

# O EFEITO DE TRATAMENTOS NÃO RESTAURADORES NA PROGRESSÃO DE LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE DENTINÁRIA SOB ESMALTE EM UM MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

TAMIRES TIMM MASKE<sup>1</sup>; CAMILA NEUENFELDT NASCIMENTO<sup>2</sup>; MARINA SOUZA AZEVEDO<sup>2</sup>; FRANÇOISE HÉLÈNE VAN DE SANDE<sup>2</sup>; ELENARA FERREIRA DE OLIVEIRA<sup>2</sup>; MAXIMILIANO SÉRGIO CENCI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – tamirestmaske@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – cencims@gmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que devido a redução da incidência de lesões de cárie, a maioria das lesões que ainda ocorrem localizam-se na superfície oclusal (MACEK et al., 2003; DEMIRCI et al., 2010). Entre essas, destacam-se as lesões de cárie oculta (RICKETTS et al., 1997). Quando diagnosticadas; tratamentos restauradores tem sido preconizados, e no entanto, tratamentos menos invasivos e mais baratos tem sido pobremente investigados.

Sabe-se que Flúor e a Clorexidina possuem um papel importante na prevenção da cárie dentária bem como em seu tratamento (KIDD et al., 1992). A utilização de tratamentos não invasivos em lesões de cárie oclusais seria aceitável para aquelas lesões limitadas a camada superficial da dentina. Portanto, o objetivo do estudo foi desenvolver um modelo experimental para avaliar o efeito da clorexidina 0,12% (CLX) e do flúor fosfato acidulado 1,23% (FFA) na formação de biofilme e na desmineralização da dentina em lesões de cárie ocultas.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. *Confecção dos espécimes*

Cento e oito dentes incisivos bovinos livres de falhas foram seccionados com auxílio de uma furadeira de bancada em discos padronizados de esmalte e dentina. Através de uma cortadeira de precisão os espécimes foram seccionados ao nível da junção amelodentinária e separados em discos de dentina e esmalte. Oitenta e um discos de esmalte foram seccionados ao meio no mesmo dispositivo e as superfícies dos discos de dentina foram totalmente recobertas por esmalte de unha, exceto a porção superior (2mm<sup>2</sup>) que permaneceram expostas.

Após esterelização em autoclave, as amostras de dentina foram imersas em meio de cultura BHI caldo com 1% de sacarose, inoculado com *Streptococcus mutans* UA 159, por 7 dias para desenvolvimento de lesões de cárie nas lacunas não recobertas com esmalte de unha.

A fim de possibilitar a avaliação inicial e final dessas lesões após o novo desafio cariogênico e tratamento, as lesões pré-formadas tiveram 1/3 de sua lesão protegida com esmalte de unha. Os discos de dentina foram divididos em quatro subgrupos (esmalte superficial íntegro ou com fendas de 0, 100 e 500µm) e então, fixados através de cera pegajosa em matrizes de acetato e, sobre eles, adaptados discos de esmalte superficial íntegro ou simulando fendas até a dentina.

### 2.2 *Processo de inoculação e formação do biofilme*

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (UFPEL), 20ml de saliva, estimulada por filme de parafina, foram coletadas de um voluntário saudável, sem uso de terapia antibiótica por um ano e que se absteve de

higiene oral por 24h e da dieta alimentar por 2h prévias a coleta. A saliva foi inoculada em volumes de 400µL sobre os espécimes em placas de 24 micro-poços. Após 1h em repouso, foi delicadamente aspirada da base dos poços e 1,8ml de meio (DMM) (WONG, SISSONS, 2001; VAN DE SANDE et al., 2011) com 1% de sacarose foram adicionados em cada poço, e as placas incubadas. Após 6h, os espécimes foram enxaguados, através de imersão em 2ml de solução salina estéril, e inseridos em uma nova placa contendo DMM; sendo novamente incubados por 18h. Os biofilmes foram individualmente formados sobre os corpos de prova em cada micro-poço. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (5-10% CO<sub>2</sub>) sob temperatura controlada (37°C) e mantidas em repouso na incubadora.

### 2.3 *Tratamentos*

Os tratamentos consistiram de imersão diária, por um minuto, em 2ml de solução de CLX 0,12% e imersão semanal em 2ml de FFA (1:3, p/v). Eles iniciaram no segundo dia do experimento e foram aplicados antes das exposições à sacarose. Após os tratamentos, os espécimes eram lavados em solução salina estéril, por imersão durante 10s. O grupo controle, assim como o grupo do FFA, foi tratado, nos demais dias da semana, com solução salina estéril sob o mesmo protocolo.

### 2.4 *Análise do crescimento dos biofilmes e dos perfis microbianos*

Após o período experimental (10 dias), os espécimes dos subgrupos foram transferidos para tubos falcon codificados contendo 1ml de solução NaCl 0,9%. Após sonicação por 30s a 7w, foram obtidas diluições seriadas até a concentração 10<sup>-7</sup> e 20µL de cada uma das concentrações foram plaqueadas em meio de cultura Ágar Sangue e Mitis Salivarius Bacitracina. As placas de meio inoculadas foram incubadas em anaerobiose a 37°C por 96h. De cada tubo falcon sonicado, retirou-se também uma alíquota de 300µL, que foi repassada a um eppendorf pré-pesado e codificado, contendo 0,90µL de álcool absoluto. A solução foi centrifugada por 5min, 10000g a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o tubo com o precipitado foi levado ao dessecador por 48h com P2O<sub>5</sub>. Cada eppendorf foi pesado novamente a fim de obter-se o peso seco do biofilme. Unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas, e os resultados expressos em UFC/mg de biofilme (peso seco).

### 2.5 *Análise da perda mineral nos discos de dentina*

Após período experimental, as amostras foram limpas com escova dental e separadas em discos de esmalte e dentina. Os discos de dentina foram precisamente seccionados nos marcos de referência da lesão formada e demarcada anteriormente pelo esmalte de unha, com auxílio de disco de diamante em uma cortadeira de bancada. As amostras das lesões foram manualmente polidas até a espessura de 300µm. As fatias então obtidas foram acopladas em uma matriz plástica contendo água destilada a fim de permitir a execução das tomadas radiográficas. Foram utilizados filmes de alta resolução, fonte de raios X a 60kV e 30mA durante 8s. As radiografias foram digitalizadas através de uma câmera acoplada a um estereomicroscópio. Os perfis minerais foram plotados em duas regiões de interesse (área protegida pelo esmalte de unha e área não protegida), e as imagens foram analisadas pelo software TeeChart 8.

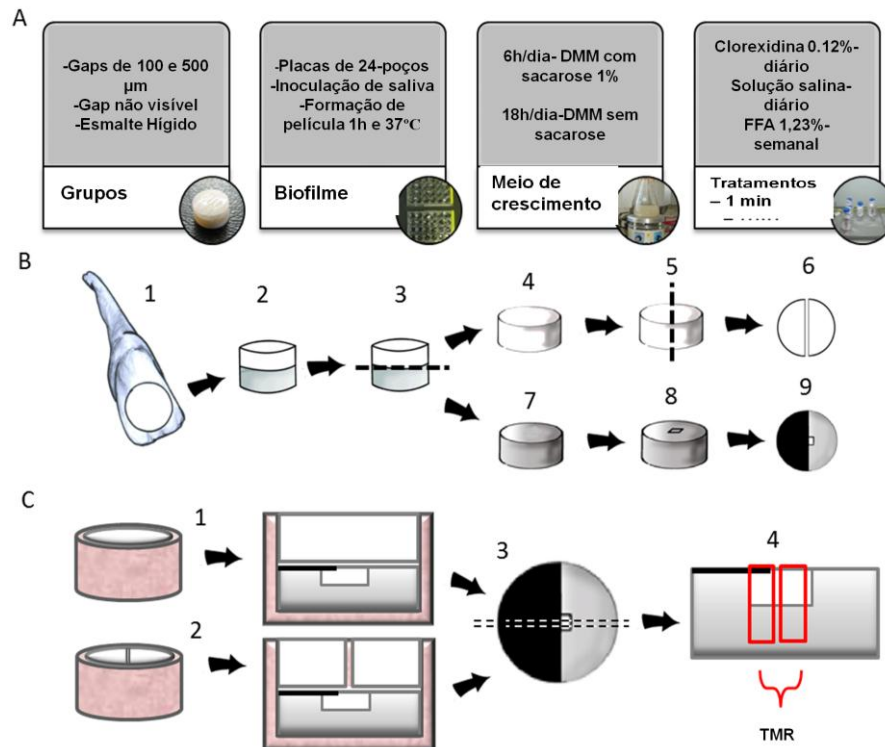


Figura 1. A) Representação esquemática do delineamento experimental. B) Preparação dos discos de dentina e esmalte. C) Configuração dos espécimes.

### 2.6 Análise estatística

Para análise dos dados utilizou-se o programa SigmaStat v. 3.5 (Systat Inc., U.S.A.). Os dados microbiológicos foram analisados por ANOVA e teste Holm-Sidak, e os perfis minerais (perda mineral e profundidade de lesão) submetidos ao teste T-pareado. Perda mineral e profundidade de lesão também foram avaliados por ANOVA e Holm-Sidak depois da subtração da parte protegida da lesão em relação a não-protégida para atingir um único valor para cada amostra. Todos os testes tiveram nível de significância de 5%.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

FFA e CLX mostraram tendência positiva para a remineralização de lesões de dentina subjacente ao esmalte, embora não demonstraram diferença estatística ( $p > 0.05$ ) para os perfis minerais (fenda x tratamentos).

Fendas estreitas (0 e 100 µm), mostraram maior perda mineral e profundidade de lesão nas lesões finais (não protegidas) do que nas lesões protegidas frente ao tratamento com flúor. Esse fenômeno poderia estar relacionado a possível estagnação de placa bacteriana no interior da fissura e interrupção da difusão de substâncias para a região abaixo do esmalte. Além disso, tal como descrito por ZAURA (2011), a presença de fluoreto seria capaz de tornar o esmalte superficial fluoreto enriquecido e menos solúvel no ambiente ácido. Em decorrência disso, ocorreria um tamponamento do superficial do ácido produzido e, ao mesmo tempo, proporcionaria uma difusão de ácidos para a fenda, gerando um desafio cariogênico alto na parte inferior dessas fendas e uma consequente desmineralização da dentina.

Em contraste, a presença de fendas amplas (500 µm) permitiria uma direta e maior difusão dos tratamentos para as lesões dentinárias abaixo do esmalte, sendo capaz de reduzir a perda mineral e profundidade de lesão e promover a

remineralização das lesões; tendência que foi observada no estudo tanto para CLX como para o FFA.

Com relação aos aspectos microbiológicos, a CLX diminuiu a contagem de microorganismos totais e aumentou a contagem de *Streptococcus Mutans* (SM) independente da ausência ou presença de fendas ( $p < 0,05$ ). A explicação mais aceita para o seu menor efeito sobre SM, é de que após tratamento com CLX, poderia haver uma diminuição inicial da presença de SM e MT, mas que depois de algum tempo, as condições ecológicas do meio ambiente poderiam favorecer a recolonização das superfícies dentárias por estes microorganismos novamente (SKOLD-LARSSON et al., 2009).

#### 4. CONCLUSÕES

Embora este estudo não tenha demonstrado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos testados, considerando a perda mineral e a profundidade das lesões de cárie, pode-se inferir que o uso de FFA 1,23% e da CLX 0,12% geraram tendência positiva para a remineralização de lesões de cárie oculta, na presença de fendas amplas, mas não em fendas estreitas. Mais estudos utilizando este modelo deveriam ser conduzidos em forma de melhor testar essa correlação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MACEK MD, BELTRAN-AGUILAR ED, LOCKWOOD SA, MALVITZ DM. Updated comparison of the caries susceptibility of various morphological types of. **J Public Health Dent**, v.63, p.174-82, 2003.

DEMIRCI M, TUNCER S, YUCEOKUR AA. Prevalence of caries on individual tooth surfaces and its distribution by age and. **Eur J Dent**, v.4, p.270-9, 2010.

VAN DE SANDE FH, AZEVEDO MS, LUND RG, HUYSMANS MC, CENCI MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. **Biofouling**. v.7, p.1057-63, 2011.

WONG, L.; SISSONS, C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. **Arch Oral Biol**, v.46, n.6, p.477-86, 2001.

KIDD EA, NAYLOR MN, WILSON RF. Prevalence of clinically undetected and untreated molar occlusal dentine caries in adolescents on the Isle of Wight. **Caries Res**. v.26, p.397-40, 1992.

SKOLD-LARSSON K, SOLLENIUS O, PETERSSON LG, TWETMAN S. Effect of topical applications of a novel chlorhexidine-thymol varnish formula on mutans streptococci and caries development in occlusal fissures of permanent molars. **J Clin Dent**. v.20, p.223-6, 2009.

ZAURA E, VAN LOVEREN C, TEN CATE JM. Efficacy of fluoride toothpaste in preventing demineralization of smooth dentin surfaces and narrow grooves in situ under frequent exposures to sucrose or bananas. **Caries Res**. v.39, p.116-22, 2005.

RICKETTS D, KIDD E, WEERHEIJM K, DE SOET H. Hidden caries: what is it? Does it exist? Does it matter? **Int Dent J**. v.47, p.259-65, 1997.