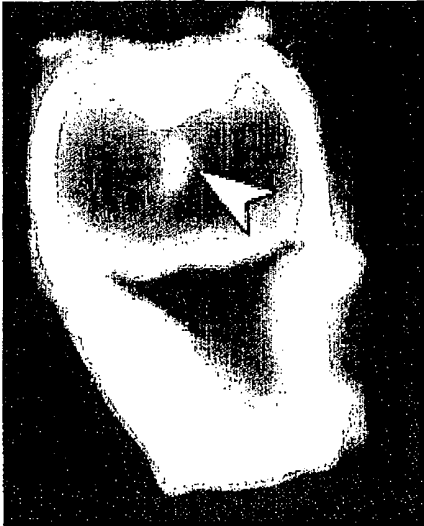


FIG. 7A



FIG. 7B

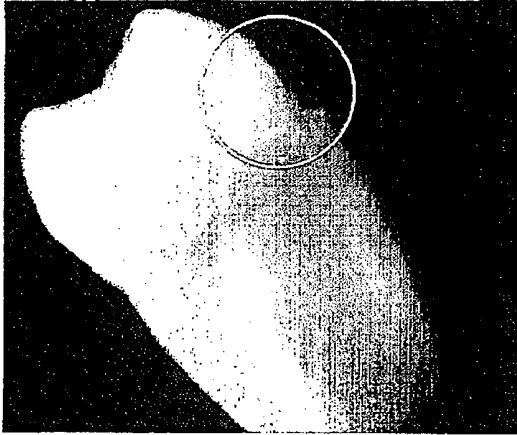


FIG. 8A

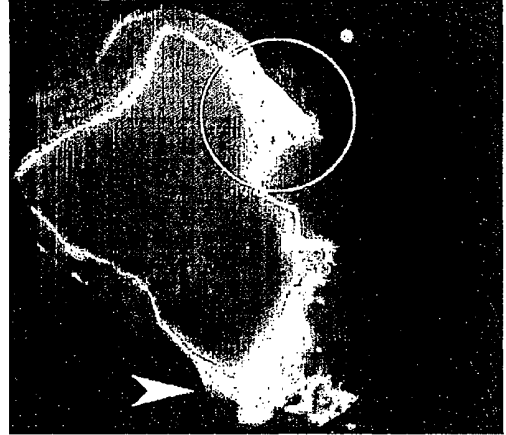


FIG. 8B



FIG. 9A

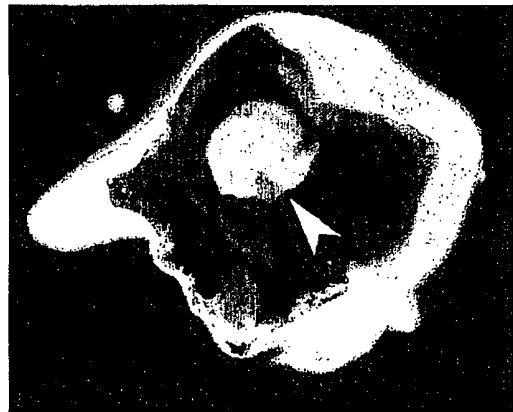


FIG. 9B



FIG. 10A



FIG. 10B

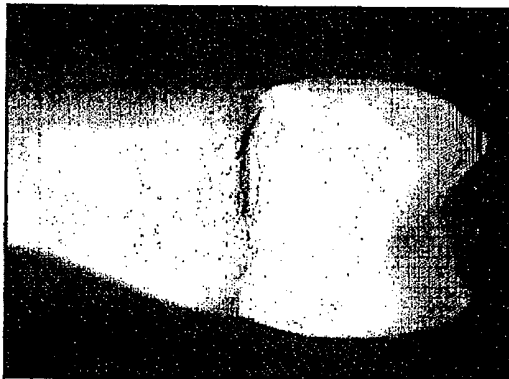


FIG. 11A



FIG. 11B

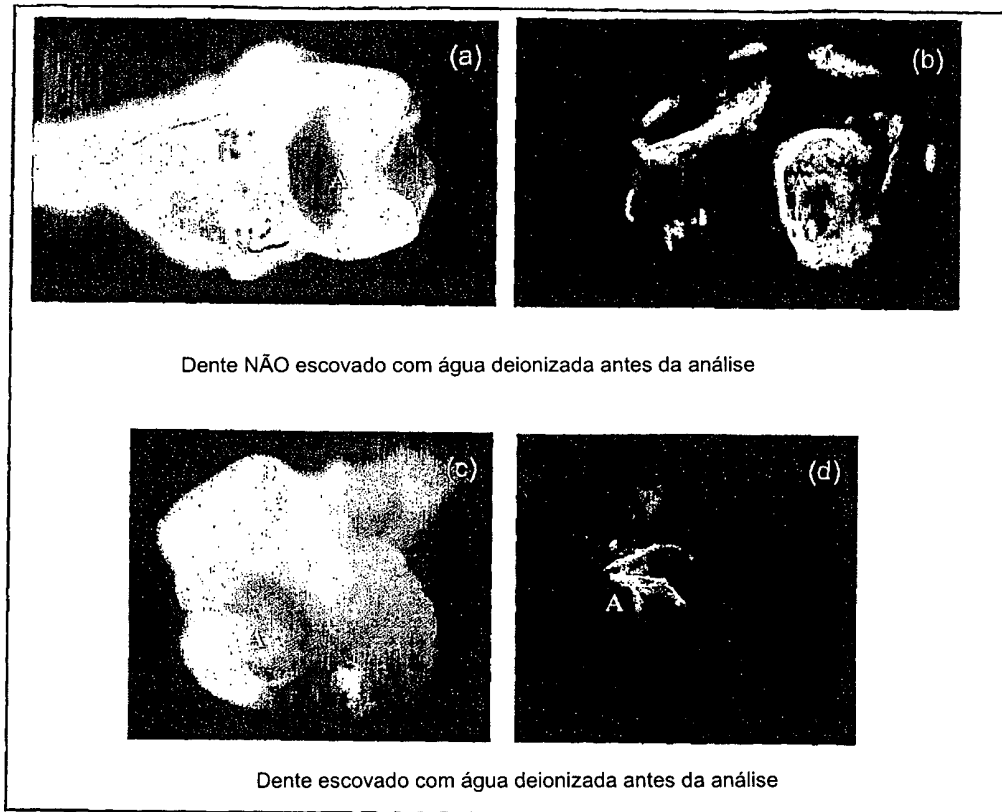


FIG. 12

Figura 12 mostrando molares decíduos com lesões em cavidade (A), (a e c) imagens dos dentes na luz (b e d) imagem monocromática seguindo aplicação do gel revelador.

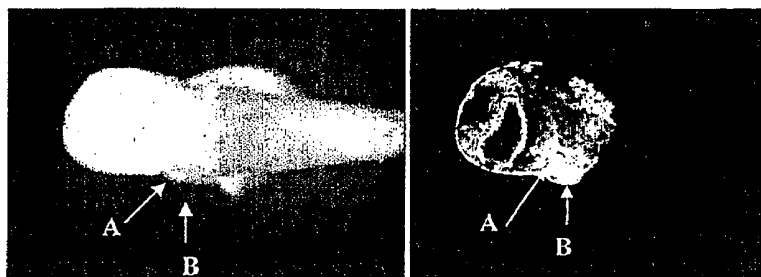


FIG. 13A

FIG. 13B

Figura 13 - mostra um incisivo (decíduo) com uma lesão grande de cáries (conhecida como síndrome de mamadeira). (a) imagem do dente na luz (b) imagem monocromática seguindo aplicação do gel revelador. A região esperada da atividade foi ao redor da borda da lesão onde desmineralização é provável. Isto foi confirmado por regiões de maior luz da borda da lesão. Luz alta é também observada na mancha A, onde o dentista causou quebra da superfície do dente durante a extração. Alguma base do material de montagem é também observada (B).

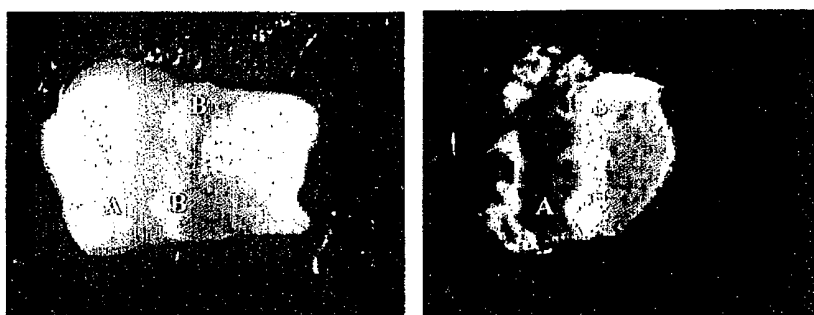


FIG. 14A

FIG. 14B

Figura 14 - Imagem mostrando a superfície lisa de um molar (decíduo). (a) imagem do dente na luz (b) imagem monocromática seguindo aplicação do gel revelador. Uma lesão de mancha branca (A) é visível como também tecido gengival residual (B). O ensaio mostra uma padronização distintiva, similar à lesão de mancha branca.

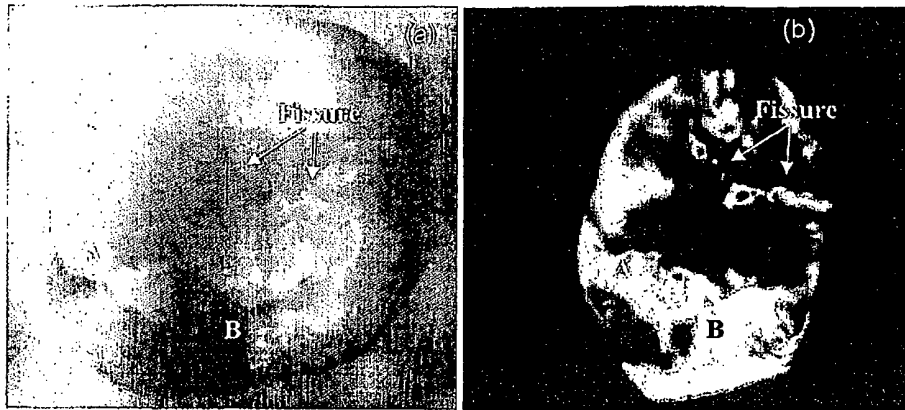


FIG. 15A

FIG. 15B

Figura 15 mostrando imagens da superfície oclusal de molar (permanente). (a) imagem do dente na luz (b) imagem monocromática seguindo aplicação de gel revelador. Uma resina de enchimento é evidente na posição A. Antes da adição do gel revelador um dentista prognosticou cáries ativas na posição B e sugeriu que as lesões de cáries ativas pudessem também estar presentes nas fissuras do dente. Nosso ensaio indica quantidades grandes de luz e desse modo desmineralização ativa da posição B como também luz capturada das fissuras. Observe que as diferenças no tamanho das imagens 9a e 9b indicando que o gel revelador não cobriu a superfície oclusal total.

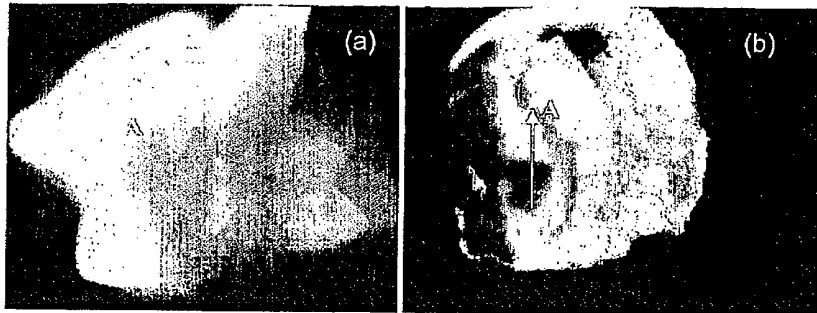


FIG. 16A

FIG. 16B

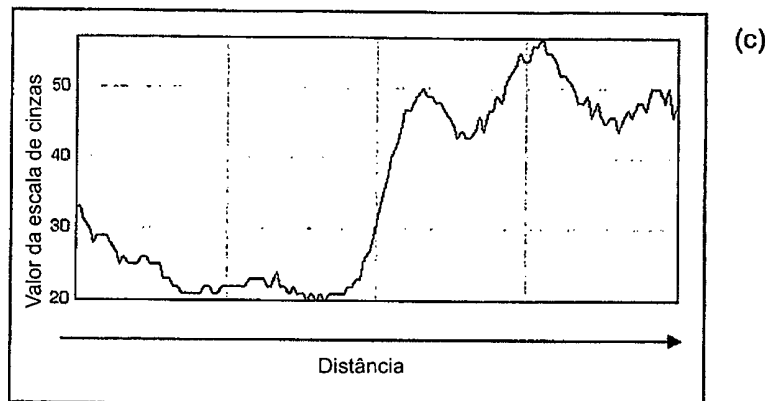


FIG. 16C

Figura 16 mostrando um molar (decíduo). (a) imagem do dente na luz (b) imagem monocromática seguindo aplicação de gel revelador (c) representação gráfica da luz gerada ao longo da lesão (→). Uma lesão de mancha branca (A) é visível. Antes da adição do gel revelador, um dentista prognosticou que a mancha branca foi facetada do outro lado da superfície, com remineralização na região inferior. Nós observamos padronização distintiva da lesão facetada com um sinal forte da área superior da lesão de mancha branca e menos luz da região inferior remineralizada do dente. Isto fornece evidência que o ensaio pode ser usado para avaliar a atividade de uma lesão de cáries e pode diferenciar entre lesões ativas e inativas.

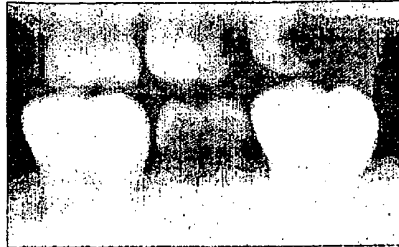


FIG. 17A

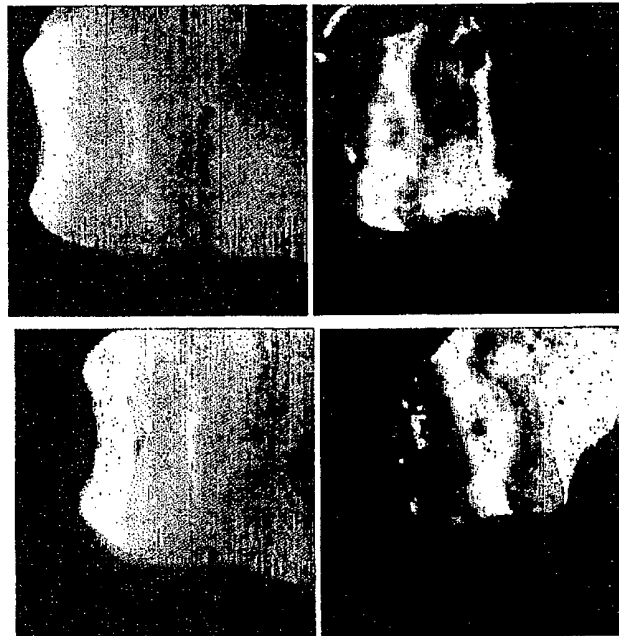


FIG. 17B

Figura 17a mostra um raio X dos molares permanentes cuja superfície mesial foi também investigada com gel revelador (17b). As superfícies mesiais dos dentes estão à esquerda no raio X, está claro que nenhuma desmineralização, que seria visível como uma sombra escura, está presente em qualquer um dos molares permanentes embora regiões de desmineralização ativa fossem observadas usando gel revelador (17b, imagens à esquerda são tiradas na luz e imagens monocromáticas à direita após adição da composição reveladora). O método é portanto capaz de identificar uma lesão ativa longa antes de um raio X ser capaz de detectar desmineralização nestes locais.

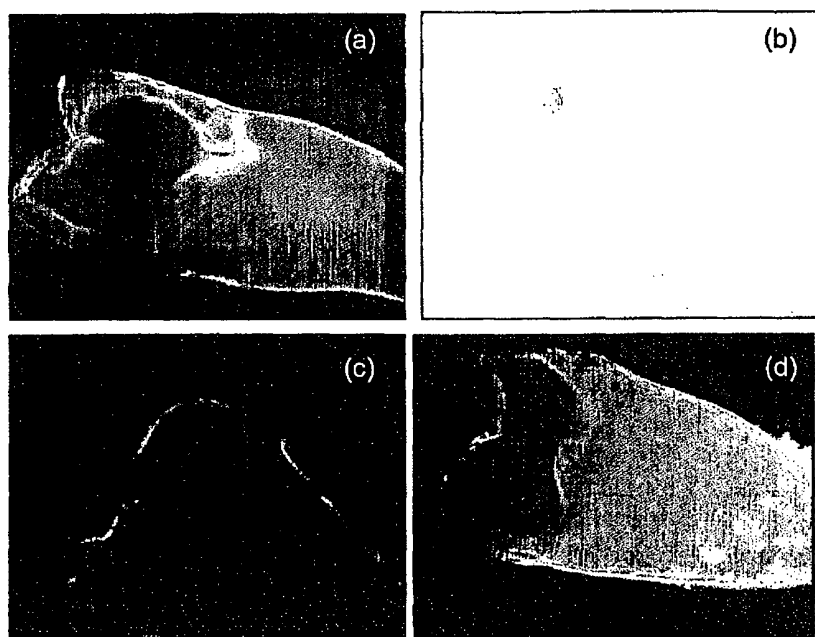
**FIG. 18**

Figura 18 (a) mostra uma imagem de um dente que tinha sido enxaguado em água deionizada e removido antes de ser avaliado (b) mostra um dente que tinha sido enxaguado e avaliado em saliva (c) mostra um dente que tinha sido enxaguado em saliva mas removido antes de ser avaliado (d) mostra um dente que tinha sido incubado em saliva, removido, enxaguado em água deionizada antes de ser avaliado.

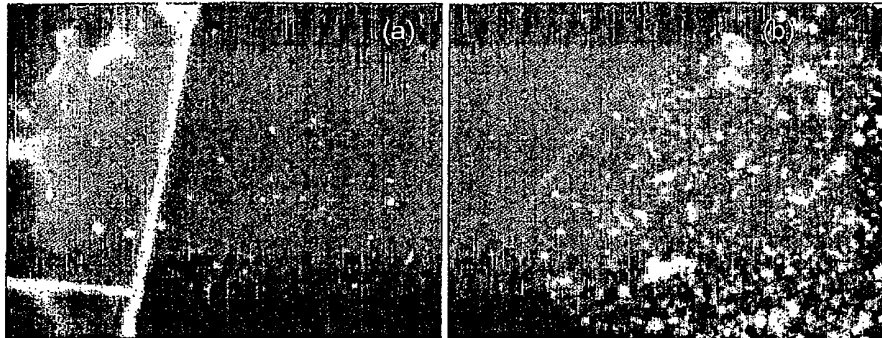


FIG. 19

Figura 19 mostra (a) cálculo supragengival e (b) cálculo subgengival e foram imageados seguindo adição da solução reveladora.

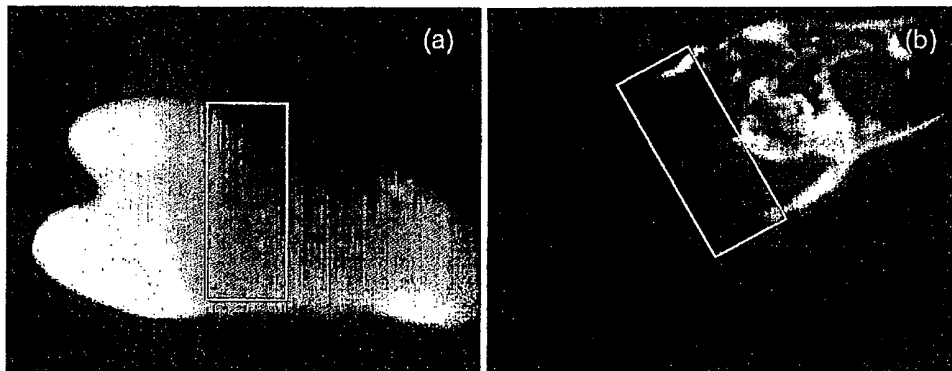


FIG. 20

Figura 20 mostra (a) imagem do dente na luz (b) imagem monocromática seguindo aplicação de gel revelador. Caixa indica área de cálculo.

**FIG. 21**

Figura 21. Imagens mostram a superfície oclusal de molar (permanente). (a) imagem do dente na luz (b) imagem monocromática seguindo aplicação de gel revelador. Uma resina de enchimento é evidente na posição A. Quantidades limitadas de luz estavam presentes da resina (A), sugerindo interferências de enchimentos de resina similares são esperadas ser mínima. Observe que as diferenças no tamanho das imagens 21a e 21b indicando que o gel revelador não cobriu a superfície oclusal total.



FIG. 22A



FIG. 22B

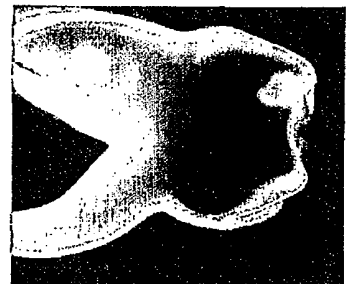


FIG. 22C



FIG. 23A



FIG. 23B



FIG. 23C

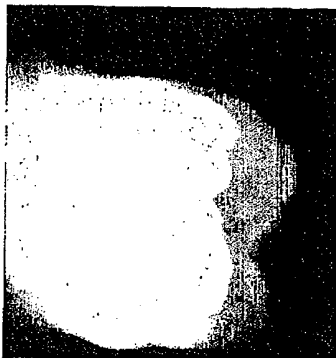


FIG. 24A

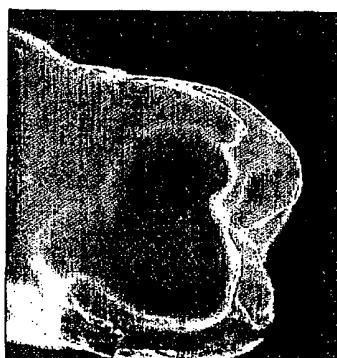


FIG. 24B



FIG. 24C

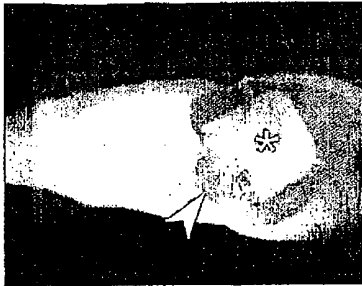


FIG. 25A



FIG. 25B

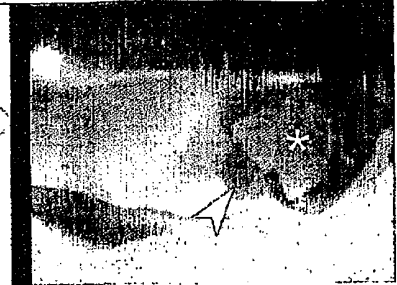


FIG. 25C

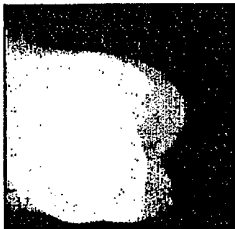


FIG. 26A

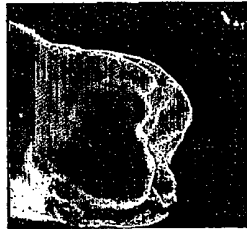


FIG. 26B



FIG. 26C



FIG. 26D

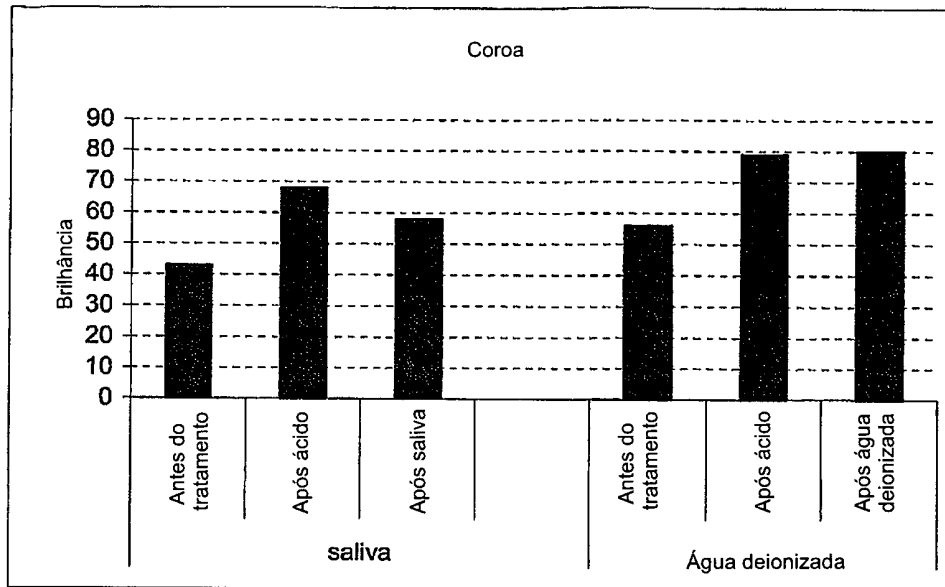


FIG. 27A

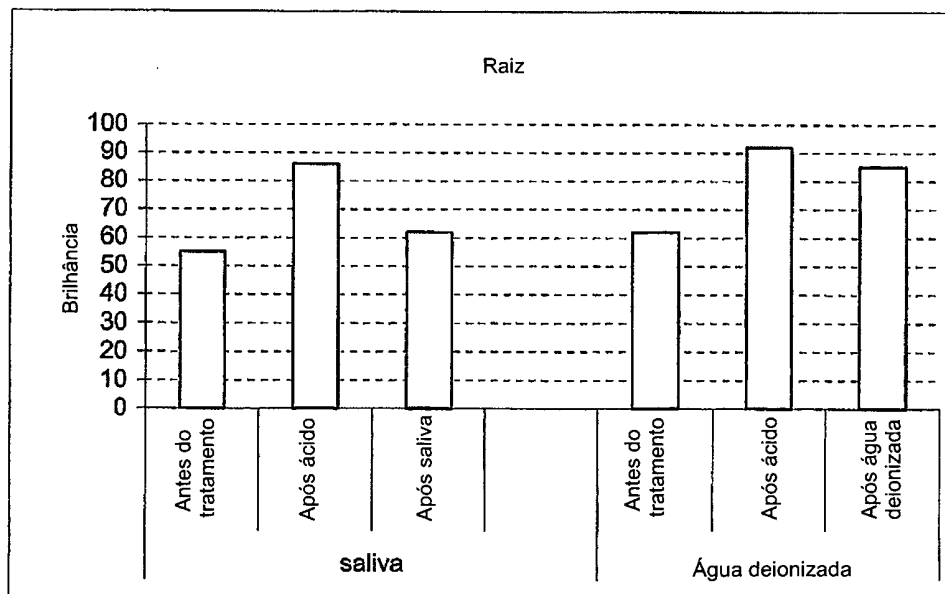


FIG. 27B

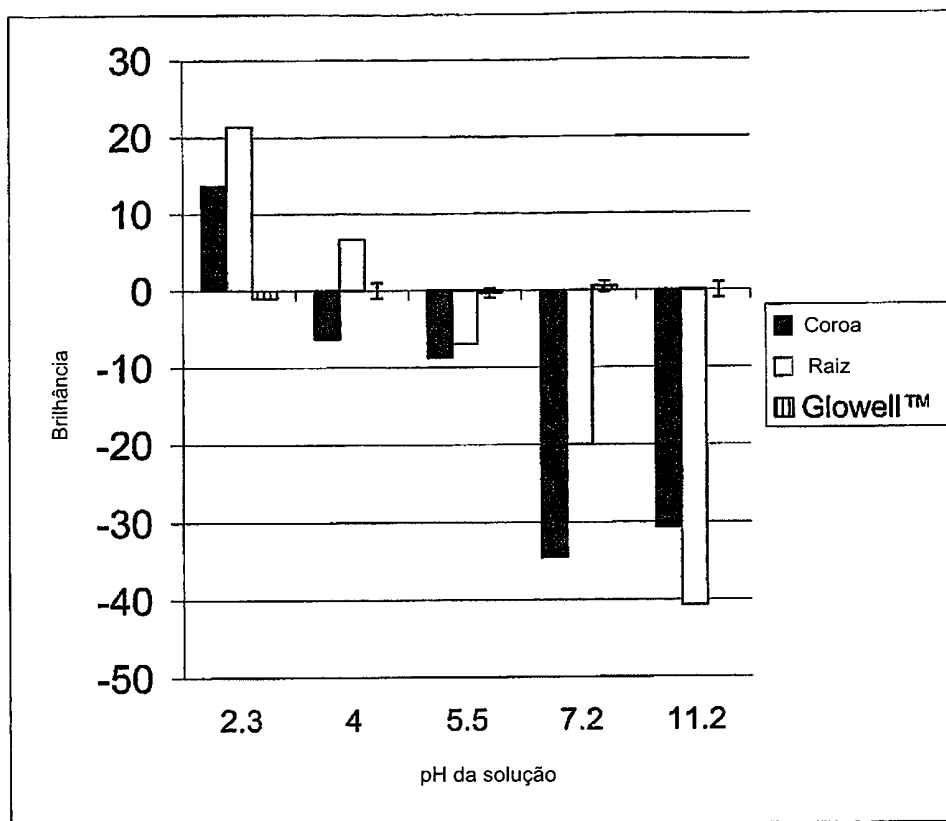


FIG. 28

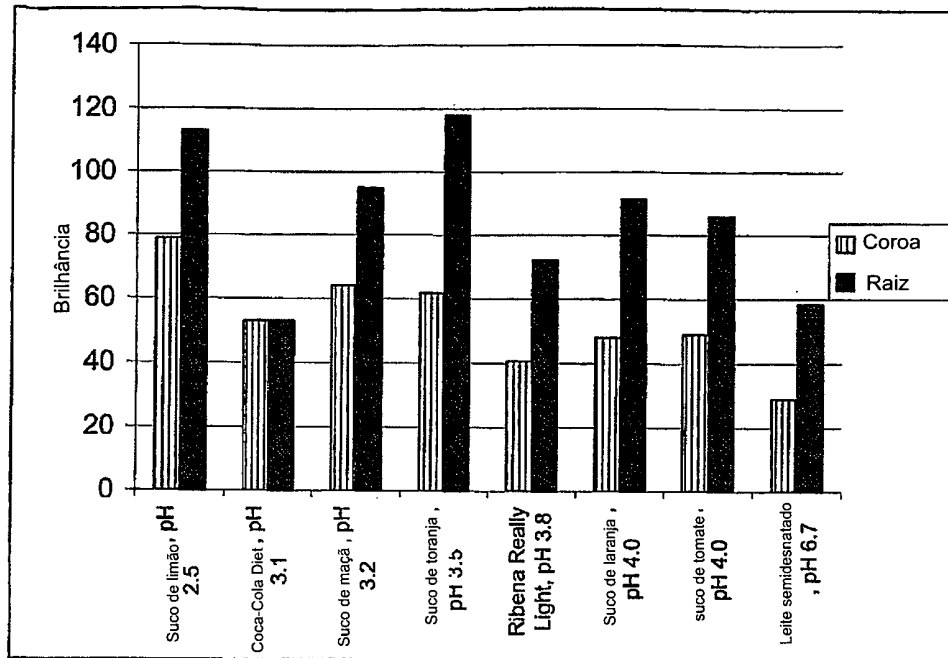


FIG. 29