

PADRONIZAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE ARTIFICIAIS EM DENTINA *IN VITRO*.

ZUCCOLOTTO, Raquel da S.¹; MASKE, Tamires T.²; NASCIMENTO, Camila Neunfedt³; OLIVEIRA, Elenara Ferreira⁴; CENCI, Maximiliano Sérgio⁵

¹Acadêmica Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas
(raquelzuccolotto@gmail.com);

²Acadêmica Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas
(tamirestmaske@hotmail.com);

³Acadêmica Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas
(camilann_28@hotmail.com);

⁴Professor Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas,
Departamento de Dentística (f.elenara@gmail.com);

⁵Professor Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas,
Departamento de Dentística (cencims@gmail.com).

1 INTRODUÇÃO

Cárie dentária é considerada uma doença multifatorial infecciosa e crônica que ocorre quando há um desequilíbrio entre o substrato dentário e o seu meio ambiente, resultando na destruição das estruturas dentárias. Sua etiologia esta relacionada a interação de fatores essenciais como dieta rica em sacarose, microbiota bucal cariogênica e estrutura dentária suscetível [Domenick et. al, 2009].

O uso de medidas preventivas pode afetar o desenvolvimento e progressão e até mesmo reverter a lesão de cárie. Com base nessa capacidade, e por se tratar de um importante problema de saúde bucal, estudos sobre sua etiologia, patogenicidade e tratamentos vem sendo amplamente investigados e nesse contexto a padronização de protocolos faz-se necessária para posteriores reproduções de estudos e, também, para avaliar a relevância dos mesmos.

A complexidade do ambiente bucal e as questões éticas relacionadas com estudos envolvendo cárie dentária *in vivo* tem motivado o desenvolvimento de modelos experimentais em laboratório. A partir disso, o presente estudo objetivou desenvolver, *in vitro*, lesões padronizadas de cárie artificial em dentina frente à imersão em caldo BHI inoculado com *Streptococcus mutans*, e produzir um protocolo para indução de lesões em dentina que visem estudos de des e remineralização.

2 METODOLOGIA

2.1 Delineamento experimental

Doze espécimes de dentina foram alocados em três grupos (n= 4): G1- 4 dias, G2- 7 dias e G3- 10 dias. Todos os grupos experimentais foram inoculados com *Streptococos mutans* UA 159 em meio de cultura BHI caldo (Infusão de Coração e Cérebro) com 1% de sacarose e foram cultivados em anaerobiose, a 37°C. Após os desafios microbiológicos de cada grupo, por quatro, sete e dez dias, a quantificação mineral foi analisada através de ensaio de microdureza interna de cada espécime.

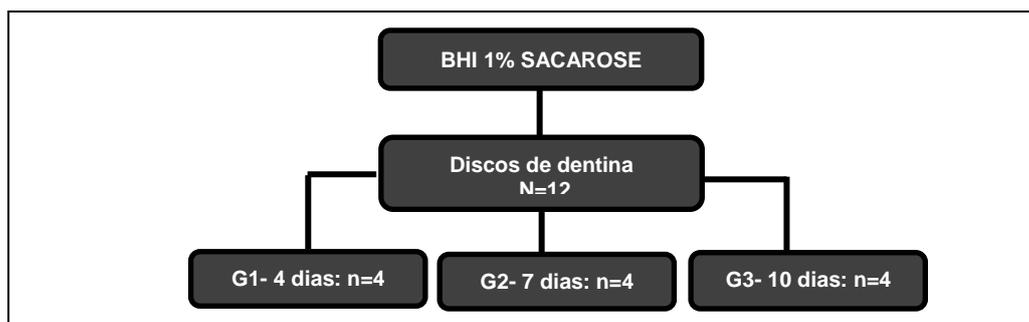


Figura 1. Representação esquemática do delineamento do estudo. Número de espécimes, divisão dos espécimes por grupos de avaliação.

2.2 Preparo dos Espécimes

Foram selecionados para o estudo doze dentes incisivos bovinos irrompidos e livres de falhas, os quais foram seccionados, com auxílio de uma furadeira de bancada, ao nível do terço médio para obtenção de discos padronizados. Através de uma cortadeira de precisão, os mesmos foram seccionados ao nível da junção amelocementária, separando-se assim, discos de dentina. Os espécimes foram polidos e padronizados, a fim de obter-se discos com espessura de 1,5 mm e 4 mm² de diâmetro.

2.3 Processo de indução de cárie

Cada disco teve suas superfícies totalmente recobertas por esmalte de unha, exceto a porção superior, na qual 2 mm² de dentina permaneceram expostas ao desafio cariogênico. Os espécimes foram autoclavados e transferidos a tubos Falcon codificados contendo 1 ml de BHI com 1% de sacarose e inoculados com *Streptococos* 159 UA, em pH em torno de 4.0. Os espécimes foram incubados, a 37°C, em jarras de anaerobiose. Foram feitas trocas de meio a cada período de 24h, pelo período de 4 dias, 7 dias e 10 dias, conforme cada grupo experimental.

2.4 Análise da perda mineral

Os discos de dentina foram seccionados, sob refrigeração, perpendicularmente ao longo eixo do disco, usando uma cortadeira de precisão, sobre o centro da lesão cariosa pré-formada até obter-se duas

metades do disco. Uma das metades foi embutida em tubos de PVC com resina epóxi e as amostras foram polidas com lixas d'água de granulação decrescente através de politriz. O ensaio de microdureza foi feito em todos os espécimes, utilizando um microdurômetro, com edentação do tipo Knoop, por 25 segundos com 5 gramas de carga. Foram realizadas quatorze edentações, divididas em 2 colunas distante 100 um entre elas e das margens da lesão, nas profundidades de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150.

2.5 Análise estatística:

Os dados foram analisados segundo ANOVA e seguida do teste de Holm-Sidak, utilizando o programa SAS v. 9.0, ambos com significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo microbiano investigado, utilizando meio BHI e inoculado com *Streptococcus mutans* e 1% sacarose, mostrou ser adequado para estudar formação de cárie em dentina. Permitiu a simulação da etiologia e fatores relacionados com o desenvolvimento de cárie de dentina, enquanto que a sacarose no meio de crescimento foi capaz de fornecer nutrição para as bactérias da cultura semelhante ao que ocorre *in vivo*. [BEIGHTON, 1986]

Analisando os dados, pode-se observar que a perda mineral em dentina, considerando todas as profundidades avaliadas, foram maiores para o G3, G2 e G1, respectivamente ($p < 0,05$). Assim, demonstrando que a cariogenicidade é dependente da exposição à sacarose, como descrito em outros estudos. [STEINER-OLIVEIRA et. al, 2011]

Quando se observa a perda mineral ocorrida no grupo G1, percebe-se que a lesão somente ocorre nas superfícies iniciais e não foi suficientemente profunda para ser usada em estudos comparativos para lesões de cáries *in vivo*. A perda mineral no G2 e G3 estendeu-se desde a superfície da lesão até a profundidade de 40-50 μm . No entanto, o grupo experimental de 10 dias demonstrou perda mineral para além dessa profundidade, alcançando a totalidade da profundidade do espécime. Esse dado, demonstra que um desafio cariogênico de 10 dias proporciona uma perda mineral excessiva nos espécimes, não permitindo que se tenha uma superfície hígida apta para avaliar processos de remineralização ou desmineralização.

Em contra partida, no grupo G2, o desafio cariogênico promoveu perda mineral até aproximadamente 50 μm e, após essa profundidade, a presença de área hígida foi observada. Tal referência permite dizer que na presença dessa condição é possível avaliar estudos de ganho e perda mineral, corroborando para que tempo de desafio cariogênico possa ser padronizado para estudos *in vitro* que envolvam indução de cárie em dentina.

4 CONCLUSÃO

A desmineralização promovida pela solução durante sete dias foi capaz de induzir lesões artificiais de cárie adequadas para estudos de desmineralização em dentina, demonstrando que a utilização desse método de indução de lesões, associado a esse período de tempo, poderá ser utilizado como um protocolo para execução de estudos *in vitro* dessa natureza.

5 REFERÊNCIAS

BEIGHTON D., HAYDAY H. The influence of diet on the growth of streptococcal bacteria on the molar teeth of monkeys (*Macaca fascicularis*). **Arch. Oral. Biol.**, 31, 449-454, 1986.

STEINER-OLIVEIRA, C., RODRIGUES, L. K. A., ZANIN, I. C. J., CARVALHO, C. L., KAMIYA, R. U., HARA, A. T., SANTOS, M. N. An in vitro microbial model associated with sucrose to produce dentin caries lesions. **Central European Journal of Biology**, 6, 414-421, 2011.

CLARKSO B. H., WEFEL J. S., MILLER I.A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro. **J Dent Res** 1984;63:1186–9.

DENG D.M., TEN CATE J.M., Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. **Caries Res.**, 38, 54-61. 2004.

DOMENICK T. Z., MARGHERITA F., ANGELES M., FERREIRA-ZANDONÁ A., MASATOSHI A., GONZÁLEZ-CABEZAS C., STEPHEN B. The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries. **JADA**. 140; 25-34. 2009.