

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**EFEITO DO MATERIAL ENDODÔNTICO NA
CARIOGENICIDADE DO BIOFILME FORMADO *IN*
VITRO SOBRE LESÕES INICIAIS DE CÁRIE
RADICULAR NATURAL**

HUGO VICTOR DANTAS

SAPIENTIA AEDIFICAT

2019

HUGO VICTOR DANTAS

**EFEITO DO MATERIAL ENDODÔNTICO NA CARIOGENICIDADE
DO BIOFILME FORMADO *IN VITRO* SOBRE LESÕES INICIAIS DE
CÁRIE RADICULAR NATURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti

João Pessoa

2019



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DEFESA DE Nº: 253

Aos dois dias do mês de dezembro do ano de 2019, às 10:00PPGO/UFPB, reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelos professores doutores: Yuri Wanderley Cavalcanti (Co-Orientador e Presidente), Thiago Isidro Vieira (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) e Diego Figueiredo Nóbrega (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) a fim de arguirm o mestrando Hugo Victor Dantas, com relação ao seu trabalho final de curso de mestrado (dissertação), sob o título “Efeito do material endodôntico na cariogenicidade do biofilme formado *in vitro* sobre lesões iniciais de cárie radicular natural”. Aberta a sessão pelo presidente da mesma, coube o candidato, na forma regimental, expor o tema de sua dissertação, dentro do tempo regulamentar. Em seguida, foi questionada pelos membros da banca examinadora, sendo as explicações necessárias fornecidas e as modificações solicitadas registradas. Logo após, os membros da banca examinadora reuniram-se em sessão secreta, tendo chegado ao seguinte julgamento, que, de público, foi anunciado: 1º Examinador (membro externo): Conceito “Aprovado”; 2º Examinador (membro vinculado ao PPGO): Conceito “Aprovado” e 3º Examinador (Orientador e Presidente): Conceito “Aprovado”. O que resultou em conceito final igual: “APROVADO”, o que permite o candidato fazer jus ao título de Mestre em Odontologia. Os documentos utilizados para avaliação da candidata durante o processo aqui descrito apresentam-se como prova documental do mesmo e, como tal, serão anexadas a esta ata para arquivamento. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que será por mim assinada, Raíssa Karen Gomes dos Santos, secretária do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB, pelo presidente, pelos demais membros da banca, e pela candidata.

Secretária do PPGO

Documento assinado digitalmente



THIAGO ISIDRO VIEIRA
Data: 29/03/2023 15:27:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Diego Figueiredo Nóbrega

1º Examinador – Membro Externo

Documento assinado digitalmente



YURI WANDERLEY CAVALCANTI
Data: 29/03/2023 16:09:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

2º Examinador – Membro do PPGO

3º Examinador – Presidente

Hugo Victor Dantas

Candidato

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192e Dantas, Hugo Victor.

Efeito do material endodôntico na cariogenicidade do biofilme formado in vitro sobre lesões iniciais de cárie radicular natural / Hugo Victor Dantas. - João Pessoa, 2019.

58 f. : il.

Orientação: Frederico Barbosa de Sousa.
Coorientação: Yuri Wanderley Cavalcanti.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Raiz dentária. 2. Cárie dentária. 3. Histopatologia. 4. Endodontia. I. Sousa, Frederico Barbosa de. II. Cavalcanti, Yuri Wanderley. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314.16(043)

HUGO VICTOR DANTAS

**EFEITO DO MATERIAL ENDODÔNTICO NA CARIOGENICIDADE
DO BIOFILME FORMADO *IN VITRO* SOBRE LESÕES INICIAIS DE
CÁRIE RADICULAR NATURAL**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa
Orientador - UFPB

Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti
Coorientador - UFPB

Prof. Dr. Thiago Isidro Vieira
Examinador – UFPB

Prof. Dr. Diego Figueiredo Nóbrega
Examinador - Externo

Dedico este trabalho a Deus, que a cada dia renova minha fé, me dando força e coragem para lutar pelos meus objetivos. Aos meus pais, Flávio e Janeide, por todo amor incondicional, dedicação, incentivo, apoio e sacrifício, dedico esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre estar ao meu lado, me sustentado até aqui, me dando forças e saúde para continuar a minha caminhada. Por me mostrar o caminho que devo escolher e colocar pessoas maravilhosas na minha vida, que me ajudam, apoiam e me inspiram.

Aos meus **pais, Flávio e Janeide** e meu **irmão, Matheus**, que sempre me apoiam e fazem dos meus sonhos, seus sonhos e assim, sempre lutam comigo. Por todo apoio nos momentos difíceis, por todo o carinho e amor que tem por mim. Para vocês todo o meu amor e dedicação!

Aos meus avós, que sempre torceram pelo meu sucesso e rezaram para que tudo o que planejei fosse concretizado. Vocês são fonte de inspiração, amor e verdade em minha vida.

Aos meus tios, que me apoiaram, incentivaram, me deram suporte, carinho, amor, ânimo para seguir. Vocês são especiais e cada um teve sua contribuição para que mais um dos meus sonhos se tornasse realidade.

Aos meus padrinhos, Manoel e Luzia, pessoas de coração imenso e que muito me ajudaram nesse percurso. Serei eternamente grato por todo amor e confiança.

Aos meus primos, em especial a Thamirys, pelas conversas, sonhos compartilhados, dúvidas, segredos, companheirismo. Vocês foram essenciais nessa minha caminhada.

Ao meu afilhado, José Ilson Júnior, por todo o amor que me oferta. Te amo!

Aos meus vizinhos de Sousa, que sempre acreditaram em mim. Não poderia esquecer vocês. Tenho gravado em minha memória, desde minha infância, todo o carinho, amor e torcida pelo meu futuro. Vocês fizeram parte desse sonho.

Aos meus amigos, Nayara, Amélia, Ângela, Tayná, Waguiño, Wescley, Rivaldo, Rafael, Nikácio, Blenda e Paulo, que sempre estiveram ao meu lado e que mesmo longe me fazem companhia, agradeço de coração por tudo. Obrigado pela

torcida de sempre. Eu estou torcendo pelo sucesso e realização de cada um de vocês.

Aos meus amigos do mestrado, obrigado por todos os momentos compartilhados durante esses últimos dois anos. Cada um contribuiu para meu crescimento e fez parte da minha história. Não foi fácil esta caminhada, mas saímos mais fortes e corajosos para encarar o futuro brilhante que nos espera.

A meus amigos/irmãos, Eugênia, Viana e Arella, que foram meus maiores companheiros, na alegria e na tristeza, ao longo desse mestrado. Muitos momentos foram de lágrimas, mas vocês, sempre me confortaram com suas palavras de ânimo, me fazendo sorrir mesmo quando tudo parecia estar desfavorável. Que nossos laços sejam para sempre, estarei sempre com vocês no meu coração.

Aos meus amigos do LAMIB, Eugênia, Renata, Leonardo, Alice, Maria Luiza, Basílio e Carol, meu muito obrigado por dividir comigo as alegrias, dúvidas, erros e acertos. Vocês foram fundamentais nessa minha trajetória.

Ao meu orientador Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa, por toda paciência e dedicação para desenvolver este trabalho. Agradeço por ter acreditado em mim, ter me dado liberdade para expressar minha opinião em meio aos obstáculos que este projeto apresentou e ter respeitado as minhas escolhas e tentativas. O senhor é um exemplo de profissional e ser humano. Sinto-me honrado por fazer parte do seu grupo de pesquisa e, com o seu apoio, estar entregando meus resultados que foram obtidos em meio a muita luta e dedicação. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti por sua coorientação e por ser uma das peças chave deste trabalho. Serei eternamente grato por toda colaboração para que este trabalho pudesse ser realizado. Admiro-o pela competência, inteligência, humildade, acessibilidade e educação. Obrigado pela ótima convivência e pelo exemplo de profissional.

A minha amiga Arella Brito que foi uma verdadeira irmã ao longo do mestrado e principalmente no desenvolver desse trabalho. Agradeço por todos os

ensinamentos, paciência, dedicação, apoio e amizade. Que Deus sempre te guie e te proteja!

A todos que fazem parte do NUMETROP, em especial a professora Leopoldina, Mariana, Isis e Heloísa que me acolheram, me ajudaram e disponibilizaram o laboratório para que eu desenvolvesse minha pesquisa. Muito obrigado!

Aos professores, Diego Nóbrega e Thiago Isidro, por terem aceitado o convite para compor a banca, contribuindo com a melhoria do nosso trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho, minha eterna gratidão!

RESUMO

Atualmente, acredita-se que existe uma barreira de esclerose dentinária subjacente à lesão cariosa natural radicular, dificultando o transporte de materiais da polpa até a lesão cariosa radicular. Entretanto, esta visão é baseada em análises bidimensionais que não levam em consideração todo o volume dentinário entre a polpa e lesão cariosa radicular. Ainda, há evidências de desmineralização da dentina profunda subjacente a lesões cariosas radiculares iniciais, indicando um caminho facilitado de transporte de materiais entre a câmara pulpar e a superfície da lesão cariosa radicular. Neste contexto, o objetivo deste estudo *in vitro* foi testar a hipótese de que a composição do material endodôntico (solução irrigadora de clorexidina) afeta a cariogenicidade do biofilme formado sobre lesões cariosas radiculares iniciais ativas não cavitárias (CRIA) em dentes tratados endodonticamente. Foram realizados três estudos (com amostras pareadas): (1) com aplicação intracanal de solução irrigadora de clorexidina a 2% (n=8; G1: CRIA e G2: superfície hígida); (2) com aplicação intracanal de diferentes concentrações (0,0%; 0,25%; 0,5%) de solução irrigadora de clorexidina (n=24; superfícies com CRIA); e (3) com aplicação de solução de contraste radiográfico na superfície de CRIA e no canal radicular, em momentos distintos (n = 8). Em ambos, foram usados dentes anteriores permanentes (uniradiculares e com único canal) humanos que apresentavam CRIA e superfície radicular hígida (conforme seleção por um examinador calibrado: Kappa de 0,97), sendo os grupos experimental e controle, respectivamente. Através de análise em microtomografia computadorizada (microCT) foram excluídos dentes com raiz trincadas ou fraturadas, reabsorção radicular interna e lesão cariosa radicular cavitária. Em todos os dentes foram realizados acesso à câmara pulpar, por via oclusal, instrumentação dos canais radiculares e restauração oclusal com resina composta e em seguida, os dentes foram esterilizados com óxido de etileno. Posteriormente, os dentes foram submetidos por 5 dias a formação de biofilme *Streptococcus mutans* UA159 sobre a região teste, estando demais áreas radiculares protegidas por verniz resistente a ácido. Subsequente ao período de formação de biofilme, foram quantificados unidades formadoras de colônia (UFC), polissacarídeos extracelulares solúveis (PECs) e insolúveis (PECi) do biofilme. Finalizada a formação de biofilme, para o estudo 3, em cada dente foi usada solução aquosa de contraste radiográfico por 24 h, aplicada em momentos distintos em dois locais (superfície da CRIA e canal radicular), e em seguida feita análise histopatológica em microCT. Os resultados mostraram que no estudo 1, os biofilmes formados sobre CRIA apresentaram menor cariogenicidade com base nos parâmetros de UFC ($p < 0,0001$; g de Hedge = -5,3; IC 95% = -7,8/-2,8), PECs ($p < 0,0001$; g de Hedge = -1,51; IC 95% = -2,8/-0,17) e PECi ($p < 0,0001$; g de Hedge = 1,80; IC 95% = -3,2/-0,4). A concentração de

clorexidina na solução irrigadora intracanal teve uma correlação negativa com a cariogenicidade do biofilme *S. mutans* (UFC) formado sobre CRIA ($p = 0,0068$; $R = -0,537$; IC 95% = $-0,17/-0,77$; poder = 87,3%). Todas as lesões do estudo 3 apresentaram um caminho facilitado entre superfície e o canal radicular, nas duas maneiras de aplicação da solução de contraste. Concluimos que a solução irrigadora de clorexidina aplicada no canal radicular afetou negativamente a cariogenicidade do biofilme de *S. mutans* formado sobre a superfície de CRIA em virtude de um caminho facilitado de transporte entre o canal radicular e a superfície da lesão cariosa na raiz.

Palavras-chave: Raiz dentária; Cárie dentária; Histopatologia; Endodontia.

ABSTRACT

Currently, it is believed that a dentine sclerosis barrier exists subjacent to initial natural root caries lesions (IRC), making it difficult the transport of materials from the pulp to the IRC. However, this view is based on two-dimensional analyzes that do not take into account the entire dentinal volume underlying IRC. In addition, there are evidences indicating a facilitated transport pathway between the pulp chamber and the IRC surface. In this context, the aim of this in vitro study was to test a hypothesis that the composition of the endodontic material (irrigating solution with chlorhexidine) affects the cariogenicity of *S.mutans* biofilm formed on IRC surface in endodontically treated teeth. Three studies (with paired samples) were performed: (1) intracanal application of 2% chlorhexidine irrigating solution (n = 8; G1: IRC and G2: sound root surface); (2) intracanal application of irrigating solutions with different chlorhexidine concentrations (0.0%; 0.25%; 0.5%) (n = 24; surfaces with IRC); and (3) application of radiographic contrast solution for 24 h, either on the IRC surface and in the pulp chamber at two distinct moments (n = 8). All teeth were human anterior permanent uniradicular teeth with single root canal presenting both sound (control) and IRC (experimental) surfaces (as selected by a calibrated examiner: Kappa 0.97). Computed microtomography (microCT) analysis excluded teeth with cracked or fractured roots, internal root resorption and cavitated root carious lesion. Occlusal access to the pulp chamber, root canal instrumentation, and occlusal restoration with composite resin were performed on all teeth, and then the teeth were sterilized with ethylene oxide. Subsequently, the teeth were subjected for 5 days to *Streptococcus mutans* UA159 biofilm formation on the root surface (control or experimental), while other root areas were protected by acid-resistant varnish. After each biofilm formation period, colony forming units (CFUs), soluble extracellular polysaccharides (PECs) and insoluble polysaccharides (PECi) were quantified. For study 3, each tooth received application of an aqueous radiographic contrast solution for 24 h, either applied on the IRC surface or in the pulp chamber, and then submitted to histopathological analysis under MicroCT. The results showed that, in study 1, the biofilms formed on IRC presented lower cariogenicity based on all parameters: CFU (p <0.0001; Hedge g = -5.3; 95% CI = -7.8 / -2, 8), PECs (p <0.0001; Hedge g = -1.51; 95% CI = -2.8 / -0.17), and PECi (p <0.0001; Hedge g = 1.80 95% CI = -3.2 / -0.4). The

chlorhexidine concentration in the intracanal irrigating solution was negatively correlated with the UFC amount formed on IRC surface ($p = 0.0068$; $R = -0.537$; 95% CI = -0.17 / -0, 77; power = 87.3%). All lesions in study 3 presented a facilitated path between surface and root canal, regardless the contrast solution application site. We conclude that the chlorhexidine irrigation solution applied in the root canal negatively affected the cariogenicity of the *S. mutans* biofilm formed on the IRC surface due to a facilitated transport pathway between the root canal and the IRC.

Keywords: Tooth root; Root caries; Histopathology; Endodontics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRIA	Cárie radicular inicial ativa não cavitária
MicroCT	Microtomografia computadorizada
NaCl	Cloreto de sódio
PEC	Polissacarídeos extracelulares
PECi	Polissacarídeos extracelulares insolúveis
PECs	Polissacarídeos extracelulares solúveis
PIC	Polissacarídeos intracelulares
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Corte coronal, obtido em microtomografia computadorizada, mostrando um caminho facilitado entre a superfície de uma CRIA e o canal radicular.	3
Figura 02	Imagem apresentando o trajeto dos túbulos dentinários da região cervical em direção à câmara pulpar, obtida a partir de microscopia de luz polarizada (aumento de 20x).	3
Figura 03	Corte transversal do dente na região apical.	16
Figura 04	União do dente ao cilindro plástico.	17
Figura 05	Isolamento da coroa e 2/3 da raiz e exposição da CRIA.	17
Figura 06	Conjunto dente-cilindro plástico fixado à tampa de um tubo para centrífuga por um fio ortodôntico.	18
Figura 07	Dente posteriormente à realização dos testes e infiltração de Thoulet a partir da superfície da CRIA.	27
Figura 08	Dente posteriormente à realização dos testes e infiltração de Thoulet a partir do canal radicular.	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Lista de estudos e suas respectivas hipóteses, fatores e desfechos.	10
Quadro 02	Valores de média (UFC/ml) \pm desvio padrão (DP) das UFC.	24
Quadro 03	Resultados da análise estatística com teste T pareado das UFC.	24
Quadro 04	Valores de média ($\mu\text{g/mL}$) \pm desvio padrão (DP) de PEC solúveis.	24
Quadro 05	Resultados da análise estatística com teste T pareado dos PEC solúveis.	25
Quadro 06	Valores de média ($\mu\text{g/mL}$) \pm desvio padrão (DP) de PEC insolúveis.	25
Quadro 07	Resultados da análise estatística com teste T pareado dos PEC insolúveis.	25
Quadro 08	Resultados da análise estatística da associação entre a concentração de clorexidina na solução irrigadora e a cariogenicidade do biofilme <i>S. mutans</i> (UFC).	26
Quadro 09	Resultados da análise estatística para o estudo 3.	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1	Características clínicas da cárie radicular.....	6
2.2	Características histopatológicas da cárie radicular.....	6
2.3	Biofilme e meio bucal.....	7
3	OBJETIVOS.....	10
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1	Considerações éticas.....	12
4.2	Caracterização do estudo.....	12
4.3	Cálculo amostral.....	12
4.4	Seleção da amostra.....	12
4.4.1	Critérios de inclusão e exclusão.....	13
4.4.2	Microtomografia computadorizada tridimensional de raios X.....	13
4.5	Limpeza e desinfecção.....	14
4.6	Exame visual-tátil.....	14
4.7	Armazenamento.....	15
4.8	Definição dos grupos.....	15
4.9	Preparo endodôntico dos canais radiculares.....	15
4.10	Preparo dos espécimes para o ensaio.....	16
4.10.1	Preparo das amostras do estudo 1 – Grupo I e estudo 2.....	17
4.10	Preparo das amostras do estudo 1 – Grupo II.....	18
4.11	Esterilização do espécime.....	18
4.12	Preparo do meio de cultura.....	18
4.13	Reativação da cepa de <i>S. Mutans</i>	19
4.14	Padronização do inóculo.....	19
4.15	Tratamento e ensaio de formação de biofilme.....	19
4.16	Análise do biofilme.....	19
4.17	Quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC)	20
4.18	Dosagem de polissacarídeos extracelulares.....	20
4.19	Infiltração da solução de contraste radiográfico.....	22
4.20	Análise dos dados.....	23
5	RESULTADOS.....	24

6	DISCUSSÃO.....	28
7	CONCLUSÃO.....	33
8	REFERÊNCIAS.....	34
	ANEXO A	
	APÊNDICE A	

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença caracterizada pela dissolução dos tecidos dentais duros por ácidos produzidos pelo biofilme oral a partir da exposição à carboidratos fermentáveis advindos da dieta¹. Os ácidos orgânicos produzidos pelo biofilme oral atravessam esmalte ou cemento, resultando em reações do complexo dentino-pulpar.

Para que as lesões de cárie radicular se desenvolvam, é necessário, dentre outros fatores, algum grau de recessão gengival, com isso à medida que o biofilme se acumula na superfície da raiz, ocorre a desmineralização inicial do cemento².

A superfície radicular é coberta por uma camada muito fina de cemento e, durante o desenvolvimento da lesão cariosa radicular, as bactérias já podem ser encontradas dentro dos túbulos dentinários nos estágios iniciais do desenvolvimento da cárie^{3,4}.

A desmineralização no cemento se propaga mais intensamente ao longo dos canais que abrigam as fibras de Sharpey e o alargamento desses canais permite a entrada de bactérias na lesão num estágio mais precoce que aquele da lesão cariosa coronal⁵. Pequenas cavidades, de difícil detecção clínica, e por vezes, separadas por cemento normal, surgem no cemento⁶.

Acredita-se que a desmineralização progride paralela à superfície do cemento, devido às linhas incrementais. Isso explicaria o porquê de mesmo quando a área de superfície da lesão parece grande, a profundidade de desmineralização não ultrapassa 0,5 a 1 mm na raiz⁷.

Com relação às reações dentinárias na lesão cariosa radicular, constatou-se por meio de análises de estereomicroscopia, que 150 µm da dentina periférica (próxima da lesão cariosa radicular) estava transparente, indicando que a desmineralização chegaria numa dentina esclerótica, com túbulos obliterados por mineral, dificultando o transporte de materiais, com isso os autores interpretaram a transparência como sinônimo de esclerose⁸. Posteriormente, em um estudo com microscopia eletrônica associada à microscopia de luz, foram publicadas evidências da esclerose da dentina (com oclusão parcial dos túbulos dentinários em alguns casos) da dentina periférica à lesão cariosa radicular⁹. Uma limitação comum aos estudos histopatológicos de Schupbach e colaboradores foi a análise

bidimensional de cortes histológicos de lesões cáries radiculares, que têm a desvantagem de não fornecer dados sobre o volume dentinário subjacente à lesão cáries.

A dentina esclerosada seria uma explicação para a progressão relativamente lenta da lesão cáries radicular após a destruição do cimento⁹. Esta hipótese é suportada em dados de uma revisão⁶ que constata que as reações dentinárias na lesão cáries radicular são semelhantes às aquelas observadas na coroa. A esclerose dentinária como a primeira reação dentinária à lesão cáries coronária, é a base para a visão predominante atual das reações dentinárias na lesão cáries coronária¹⁰.

O relato de dentina esclerosada na parte periférica da lesão cáries radicular inicial implica no transporte de materiais entre a superfície radicular e o canal radicular e vice-versa. Em coerência com isto, os procedimentos não invasivos investigados na literatura são restritos à aplicação de materiais apenas na superfície radicular.

Desde o advento da radiomicrografia, têm sido publicadas imagens evidenciando o aspecto dúbio da dentina translúcida, que pode ser tanto desmineralização como esclerose¹¹. Recentemente, foram publicadas evidências de que também o aspecto de dentina normal ao estereomicroscópio é dúbio, podendo representar dentina normal ou desmineralizada quando analisada pela radiomicrografia^{12,13}.

A existência de um caminho facilitado de transporte de materiais entre o canal radicular e a lesão cáries radicular inicial ativa (CRIA) abriria a possibilidade de materiais vindos do canal radicular afetarem tanto a lesão como o biofilme formado sobre ela. Os procedimentos endodônticos, indicado por razões não relacionadas à CRIA, poderiam abrir oportunidades especiais de interferir com processos químicos na lesão cáries radicular e no biofilme subjacente. Assim, o presente estudo têm implicações no tratamento não invasivo da CRIA.

Materiais endodônticos usados como soluções irrigadoras, medicação intracanal e para obturação endodôntica podem liberar antibiótico e/ou flúor, potencialmente afetando a cariogenicidade do biofilme e a atividade iônica em relação ao mineral dental nos poros da lesão cáries radicular. Se o dente tratado endodônticamente apresentasse uma CRIA, a possibilidade da existência de um

transporte facilitado entre o canal radicular e a lesão cáriosa pode ser explorada pelo clínico para atuar de maneira não invasiva nesta lesão (Figura 01).



Figura 01: Corte coronal, obtido em microtomografia computadorizada, mostrando um caminho facilitado entre a superfície de uma CRIA e o canal radicular. Seta vermelha: superfície com cárie radicular inicial ativa. Seta amarela: Regiões de dentina infiltradas por solução de *Thoulet*.

A porção cervical da raiz apresenta uma espessura de cimento de 30-60 micrometros no milímetro no terço mais cervical (segundo medidas feitas pelo autor). Os túbulos dentinários que saem dessa região partem em direção ao canal radicular num trajeto sinuoso e em sentido apical (Figura 02). Ao atingirem o canal radicular situam-se cerca de 2 mm da junção amelo-cementária. Considerando um dente com um canal radicular de 17 mm de comprimento. Esta posição está contida na metade do terço cervical do canal radicular. Neste local são colocados soluções irrigantes, medicação intracanal temporária e obturadores endodônticos.

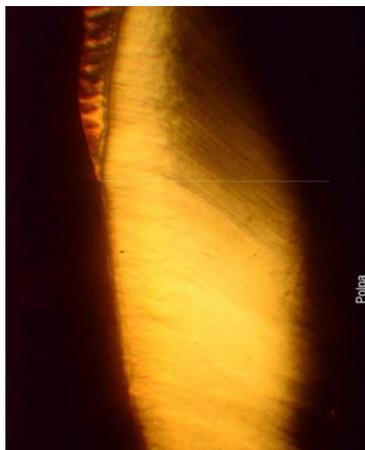


Figura 02: Imagem apresentando o trajeto dos túbulos dentinários da região cervical em direção à câmara pulpar, obtida a partir de microscopia de luz polarizada (aumento de 20x).

De acordo com dados recentes da Organização Mundial de Saúde, a média de expectativa de vida no mundo cresceu 5,5 anos de 2000 (66,5 anos) a 2016 (72 anos), sendo o maior incremento desde a década de 1960¹⁴. Paralelamente, houve um aumento da retenção de dentes em pessoas acima dos 50, 60 e 70 anos de idade¹⁵. Devido a uma série de fatores, dentre eles o aumento da exposição radicular¹⁶, o grupo etário com maior risco a desenvolver lesões cariosa radiculares é o de idosos¹⁷. Dados da Associação Americana de Endodontia indicam que idosos acima de 65 anos perfazem cerca de 26% de todos os pacientes atendidos¹⁸. Considerando dados recentes de que a prevalência mundial de cárie dentária aumentou de 1990 a 2015¹⁹, tudo indica que o tratamento endodôntico vai ser cada vez mais importante na saúde dos idosos devido à importância dos dentes naturais na manutenção de prótese e na qualidade de vida. Esse contexto indica que tanto o tratamento endodôntico em dentes com lesões cariosas radiculares e o desenvolvimento de lesões cariosas radiculares em dentes tratados endodonticamente tendem a ser cada vez mais comuns.

Em um dente com esmalte e dentina normais, existe um transporte de íons (dentro de um fluido) da superfície dental até a polpa e vice-versa²⁰. Materiais vindos do fluido pulpar se incorporam na dentina e passam a formar o fluido dentinário²¹. No caso da medicação intracanal com clorexidina, um estudo recente demonstrou que esta pode se difundir através dos túbulos dentinários e exercer algum efeito antimicrobiano afetando a produção de polissacarídeos extracelulares do biofilme formado sobre a lesão cariosa²². Se esse caminho também existir subjacente a lesões cariosas radiculares iniciais, o tratamento não invasivo de CRIA em dentes tratados endodonticamente poderia ter contribuição do material endodôntico.

É importante ressaltar que a esclerose dentinária é associada com a translucidez da dentina detectada ao estereomicroscópio, mas uma dentina translúcida pode ser tanto esclerótica como cariada, havendo dessa forma limitações. Existe baixíssima correlação entre a translucidez da dentina e sua radiopacidade²³. Entretanto, esta visão é baseada em análises bidimensionais que não levam em consideração todo o volume dentinário entre a polpa e lesão cariosa radicular.

Portanto, esse trabalho tem como objetivo de testar a hipótese nula de que a solução irrigadora intracanal de clorexidina não afeta a matriz extracelular do biofilme formado na CRIA.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características clínicas da cárie radicular

A presença de recessão gengival, com o aumento da idade, resulta na exposição da raiz ao ambiente oral na maioria dos indivíduos, porém, essa recessão não pode ser vista como um fator associado unicamente à idade, ela pode ser resultado de diversos fatores sejam eles anatômicos, iatrogênicos ou fatores associados à gengivite e/ou periodontite⁶.

Devido à exposição radicular, esse defeito antiestético pode causar hipersensibilidade dentinária e propiciar as lesões de cárie radicular entre outros problemas²⁴. A progressão da cárie é um processo dinâmico caracterizado por períodos alternados de dissolução e redeposição de minerais no tecido dental duro^{25,26}. Quando ocorre, ao longo do tempo, uma perda mineral resulta em uma lesão de cárie^{27,28}.

As lesões cariosas radiculares geralmente se desenvolvem em áreas de retenção de biofilme, ao longo da junção amelo – cementária, margem gengival e superfícies irregulares, lugares estes que apresentam uma maior dificuldade durante a escovação de remoção do biofilme dental. As superfícies cariosas podem se apresentar desde manchas pequenas, branca e descolorida até áreas extensas, acastanhadas ou escuras⁶.

Da mesma forma que a cárie coronal, as lesões de cáries radiculares também são caracterizadas de acordo com sua atividade: como lesões ativas ou inativas. Assim, a lesão cariiosa inicial ativa no esmalte exibe uma aparência opaca esbranquiçada com uma superfície áspera²⁹, enquanto a lesão ativa radicular é macia ou coriácea e descolorida³⁰, amarelada ou acastanhada clara e geralmente são cobertas por um depósito microbiano, na presença de cavitação as margens são afiadas e irregulares, já a lesão inativa tem a cor marrom escuro –preta, superfície brilhantes, lisa, se tiver a presença de cavidade esta se apresenta áspera com margens aparentes⁶.

2.2 Características histopatológicas da cárie radicular

As alterações fisiológicas que ocorrem no complexo dentino-pulpar correspondem a formação de dentina secundária e esclerose dos túbulos

dentínarios. Os estímulos patológicos das lesões de cárie incitam a formação de dentina terciária³¹.

A formação de dentina secundária e esclerose tubular, levam a uma diminuição considerável no movimento do fluido dentro dos túbulos dentínarios³², e conseqüentemente a uma diminuição da sensibilidade da polpa em indivíduos mais velhos.

A dentina secundária é formada, lentamente, assim que o dente está totalmente formado e sua raiz está completamente desenvolvida. A sua deposição se dá ao longo dos anos ocasionando a modificação da trajetória dos túbulos dentínarios e sendo responsável, em parte, pela esclerose tubular³¹.

Um fator importante para a redução do volume dos túbulos dentínarios para penetração de bactérias e seus produtos metabólicos, bem como para a redução da penetração de soluções irrigantes e drogas intracanal é a esclerose dentinária³³.

Estudos indicam que tanto a estagnação quanto a remineralização das lesões ativas dependem do grau: de atividade de esclerose dos túbulos dentínarios nas áreas subjacentes a lesão, da infecção bacteriana da dentina, da progressão das lesões e da localização na superfície radicular^{8,30}.

Nos estágios iniciais do desenvolvimento da cárie envolve uma desmineralização do cemento ao longo de fibras colágenas³⁴ e mudança dos cristais de hidroxiapatita^{4,35}. A invasão bacteriana ocorre ao longo das fibras de colágeno e pode ser parcialmente responsável pela divisão de fibras^{2,35}.

A literatura ainda aponta o número de túbulos dentínarios na dentina radicular ser significativamente menor do que na dentina coronal e a esclerose na dentina radicular aumentar com a idade, como as causas que podem explicar porque a cárie de superfície radicular progredir lentamente. Além de, o biofilme microbiano pode ser mais fluido e permitir um melhor acesso à saliva, aumentando a reposição lenta de minerais, o que retarda a progressão das lesões⁶.

2.3 Biofilme e meio bucal

Um dos principais agentes etiológicos da cárie dentária é a bactéria gram positiva, *S. mutans*, devido à sua capacidade de colonizar a superfície dental, metabolizar carboidratos e produzir ácido láctico, além de ter a capacidade de crescer e se multiplicar em ambiente ácido^{36,37}.

O biofilme é definido como uma população ou comunidade de microrganismos que vivem em estruturas organizadas (matriz extracelular) em uma interface entre o sólido e o líquido³⁸. A microflora do biofilme residente consiste em uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo facultativamente espécies aeróbicas e obrigatoriamente anaeróbicas e fungos³⁹.

A formação do biofilme envolve a interação entre colonizadores bacterianos precoces e a película adquirida de esmalte formada por proteínas e glicoproteínas que é adsorvida à superfície do dente de forma natural e atua como parte da defesa do hospedeiro, ajudando a prevenir a colonização por microrganismos exógenos e muitas vezes patogênicos³⁹. No biofilme, os microrganismos apresentam-se embebidos em uma matriz extracelular composta por glicoproteínas e polissacarídeos⁴⁰.

O processo de formação de biofilme por meio do *S. mutans* inicia-se com o revestimento da superfície do dente pela película adquirida^{41, 42}. Na presença de sacarose, as bactérias aderem-se firmemente à superfície do dente como resultado da produção de exopolissacarídeos (glucanos), por meio da atividade da enzima glicosiltransferase. Sendo assim, o acúmulo de biofilme faz com que o *S. mutans* metabolize eficientemente a sacarose (açúcar ou polímeros, tais como o amido) para produzir grandes quantidades de ácido láctico, capaz de solubilizar o componente mineral do dente e iniciar o processo de cárie^{36,37}.

A virulência do biofilme dental é dependente da formação de polissacarídeos extracelulares produzidos pelos microrganismos presentes nesse biofilme e da queda do pH do seu fluido provocada pelo ácidos resultantes da metabolização dos açúcares da dieta pelos microrganismos. Os polissacarídeos extracelulares melhoram a aderência bacteriana às superfícies dos dentes e modificam a matriz do biofilme, aumentando sua porosidade e facilitando a instalação da cárie³⁹.

Os polissacarídeos nos biofilmes podem ser divididos em duas categorias: polissacarídeos extracelulares (PEC) e polissacarídeos intracelulares (PIC). PEC e PIC influenciam a cariogenicidade dos biofilmes dentários em pelo menos duas vias: PEC promovem a aderência e, por serem fonte de energia extracelular, a acumulação bacteriana nas superfícies dos dentes, além de causar mudanças bioquímicas e estruturais na matriz dos biofilmes; e PIC, sendo uma fonte de energia intracelular, promovem menores níveis de pH em jejum durante períodos

de privação de nutrientes, o que pode resultar na seleção de microorganismos cariogênicos e desenvolvimento de cáries⁴³.

Os PEC em especial desempenham um papel importante na patogênese da cárie dentária, mais especificamente através de: (i) reforço da aderência bacteriana e acumulação adicional de microorganismos, (ii) fornecimento de integridade estrutural e volume para biofilmes e (iii) aumento da acidogenicidade da matriz do biofilme, podendo ainda ser divididos em solúveis e insolúveis, sendo os insolúveis mais envolvidos nos mecanismos descritos⁴³.

A sacarose presente em nossa dieta é considerada o carboidrato dietético mais cariogênico^{44,45}, e causa grandes alterações bioquímicas e fisiológicas durante o processo de formação de biofilmes. Um estudo de biofilme formado na presença de sacarose ou na presença de uma mistura de seus monossacarídeos (glicose + frutose) concluiu que o biofilme formado na presença da sacarose ou de seus constituintes foi mais cariogênica que o grupo controle, e seu maior volume pode ser atribuído à formação de polissacarídeos extracelulares⁴⁵. A produção de ácido a partir do metabolismo da sacarose interrompe o equilíbrio da comunidade microbiana, favorecendo o crescimento de espécies cariogênicas, onde o biofilme formado na presença desse carboidrato é mais cariogênico devido à sua alta concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECi), que alteram a matriz do biofilme, tornando-o mais poroso⁴⁶.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo *in vitro* foi testar a hipótese de que a composição do material endodôntico (solução irrigadora de clorexidina) afeta a cariogenicidade do biofilme formado sobre lesões cariosas radiculares iniciais ativas não cavitárias.

Como objetivos específicos, três estudos foram planejados, como descrito no quadro 1.

Quadro 1. Lista de estudos e suas respectivas hipóteses, fatores e desfechos.

Estudo	Hipótese	Fator	Desfecho
1	Teste de hipótese (de diferença de médias) de que o tipo de superfície radicular afeta a cariogenicidade do biofilme formado sobre superfície radicular de dente tratado endodonticamente com solução irrigadora de clorexidina	Superfície radicular (nível de medida dicotômico): superfície hígida e CRIA	Unidades formadoras de colônias, UFC, de <i>S. mutans</i> ; Polissacarídeos extracelulares solúveis (PECs); Polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECi).
2	Hipótese de associação: quanto maior a concentração de clorexidina na solução irrigadora, menor a cariogenicidade do biofilme	Superfície com CRIA contendo solução salina de cloreto de sódio 0,9% e solução aquosa com diferentes concentrações de clorexidina (0,25 e 0,5) no canal radicular	Unidades formadoras de colônias, UFC, de <i>S. mutans</i>
3	Hipótese de que a proporção de CRIA com	Superfície radicular com CRIA	Corte tomográfico demonstrando

	caminho facilitado da superfície radicular até o canal radicular é pequena (20%)		caminho entre a superfície da CRIA e o canal radicular
--	----------------------------------------------------------------------------------	--	--------------------------------------------------------

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Esta pesquisa foi conduzida em conformidade as diretrizes e normas vigentes que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob protocolo: CAAE: 09393519.1.0000.5188 (ANEXO A).

4.2 Caracterização do estudo

O presente estudo caracterizou-se como quantitativo, laboratorial, experimental, analítico, prospectivo, transversal, com técnica de observação direta.

4.3 Cálculo amostral

Para o cálculo amostral, foi considerada a diferença entre os dois grupos mais díspares, o que é um procedimento aceitável quando se planeja estudo com mais de dois grupos. Com um nível de significância de 1% bicaudal e um poder de 90%. Com relação à magnitude de efeito de diferença para as quantidades de PEC solúveis e insolúveis, foram utilizados valores de um estudo piloto com amostras pareadas: magnitude g de Hedge de 3,2. O tamanho amostral ficou em 5 amostras. Estimando perdas de 30%, o tamanho amostral final ficou em 8 amostras.

4.4 Seleção da amostra

Os elementos dentários utilizados nesta pesquisa, permanentes irrompidos, unirradiculares, com CRIA, foram obtidos mediante doação de pacientes maiores de 18 anos de idade, individualmente. As doações foram realizadas após o paciente ser esclarecido sobre os objetivos deste estudo, assim como a necessidade da sua concordância de participação mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Os dentes foram extraídos

por diversas indicações, identificadas por um cirurgião dentista não participante desta pesquisa.

4.4.1 Critérios de inclusão e exclusão

Tendo em vista a segurança quanto à integridade da raiz avaliada, os elementos dentários foram selecionados de forma a excluir da amostra os dentes com:

- trincas ou fraturas na região radicular;
- mais de uma raiz;
- mais de um canal radicular por raiz;
- lesão cariosa radicular cavitária;
- reabsorção radicular interna que não seja desgastada por uma instrumentação endodôntica simples;
- canal radicular acessório desembocando nos terços cervical e médio da raiz.

Para tanto, os dentes foram examinados utilizando uma lupa estereomicroscópica nos aumentos de 10x e 40x e microtomografia computadorizada tridimensional de raios X (microCT).

4.4.2 Microtomografia computadorizada tridimensional de raios X inicial

Para padronização do escaneamento e reconstrução no microCT, foi realizado em um equipamento Skyscan 1172, Bkuker, Bélgica, foram definidos parâmetros comuns a todas as amostras, quais sejam: para aquisição da imagem: pixel de 27,07 μm (matriz de pixels de tamanho grande), filtro de alumínio e cobre, passo de rotação de 0,4°, média de quadros de 3, movimento aleatório de 10, 100 kV de energia e rotação de 180°. Para a reconstrução da tomografia 3D, foram usados os seguintes parâmetros: suavização de 6, correção de endurecimento de feixe de 25% e correção de artefato de anéis de 8.

4.5 Limpeza e desinfecção

Depois dessa primeira seleção, cada elemento dentário foi limpo com o auxílio de curetas periodontais Trinity® (Brasil), através das quais tiveram seus remanescentes de tecido mole e cálculos dentários cervicais removidos.

O processo de desinfecção foi realizado mediante utilização de pelotas de algodão embebidas em solução de hipoclorito de sódio 1% Asfer® (São Paulo - Brasil), aplicados em movimentos ativos, no sentido coroa-ápice radicular, durante 30 segundos, com o objetivo de remover possíveis remanescentes de biofilme na região radicular que ainda pudessem estar presentes.

Em seguida, os dentes foram lavados com jato ar/água da seringa tríplice durante 30 segundos e secos apenas com jato de ar pelo mesmo tempo. Desta forma os elementos dentários foram preparados para a etapa seguinte de exame visual - tátil da lesão cariosa.

4.6 Exame visual - tátil

Com o objetivo de padronização, as lesões cariosas radiculares foram selecionadas com base nos critérios de diagnóstico visual e tátil. Para isto, foi realizado o exame visual a olho nu, com iluminação ambiente, estando a face avaliada a 25 cm dos olhos do examinador, com auxílio de uma sonda WHO.

A avaliação foi realizada por um examinador calibrado. Para calibração, foram utilizados 30 elementos dentários (duas áreas radiculares por dente), que teve cada face analisada duas vezes, entre intervalo de 15 dias, quanto aos seguintes escores⁶:

- Escore 0 - hígida: superfície lisa, brilhosa à luz refletida, coloração amarelada, e consistência dura à sondagem;
- Escore 1 - lesão inativa: lesão cariosa inicial não cavitária com superfície lisa à sondagem suave, brilhosa à luz refletida, coloração marrom escuro ou preto, e consistência dura à sondagem;
- Escore 2 - lesão ativa lesão: cariosa inicial não cavitária com superfície rugosa à sondagem suave, opaca à luz refletida, coloração amarela ou acastanhada clara, e consistência mole à sondagem;

Para cada um desses escores foi calculado o índice de confiabilidade Kappa máximo. O examinador foi considerado por ter um valor de Kappa máximo de 0,97.

Foram considerados para esta pesquisa os dentes que apresentaram superfície radicular hígida e lesão radicular ativa não cavitária (na região cervical).

4.7 Armazenamento

Os elementos dentários que não estivessem sendo estudados, analisados ou mesmo em processo de hidratação, eram armazenados em solução aquosa de azida sódica 0,02% (pH 7,0) até sua posterior utilização⁴⁷.

4.8 Definição dos grupos

Foram considerados dois grupos pareados para o estudo 1, com solução irrigadora intracanal de clorexidina 2%, com um tamanho amostral de 8 dentes e mais três grupos pareados para o estudo 2, um grupo com solução salina de cloreto de sódio (NaCl) e dois grupos com solução irrigadora intracanal de clorexidina em diferentes concentrações (0,25% e 0,5%), apresentando tamanho amostral de 8. Para o primeiro estudo os grupos foram assim constituídos: (I) superfície com CRIA com aplicação intracanal de solução irrigadora de clorexidina a 2% e (II) superfície radicular hígida (grupo controle negativo em relação ao transporte facilitado) com aplicação intracanal de solução irrigadora de clorexidina a 2%.

Para o segundo estudo os grupos serão assim constituídos: (I) CRIA com aplicação intracanal de solução salina de cloreto de sódio 0,9%, (II) CRIA com aplicação intracanal de solução irrigadora de clorexidina a 0,25% e (III) CRIA com aplicação intracanal de solução irrigadora de clorexidina a 0,5%.

4.9 Preparo endodôntico dos canais radiculares

Foi feita a abertura coronária com as pontas esféricas diamantadas 1012, 1013 ou 1014 e localização dos canais radiculares com as limas especiais #06, #08 ou #10. Em seguida, foi utilizada as brocas Gattes Glidden para alargar a entrada dos canais e ampliar os terços médio e cervical. Para remoção do smear layer, o canal foi preenchido com EDTA 17%, com auxílio de uma seringa de

plástico, onde permaneceu por 3 minutos, depois foi irrigado e aspirado com hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) e seco com ponta de papel absorvente.

4.10 Preparo dos espécimes para o ensaio

Os dentes selecionados que apresentavam lesões cariosas cavitárias coronárias, tiveram as mesmas restauradas com resina composta e aqueles que tinham exposições radiculares adicionais às áreas da CRIA, tiveram as áreas de exposição seladas com adesivo dentário. Em seguida, os dentes foram seccionados transversalmente na região apical, 2 mm acima do ápice, com auxílio de um disco diamantado dupla face KG Sorensen®, São Paulo, Brasil, montado em mandril para peça de mão em baixa rotação sob refrigeração constante (Dabi Atlante®, Ribeirão Preto, Brasil), com o objetivo de facilitar o acesso ao canal radicular e a aplicação da solução irrigadora intracanal (Figura 03).



Figura 03: Corte transversal do dente na região apical.

Em seguida, as raízes de todos os elementos dentários foram unidas a cilindros plásticos através da sua região medial (Figura 04). A união dessas estruturas se deu por meio de resina composta fotopolimerizável e Super cola, usadas de maneira isolada (uma de cada vez) e simultânea (primeiro a resina e depois a cola).



Figura 04: União do dente ao cilindro plástico.

4.10.1 Preparo das amostras do estudo 1 - Grupo I e estudo 2

Para a realização do ensaio com o grupo I dos estudos 1 e 2, os dentes tiveram toda a coroa e 2/3 da raiz (região cervical e medial) isolada com verniz resistente a ácido, de forma que apenas a lesão cáriosa permanecesse exposta. Essa etapa teve a importância de garantir que qualquer transporte de líquido entre o canal radicular e o meio externo se desse através da lesão (Figura 05).



Figura 05: Isolamento da coroa e 2/3 da raiz e exposição da CRIA.

Após isso, o conjunto dente-cilindro plástico foi fixado à tampa de um tubo para centrifuga de 15ml por um fio ortodôntico, de forma que dentro desse tubo dispusesse de um compartimento (externo ao dente) (Figura 06), onde foi colocado 1ml do meio de cultura Extrato de Levedura e Triptona (TYE) + sacarose 1%.

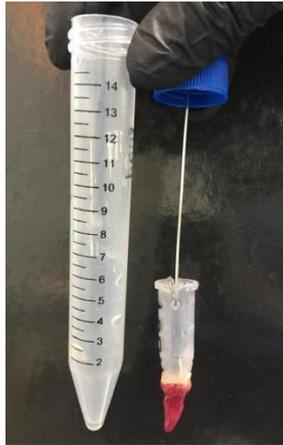


Figura 06: Conjunto dente-cilindro plástico fixado à tampa de um tubo para centrifuga por um fio ortodôntico.

4.10.2 Preparo das amostras dos estudos 1 – Grupo II

Para a realização do ensaio do grupo II do estudo 1, por se tratar das mesmas amostras ensaiadas no grupo I, foi necessário remover o verniz com removedor à base de acetona e novamente pintar o dente de forma a deixar exposta uma área da raiz sadia de iguais dimensões às da lesão cariada do mesmo dente.

O ensaio desse grupo se deu com o mesmo mecanismo descrito no grupo 1, onde foi colocado o meio (TYE + sacarose).

4.11 Esterilização do espécime

Os espécimes foram esterilizados com Óxido de Etileno previamente ao início de cada experimento.

4.12 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o extrato de levedura e Triptona (TYE – KASVI, BRASIL) enriquecido com 1% de sacarose. Para o preparo de 100 ml deste, foram dissolvidos 1 g de Sacarose, 2,5 g de Triptona e 1,5 g de Extrato de levedura em água destilada, utilizando para tal uma proveta e um frasco de vidro de 250 ml. Inicialmente foi colocada uma pequena quantidade de água destilada e misturado, em seguida foi adicionado água até atingir 100 ml. O meio foi transferido para tubos falcon de 50 ml, que foram esterilizados em autoclave vertical e reservados em geladeira até o dia do experimento. Para que pudesse

ser usado posteriormente, o meio deveria apresentar-se translúcido, indicando que não houve crescimento de microorganismos.

4.13 Reativação da cepa de *S. mutans*

Inicialmente, foi realizado um esfregaço da cepa UA 159 do *S. mutans* numa placa de petri com meio MSA, que foi colocado em microaerofilia por 24 horas.

Em seguida, colônias de bactérias foram coletadas com alça e colocadas em um tubo falcon contendo o meio (TYE + sacarose). O meio contendo o *S. mutans* retornou à microaerofilia por 72 horas, juntamente com um meio sem microorganismo para controle de esterilização e crescimento.

4.14 Padronização do Inóculo

A padronização da quantidade de *S. mutans* presente no inóculo se deu através de leituras de absorbância e foram realizadas no comprimento de onda de 600 nanômetros (A600nm). Previamente à leitura, o aparelho foi zerado (Blank) com o valor do meio puro. O meio misturado ao *S. mutans* foi diluído até que o inóculo apresentasse $\cong 1 \times 10^8$ células viáveis, que correspondia ao valor entre 0,08 e 0,12 obtido do espectrofotômetro (Figura 07).

4.15 Tratamento e ensaio de formação de biofilme

Após serem esterilizadas, as amostras passaram pelo ensaio durante 5 dias, quando não estavam sendo manipuladas permaneceram em estufa bacteriológica (37°C). Foi adicionado no interior do canal radicular, com auxílio de uma seringa de 3 ml, a solução de clorexidina para os estudos: 1 e 2 (grupo II e III) e ao estudo 2 (grupo I) foi adicionado solução salina de NaCl 0,9%. O meio foi trocado após 48h de início do experimento e desprezado ao final do 5° dia.

4.16 Análise do biofilme

Após a o período de cultivo, os espécimes foram coletados e acondicionados em microtubos com solução salina 0,9% e submetidos à agitação em vortex por 60 segundos, para desprendimento do biofilme.

4.17 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Uma alíquota de 1 mL equivalente a cada espécime da suspensão foi diluída seriadamente (10^0 a 10^{-8}), e semeadas em placas em Agar Mitis Salivarius (MSA Agar) com 15% de sacarose (KASVI®, Brasil), para *S. mutans*, pela técnica da gota (10 μ L), em triplicata para avaliação da viabilidade dos biofilmes e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL), em um das diluições, com valores convertidos em escala logarítmica.

4.18 Dosagem de Polissacarídeos Extracelulares

Após o período de 120 horas de desenvolvimento dos biofilmes, o meio de cultura foi removido e o biofilme formado foi re-suspendido em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%), por meio de pipetagem e agitação em vórtex (60 s). A suspensão foi transferida para microtubos e posteriormente utilizada para dosagem de biomassa e de polissacarídeos extracelulares solúveis (PECs) e polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECi). A metodologia de extração e dosagem de polissacarídeos foi previamente descrita na literatura^{48,49,50}. Segue abaixo a descrição de forma detalhada:

- Após a solubilização do biofilme em 1 mL de solução salina, deve-se reservar um volume mínimo de 400-500 μ L;
- Os microtubos pré-pesados contendo a suspensão dos microrganismos devem ser centrifugados (3000 g) por 5 min;
- Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser transferido para um novo tubo, com auxílio de uma micropipeta. O pellet deve permanecer ao fundo do microtubo, tomando-se cuidado para não o romper durante o processo de aspiração;
- O sobrenadante é transferido para outro microtubo com igual volume de álcool a 99% para precipitação do PECs (solução 1). O tubo contendo o sobrenadante do biofilme e álcool 99% deve ser levado para o congelador (-20° C), permanecendo por no mínimo 30 min;
- Nesse momento o microtubo contendo o pellet é pesado para a determinação do peso úmido do biofilme através da equação: Peso final - peso inicial do microtubo;

- Ao pellet é adicionado 500 μL de NaOH 1 M para extração/solubilização do PECi (solução 2). Após adicionar NaOH, os tubos devem ser posicionados em mesa agitadora por 15 min ou agitados no vórtex por 1 min;
- Em seguida, a solução 2 (pellet + NaOH) é centrifugada por 5 min;
- Após centrifugação, o sobrenadante da solução 2 é removido e transferido para um novo microtubo, para precipitação do PECi; O pellet remanescente pode ser solubilizado novamente com 100 μL de NaOH 1M, centrifugado e coletado o sobrenadante.
- Após esse processo, o tubo contendo o pellet da solução 2 deve ser desprezado ou utilizado para extração de PIC.
- Ao sobrenadante obtido da centrifugação da solução 2, adiciona-se igual volume de álcool 99% e armazena-se o microtubo no congelador (-20°C) por no mínimo 30 min;
- Nesse momento, o PECs (resultante da solução 1) deve ter precipitado. O tubo contendo solução 1 + álcool 99% é retirado do congelador e centrifugado (3000 g) por 5 min;
- Em seguida, descarta-se o sobrenadante (álcool 99%), observa a formação de um pequeno pellet. Verte-se o microtubo sobre uma folha de papel absorvente e reserva-se o microtubo com a tampa aberta dentro da capela para secar;
- Quando o microtubo da solução 1 (PECs) estiver seco, inserir 250 μL de NaOH 1M. A diluição do pellet de PECs com NaOH 1 M nesta etapa consiste em preparar a amostra para dosagem. O volume de 250 μL consiste no valor mínimo a ser utilizado, uma vez que se utiliza 200 μL para cada dosagem.
- Nesse momento, o PECi (resultante da solução 2) deve ter precipitado. O tubo contendo o sobrenadante da solução 2 + álcool 99% é removido do congelador e centrifugado (3000 g) por 5 min;
- Em seguida, descarta-se o sobrenadante (álcool 99%), observa a formação do pellet de PECi. Verte-se o microtubo sobre uma folha de papel absorvente e reserva-se o microtubo com a tampa aberta dentro da capela para secar;
- Quando o microtubo da solução 2 (PECi) estiver seco, inserir 250 μL de NaOH. A diluição do pellet de PECs com NaOH 1 M nesta etapa consiste em preparar a amostra para dosagem. O volume de 250 μL consiste no valor mínimo a ser utilizado, uma vez que se utiliza 200 μL para cada dosagem.

- Identificar os tubos de vidro correspondentes PECs e PECi e inserir 200 µL de fenol 5%;
- Em seguida, inserir 200 µL de cada amostra no tubo de vidro correspondente;
- Preparar a curva com padrões de glicose conhecidos (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200).
- Para reação fenol-sulfúrico, utilizar, por amostra: 200 µL de fenol + 200 µL da amostra (PECs, PECi ou Ponto da curva Padrão) + 1 mL de ácido sulfúrico;
- Inserir 1 mL de ácido sulfúrico P.A. em cada tubo de vidro contendo 200 µL de fenol + 200 µL da amostra (ou do padrão);
- Fazer a leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm – Anotar valores de absorbância;
- Após a leitura, descartar o conteúdo em um recipiente apropriado e colocar os tubos de vidro em um recipiente com água.

4.19 Infiltração da solução de contraste radiográfico

Ao final, cada elemento dentário teve a região da lesão cariosa em contato com uma solução aquosa de iodeto de mercúrio e iodeto de potássio com índice de refração de 1,47. Tal solução é conhecida como solução de *Thoulet* e foi usada como contraste radiográfico por apresentar elementos químicos (mercúrio) com alta absorção de raios X. Considerando o lento processo de penetração de líquidos com alto coeficiente de penetração (a solução de *Thoulet* 1,47 tem um coeficiente de penetração de 2297 cm / s⁵⁰ enquanto a água possui um coeficiente de penetração de 4039 cm / s⁵¹). A solução de contraste foi colocada em contato com a região da lesão cariosa por 24 horas à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, os dentes foram removidos dos seus suportes de fixação e passaram por uma análise em microCT, onde foi avaliada a proporção de dentes com um caminho facilitado de transporte entre a superfície da CRIA e o canal radicular. Em seguida, todos os dentes foram deixados em água por 24h e posteriormente, analisados em microCT para verificar que toda a solução de contraste radiográfico havia sido removida. Para finalizar, a solução de *Thoulet* foi colocada no interior do canal radicular, de modo que preenchesse todo o canal, e depois foram analisados em microCT, onde foi avaliada a proporção de dentes

com um caminho facilitado de transporte entre o canal radicular e a superfície da CRIA.

4.20 Análise dos dados

Para o estudo I, quanto à diferença entre os dois grupos pareados, os dados de cada grupo foram testados em relação à normalidade pelo cálculo da curtose e assimetria, e aqueles com uma variação de ± 2 do valor ótimo (-2 a 2 na assimetria; 1 a 5 na curtose) foram considerados como normalmente distribuídos⁵². Após confirmação da normalidade, o teste T pareado foi aplicado com um nível de significância de 5% bicaudal, e foram calculados a significância, a magnitude do efeito (G de Hedge), seu intervalo de confiança de 95%, e o poder⁵³. Isto foi aplicado para cada um dos três desfechos do estudo I.

Para o estudo II (associação), o valor de UFC de cada amostra, nas três concentrações de clorexidina (0,0%; 0,25% e 0,5%), foi normalizado em relação ao valor obtido com a solução salina no canal radicular. Isto é, cada valor foi dividido pelo valor de UFC obtido com a solução salina no canal radicular. A correlação de Pearson foi aplicada, com um nível de significância de 5% bicaudal, onde foram calculados a significância, a magnitude do efeito (coeficiente "R"), seu intervalo de confiança de 95%, e o poder⁵³.

Para o estudo III, foi aplicado o teste de hipótese de diferença de proporções para uma única amostra, no qual a proporção da amostra foi comparada com uma proporção esperada na população⁵³, esta última no valor de 20%. Este valor representa a proporção esperada na população de CRIA com caminho facilitado entre a superfície da CRIA e o canal radicular. A proporção de 20% é considerada pequena⁵³. Com um nível de significância de 5% bicaudal, e foram calculados a significância, a magnitude do efeito (H de Cohen), seu intervalo de confiança de 95%, e o poder⁵³.

5 RESULTADOS

Os dados a seguir mostram, respectivamente, os dados de média e desvio-padrão para o desfecho UFC (Log_{10} de UFC/ml) (Quadro 02), e os resultados da análise estatística (Quadro 03) do estudo 1. A hipótese nula foi rejeitada para UFC ($p < 0,0001$), mostrando que o tipo de superfície radicular afetou a formação de colônias no biofilme, com uma magnitude de efeito g de Hedge alta (5,32) e alto poder (99,99%).

Quadro 02 – Valores de média (Log_{10} de UFC/ml) \pm desvio padrão (DP) das UFC.

Grupo	Tipo de Superfície radicular	Média \pm desvio padrão
CRIA	Superfície de lesão cariiosa com solução de clorexidina no canal radicular	5,58 \pm 1,25
Superfície hígida	Superfície radicular normal com solução de clorexidina no canal radicular	12,00 \pm 0,16

Quadro 03 – Resultados da análise estatística com teste T pareado das UFC.

Valor de p	g de Hedge	IC lim sup	IC lim inf	Poder
$1,37 \times 10^{-6}$	-5,32	-2,80	-7,84	0,99

IC: intervalo de confiança; *significância estatística ($p < 0,0001$).

Para o estudo 1, seguem os dados de média e desvio padrão (Quadro 04) do desfecho da quantidade de PECs ($\mu\text{g/mL}$). Os resultados da análise estatística, com teste T pareado, estão descritos no quadro 05. A hipótese nula foi rejeitada para PECs ($p < 0,0001$), mostrando que o tipo de superfície radicular afetou a formação de polissacarídeos extracelulares solúveis no biofilme, com uma magnitude de efeito g de Hedge alta (-1,51) e alto poder (95,24%).

Quadro 04 – Valores de média ($\mu\text{g/mL}$) \pm desvio padrão (DP) de PEC solúveis.

Grupo	Tipo de Superfície radicular	Média \pm desvio padrão
CRIA	Superfície de lesão cariiosa com solução de clorexidina no canal radicular	85,00 \pm 38,07
Superfície hígida	Superfície radicular normal com solução de clorexidina no canal radicular	178,57 \pm 54,64

Quadro 05 - Resultados da análise estatística com teste T pareado dos PEC solúveis.

Valor de p	g de Hedge	IC lim sup	IC lim inf	Poder
0,003	-1,518	-0,176	-2,859	0,952

IC: intervalo de confiança; *significância estatística ($p < 0,0001$).

Quanto ao desfecho da quantidade de PECi ($\mu\text{g/mL}$), do estudo 1, seguem os quadros 06 e 07. O quadro 06 mostra os dados de média e desvio padrão. Os resultados da análise estatística estão descritos no quadro 07. A hipótese nula também foi rejeitada para PECi ($p < 0,0001$), mostrando que o tipo de superfície radicular afetou a formação de polissacarídeos extracelulares insolúveis no biofilme com uma magnitude de efeito g de Hedge alta (-1,80) e alto poder (98,57%).

Quadro 06 – Valores de média ($\mu\text{g/mL}$) \pm desvio padrão (DP) de PEC insolúveis.

Grupo	Tipo de Superfície radicular	Média \pm desvio padrão
CRIA	Superfície de lesão cáriosa com solução de clorexidina no canal radicular	64,68 \pm 33,89
Superfície hígida	Superfície radicular normal com solução de clorexidina no canal radicular	166,71 \pm 50,78

Quadro 07 - Resultados da análise estatística com teste T pareado dos PEC insolúveis.

Valor de p	g de Hedge	IC lim sup	IC lim inf	Poder
0,001	-1,807	-0,404	-3,210	0,985

IC: intervalo de confiança; *significância estatística ($p < 0,0001$).

Para o estudo 2, os resultados da análise estatística da associação entre concentração de clorexidina na solução irrigadora e a cariogenicidade do biofilme *S. mutans* (UFC) formado sobre CRIA estão descritos no quadro 08. A concentração de clorexidina na solução irrigadora intracanal mostrou ter uma correlação negativa com a cariogenicidade do biofilme *S. mutans* (UFC) formado sobre CRIA ($p < 0,00001$; R de Pearson= - 0,537; IC 95% = -0,17; -0,77; poder = 87,34%; Gráfico 01).

Quadro 08 – Resultados da análise estatística da associação entre a concentração de clorexidina na solução irrigadora e a cariogenicidade do biofilme *S. mutans* (UFC).

Erro tipo I	Coef.R (Pearson)	IC lim sup	IC lim inf	Poder
0,006838901	-0,537	-0,170	-0,773	0,873

Coef. R: Coeficiente de relação de Pearson.

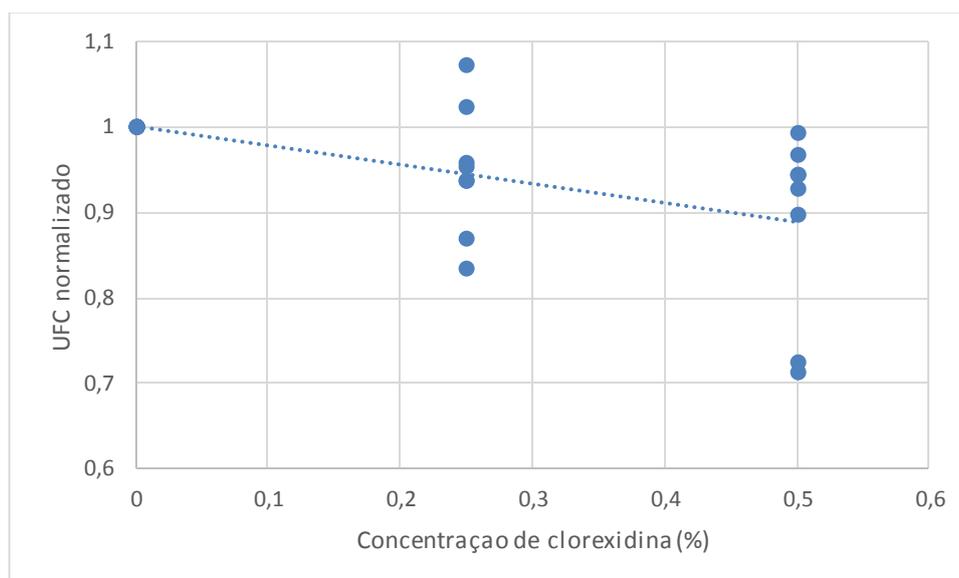


Gráfico 01. Dados da associação (Pearson) da concentração de clorexidina na solução irrigadora intracanal com a cariogenicidade do biofilme de *S. mutans* (UFC normalizado em relação ao valor com concentração de 0%), n=24.

Usando a análise de MicroCT 3D (estudo 3), todos os dentes testados apresentaram um transporte facilitado de fluido dentinário entre o canal radicular e a superfície da CRIA posterior à infiltração com solução aquosa de contraste radiográfico (solução de Thoulet) por 24 h, tanto no sentido da superfície da CRIA para o canal radicular (Figura 07) como na direção oposta (do canal radicular para a superfície da CRIA) (Figura 09), sendo diferente da proporção esperada de 20% com magnitude de efeito alta (H de Cohen = 3,13) e poder de 99,9% (Quadro 07). Os resultados estatísticos foram idênticos para os dois locais de aplicação da solução de contraste.

Quadro 09 – Resultados da análise estatística para o estudo 3.

Valor de p	H de Cohen	IC lim sup	IC lim inf	Poder
$1,889 \times 10^{-10}$	3,131	3,954	2,309	0,999

* Os resultados foram iguais para os dois locais de aplicação da solução de contraste (superfície da CRIA e canal radicular).

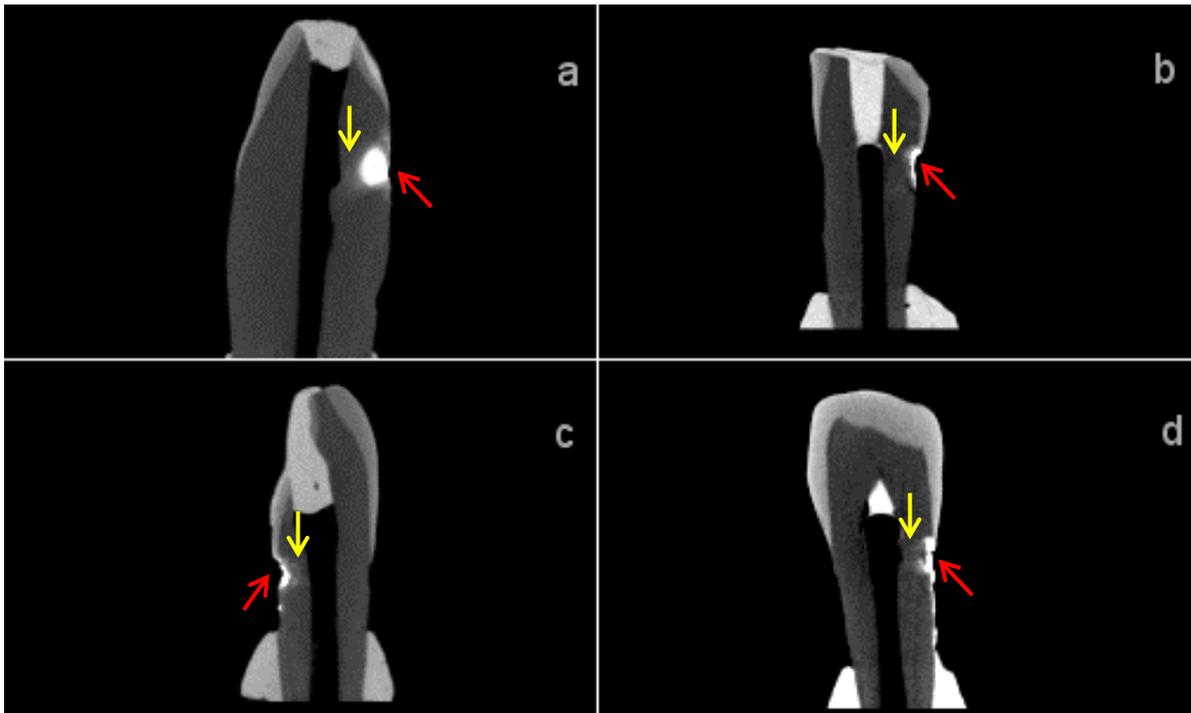


Figura 07: Em a,b,c e d podemos ver o dente posteriormente à realização dos testes e infiltração de *Thoulet* a partir da superfície da CRIA. Seta vermelha: superfície com cárie radicular inicial ativa. Seta amarela: regiões de dentina infiltradas por solução de *Thoulet*.

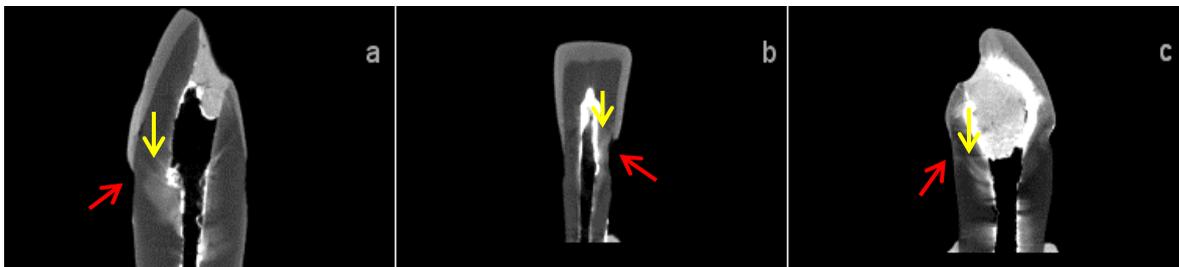


Figura 08: Em a,b e c podemos ver o dente posteriormente à realização dos testes e infiltração de *Thoulet* do canal radicular para a superfície da CRIA. Seta vermelha: superfície com cárie radicular inicial ativa. Seta amarela: regiões de dentina infiltradas por solução de *Thoulet*.

6 DISCUSSÃO

Este estudo fornece evidências de que a dentina subjacente à CRIA oferece um caminho facilitado de transporte desde o canal radicular até a superfície da CRIA, com importantes implicações na prevenção e no tratamento não invasivo da CRIA.

Dentes tratados endodonticamente têm a espessura de dentina reduzida devido ao alargamento do canal radicular para posterior obturação. Assim, é importante ressaltar que a profundidade do caminho facilitado de transporte evidenciado nas imagens de microCT não representa a total espessura natural de dentina subjacente à CRIA, mas sim uma situação próxima daquela situação clínica de dentes tratados endodonticamente. Nossos dados evidenciam uma redução, com alta magnitude de efeito, da cariogenicidade do biofilme de *S. mutans*, em termos de UFC e PEC solúveis e insolúveis. A comprovação da formação de PECs é uma evidência do potencial adesivo do biofilme de *S. mutans* à superfície radicular.

No estudo 1, o fato dos desfechos (UFC, PECl e PECs) no grupo controle (superfície radicular hígida) terem sido menores que os do grupo experimental pode ser explicado pela presença de camadas teciduais que recobrem a dentina radicular tubular na região cervical da raiz. Estas últimas consistem na camada hialina da dentina (15-30 μm), pobre ou desprovida de túbulos, que une o cemento acelular à dentina, e o cemento acelular^{54,55}. Similaridade entre as radiopacidades da camada hialina, da dentina esclerosada e do cemento acelular cervical têm sido relatadas⁵⁶, e essas duas camadas têm pouca porosidade. Caso a dentina subjacente à CRIA estivesse esclerosada, restariam túbulos esclerosados e dentina intertubular, e assim se esperaria que os resultados de UFC, PECs e PECi fossem semelhantes. Os resultados do estudo 1 sugerem que a dentina subjacente à CRIA é mais permeável que a cobertura externa da região cervical da raiz hígida.

No estudo 2, apresentamos evidência de uma correlação dose-resposta, com uma diminuição de UFC à medida que a concentração de clorexidina aumenta no canal radicular. Esta associação não foi testada no lado controle porque a repetitiva exposição da superfície radicular sadia ao desafio cariogênico por várias semanas poderia produzir uma lesão com profundidade superior à soma das

camadas externas menos porosas da raiz (cimento acelular e camada hialina da dentina), expondo a dentina tubular e permitindo, assim, a comunicação da câmara pulpar com a superfície radicular.

O estudo 3, ao usar de componentes químicos de baixa reatividade (iodo e mercúrio) com o mineral dentinário, evidenciou a morfologia do caminho facilitado entre a superfície da CRIA e o canal radicular. A análise feita a partir da inserção da solução de contraste no canal radicular mostrou a chegada da solução até a superfície da CRIA, mas não na superfície radicular controle. Os resultados deste estudo provêm uma explicação para o mecanismo que levou aos efeitos relatados nos demais estudos: um caminho de transporte facilitado de materiais entre o canal radicular e a superfície da CRIA.

Atualmente a estereomicroscopia é uma técnica considerada padrão-ouro para detecções de reações dentinárias ao processo carioso^{5 7,58}. Nesta técnica a dentina translúcida é interpretada como dentina esclerótica^{59,60,61}, porém essa interpretação se dá apenas por análises bidimensionais que não levam em consideração todo o volume dentinário entre a polpa e lesão cariosa radicular, contudo vários estudos relataram evidência de que a dentina translúcida sob estereomicroscopia pode ser esclerótica ou desmineralizada⁶².

Neste estudo, as amostras foram analisadas em microtomografia computadorizada (microCT) que corresponde a uma técnica não destrutiva, que permite a análise volumétrica da dentina subjacente à CRIA^{63,64,65}. Há discordância dos nossos resultados em relação aos dos estudos de Schupbah e colaboradores^{8,9}, que relataram dentina principalmente esclerosada subjacente à CRIA, podendo ser explicado pelo fato desses autores usarem cortes histológicos físicos representativos de áreas específicas das lesões cariosas, enquanto nosso estudo analisou cortes histológicos digitais de todo o volume dentinário subjacente às lesões cariosas.

Pelos nossos resultados, não é possível afirmar que as lesões não apresentavam esclerose na dentina subjacente. Também não se pode afirmar se a desmineralização avançou profundamente a ponto de abrir os túbulos da dentina esclerosada localizada mais internamente. A explicação mais provável é que as lesões tenham apresentado esclerose, mas que esta tenha ocluído parcialmente os túbulos dentinários, como mostrado nos estudos de Schupbach⁹, mantendo uma passagem aberta através da dentina intertubular que se encontra

parcialmente mineralizada e que a esclerose dos túbulos dentinários também ocorre como resposta a estímulos cariogênicos na cárie radicular³¹.

Em nossa pesquisa de biofilme *in vitro*, a sacarose foi acrescentada ao meio de cultura, renovado 48h após o início de indução do biofilme, diferente de outros estudos com biofilme de *S. mutans* que usaram aplicações intermitentes de sacarose⁵⁰, onde o fluido dentinário modificado ficou em contato com a dentina por dias, tornando possível que o fluido dentinário se infiltrasse nos poros cariados, eventualmente, e atingisse a superfície externa da raiz, onde interagiu com o fluido do biofilme de *S. mutans*. Essa interação resultou nas menores quantidades de UFC, PECs e PECi quando a solução de clorexidina 2% (agente antibacteriano), no estudo 1, foi utilizada para modificar o fluido dentinário na superfície cariada (grupo experimental) em relação a superfície hígida (grupo controle). Dessa forma, esses resultados sugerem que o fluido dentinário pode interagir com fluido do biofilme e afetar a composição de um biofilme cariogênico formado *in vitro* na superfície da CRIA. Um estudo prévio, com faces proximais coronárias também relatou a influência do fluido dentinário na virulência do biofilme cariogênico formado sobre lesão cáriosa natural proximal de esmalte²². Assim, nossos estudos também têm implicações no tratamento não invasivo da CRIA.

Considerando que, na presença de sacarose, os PECi influem mais amplamente na cariogenicidade do biofilme do que os PECs⁴⁶, os resultados sugerem que há maior redução na cariogenicidade do biofilme quando este foi formado sobre lesão cáriosa estando o fluido dentinário subjacente sob influência da clorexidina 2% inserida no canal radicular, apresentando um alto poder. Isso é importante se considerarmos uma ampla gama de procedimentos restauradores dentários que usam a clorexidina e outros antibióticos na composição de irrigantes intracanal e medicamentos endodônticos temporários⁶⁶ e selantes endodônticos⁶⁷ utilizados no tratamento do canal radicular, como foi o caso deste estudo.

Embora o tratamento de canal seja um procedimento bastante invasivo para o dente, os materiais endodônticos / restauradores usados nesse tratamento podem ter um efeito não invasivo a CRIA. Materiais contendo antibióticos/íons flúor podem se difundir através da dentina desmineralizada e atingir a superfície da lesão cáriosa radicular.

Inúmeros estudos já foram realizados com fins de inibir o crescimento do biofilme bacteriano, sendo a clorexidina a substância mais bem aceita^{39,68}, sua ação é devida à adsorção da mesma na parede celular do microrganismo, resultando em vazamento de componentes intracelulares⁶⁹. A solução de clorexidina em diferentes concentrações (0,0; 0,25% e 0,5%) foi inserida no canal radicular das amostras, e em seguida estas foram submergidas dentro de um meio enriquecido com sacarose, de forma que qualquer inibição do biofilme que ocorresse seria por motivo da perfusão da clorexidina do canal radicular em direção à superfície CRIA. Tomou-se o cuidado de impermeabilizar o restante da coroa para garantir que o transporte da clorexidina se desse apenas através da lesão. Foi observado, que a análise quantitativa do biofilme formado sobre a lesão com clorexidina 0,5% afetou a composição do biofilme mais do que a clorexidina 0,0% e assim sucessivamente, considerando o desfecho UFC, mostrando dessa forma que à medida que a concentração de clorexidina aumenta, a cariogenicidade do biofilme diminui, corroborando com os estudos que apontam que em concentrações mais altas, a clorexidina é bactericida devido à precipitação ou coagulação do citoplasma, provavelmente causada pela reticulação de proteínas⁷⁰.

Contudo, nosso estudo apresenta algumas limitações, uma vez que as condições *in vitro* usadas não têm a influência de fluidos dentários, como saliva e fluido periodontal que poderiam exercer um efeito no fluido do biofilme e no conteúdo de fluido dos túbulos dentinários, assim como as limitações apresentadas em outros estudos²². Uma outra limitação é que nosso estudo inclui lesões cariosas de história desconhecida, de modo que não sabemos há quanto tempo cada lesão se formou. O termo “inicial” só é válido para a característica visual das lesões cariosas, não para o tempo de formação. O uso de solução irrigadora de clorexidina teria uma ação temporal muito curto sobre o biofilme cariogênico formado sobre CRIA, o que limita a aplicabilidade clínica do nosso estudo. Materiais endodônticos usados como medicamento intracanal e material obturador, principalmente este último, que teriam efeito a longo prazo, liberam substâncias mais lentamente para os túbulos dentinários, requerendo um tempo relativamente longo de permanência do biofilme sobre a superfície da CRIA. A formação de um biofilme de *S. mutans* com sacarose por muito tempo poderia causar uma desmineralização adicional muito intensa sobre a CRIA, atuando

como um viés, de modo que o modelo de biofilme formado *in vitro* usado neste estudo não é adequado para analisar o transporte de materiais endodônticos do canal radicular até a CRIA. Nossos resultados, embora limitados pelo uso de solução aquosa, são importantes por abrirem novas questões, até então não pensadas, sobre o efeito do material endodôntico na prevenção e tratamento não invasivo de CRIA. Novos modelos experimentais poderão ser usados para responder se materiais endodônticos obturadores liberam substâncias (clorexidina, flúor, etc) com potencial atuação no biofilme formado sobre lesões cariosas radiculares, podendo abrir caminho para estudos clínicos.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo evidenciou que existe um caminho facilitado de transporte de materiais subjacente à CRIA, permitindo, em dentes instrumentados endodonticamente, que a solução irrigadora intracanal com clorexidina reduza a cariogenicidade de biofilme de *S. mutans* (em termos de UFC, PECs e PECi) formado *in vitro* sobre a superfície da CRIA. Estes resultados abrem um caminho para desenvolver tratamento endodônticos com potencial impacto na prevenção e no tratamento não invasivo de lesões cariosas radiculares.

8 REFERÊNCIAS

- 1 Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, Van Landuyt K, Banerjee A, Campus G, Doméjean S, Fontana M, Leal S, Lo E, Machiulskiene V, Schulte A, Splieth C, Zandona AF, Innes NP. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Adv Dent Res.* 2016 May;28(2):58-67.
- 2 Wefel JS. Root caries histopathology and chemistry. *Am J Dent.* 1994 Oct;7(5):261-5.
- 3 Nyvad B, Fejerskov O. Root surface caries: clinical, histopathological and microbiological features and clinical implications. *Int Dent J.* 1982 Dec;32(4):311-26.
- 4 Ekstrand KR, Zero DT, Martignon S, Pitts NB. Lesion activity assessment. *Monogr Oral Sci.* 2009;21:63-90.
- 5 Nyvad B, Fejerskov O. An ultrastructural study of bacterial invasion and tissue breakdown in human experimental root-surface caries. *J Dent Res.* 1990 May;69(5):1118-25.
- 6 Fejerskov O, Nyvad B. Root Surface Caries - Rationale Behind Good Diagnostic Practice. *Monogr Oral Sci.* 2017;26:43-54.
- 7 Sumney DL, Jordan HV, Englander HR. The prevalence of root surface caries in selected populations. *J Periodontol.* 1973 Aug;44(8):500-4.
- 8 Schüpbach P, Guggenheim B, Lutz F. Human root caries: histopathology of initial lesions in cementum and dentin. *J Oral Pathol Med.* 1989 Mar;18(3):146-56.
- 9 Schüpbach P, Guggenheim B, Lutz F. Histopathology of root surface caries. *J Dent Res.* 1990 May;69(5):1195-204.
- 10 Bjørndal L, Thylstrup A. A structural analysis of approximal enamel caries lesions and subjacent dentin reactions. *Eur J Oral Sci.* 1995 Feb;103(1):25-31.
- 11 Applebaum E. Tissue changes in dental caries. *Ann Dent.* 1948 Mar;7(1):1-14.
- 12 de Sousa FB, da Silva PF, Chaves AMB. Stereomicroscopy has low accuracy for detecting the depth of carious lesion in dentine. *Eur J Oral Sci.* 2017 Jun;125(3):229-231.
- 13 Campos SAG, Vieira MLO, de Sousa FB. Correlation between ICDAS and histology: Differences between stereomicroscopy and microradiography with contrast solution as histological techniques. *PLoS One.* 2017 Aug 25;12(8):e0183432.
- 14 Organização Mundial de Saúde. (https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/life_tables/situation_trends_text/en/) Acessado em 09 de outubro de 2019.

- 15 Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar;44 Suppl 18:S94-S105.
- 16 Hayes M, Da Mata C, Cole M, McKenna G, Burke F, Allen PF. Risk indicators associated with root caries in independently living older adults. *J Dent*. 2016 Aug;51:8-14.
- 17 Gati D, Vieira AR. Elderly at greater risk for root caries: a look at the multifactorial risks with emphasis on genetics susceptibility. *Int J Dent*. 2011;2011:647168.
- 18 Goodis HE, Rossall JC, Kahn AJ. Endodontic status in older US adults. Report of a survey. *JADA* 2001;132:1525–1530.
- 19 Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, Murray CJL, Marcenes W; GBD 2015 Oral Health Collaborators. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res*. 2017 Apr;96(4):380-387.
- 20 Atkinson HF. An investigation into the permeability of human enamel using osmotic methods. *Br Dent J*. 1947; Nov 21;83(10):205-14.
- 21 Haldi J, Winfrey WYNN, Culpepper WD. Dental pulp fluid—I: Relationship between dental pulp fluid and blood plasma in protein, glucose and inorganic element content. *Archives of Oral Biology*. 1961; Apr:3(3):201-206.
- 22 de Barros Pinto L, Lira MLLA, Cavalcanti YW, Dantas ELA, Vieira MLO, de Carvalho GG, de Sousa FB. Natural enamel caries, dentine reactions, dentinal fluid and biofilm. *Sci Rep*. 2019; Feb 26;9(1):2841.
- 23 Silva PF, de Holanda Ferreira DA, Meira KR, Forte FD, Chaves AM, de Sousa FB. Dentin reactions to caries are misinterpreted by histological "gold standards". *F1000Res*. 2014 Jan 16;3:13.
- 24 Marini M, Greggi SL, Passanezi E, Sant'ana A. Gingival recession: Prevalence, extension and severity in adults. *J Appl Oral Sci* 2004;12(3):250-5.
- 25 Larsen MJ, Bruun C: Caries chemistry and fluoride – mechanisms of action; in Thylstrup A, Fejerskov O (eds): *Textbook of Clinical Cariology*, ed 2. Copenhagen, Munksgaard, 1994, pp 231–257.
- 26 Fejerskov O, Clarkson BH: Dynamics of caries lesion formation; in Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA (eds): *Fluoride in Dentistry*, ed 2. Copenhagen, Munksgaard, 1996, pp 187–213.

- 27 Fejerskov O, Manji F: Risk assessment in dental caries; in Bader JD (ed): Risk Assessment in Dentistry. Chapel Hill, University of North Carolina Dental Ecology, 1990, pp 215–217.
- 28 Fejerskov O: Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25: 5–12.
- 29 Holmen L, Thylstrup A, Årtun J: Surface changes during the arrest of active enamel caries lesions in vivo. A scanning electron microscope study. *Acta Odontol Scand* 1987;45:383–390.
- 30 Nyvad B, Fejerskov O: Active root surface caries converted into inactive caries as a response to oral hygiene. *Scand J Dent Res* 1986;94:281–284.
- 31 Carvalho TS, Lussi A. Assessment of Root Caries Lesion Activity and Its Histopathological Features. *Monogr Oral Sci.* 2017;26:63-69.
- 32 Thaler A, Ebert J, Petschelt A, Pelka M: Influence of tooth age and root section on root dentine dye penetration. *Int Endod J* 2008; 41: 1115–1122.
- 33 Ørstavik D, Haapasalo M (1990) Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endodontics & dental traumatology* 6, 142–9.
- 34 Thylstrup A, Fejerskov, O. Pathology of Dental Caries. In: Textbook of Cariology, A. Thylstrup and O. Fejerskov, Eds., Copenhagen. Munksgaard. 1986; 204-234.
- 35 Kidd EA, Fejerskov O: What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004; 83:C35–C38.
- 36 Marsh PD, Martin MV. Oral Microbiology. 5th edition. United Kingdom: Churchill Livingstone; 2009.
- 37 Lamont RJ, Burne RA, Lantz MS, Leblanc DJ. Oral Microbiology and Immunology. USA: American Society for Microbiology Press; 2006.
- 38 Fejerskov, O. "Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care." *Caries research.* 2004;38(3):182-191.
- 39 Queiroz VS et al. "Influence of the Culture Medium in Dose-Response Effect of the Chlorhexidine on Streptococcus mutans Biofilms." *Scientifica* 2016 (2016).
- 40 ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to Candida biofilm formation. *J Dent Res.* 2009; 88(2):105-15.
- 41 Bowen WH, Koo H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011; 45(1):69–86.

- 42 Zijngje V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One* 2010; 5(2):e9321.
- 43 Leme, AFP, et al. "The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight." *Journal of dental research*. 2006;85(10):878-887. 42
- 44 Röllä G, Scheie AA, Ciardi JE: Role of sucrose in plaque formation. *Scand J Dent Res* 1985; 93: 105–111.
- 45 Cury, JA, et al. "Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose." *Caries research*. 2000;34(6):491-497.
- 46 Dibdin GH & Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res*. 1988. 67, 890 –895.
- 47 Campos, SAG, Vieira MLO, Sousa FB. "Correlation between ICDAS and histology: Differences between stereomicroscopy and microradiography with contrast solution as histological techniques." *PloS one*. 2017;12(8):e0183432.
- 48 Ayres MCC, et al. "Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*." *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(1):90-7.
- 49 Dubois M, et al. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical chemistry*. 1956;28(3):350-356.
- 50 Ccahuana-Vásquez, Renzo Alberto, and Jaime Aparecido Cury. "S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization." *Brazilian oral research*. 2010;24(2):135-141.
- 51 Meira KRS, de Mattos Brito CS & de Sousa FB. Predicting infiltration of the surface layer of natural enamel caries. *Arch. OralBiol*. 60(6), 883–893 (2015).
- 52 Field A. *Discovering Statistics Using SPSS*. London, SAGE; 2009.
- 53 Cohen J. *Statistical power analysis for behavioral sciences*, 2^a ed. Nova lorque: Lawrence Erlbaum; 1988.
- 54 Dunitz M. *Tooth wear and sensitivity: clinical advances in restorative dentistry*. 1st edition. United Kingdom: The Livery House; 2000.
- 55 Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *NIH Public Access*. 2012; 3: 711-735.
- 56 Owens PDA. The root surface In human teeth: a microradiographic study. *J. Anat*. 1976; 122 (2): 389-401.

- 57 Gomez J, Tellez M, Pretty IA, Ellwood RP, Ismail AI. Non-cavitated carious lesions detection methods: A systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013;41(1):55–66.
- 58 Rodrigues JA, Hug I, Diniz MB, Lussi A. Performance of fluorescence methods, radiographic examination and ICDAS II on occlusal surfaces in vitro. *Caries Res.* 2008;42(4):297–304.
- 59 Bjorndal, L. & Thylstrup, A. A structural analysis of approximal enamel caries lesions and subjacent dentin reactions. *Eur. J. Oral Sci.* 103(1), 25–31 (1995).
- 60 Ekstrand, K. R., Kuzmina, I., Bjorndal, L. & Thylstrup, A. Relationship between external and histologic features of progressive stages of caries in the occlusal fossa. *Caries Res.* 29(4), 243–250 (1995).
- 61 Mitropoulos P, Rahiotis C, Kakaboura A, Vougiouklakis G. The impact of magnification on occlusal caries diagnosis with implementation of the ICDAS II criteria. *Caries Res.* 2012. 46(1), 82–86.
- 62 Gottlieb B, Diamond M, Applebaum E: The caries problem. *Am J Orthod Dent Surg.* 1946;32:365–379.
- 63 Neves AA. et al. Micro-CT based quantitative evaluation of caries excavation. *Dental materials,* 2010; 26(6):579-588.
- 64 Neves AA. et al. Caries-removal effectiveness and minimal-invasiveness potential of caries-excitation techniques: a micro-CT investigation. *Journal of dentistry,* 2011; 39(2): 154-162.
- 65 Soviero V M. et al. Validity of MicroCT for in vitro detection of proximal carious lesions in primary molars. *Journal of dentistry.* 2012; 40(1): 35-40.
- 66 Rahimi S. et al. A review of antibacterial agents in endodontic treatment. *Iran. Endod. J.* 2014. 9(3), 161–168.
- 67 Gjorgievska ES. et al. Component release and mechanical properties of endodontic sealers following incorporation of antimicrobial agents. *BioMed Res.* 2017. Int., <https://doi.org/10.1155/2017/2129807>.
- 68 Strydonck DAC, et al. "Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review." *Journal of clinical periodontology.* 2012;39(11):1042-1055.
- 69 Gjermo P. Chlorhexidine in dental practice. *J Clin Periodontol* 1974;1:143-52.
- 70 Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodont Res* 1973;8:61-7.

ANEXO A

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DO MATERIAL ENDODÔNTICO NA CARIOGENICIDADE DO BIOFILME FORMADO IN VITRO SOBRE LESÕES INICIAIS DE CARIE RADICULAR NATURAL

Pesquisador: HUGO VICTOR DANTAS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09393519.1.0000.5188

Instituição Proponente: Centro de Ciência da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.218.958

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba como requisito da Disciplina Seminários em Ciências Odontológicas, cujo autor pretende testar a hipótese de que a composição do material endodôntico afeta a cariogenicidade do biofilme formado sobre lesões cariosas radiculares naturais iniciais em dentes tratados endodônticamente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Testar a hipótese de que a composição do material endodôntico afeta a cariogenicidade do biofilme formado sobre lesões cariosas radiculares naturais iniciais.

Objetivo Secundário:

Estudo 1: (I) quantificar os polissacarídeos extracelulares solúveis do biofilme de *S. mutans* (dados contínuos potencialmente normais); (II) quantificar os polissacarídeos extracelulares insolúveis do biofilme *S. mutans* (dados contínuos potencialmente normais); Estudo 2: (I) quantificar a concentração de fluoreto na fase sólida do biofilme (dados contínuos potencialmente normais); (II) quantificar a concentração de fluoreto na fase líquida do biofilme (dados contínuos potencialmente normais).

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

Edição 01 de 03

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Sr.(a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada: EFEITO DO MATERIAL ENDODÔNTICO NA CARIOGENICIDADE DO BIOFILME FORMADO *IN VITRO* SOBRE LESÕES INICIAIS DE CÁRIE RADICULAR NATURAL, desenvolvida por HUGO VICTOR DANTAS, aluno regularmente matriculado no PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do professor Dr^o. Frederico Barbosa de Sousa e Co-orientador Prof. Dr^o. Diego Figueiredo Nóbrega .

O objetivo geral da pesquisa é: testar a hipótese de que a composição do material endodôntico afeta a cariogenicidade do biofilme formado sobre lesões cariosas radiculares naturais iniciais. Como objetivo específico: quantificar os polissacarídeos extracelulares solúveis do biofilme de *S.*, quantificar os polissacarídeos extracelulares insolúveis do biofilme *S. mutans*, quantificar a concentração de fluoreto na fase sólida do biofilme e quantificar a concentração de fluoreto na fase líquida do biofilme.

Justifica-se o presente estudo por se tratar da existência de um transporte facilitado entre a câmara pulpar e a lesão cariosa radicular podendo ser explorada pelo clínico para atuar de maneira não invasiva em uma lesão cariosa radicular inicial de um dente tratado endodonticamente. A literatura sobre o tema é escassa e pouco divulgada, fato que despertou real interesse em estudá-lo e divulgá-lo.

A participação do(a) sr.(a) na presente pesquisa é de fundamental importância, mas será voluntária, não lhe cabendo qualquer obrigação de fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelos pesquisadores se não concordar com isso, bem como, participando ou não, nenhum valor lhe será cobrado, como também não lhe será devido qualquer valor.

Caso decida não participar do estudo ou resolver a qualquer momento dele desistir, nenhum prejuízo lhe será atribuído, sendo importante o esclarecimento de que os riscos da sua participação são considerados mínimos, limitados à possibilidade de eventual desconforto psicológico ao responder o questionário que lhe será apresentado, enquanto que, em contrapartida, os benefícios obtidos

com este trabalho serão importantíssimos e traduzidos em esclarecimentos para a população estudada.

Em todas as etapas da pesquisa serão fielmente obedecidos os Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos, conforme Resolução nº. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que disciplina as pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil.

Solicita-se, ainda, a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos científicos ou divulgá-los em revistas científicas, assegurando-se que o seu nome será mantido no mais absoluto sigilo por ocasião da publicação dos resultados.

Caso a participação de vossa senhoria implique em algum tipo de despesas, as mesmas serão ressarcidas pelo pesquisador responsável, o mesmo ocorrendo caso ocorra algum dano.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Eu, _____, declaro que fui devidamente esclarecido (a) quanto aos objetivos, justificativa, riscos e benefícios da pesquisa, e dou o meu consentimento para dela participar e para a publicação dos resultados, assim como o uso de minha imagem nos slides destinados à apresentação do trabalho final. Estou ciente de que receberei uma cópia deste documento, assinada por mim e pelo pesquisador responsável, como trata-se de um documento em duas páginas, a primeira deverá ser rubricada tanto pelo pesquisador responsável quanto por mim.

João Pessoa-PB, ____ de _____ de 2019.

Hugo Victor Dantas
Pesquisador responsável

Participante da Pesquisa

Pesquisador Responsável: Hugo Victor Dantas
Endereço do Pesquisador Responsável: Rua Douro Ephigênio Barbosa da Silva, 450 – Bairro Jardim Cidade Universitária – João Pessoa-PB - CEP: 58.052-310 - Fones: 99993 – 3705 - E-mail: hugodantas92@gmail.com
E-mail do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba: eticaccs@ccs.ufpb.br – fone: (83) 3216-7791 – Fax: (83) 3216-7791
Endereço: Cidade Universitária – Campus I – Conj. Castelo Branco – CCS/UFPB – João Pessoa-PB - CEP 58.051-900

OBSERVAÇÃO: No caso do pesquisado ser analfabeto, deverá ser colocado o quadrículo para colocação da impressão datiloscópica, assim como deverá ser inserido o espaço para colocação da assinatura de uma testemunha.

Hugo Victor Dantas
Pesquisador responsável

Testemunha

