

## ADESÃO EM DENTINA AFETADA POR CÁRIE: EFEITO DO TEMPO DE DESAFIO CARIOGÊNICO EM MODELO DE BIOFILME DE MICROCOSMOS

KATIELLE VALENTE BRAUNER<sup>1</sup>; TAMIRES TIMM MASKE<sup>2</sup>, FRANÇOISE HÉLÈNE VAN DE SANDE<sup>2</sup>, CRISTINA PEREIRA ISOLAN<sup>2</sup>, RAFAEL RATTO DE MORAES<sup>2</sup>; MAXIMILIANO SERGIO CENCI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [katiellevb@gmail.com](mailto:katiellevb@gmail.com)

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

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [cencims@gmail.com](mailto:cencims@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Cárie dentária é considerada uma das doenças orais mais comuns em seres humanos (SELWITZ et al. 2007). O tratamento de lesões de cárie com extensão em dentina é frequentemente associado à execução de restaurações. De acordo com os conceitos da odontologia minimamente invasiva, o tecido dental cariado deve ser parcialmente removido (MALTZ et al. 2007), e portanto, os procedimentos restauradores incluem a adesão substratos dentais hígidos ou afetados pela cárie.

A maioria das investigações sobre a adesão em odontologia é realizada utilizando substratos dentais hígidos (PERDIGAO, 2010). No entanto, de acordo com o estudo de SAY et al. (2005), a resistência de união diminuiu significativamente quando os sistemas adesivos foram utilizados na adesão à dentina cariada. A compreensão das propriedades dos sistemas adesivos, bem como do substrato dentário envolvido é de extrema importância para a realização de restaurações adesivas.

Neste contexto, a utilização de substratos dentários afetados por cárie é importante para avaliação dos sistemas adesivos. Modelos de estudo *in vitro*, com desafio químico ou microbiológico, têm sido reportados para o desenvolvimento de lesões de cárie artificial. Dentre as metodologias utilizadas, os modelos de biofilme de microcosmos parecem melhor mimetizar o biofilme oral e os eventos que ocorrem sob condições clínicas orais, incluindo o desenvolvimento de lesões de cárie *in vitro* (MCBAIN, 2009).

Assim, os objetivos deste estudo foram adaptar um modelo de biofilme microcosmos desenvolvido anteriormente (VAN DE SANDE et al., 2011) para o desenvolvimento de lesões artificiais de cárie em dentina e estabelecer um protocolo para testes de adesão à dentina cariada.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Delineamento experimental

Um modelo de biofilme de microcosmos previamente desenvolvido e padronizado para indução de lesão de cárie artificial em esmalte dentário (VAN DE SANDE et al., 2011) foi utilizado para estabelecer o modelo em dentina. Os fatores em estudo foram os tempos de desafio cariogênico (3, 5, 7, 14 e 21 dias) e as variáveis de resposta avaliadas foram a perda mineral integrada ( $\Delta S$ ; dureza interna), a resistência união ao cisalhamento e o modo de falha. Dez espécimes foram testados em cada grupo, e um grupo adicional sem formação de biofilme e desafio cariogênico foi considerado como controle (n=10).

#### 2.2 Confeção das amostras

Sessenta incisivos centrais bovinos foram selecionados. Discos de dentina e esmalte (2mm de espessura e 6 mm diâmetro) foram obtidos da superfície

vestibular, utilizando uma broca diamantada (tipo trefina) arrefecida em água. O esmalte remanescente foi removido com papel abrasivo de granulação # 80 para exposição de dentina, e subseqüentemente polido com papel abrasivo de granulação # 600 durante 1 min para padronização da smear layer dentária. A superfície da dentina foi inspecionada com um estereomicroscópio óptico de ampliação 40x para assegurar a ausência de esmalte sobre a superfície. Esmalte de unha foi aplicado nas paredes laterais e inferiores dos discos, deixando apenas a superfície vestibular exposta. Os discos foram fixados com um suporte confeccionado com fio ortodôntico, e todos os discos foram esterilizados por radiação gama e conservados a 4°C (atmosfera úmida) até à utilização.

### *2.3 Modelo de biofilme - Lesões artificiais de cárie em dentina*

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (#03/2013), 35ml 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 24 h e da dieta alimentar por 2 h prévias a coleta. A saliva foi inoculada em volumes de 400 µL sobre os espécimes em placas de 24 micro-poços. Após 1 h hora em repouso, foi delicadamente aspirada da base dos poços e 1,8 ml de meio (DMM) (WONG, SISSONS, 2001) com 1% de sacarose foram adicionados em cada poço, e as placas incubadas. Após 4 h, os espécimes foram enxaguados, através de imersão em 2 ml de solução salina estéril, e inseridos em uma nova placa contendo DMM, desta vez sem sacarose, e sendo novamente incubados por 20 h. 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. Durante 3, 5, 7, 14 e 21 dias a mesma rotina de exposição alternada de DMM suplementado com ou sem sacarose foi realizada.

### *2.4 Teste de resistência de união e modo de falha*

Depois de cada período experimental, os discos de dentina foram limpados com escova dentária e água destilada, e foram embebidos em resina acrílica em tubos de PVC (policloreto de polivinila). O sistema adesivo Clearfil SE Bond foi aplicado sobre a dentina afetada por cárie de acordo com as instruções do fabricante. Para os ensaios de resistência ao cisalhamento, moldes de elastômero com um orifício cilíndrico (1,5mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura) foram colocados sobre os discos. O adesivo foi fotoativado por 20 s usando uma unidade de fotopolimerizadora (Radii, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália) com 1400-mw/cm<sup>2</sup> irradiância. Os orifícios foram preenchidos com resina composta (Filtek Z350 XT, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) e fotoativados por 20 s novamente. Para o teste de resistência de união, um fio de aço inoxidável (0,2 mm de diâmetro) foi adaptado em torno de cada cilindro e alinhado com a interface de união adesiva. Esse teste foi realizado em uma máquina de ensaios mecânicos (DL500, EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil) a uma velocidade de 0,5 mm/min até a falha. Espécimes fraturados foram observados sob uma ampliação de até 500x usando microscópio óptico para determinação do modo de falha: falha adesiva (interfacial) ou mista (parcialmente adesiva e parcialmente coesiva em dentina).

### *2.5 Desmineralização integrada - Preparo das amostras e teste*

Após o teste de resistência de união, os discos de dentina foram longitudinalmente seccionados através de um disco de diamante refrigerado em

água. Os corpos de prova seccionados (metades) foram incluídos em resina acrílica, desgastados com lixas de granulação decrescentes e polidos com disco de feltro e suspensão policristalina de diamante (1  $\mu\text{m}$ ). A avaliação de dureza transversal foi realizada utilizando um durômetro (Future Tech FM-700, Tóquio, Japão) carregado com 5 g de peso por 5 segundos. Duas colunas de oito endentações foram realizadas, a distâncias de 50 e 225  $\mu\text{m}$  da margem lateral do espécime. As endentações foram feitas nas profundidades de: 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{m}$  a partir da superfície vestibular da amostra. A área de desmineralização integrada ( $\Delta\text{S}$ ) foi calculada subtraindo o perfil de dureza (número de dureza Knoop,  $\text{kgf}/\text{mm}^2$ ) da dentina afetada por cárie, dos valores de dureza obtidos para a dentina hígida.

### 2.6 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o programa SigmaStat v 3,5. Os dados minerais foram transformados em raiz quadrada. A resistência de união e os dados minerais foram então, analisados separadamente por ANOVA e Holm-Sidak teste. A correlação de Spearman também foi feita nos dados minerais e nas resistências de união. O nível de significância foi fixado em 5%.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados para resistência de união (RU), desmineralização integrada ( $\Delta\text{S}$ ) e profundidade de lesão (LD) estão apresentados na Figura 1.

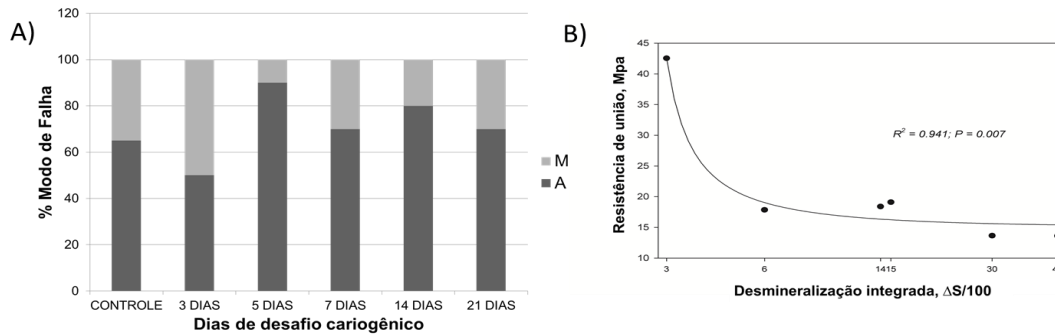
De acordo com os resultados de perda mineral, este estudo demonstra que o modelo de biofilme utilizado foi capaz de induzir atividade cariogênica e a formação de lesões artificiais em dentina bovina. Valores de  $\Delta\text{S}$ , LD aumentaram progressivamente em relação aos dias de crescimento bacteriano no modelo. Valores significativamente mais baixos de  $\Delta\text{S}$  foram encontrados para a dentina hígida (controle) do que para a dentina afetada por cárie em todos os grupos experimentais ( $P < 0,001$ ), com exceção do grupo sob desafio cariogênico por 3 dias ( $P = 0,062$ ). Desta forma, sugere-se que tempos superiores a 3 dias devem ser utilizados para indução de lesão de cárie artificial em dentina, no modelo proposto.

A diferença no conteúdo mineral e orgânico da dentina afetada por cárie permite uma maior sensibilidade ao ataque ácido, resultando em uma zona mais profunda da desmineralização (TANIGUCHI et al. 2009). Além disso, essa diferença gera uma espessa smear layer e enriquecida com componentes orgânicos. Assim, uma desmineralização mais profunda com a formação de smear layer mais espessa, poderia afetar a infiltração da resina adesiva e a vedação da interface adesiva-restauração (NAKASHIMA et al., 2011).

Valores de RU mostraram correlação inversa significativa entre os valores  $\Delta\text{S}$  ( $R = -0.453$ ;  $P < 0.001$ ) e LD ( $R = -0.306$ ;  $P = 0.034$ ). Uma queda exponencial significativa entre a RU e  $\Delta\text{S}$  também foi demonstrada ( $R^2=0.941$ ;  $P=0.007$ ). A correlação entre  $\Delta\text{S}$ , LD e RU sugere que a menor quantidade de cristais de hidroxiapatita, a profundidade da lesão e a presença de uma smear layer espessa, poderiam estar relacionados à diminuição da resistência de união de adesivos autocondicionantes.

O adesivo autocondicionante utilizado demonstrou menores valores de RU para dentina afetada por cárie, no entanto, apresentou falha adesiva para todos os grupos submetidos a desafio cariogênico, inclusive para o grupo de controle. Assim, sugere-se que o modelo proposto é adequado para a realização de testes de adesão, uma vez que o substrato dentário afetado por cárie foi capaz de preservar a integridade dentária, sem gerar predominância de falhas coesivas em

dentina.



C) Tabela 1. Médias (desvio-padrão) de resistência de união (RU), desmineralização integrada (ΔS) e profundidade de lesão (PL) em função do tempo de desafio cariogênico

	Controle	Desafio cariogênico				
		3 dias	5 dias	7 dias	14 dias	21 dias
RU, MPa	42.5 (10.1) <sup>a</sup>	17.9 (5.4) <sup>b</sup>	18.4 (12.0) <sup>b</sup>	19.1 (9.4) <sup>b</sup>	13.7 (8.0) <sup>b</sup>	13.6 (6.6) <sup>b</sup>
ΔS	318 (233) <sup>d</sup>	624 (355) <sup>d</sup>	1386 (371) <sup>c</sup>	1489 (806) <sup>c</sup>	2986 (1223) <sup>b</sup>	4695(1060) <sup>a</sup>
PL, μm	-	24.4 (7.1)	38(7.8)	50 (38.4)	80 (25.6)	150 (0.0)

Figura 1. A) Padrão de modo de falha B) Queda exponencial entre RU e ΔS. C) Médias e desvio padrão para os valores de RU, LD e ΔS

#### 4. CONCLUSÕES

O modelo de biofilme de microcosmos proposto foi capaz de induzir lesões artificiais de cárie de em dentina. A adesão à dentina foi negativamente afetada pela presença de tecido cariado, tornando o modelo útil para estudos laboratoriais envolvendo a adesão à dentina cariada.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, Pelotas, v.7, p.1057-63, 2011.
- SELWITZ RH, ISMAIL AI, PITTS NB. Dental caries. **Lancet**, Florida, v.369, n.9555, p.51-9, 2007.
- MALTZ M, OLIVEIRA EF, FONTANELLA V, CARMINATTI G. Deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: 40-month follow-up study. **Caries research**, Porto Alegre, v.41, p.493-6, 2007.
- MCBAIN AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. **Advances in applied microbiology**, Manchester, v.69, p.99-132, 2009.
- PERDIGAO J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. **Dental materials**, Minneapolis, v.26, p.24-37, 2010.
- SAY EC, NAKAJIMA M, SENAWONGSE P, SOYMAN M, OZER F, TAGAMI J. Bonding to sound vs caries-affected dentin using photo- and dual-cure adhesives. **Operative dentistry**, Istanbul, v.30, p.90-8, 2005.
- NAKASHIMA S, YOSHIE M, SANO H, BAHAR A. Effect of a test dentifrice containing nano-sized calcium carbonate on remineralization of enamel lesions in vitro. **Journal of oral science**, Odawara, v.51, p.69-77, 2009.
- TANIGUCHI G, NAKAJIMA M, HOSAKA K, IWAMOTO N, IKEDA M, FOXTON RM. Improving the effect of NaOCl pretreatment on bonding to caries-affected dentin using self-etch adhesives. **Journal of dentistry**, Tokio, v.37, p.769-75, 2009.