

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**Contaminação de Lesões Não Cavitadas:  
Estudo em Microscopia Eletrônica de  
Varredura**

*Clarissa Cavalcanti Fatturi*

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos obrigatórios para obtenção do título de  
Mestre em Clínica Odontológica - Cariologia

*Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marisa Maltz*

Porto Alegre, agosto de 2001.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

F254a

Fatturi, Clarissa Cavalcanti

Contaminação de lesões não cavitadas: estudo em microscopia eletrônica e varredura / Clarissa Cavalcanti Fatturi ; Orientação de Marisa Maltz. – Porto Alegre, 2001.

xx f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Curso de Mestrado em Odontologia - Clínica Odontológica (Cariologia).

1. Cárie dentária 2. Microscopia 3. Microbiologia I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia II. Título

CDU 616.314-002

Bibliotecária: Eloisa Futuro Pfitscher

CRB 10/598

*Jesus, em quem todos os  
tesouros da sabedoria e do  
conhecimento estão ocultos.*

*Cl 2:3*

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elias e Raquel, pelo exemplo e incentivo em todas as etapas da minha vida.

Às minhas irmãs, Leticia e Camila, e aos meus cunhados, Timóteo e Fabrício, por fazerem parte da minha família e me enriquecerem.

Ao meu amor e, em breve, esposo, Édino Parolo pelo carinho e incentivo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Maltz pela competência demonstrada não só na orientação do trabalho, mas também no aprimoramento da minha formação profissional.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Faculdade de Odontologia pela acolhida na Graduação e Pós-Graduação com ensino ainda público e qualificado.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo incentivo à pesquisa e ao auxílio em todas as fases de elaboração do trabalho.

Às funcionárias do CME Francis F. Darsie, Miriam S. dos Santos, Christiane Q. Lopes e Moema Queiroz pela dedicação e competência.

Ao Corpo Docente do Curso de Pós Graduação em Odontologia pelo ensino.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Susana M. W. Samuel pela orientação na Iniciação Científica durante a Graduação.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Maria Antonieta Lopes de Souza pela colaboração na orientação do trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elaine Fachin pelo auxílio prestado nas fotografias.

À amiga Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Vânia C. Fontanella pelo desprendimento demonstrado ao compartilhar seus conhecimentos e pela disposição em ajudar-me

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Anna Cristina Medeiros Fossati pelo incentivo e auxílio na análise das amostras no Laboratório de Histologia.

Às professoras e amigas do Departamento de Odontologia Preventiva e Social Sandra Henz, Berenice Barbachan pela revisão crítica do artigo.

Aos professores Aluí Barbisan e Tânia Drehmer pela amizade e ensino.

Aos mestres Elenara Oliveira e Alexandre Volkweis pelo apoio e disposição em ajudar.

Aos colegas de mestrado que se fizeram presentes não só nos momentos alegres mas também nos difíceis.

À colega e amiga Lisiane C. C. de Barros pelo companheirismo e ajuda no decorrer do curso.

Aos colegas, Lisiane H., Antônio, Daniela, Diego, Rô, Carla, Alice, Patty, Cris, Tati, Clélea, Alexandre e Fernando, que com sua amizade tornaram o mestrado mais alegre.

À colega e também amiga Vanessa C e S Schmitt pela colaboração na análise crítica do trabalho.

Aos Bolsistas de Iniciação Científica Rafael Bianchi, Caren Bavaresco, Israel Camatti e Gustavo Carminatti que foram de grande auxílio nesta fase.

Ao monitor da Disciplina de Odontologia Preventiva Felipe Lazzarotto pela colaboração e auxílio.

Ao estatístico Sérgio Kato pelo auxílio na análise dos dados.

Aos funcionários do Laboratório de Informática Luiz, Fernanda e Alexandre que, além do uso dos computadores, me proporcionaram dicas de informática.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Preventiva pela colaboração e amizade.

## **SUMÁRIO**

**LISTA DE FIGURAS / VIII**

**LISTA DE ANEXO / X**

**CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO / 11**

**CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA / 13**

2.1 Processo de formação de lesão / 13

2.1.1 Zonas da Lesão cariiosa não cavitada / 14

2.1.1.1 Zona translúcida / 14

2.1.1.2 Zona escura / 15

2.1.1.3 Corpo da lesão / 16

2.1.1.4 Camada superficial / 16

2.1.2 Teor protéico das lesões não cavitadas / 18

2.2 Aspecto clínicos e histopatológicos das lesões não cavitadas / 19

2.2.1 Lesões não cavitadas ativas / 19

2.2.2 Lesões não cavitadas inativas / 22

2.3 Penetração bacteriana / 25

2.4 Adesão bacteriana / 29

**CAPÍTULO 3 - CONCLUSÕES DA REVISÃO DA LITERATURA / 34**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS / 35**

**ARTIGO / 40**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** Bloco de esmalte desmineralizado através de modelo *in situ*. / 50

**Figura 2** Número de bactérias encontradas em lesões ativas formadas *in situ* em blocos de esmalte usados por dois indivíduos (A e B) / 50.

**Figura 3A** Visão geral do esmalte em lesão ativa (Bloco da Figura 1). Marcação da região em que foram encontradas as bactérias da Figura 3B / 51.

**Figura 3B** Bactérias na área demarcada da Figura 3A. Pode-se notar a presença de bactérias de diferentes tamanhos. Distância m relação à superfície do de 0,102 mm / 51.

**Figura 4A** Microrganismos no esmalte próximo a superfície da lesão ativa. Seta demonstra canal da superfície para o interior do esmalte com presença bacteriana / 52

**Figura 4B** Maior aumento de Figura 4A. Setas indicam lacunas no esmalte onde foram encontrados bacilos / 52

**Figura 5A** Colônia de bactérias próximo à superfície. Canais de desmineralização levando até o interior do esmalte / 53

**Figura 5B** Maior aumento da Figura 5A. Presença de fios entre as bactérias e o dente / 53

**Figura 6** Cocos unidos uns aos os outros e ao dente através de fimbrias e fios de adesão / 53

**Figura 7A** Dente com lesão inativa pigmentada / 54

**Figura 7B** Cocos indicados pela seta em dentina intertubular / 54



**Figura 7C** Cocos formando colônia. Maior aumento da Figura 7B / 54

**Figura 8A** Dente com lesão inativa / 55

**Figura 8B** Colônia de cocos (c) e levedura (L) no esmalte em lesão inativa da Figura 8A / 55

**Figura 9** Número de microrganismos encontradas em quatorze lesões inativas formadas *in vivo* / 56

**Figura 10** Microrganismos de forma espiralada e filamentosa em esmalte de lesão inativa / 56

**Figura 11** Cocos no interior do túbulo dentinário em lesão inativa / 57

**Figura 12** Média e desvio padrão do número de microrganismos por  $\text{mm}^2$  nas lesões ativas e inativas / 57

## LISTA DE ANEXO

**Anexo 1** Termo de consentimento informado / 66

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O entendimento do processo de formação e paralisação da lesão cariiosa é fundamental para um adequado diagnóstico e tratamento da doença cárie. As modificações teciduais são primeiramente detectadas em nível ultra-estrutural para, após, serem percebidas macroscopicamente. As primeiras manifestações clínicas das lesões cariosas são a perda da translucidez do esmalte e a presença de uma superfície esbranquiçada, rugosa e sem brilho. A modificação de fatores locais pode levar à paralisação do processo cariioso. Essa inativação da doença tem como consequência a modificação do aspecto da lesão que passa a ser brilhoso, liso, podendo permanecer esbranquiçado ou pigmentar (NYVAD e FEJERSCOV, 1997). Em alguns casos há o desaparecimento clínico da lesão (BACKER DIRKS, 1966).

A lesão não cavitada ocorre pelo processo metabólico da placa dentária na superfície do dente. A perda mineral inicial é subsuperficial com a manutenção de uma camada externa porosa. As microcavidades resultantes da desmineralização são colonizadas por bactérias. O momento em que ocorre a invasão bacteriana tem sido foco de atenção de clínicos e pesquisadores devido à importância da definição da oportunidade do tratamento restaurador. As lesões não cavitadas são geralmente ditas como não contaminadas (SILVERSTONE e MJÖR, 1993; WOLINSKY, 1994) e o

seu tratamento está vinculado, na maioria das vezes, a intervenções não invasivas, enquanto o tratamento restaurador está relacionado à presença de bactérias no interior dos tecidos (WOLINSKY, 1994). O início da presença bacteriana no tecido dentário tem sido discutido. Alguns estudos demonstram a presença de bactérias sob lesões não cavitadas contradizendo a afirmação anterior (BRÄNNSTRÖM *et al.*,1980; SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN, 1985; LUOMA, LUOMA e PELTTARI, 1984). As lesões com característica de atividade apresentaram bactérias no esmalte (LUOMA, LUOMA e PELTTARI, 1984) e até mesmo na dentina (BRÄNNSTRÖM *et al.*,1980 ). A consequência dessa infecção na continuação do processo carioso é alvo de discussão. FRISBIE e NUCKOLLS (1947) encontraram contaminação de microrganismos em lesões não cavitadas inativas. Esse achado não foi confirmado por BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) que raramente observaram bactérias em lesões inativas. O conhecimento do início da infecção do tecido dentário e a sua consequência no desenvolvimento do processo carioso são indispensáveis para o controle desta doença.

## **CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Processo de formação de lesão**

Os tecidos dentários apresentam uma íntima relação com o meio bucal no qual estão inseridos. Os dentes estão sujeitos continuamente a trocas fisiológicas de íons com a saliva e o biofilme dental. Essa relação, quando na ausência de doença, apresenta-se equilibrada. Os minerais que saem do dente e os que retornam ocorrem na mesma proporção. Os sinais clínicos de lesão de cárie só estarão presentes quando houver o predomínio da desmineralização dentária em relação à remineralização pela diminuição do pH. Os prótons responsáveis por esse desequilíbrio iônico são consequência direta do metabolismo bacteriano. As bactérias, presentes no biofilme dental, metabolizam o substrato liberando ácidos. Como consequência, haverá no esmalte a formação de uma lesão. A lesão em sua fase inicial é dita como não cavitada pois há a manutenção da camada superficial. Com a progressão do processo, a camada mais externa do esmalte é perdida estabelecendo-se a lesão cavitada. A lesão não cavitada, ao ser analisada no microscópio óptico de luz polarizada, revelará uma estrutura bastante peculiar. Em análises histológicas a alteração tecidual pode ser evidenciada com a formação de 4 zonas de lesão: a zona translúcida, a zona

escura, o corpo da lesão e a camada superficial (SILVERSTONE, 1973). Cada uma dessas zonas apresenta características distintas em relação ao volume de poros, tamanho dos cristais de hidroxiapatita, concentração de prótons e presença protéica.

### **2.1.1 Zonas da lesão cariiosa não cavitada**

#### **2.1.1.1 Zona translúcida**

Na análise em luz polarizada, essa zona corresponde à primeira alteração histológica observada no esmalte dentário de lesões iniciais situada logo abaixo da camada superficial (DARLING, 1958; SILVERSTONE, 1973). Com a progressão da lesão, a zona translúcida passa a ser a região mais interna da lesão situando-se entre o esmalte hígido e a zona escura (SILVERSTONE, 1973). Primeiramente ela era considerada como uma zona de maior conteúdo mineral em relação ao esmalte hígido a exemplo do que ocorre na zona translúcida das lesões dentinárias (DARLING, 1958). GUSTAFSON (1957) observou que a zona translúcida apresentava uma maior birrefringência negativa em relação ao esmalte hígido quando se usava quinolina ou bálsamo do Canadá como meio de imersão para análise em luz polarizada. CRABB e MORTIMER (1967) utilizando uma técnica de microdensitometria bidimensional não confirmaram tal hipótese pois a desmineralização abrangia a região da zona translúcida. Os poros presentes nessa região são de aproximadamente 1% de seu volume, ou seja, uma porosidade maior daquela encontrada no esmalte normal que é de 0,1% (DARLING, 1958). O efeito óptico criado na análise da luz polarizada pode ser explicado, uma vez que o esmalte

hígido circundante à zona translúcida não é penetrado pela quinolina e permanece preenchido por ar que apresenta um índice de refração de 1,0, ou seja, menor que o da quinolina que é de 1,62. Os poros presentes nessa região apresentam tamanhos variados (SILVERSTONE, 1973) e, por isso, há a diferença na permeabilidade aos diferentes meios de imersão. Nem sempre a zona translúcida é encontrada no estudo das lesões de cárie. A espessura dessa região varia entre 5 a 100  $\mu\text{m}$  com média de 40  $\mu\text{m}$  (SILVERSTONE, 1968).

#### **2.1.1.2 Zona escura**

A zona seguinte, em direção à superfície do esmalte, é a zona escura que recebeu esse nome devido a sua coloração marrom escura na análise em microscopia de luz transmitida em meio, com índice de refração similar ao do esmalte. Sua característica de birrefringência positiva é consequência do tamanho dos cristais e da porosidade da região. O volume de poros é maior do que os da zona translúcida, ficando em torno de 2 a 4% (SILVERSTONE, 1968). O comportamento da zona escura, em meio aquoso, é considerado como de corpo misto devido a seus poros grandes e pequenos (DARLING, 1958). O tamanho dos cristais de hidroxiapatita nessa zona podem variar entre 50 a 100 nm de largura, isto é, maiores do que os cristais da zona anterior que possuem uma largura de aproximadamente 30 nm. A zona escura é mais prevalente que a zona translúcida, estando presente em 85% a 90% das lesões. O seu tamanho é bastante variável e apresenta uma estreita relação com o processo de remineralização. As lesões de cárie paralisadas geralmente

apresentam zonas escuras mais amplas (CRABB, 1966). Essa zona é o reflexo das fases alternadas de desmineralização e remineralização (SILVERSTONE, 1973).

### **2.1.1.3 Corpo da lesão**

O corpo da lesão, por sua vez, é a região de maior desmineralização e também a mais larga. Essa zona da lesão encontra-se localizada entre a camada superficial e a zona escura (SILVERSTONE, 1973). O volume de poros pode variar de 5 a 25% da periferia para o centro da lesão (DARLING, 1958). Em meio de imersão aquoso, o corpo da lesão mostra uma região de birrefringência positiva que o difere das demais zonas da lesão (SILVERSTONE, 1973). Nessas zonas os cristais de hidroxiapatita podem ter larguras de 10 a 30 nm. Há nessa região uma maior desmineralização pela facilidade de acesso a prótons em relação às zonas anteriores mais internas. A análise das lesões em microscópio de luz polarizada evidencia áreas bem mineralizadas passando através do corpo da lesão (CRABB, 1966) que podem representar a redeposição mineral em áreas com mudança do desafio cariogênico (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995). A lesão inicial de cárie é dita como subsuperficial pois há a manutenção da camada externa mais mineralizada do que o corpo da lesão (SILVERSTONE, 1968).

### **2.1.1.4 Camada superficial**

A camada superficial é uma camada de espessura aproximada de 30  $\mu\text{m}$  e que apresenta um volume de poros menores do que 5% (SILVERSTONE, 1968). Na



análise em microscopia de luz polarizada essa zona apresenta birrefringência negativa, enquanto a superfície possui birrefringência positiva (SILVERSTONE, 1973). Vários estudos foram realizados na tentativa de se explicar a manutenção dessa camada com a continuação da desmineralização nas camadas inferiores. Primeiramente, acreditava-se que sua permanência estava relacionada a alguma característica especial do esmalte externo que lhe conferisse maior resistência. Essa idéia foi sustentada pelo fato de se encontrar nela uma concentração menor de íons magnésio e do composto carbonato em relação à porção mais interna do esmalte (ROBINSON, WEATHERELL e HALLSWORTH, 1981). Soma-se a isso, uma maior concentração de elementos menos solúveis como o flúor, zinco e chumbo que estão dispostos em gradiente de concentração decrescente da porção externa do esmalte para o interior (BRUDEVOLD, 1960). VON DER FEHR (1967) ao analisar lesões de cárie *in vitro* realizadas após abrasão do esmalte constatou que o desenvolvimento da lesão continuava sendo subsuperficial com uma menor espessura de camada superficial em relação ao esmalte não abrasionado. AOBA *et al.* (1981) através de estudo com difração de raios X constataram que a presença dessa camada superficial se deve à redeposição de íons, tanto do meio externo quanto do corpo da lesão, o que vem a corroborar com estudos realizados por outros autores com mesmos resultados (SILVERSTONE, 1973). Pode-se observar o fenômeno de remineralização pela adição de cálcio e fosfato precipitando nessa superfície. A camada superficial, apesar de ser mantida, não pode ser considerada intacta uma vez que sofre os efeitos tanto da desmineralização quanto da remineralização e participa do processo de cárie tanto quanto as outras regiões descritas. Os cristais de

hidroxiapatita na camada superficial apresentam um diâmetro médio de 50 a 80 nm o que demonstra claramente o processo de remineralização que ocorre nessa camada.

### **2.1.2 Teor protéico das lesões não cavitadas**

Além da alteração da mineralização nas diferentes zonas da lesão, pode-se observar uma modificação no teor protéico do esmalte dentário. As proteínas e o conteúdo aquoso do esmalte representam apenas 4% do volume do esmalte dentário hígido. No entanto, TERANAKA, KOULOURIDES e BUTLER (1986) observaram um aumento contínuo de material orgânico no interior das lesões de cárie em função do tempo. A função da proteína na superfície externa e no interior da lesão ainda não foi totalmente elucidada. ROBINSON, HALLSWORTH e KIRKHAM (1990) avaliaram o efeito da desproteinização, com solução de hipoclorito de sódio, na penetração de cálcio em lesões não cavitadas. Noventa por cento das lesões estudadas apresentaram um aumento na quantidade total de cálcio presente após a desproteinização e imersão em solução contendo cálcio em relação a mesma lesão controle que não teve acesso à substância desproteinizante. A profundidade de penetração do cálcio foi maior na superfície tratada em relação ao controle. O teor do elemento cálcio no corpo da lesão também aumentou. Esses resultados têm mostrado que as proteínas parecem restringir a entrada de íons no interior da lesão e, com isso, inibir o crescimento do cristal.

A presença protéica não está restrita à superfície. ROBINSON *et al.*(1998) avaliaram a distribuição da albumina em lesões de cárie e em superfícies híginas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada à técnica imuno-

histoquímica e transferência de proteína. Nas lesões não cavitadas, a albumina foi encontrada, na maioria das vezes, distante da superfície externa do esmalte. Algumas das esferas, que indicavam a presença da proteína, foram encontradas formando aglomerados no interior do tecido. SHORE *et al* (2000) avaliaram a distribuição de duas proteínas exógenas em lesões de cárie iniciais. As proteínas albumina e amilase salivar foram encontradas em regiões de lesão com porosidade de 10 a 20% de desmineralização, correspondendo a área de transição entre a zona escura e o corpo da lesão.

## **2.2 Aspecto clínicos e histopatológicos das lesões não cavitadas**

As alterações histopatológicas das lesões cáries não cavitadas são vistas, na clínica, como uma modificação do aspecto translúcido do esmalte que se torna opaco e rugoso. BJØRNDAL e THYLSTRUP (1995) ao analisarem a progressão de lesões de cárie não cavitadas encontraram correlação ( $r=0,876$ ) entre as modificações histológicas e as alterações clinicamente visíveis. Quanto mais avançada era a lesão em nível histológico, mais nítida era a lesão em esmalte. As lesões não cavitadas podem paralisar devido a mudanças no meio ambiente local, sendo denominadas então de lesões não cavitadas inativas.

### **2.2.1 Lesões não cavitadas ativas**

As lesões ativas apresentam superfície de coloração esbranquiçada, sem brilho e rugosa. Essas lesões são de rápida progressão e sua presença denota uma

atividade atual de doença cárie. A perda da translucidez do esmalte é uma consequência da porosidade interna do tecido e da rugosidade superficial alterando a refração da luz na superfície do esmalte (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995). Dessa forma, a lesão de mancha branca visível clinicamente ocorre como um resultado do aumento da porosidade interna do tecido e também da desmineralização superficial. A sensação tátil de rugosidade pode ser percebida nas lesões ativas quando comparadas ao tecido sadio.

As lesões ativas iniciais podem ser estudadas através de modelo *in vivo* e *in situ*. Estudo realizado em humanos por VON DER FEHR, LÖE e THEILADE (1970) demonstra claramente a formação de lesões ativas de cárie em população de indivíduos submetidos a intenso desafio cariogênico. A formação de lesões ativas ocorreu durante um período de vinte e um dias com suspensão da higiene oral e bochecho de sacarose nove vezes ao dia. O aspecto clínico das lesões era de opacidade, rugosidade e embranquecimento. Devido a razões éticas, esses estudos não podem ser repetidos. HOLMEN *et al.* (1985) avaliaram as modificações consecutivas da superfície externa da lesão cariiosa não cavitada formada em modelo *in vivo* por um período de 1, 2, 3 e 4 semanas. Três pacientes, que possuíam pré-molares com indicação de extração, fizeram parte do estudo. Os pré molares foram bandados deixando-se um espaço na face vestibular para o acúmulo de placa durante o período experimental. Após uma semana, pode-se notar, ao microscópio eletrônico de varredura, a dissolução da camada externa do esmalte e acentuação de características anatômicas como orifícios dos processos de Tomes e as periquemácias. Com a evolução do processo cariioso, o alargamento dos espaços cristalinos e a dissolução do próprio cristal de hidroxiapatita tornaram-se cada vez

mais evidentes. Após três semanas, a desmineralização da camada externa da lesão era mais nítida mesmo em menores ampliações. Os orifícios dos processos de Tomes encontravam-se mais comprometidos. Usando metodologia semelhante, MELROSE, APPENTON e LOVIOUS (1996) estudaram o aspecto morfológico das lesões não cavitadas formadas durante 4 semanas. Vinte e dois pré-molares foram submetidos ao desafio cariogênico *in situ* durante quatro semanas. Após o período experimental, os dentes foram extraídos e analisados em MEV. A superfície da lesão apresentou uma acentuação das periquemácias e a presença de vários orifícios focais. Esses orifícios apresentavam diâmetro entre 10-20  $\mu\text{m}$  sendo mais largos na superfície do que na porção interna. As paredes dos orifícios focais apresentavam-se bastante irregulares.

A presença de poros e depressões também foi verificada por outros autores ao estudarem a superfície de lesões incipientes (BRÄNNSTRÖM, FRISKOPP e WICTORIN, 1977; BRÄNNSTRÖM *et al.*, 1980; FRISBIE e NUCKOLLS, 1947). BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) observaram poros na superfície das lesões não cavitadas com profundidade de 10 a 20  $\mu\text{m}$ . LUSTMAN *et al.* (1974) analisaram o padrão de desmineralização em cinco dentes humanos extraídos que apresentavam lesões brancas e opacas. Um degrau entre o tecido hígido e o cariado podia ser observado em alguns dentes. O esmalte apresentava-se desmineralizado com a dissolução mais proeminente do centro do prisma em relação à região interprismática, dando à superfície o aspecto de favos de mel.

PALAMARA *et al.* (1992) observaram sinais de dissolução ácida em dentes extraídos que apresentavam lesões não cavitadas. Em microscopia eletrônica de transmissão (MET) a perda mineral foi percebida através de espaços alargados entre

os cristais de hidroxiapatita. Canais criados pela desmineralização podem formar-se entre os prismas com 40 nm de largura e 1µm de profundidade. BRÄNNSTRÖM *et al.*(1980) acreditam que a região entre os prismas apresenta uma menor resistência ao ácido produzido pelas bactérias, podendo ser um canal propício à entrada bacteriana.

### **2.2.2 Lesões não cavitadas inativas**

Devido à mudança nas condições bucais, pode-se ter a paralisação do processo e a inativação das lesões. As lesões não cavitadas inativas podem ter coloração branca ou pigmentada. A opacidade da superfície é substituída por brilho e a textura passa de rugosa à lisa. A presença de pigmentos exógenos ou material orgânico corante é o que difere as lesões escuras das lesões brancas. Ultra-estruturalmente não há diferença entre as lesões de cores diferentes quando analisadas no microscópio eletrônico de varredura (HAIKEL, FRANK e VOEGEL, 1983). Dependendo do grau de perda mineral conseqüente da lesão, pode-se observar até mesmo o desaparecimento clínico de lesões incipientes após processo de inativação.

BACKER DIRKS (1966) estudou por sete anos a incidência de lesões cariosas em uma população de noventa indivíduos. Nesse trabalho, mais da metade das lesões não cavitadas presentes no início do estudo haviam desaparecido clinicamente após o período de acompanhamento (37 / 72). A modificação clínica da lesão ocorreu pela alteração dos fatores etiológicos locais. VON DER FEHR, LÖE e THEILADE (1970) realizou um estudo com formação de cárie em humanos que foram passíveis de controle sem intervenção invasiva através de higiene bucal, uso

de solução fluoretada e diminuição do substrato cariogênico. HOLMEN, THYLSTRUP e ÅRTUN (1987) estudaram a superfície de lesões não cavitadas inativas em MEV. Pré-molares foram bandados deixando-se um espaço livre na face vestibular para acumular placa e formar lesões não cavitadas. Após, os dentes permaneceram na boca por períodos variados de 1 a 3 semanas sem a banda para avaliar o efeito progressivo do retorno do controle de placa sobre as superfícies. Nos dentes controle, que foram extraídos logo após o período de formação de lesão, foram avaliadas cavidades clinicamente visíveis que quando analisadas em maior aumento encontravam-se preenchidas por depósitos microbianos. Após a remoção da placa bacteriana e da película adquirida, o fundo da cavidade clinicamente visível foi analisado e apresentava prismas parcialmente dissolvidos circundados por esmalte interprismático abrasionado. Os cristais na região prismática apresentavam-se menos compactados do que os da região interprismática. A análise da superfície da lesão mostrou-se desmineralizada com a presença de cristais pouco agregados. Conforme os dentes permaneciam por mais tempo na cavidade oral, era possível notar a presença de arranhões na superfície que iam sendo suavizados ao final das três semanas. Os cristais que antes estavam separados por espaços intercristalinos maiores foram tornando-se mais agregados pelo aplainamento contínuo da superfície à semelhança do que ocorreu com os riscos ocasionados pela remoção mecânica diária da placa.

SILVERSTONE e POOLE (1968) avaliaram o efeito da saliva e solução calcificante *in vitro* no aspecto histológico das lesões de esmalte. Vinte lesões foram analisadas, sendo dez produzidas *in vitro* e dez lesões de dentes extraídos. Pode-se observar um alargamento da zona escura em direção a área antes compreendida pelo

corpo da lesão quando as lesões foram analisadas em quinolina após quatro semanas de embebição nos fluidos. Em meio aquoso, a birrefringência foi alterada em algumas áreas que passaram de positivas para negativas. Essas modificações encontradas caracterizam o depósito mineral no interior da lesão cariiosa e conseqüente modificação do seu aspecto histológico. PALAMARA *et al.* (1992) confirmam o fato de haver remineralização de algumas regiões no interior da lesão cariiosa por terem encontrado novos cristais e núcleos de cristalização no interior da lesão de cárie analisada em MET. Cristais com formato de agulha com 8 nm de largura e 100 nm de comprimento foram encontrados distribuídos de forma desordenada ou concêntricas em relação a um núcleo de cristalização. Na periferia dos prismas cristais alargados com 50 a 110 nm de diâmetro e de bordos arredondados também caracterizam a remineralização de cristais no interior da lesão. Todavia, é bastante discutível a possibilidade de total remineralização do interior da lesão cariiosa. Para LARSEN e FEJERSCOV (1989) o acesso a íons como cálcio e fosfato estaria limitado a profundidades não superiores a 100  $\mu\text{m}$  *in vivo*. Como conseqüência, haveria nas lesões inativas, a permanência de áreas desmineralizadas representativa de uma cicatriz no tecido (NYVAD e FEJERSCOV, 1997).

Por outro lado, se a paralisação do processo não ocorrer, pode-se evoluir para o estágio de cavitação. Nessa fase, a contaminação bacteriana é sabida em função da perda da camada superficial. No entanto, alguns autores especulam a precocidade da infecção do tecido dentário em estágios tão precoces quanto o não cavitado.



### 2.3 Penetração bacteriana

A infecção do tecido dentário é objeto de pesquisa devido a sua importância no tratamento das lesões cariosas. A esse respeito, BLACK (1914) afirma: “Minha experiência mostra que, mesmo em casos de marcada desmineralização do esmalte, a cárie pode ser efetivamente controlada em qualquer caso desde que esta não se encontre contaminada”. A possibilidade de agir de forma não invasiva nas lesões livres de microrganismos é amplamente aceita. Nessa categoria enquadram-se as lesões não cavitadas que são consideradas como livre de microrganismos (SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN, 1985). Em livros-texto de dentística e microbiologia pode-se ver essa idéia reafirmada (MJÖR e SILVERSTONE, 1993; WOLINSKY, 1994). MJÖR e SILVERSTONE (1993) mencionando as lesões incipientes de cárie dentinária sob uma superfície de esmalte intacta afirmam: “...nesse estágio relativamente precoce da cárie da dentina, as bactérias em si não invadiram o tecido. Isto somente ocorre quando uma cavidade fica estabelecida no esmalte sobrejacente”. A observação clínica da possibilidade de inativação de lesões de cárie não cavitadas é geralmente explicada pelo fato destas não terem no seu interior a presença de bactérias. Entretanto, a contaminação de lesões ativas e inativas com superfície externa íntegra tem sido bastante discutida. Atualmente considera-se também a possibilidade de controle de lesões cavitadas sem tratamento invasivo (NYVAD e FEJERSCOV, 1997).

HURST, NUCKOLLS e FRISBIE (1953a, 1953b, 1954) realizaram uma seqüência de estudos *in vitro* com o objetivo de elucidar a penetração bacteriana em lesões não cavitadas realizadas *in vitro*. Experimentos foram feitos com molares de

hamsters não erupcionados e estéreis em diferentes condições de substrato, inócuo e ambiente. HURST, NUCKOLLS e FRISBIE (1953a) inocularam dentes de hamsters com culturas puras de microrganismos considerados cariogênicos (*Lactobacilos*, *Streptococos viridans* e *Actinomices*). Todas as bactérias estudadas foram capazes de penetrar o esmalte dentário em estágio bastante precoce. A presença bacteriana ocorreu em várias profundidades até mesmo próximo a junção amelo-dentinária (JAD). A fim de avaliar se esta era uma capacidade específica de alguns microrganismos, o experimento foi repetido substituindo-se as bactérias acidogênicas por bactérias não associadas à cavidade oral (HURST, NUCKOLLS e FRISBIE, 1953b). Das quinze bactérias avaliadas, apenas uma delas (*Corynebacterium diphtheriae*) foi capaz de penetrar o esmalte. Conclui-se que a habilidade de infecção dos microrganismos estaria associada a alguma característica metabólica específica das bactérias. Quando o meio de cultura foi enriquecido com dextrose a 2%, a penetração bacteriana apresentou-se extensa (HURST, NUCKOLLS e FRISBIE., 1954). O ambiente ácido presente no experimento parece ter favorecido a contaminação mais precoce do esmalte dentário. Em todos os estudos houve penetração bacteriana em dentina em graus variados. Todavia, os autores discutem a possibilidade das bactérias terem entrado pela câmara pulpar, pois o forame apical não havia sido selado.

LUOMA, LUOMA e PELTTARI (1984) analisaram a penetração bacteriana em lesões não cavitadas formadas em modelo animal. Ratos foram submetidos a diferentes dietas cariogênicas contendo ou não flúor. Microrganismos foram encontrados dentro das lesões nas quais a superfície não apresentava cavitação. No grupo tratado com flúor, as bactérias não apresentavam contornos definidos e um

precipitado amorfo pôde ser verificado. A presença de flúor como elemento cariostático parece ter influenciado na infecção tecidual. A localização das bactérias ocorria próximo à superfície (15 $\mu$ m) indo até a JAD. As colônias situavam-se preferencialmente entre os prismas. As bactérias no interior do tecido apresentavam-se, muitas vezes, dentro de lacunas evidenciando sua capacidade de destruição. Segundo os autores, haveria dois frentes de desmineralização, um externo, proveniente das bactérias da placa dental, e outro interno, oriundo das bactérias no interior do tecido.

Estudos em dentes humanos com lesões não cavitadas também têm demonstrado presença bacteriana. FRISBIE e NUCKOLLS (1947) estudando a histopatologia de lesões de coloração amarela a marrom, com superfície dura e sem quebra observaram que os primeiros microrganismos invasores eram cocos Gram-positivos. Na presença de infecção pronunciada, podia-se notar, partindo do centro de infecção, canais de contaminação por várias direções que deixavam ilhas de esmalte não contaminado circundado por canais com presença bacteriana formando anastomoses. A microbiota no interior da lesão tornou-se mais variável com a progressão do processo carioso e outros microrganismos como os de forma filamentosa foram encontrados em grande número. Esses autores acreditam que as lesões chamadas de restritas ou inativas apresentariam uma progressão lenta com um aumento contínuo da área e da profundidade da lesão até envolver a dentina. Nesse tecido, onde o conteúdo orgânico é maior, a progressão seria rápida havendo um frente retrógrado de infecção da dentina em direção ao esmalte. Portanto, a manutenção da camada superficial mais dura não impediria a continuação do

processo a partir do centro de infecção até a dentina. Para esses autores, a presença de bactérias no interior do tecido levaria sempre à progressão da lesão.

SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN (1985) estudaram o aspecto microscópico de lesões não cavitadas em dentes humanos extraídos com superfície não rugosa e de coloração branca. Bactérias foram encontradas em apenas sete das vinte e três lesões estudadas. A morfologia bacteriana predominante era de cocos e bacilos que poderiam estar isolados ou formando colônias. Em duas amostras as bactérias foram encontradas na JAD. A contaminação da dentina foi evidenciada em um dente. Precipitado amorfo foi um achado comum nos dentes estudados. As bactérias encontradas poderiam situar-se em lacunas criadas por elas através da desmineralização da hidroxiapatita. Os autores não discutem a atividade da lesão, entretanto, pela descrição das características de superfície as lesões estudadas parecem ser inativas. BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) estudaram a infecção em lesões incipientes em esmalte através da técnica de MEV. A presença de bactérias nas lesões inativas era rara. Por outro lado, microrganismos foram encontrados com frequência na subsuperfície de lesões ativas. A área de desmineralização correspondia à área infectada. Os microrganismos encontrados no interior do tecido seguiam a orientação dos prismas do esmalte. As bactérias possuíam forma de cocos, bacilos e filamentos e situavam-se dentro ou próximos a lacunas. Um estroma orgânico semelhante à rede foi encontrado no esmalte provavelmente produzido pelas bactérias. A contaminação atingiu, em algumas amostras, a JAD e a dentina. Os canais para a invasão bacteriana parecem ser formados entre os prismas onde pode haver uma menor resistência ao ácido produzido pelas bactérias. Em poucos casos, a dentina, logo abaixo da JAD, apresentava-se bastante desmineralizada com a porção

peritubular completamente removida e algumas bactérias na luz do túbulo. Os autores acreditam que essas bactérias na JAD teriam a capacidade de se espalhar lateralmente, realizar uma infecção retrógrada do esmalte e, assim, produzir a desmineralização interna e constituindo um risco à progressão da lesão. Como conclusão, os autores afirmam: “os clínicos deveriam, portanto, sempre ter presente a importância de remover as estruturas afetadas na JAD a alguma distância da cavidade, para reduzir o risco de cárie secundária”.

A contaminação do tecido dentário parece ocorrer mesmo em presença de lesões não cavitadas. A relação entre a presença das bactérias e as características externas da lesão ainda é controversa. Enquanto FRISBIE e NUCKOLLS (1947) encontraram microrganismos sob lesões não cavitadas inativas, BRÄNSTRÖM *et al.* (1980) observaram rara contaminação nas lesões com tais características. THYLSTRUP e QVIST (1987) afirmaram não observar bactérias no interior de lesões inativas. O conhecimento da prevalência de infecção nesse estágio precoce da lesão cariosa, em relação a sua atividade, é indispensável para a elucidação das diferentes possibilidades de tratamento.

#### **2.4 Adesão bacteriana**

A habilidade dos microrganismos associados à cárie em colonizar superfícies é um dos importantes fatores de virulência no desenvolvimento de lesões cariosas (LOESCHE, 1986). A forma com a qual os microrganismos se organizam para formar o biofilme dental supragengival pode guardar semelhança com seu arranjo no interior do esmalte dentário. Os mecanismos de adesão presentes no ambiente externo também estão presentes no interior das lesões.

A formação do biofilme dental pode ser dividida em duas fases. A primeira fase é a de adesão em que as bactérias se fixam à película adquirida. A segunda fase é a de agregação. Nessa etapa, pode-se verificar o crescimento e multiplicação das bactérias já aderidas ao dente e também a agregação de outros microrganismos a essa estrutura bacteriana previamente formada. Assim, o acúmulo bacteriano pode ocorrer não só pela multiplicação das bactérias já aderidas mas também pela adesão de novas bactérias (RUSSELL, 1979).

O processo pelo qual as bactérias cariogênicas são capazes de aderir e colonizar a superfície dentária é complexo e envolve várias etapas que podem ser dependentes ou não de sacarose.

Inicialmente, as bactérias têm a capacidade de aderir a película mesmo sem a presença de sacarose. Essa adesão pode ocorrer através de interações eletrostáticas entre elementos da parede celular e constituintes da película adquirida. Essa forma de união é muito importante na colonização bacteriana apesar de ser fraca e poder ser facilmente desfeita. A parede celular bacteriana apresenta ácidos lipoteicóicos que, por serem eletronegativos, se unem a cátions divalentes que também possuem afinidade às glicoproteínas da película. Com isso, há a formação de uma ponte iônica entre as duas superfícies. Além desses componentes hidrofóbicos, as bactérias possuem proteínas associadas a parede celular que exercem a função de receptores para adesão que são as adesinas.

Várias adesinas de bactérias cariogênicas já foram identificadas. Uma das principais adesinas encontrada na parede celular de *Streptococos mutans* é a Pac (190 KD) que está envolvida com a adesão desse microrganismo ao dente. Essa adesina também é chamada de proteína B, P1, IF e Ag I/II. (RUSSELL, 1979; FORESTER,

HUNTER e KNOX, 1983; HUGHES *et al.*,1980). O *Streptococcus sobrinus* apresenta a adesina SpaA (210KD), também conhecida como Pag, que apresenta similaridades estruturais com a proteína Pac embora não esteja clara sua homologia de função. Em modelo *in vitro* a adesina Ag I/II apresentou adesividade à hidroxiapatita coberta por saliva (HAJISHENGALLIS, KOGA e RUSSELL, 1994). Anticorpos contra esse antígeno impediram a aderência do *Streptococcus mutans* à hidroxiapatita coberta por saliva *in vitro* (DOUGLAS e RUSSELL, 1984). Em experimentos *in vivo* anticorpos para proteína Ag I/II reduziram a colonização pelas bactérias. Essa proteína está envolvida com as interações hidrofóbicas entre a superfície dentária e a parede celular bacteriana. Segundo OKAHASHI *et al.* (1989) cepas defectivas para produção do antígeno Pac possuem menor hidrofobicidade do que as cepas não mutantes. Ag I/II mostra também adesão ao colágeno o que pode determinar a habilidade do microrganismo de invadir túbulos dentinários (LOVE, McMILLAN e JENKINSON, 1997). SCIOTTI *et al.*(1997) mostraram que essa proteína pode também se aderir a outras moléculas não colágenas da matriz extracelular encontrados na dentina.

PERRONE, GFELL e GREGORY (1997) observaram adesina P1 em fímbrias de *Streptococcus mutans*. Nesse estudo as fímbrias de *Streptococcus mutans* foram estudadas a partir de bactérias coletadas de seis pacientes com cárie ativa e cinco pacientes livres de cárie. No teste de imunotransferência, a expressão da proteína P1 foi maior nas fímbrias das bactérias coletadas de pacientes cárie ativos em comparação aos livres de cárie. A diferença na composição das fímbrias dos *Streptococcus mutans* pode ter um importante papel na virulência desses microrganismos em relação à cárie. As fímbrias também foram analisadas em MET

com contraste imunohistoquímico. A morfologia das fimbrias era como a de pequenos pêlos de 100-200 nm por toda a superfície bacteriana. As fimbrias contendo adesinas podem ser consideradas como um outro mecanismo de adesão presente nessa bactéria cariogênica.

O mecanismo de adesão dependente de sacarose torna a adesão inicial mais estável, pois essa não é desfeita com facilidade, além de ser importante na agregação bacteriana (CURTISS, 1986). Na adesão mediada por sacarose, a enzima glicosiltransferase liberada pelas bactérias e a porção da glicosiltransferase aderida à célula serão os principais elementos responsáveis pela adesão e agregação. A capacidade do estreptococcus do grupo mutans em produzir glicanos insolúveis extracelulares a partir da sacarose lhe confere a habilidade de colonizar superfícies lisas dos dentes. Esse processo é mediado através de enzimas chamadas de glicosiltransferases. Esse conjunto de enzimas apresenta uma atividade de transferase, ou seja, ela quebra a molécula de sacarose e forma um polímero de glicose. Existem diferentes tipos de polímeros de glicose produzidos pelas bactérias que podem variar em relação ao comprimento de cadeia, tipo de ligações entre as moléculas de glicose, graus de ligações cruzadas e solubilidade. Os polímeros insolúveis estão mais diretamente relacionados com o desenvolvimento de lesões cáries do que os polímeros solúveis. Cepas de bactérias que não produzem glicosiltransferase quando inoculadas em modelos animais mostram uma diminuição do número de lesões cáries em superfícies lisas comparadas ao grupo controle em que os genes da glicosiltransferase não estavam mutados (YAMASHITA *et al.*, 1993). As proteínas ligantes a glicanos, também chamadas de porção da glicosiltransferase aderida à célula, são importantes na união célula-célula e na união



entre glicano-célula. A adesão intrabacteriana está associada a esses componentes protéicos presentes na membrana externa que servem como receptores para reconhecimento e ligação de outra bactéria vizinha pela sua proteína ligante à glicano. A ligação glicano-célula favorecerá não só a colonização inicial mas também a agregação bacteriana após sua fixação inicial. Os glicanos quando presentes na película adquirida podem ser reconhecidos pelas bactérias que apresentam proteínas ligantes à glicanos em sua parede externa. Na fase de agregação de bactérias a presença de polímeros extracelulares, produzidos por bactérias da placa, favorece a adesão de outras bactérias que reconhecem esses sítios de ligação. LIE (1977), ao estudar a formação inicial de placa supragengival em MEV, observou fios de material extracelular ligando uma bactéria a outra e ligando a bactéria à película dentária. Essa estrutura semelhante a fios que foi encontrada está envolvida com a formação de placa supragengival e também com a adesão bacteriana. Há possibilidade de que esses fios encontrados sejam polissacarídeos produzidos pelas bactérias uma vez que o experimento foi realizado com presença de sacarose.

As bactérias só são patogênicas à um determinado tecido ou órgão na medida em que têm capacidade de colonizar esta estrutura. Vários dos mecanismos de adesão que são observados na formação do biofilme dental estão presentes quando as bactérias invadem os tecidos dentários.

### **CAPÍTULO 3 - CONCLUSÕES DA REVISÃO DA LITERATURA**

As evidências apresentadas nos vários trabalhos estudados mostram que: 1) A lesão de cárie inicial desenvolve-se subsuperficialmente; 2) A lesão não cavitada ativa pode sofrer processo de inativação podendo desaparecer clinicamente ou permanecer como uma cicatriz no tecido; 3) Alguns autores associam a penetração bacteriana ao estágio de cavitação da lesão; 4) Estudos com cortes histológicos e análise em MEV demonstram contaminação por microrganismos em estágios precoces da lesão cariosa (lesão não cavitada); 5) Os microrganismos são capazes de se fixar à apatita dental através de mecanismos de adesão; 6) Poucos estudos diferenciam a penetração bacteriana nas lesões em ativas e inativas e aqueles que o fazem apresentam resultados controversos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOBA, T. et al. The intact surface layer in natural enamel caries and acid - dissolved hydroxyapatite pellets. **J Oral Pathol**, Oxford, v.10, n.1, p.32-39, Feb. 1981.
- BACKER DIRKS, O. B. Post-eruptive changes in dental enamel. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.45, n.3, p.503-511, May 1966.
- BJØRNDAL, L.; THYLSTRUP, A. A structural analysis of approximal enamel caries lesions and subjacent dentin reactions. **Eur J Oral Sci**, Munksgaard, v.103, n.1, p.25-31, Feb. 1995.
- BLACK, G.V. Operative dentistry. Chicago: Medico-Dental Publishing Co., 1914: 1: 188-190.
- BRÄNNSTRÖM, M. et al. Invasion of microorganisms and some structural changes in incipient enamel caries. **Caries Res**. Basel, v.14, n.5, p.276-284, Sep/Oct. 1980.
- BRÄNNSTRÖM, M.; FRISKOPP, G.; WICTORIN, L. Experimental caries in young human. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.22, n.10/11, p.571-578, Oct/Nov. 1977.
- BRUDEVOLD, F. Chemistry of the enamel surface, **J. Dent. Res.**, Chicago, v.39, n.6, p.1083, Nov/Dec. 1960.
- CRABB, H. Enamel caries observations on the histology and pattern of progress of the approximal lesion. **Br. Dent. J.**, London, v.121, n.3, p.115-129, Aug. 1966.
- CRABB, H.S.; MORTIMER, K.V. Two-dimensional microdensitometry. A preliminary report. **Br. Dent. J.**, London, v.122, n.8, p.337-430, Apr. 1967.
- CURTISS, R. I. Genetic analysis of streptococcus mutans virulence and prospects for an anticaries vaccine. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.65, n.8, p.1034-1045, Aug. 1986.
- DARLING, A. I. Studies of early lesion of enamel caries. **Br. Dent. J.**, London, v.105, n.4, p.119-135, Aug. 1958.
- DOUGLAS, C. W. I.; RUSSEL, R. R. B. Effect of specific antisera upon streptococcus mutans adherence to saliva-coated hydroxyapatite. **FEMS microbiol Lett**, v.25, n. 2/3 , p.211-214. 1984.
- FORESTER, H.; HUNTER, N.; KNOX, K. W. Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of streptococcus mutans, **J. Gen. Microbiol**, v.129, n.9, p.2779-2788. Sep. 1983.
- FRISBIE, H.; NUCKOLLS, J. Caries of the enamel. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.26, n.3, p.181-202, June 1947.

GUSTAFSON, G. The histopathology of caries of human dental enamel with special reference to the division of the lesion into zones. **Acta Odont Scand**, Stockholm, v.15, n.15, p.13-56, Feb. 1957.

HAIKEL, Y.; FRANK, R. M.; VOEGEL, J. C. Scanning electron microscopy of the human enamel surface layer of incipient carious lesions. **Caries Res.** Basel, v.17, n.1, p.1-13, Jan-Feb. 1983.

HAIKEL, Y.; KOGA, T.; RUSSEL, M. W. Affinity and specificity of the interactions between streptococcus mutans antigen I/II and salivary components. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.73, n.9, p.1493-1502. Sep. 1994

HOLMEN, L.; THILSTRUP, A.; ÅRTUN, J. Surface changes during the arrest of active enamel carious lesions in vivo: a scanning electron microscope study. **Acta Odont Scand**, Oslo, v.45, n.6, p.383-390, 1987.

HOLMEN, L et al. A scanning electron microscopic study of progressive stages of enamel caries in vivo. **Caries Res.**, Basel, v.19, n.4, p.355-367, July/Aug. 1985.

HUGHES, M. et al. Evidence for an immunological relationship between streptococcus mutans and human cardiac tissue. **Infect Immun**, v.27, n.2, p.576-588, 1980.

HURST, V.; NUCKKOLS, J.; FRISBIE, E. In vitro studies on the initiation of enamel caries II. Failure of certain bacteria to penetrate the enamel in nonacid environment. **Oral Pathology**, St. Louis, v.6, n.10, p.1236-1238, Oct. 1953a.

HURST, V.; NUCKOLLS, J.; FRISBIE, E. In vitro studies on the initiation of enamel caries II. Enamel penetration by oral bacteria in a nonacid environment. **Oral Pathology**, St. Louis, v.6, n.8, p.976-994, Aug. 1953b.

HURST, V.; NUCKOLLS, J.; FRISBIE, E.; In vitro studies on the initiation of enamel caries IV. Enamel penetration and decalcification by acidogenic bacteria. **Oral Pathology**, St. Louis, v.2, n.2, p.186-193, Feb. 1954.

LARSEN, M. J.; FEJERSCOV, O. Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions, **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.97, n.4, p.285-296, Aug. 1989.

LIE, T. Early dental plaque morphogenesis. **J. Periodontal Res**, Munksgaard, v.12, n.2, p.73-89, Mar. 1977.

LOESCHE, W. J. Role of streptococcus mutans in human dental decay **Microbiol Rev**, n.50, v.4, p.353-380, Dec. 1986

LOVE, R. M.; McMILLAN, M.D.; JENKINSON, H. F. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/ II family of polypeptides. **Infect Immun**, v.65, n.12, p.5157-5164, Dec. 1997

LUOMA, A. R.; LUOMA, H.; PELTTARI, A. Microbial invasion and subsurface colonization of rat enamel in early fissure caries observed by scanning electron microscopy. **Scan J Dent Res**, Copenhagen, v.92, n.2, p.120-126, Apr. 1984.

LUSTMAN, J. et al. White enamel patches: a scanning electron microscope study of approximal surface following removal of plaque **J Oral Pathol**, Oxford, v.3, n.3, p.123-126, 1974.

MELROSE, C. A.; APPLETON, J.; LOUVIS, B.B.J. A scanning electron microscopic study of early enamel caries formed in vivo beneath orthodontic bands. **BJO**, Salem, v.23, n.1, p.43-47, Feb. 1996.

NYVAD, B.; FEJERSCOV, O. Assessing the stage caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. **Community Dent Oral Epidemiol**, Munksgaard, v.25, n.1, p.69-75, Feb. 1997.

OKAHASHI, N. et al. Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. **Mol Microbiol**, v.3, n.5, p.673-678, May 1989.

PALAMARA, J. et al. Ultrastructure of the intact surface zone of white spot and brown spot carious lesions in human enamel. **J Oral Pathol**, Oxford, v.15, n.1, p.28-35, Jan. 1992.

PERRONE, M.; GFELL, L.E.; GREGORY, R.L. Evaluacion de los niveles de la adhesina p1 em fimbrias de *Streptococcus Mutans* aisladas de pacientes susceptibles y resistentes a la caries dental. **Acta Odont. Venezolana**, Caracas, v.35, n.1, p.16-24, Enero/Abril 1997.

ROBINSON, C. et al. Identification of human serum albumin in human caries lesions of enamel: the role of putative inhibitors of remineralisation. **Caries Res.**, Basel, v.32, n.3, p.193-199, May/June 1998.

ROBINSON, C.; HALLSWORTH, R.C.; KIRKHAM, J. Effect of surface zone deproteinisation on the access of mineral ions into subsurface carious lesion of human enamel. **Caries Res**, Basel, v.24, n.4, p.226-230, July/Aug. 1990.

ROBINSON, C.; WEATHRELL, J. A.; HALLSWORTH, A.S. Distribution of magnesium in mature human enamel. **Caries Res.**, Basel, v.15, n.1, p.70-77, Jan/Fev. 1981.

RUSSEL, R. R. B. Glucan-binding proteins of streptococcus mutans serotype c. **J Gen Microbiol**, v.112, n.1, p.197-20, May 1979.

- SCIOTTI, M. et al. The N-terminal half part of the oral streptococcal antigen I/II f contains two distinct domains. **FEMS Microbiol Lett**, v. 153, n.2, p.439-445, Aug. 1997
- SEPPÄ, L.; ALAKUIJALA, P.; KARVONEN, I. A scanning electron microscopi study of bacterial penetration of human enamel in incipient caries. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.30, n.8, p.595-598, Aug. 1985.
- SHORE, R. C. et al. Distribution of exogenous proteins in caries lesions in relation to the pattern of demineralization, **Caries Res.**, Basel, v.34, n.2 , p.188-193, Mar/Apr. 2000.
- SILVERSTONE, L.M. The surface zone in caries and caries-like lesions produced in vitro. **Br. Dent. J.**, London , v.124, n.3/4, p.145-157, Aug. 1968.
- SILVERSTONE, L.M.; MJÖR, I. Cárie dental. In: HÖRSTED.; BINDSLEV, P.; MJOR, I. **Dentística Operatória Moderna**. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1993. 306p. Cap.2, p.16-54 .
- SILVERSTONE, L.M.; POOLE, D.F. The effect of saliva and calcifying solutions upon the histological appearance of enamel caries. **Caries Res.**, Basel, v.2, n.1, p.87-93, Jan. 1968.
- SILVERSTONE, LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. **Oral Sciences Reviews**, Munksgaard, v.3, p.100-132, 1973.
- TERANAKA, S.; KOULOURIDES, T.; BUTLER, W.T. Protein content and amino acid content of consolidated carious lesions in human enamel and of experimental lesions in bovine enamel exposed to the human mouth. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.31, n.6, p.405-411, 1986.
- THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica.2.ed. São Paulo: Ed. Santos, 1995.421P. Cap.6, p.111-157: Características clínicas e patológicas da cárie dentária.
- THYLSTRUP, A.; QVIST, U. Principal enamel and dentine reactions during caries progression. In: THILSTRUP, A.; LEACH, S.A.; QUIST, U. Dentine reactions in the oral cavity. Oxford: IRL Press, 1987, p.293-300.
- VON DER FEHR , F. R. A study of carious lesions produced in vivo in unabraded, abraded, exposed, and f-treated human enamel surfaces, with emphasis on the x-ray dense outer layer. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.12, n.11, p.797-814, July 1967.
- VON DER FEHR, F. R.; LÖE, H.; THEILADE,E. Experimental caries in man. **Caries Res**, Basel, v.4,p.131-148, 1970.

WOLINSKY, L.E. Caries and cariology. In: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M.G. Oral microbiology and immunology. Philadelphia: Saunders,1994. 477p. Cap.27, p.341-359.

YAMASHITA, Y. et al. Role of streptococcus mutans gtf genes in caries induction in the specific-pathogen free-rat model. **Infect Immun**, v.61, n.9, p.3811-3817, Sep. 1993

## **Contaminação de Lesões não Cavidadas: Estudo em Microscopia**

### **Eletrônica de Varredura**

#### ***Microbiological Contamination of Non Cavitated Lesions: A Scanning***

#### ***Electron Microscope Study***

#### **Palavras-Chave**

Microscopia, Carie dentária, Microbiologia

#### **Key Words**

Microscopy, Dental caries, Microbiology

#### **Resumo**

A contaminação por microrganismos em lesões não cavidadas ativas e inativas foi analisada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). As lesões ativas foram formadas em modelo *in situ*. Dois participantes utilizaram aparelho removível palatino com 5 blocos de esmalte, totalizando dez blocos. Um espaço de 1mm foi deixado entre a superfície do bloco e o acrílico, o qual foi recoberto com tela plástica a fim de facilitar o acúmulo de placa. O desafio cariogênico foi realizado através da aplicação de solução de sacarose a 15%, 8 vezes ao dia, durante cinquenta dias. As amostras de quatorze lesões inativas foram obtidas em dentes extraídos. Microrganismos foram detectados tanto no interior das lesões ativas quanto das inativas. Todas lesões ativas apresentaram bactérias, cuja distribuição variava de bem



próximo à superfície até o limite amelo-dentinário. Também foi evidenciada contaminação do esmalte em todas as lesões inativas, atingindo a dentina em cinco casos. No tecido dentinário, bactérias puderam ser encontradas no interior dos túbulos e na região intertubular. Cocos e bacilos foram as formas bacterianas mais prevalentes, tendo sido eventualmente encontradas bactérias de forma filamentosas e espiraladas. As lesões inativas apresentavam também leveduras. Mecanismo de adesão mediado por fímbrias ou fios foram encontrados entre as bactérias e entre elas e o esmalte. De maneira geral, foi possível observar bactérias dentro de lacunas no esmalte oriundas do processo de desmineralização. Foi observada a presença de microrganismos em lesões não cavitadas ativas e inativas e essa não define a continuação do processo cariioso.

### **Abstract**

The contamination by microorganisms in non cavitated active and inactive lesions was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The active lesions were obtain through an *in situ* model. Two individuals worn a removable oral appliance with five enamel blocks, totaling up ten blocks. A gap of 1mm was kept between the surface of the specimens and the acrylic which was covered by a plastic net to allow plaque accumulation. The cariogenic challenge was done through the application of a solution of 15% of sucrose, eight times a day, during fifty days. The fourteen samples of inactive lesions were obtained from extracted teeth. Microorganisms were observed inside inactive and active lesions. All the active lesions showed bacteria with a variable distribution: from the area near the surface to the dentin-enamel junction. It was also observed a contamination of the enamel in all

inactive lesions, reaching the dentine in five cases. In the dentinary tissue, the bacteria could be inside the tubules and in the inter tubular region. Cocci and bacilli were the microorganisms shapes most often found, while filamentous and spiral bacteria were seldom present. Yeast-like microorganisms were also found in inactive lesions. Adhesion mechanism mediated by pilli and threads were found between bacteria and between bacteria and tooth surface. In general, bacteria could be seen inside cavities in the enamel created by the bacterial demineralization. The presence of microorganisms in non cavitated active and inactive lesions was observed and it does not define the continuation of the carious process.

### **Introdução**

O esmalte e a dentina de lesões de cárie não cavitadas ainda têm sido considerados como livre de microrganismos (SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN *et al.*, 1985; SILVERSTONE e MJÖR; 1993). A penetração bacteriana estaria restrita a estágios mais avançados da lesão, onde a camada superficial encontra-se rompida. No entanto, estudos histológicos na década de 40 e 50 (FRISBIE e NUCKOLLS, 1947; HURST, NUCKOLLS e FRISBIE, 1953) evidenciaram a presença de microrganismos em lesões cariosas não cavitadas. Igualmente, encontrou-se penetração bacteriana em estudos com microscopia eletrônica de varredura (MEV) (BRÄNNSTRÖM *et al.*, 1980; LUOMA, LUOMA e PELTTARI, 1984; SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN, 1985). Nesses estudos, a relação entre a atividade de lesão cariosa e a presença de contaminação dos tecidos dentários não encontra-se elucidada. As lesões não cavitadas ativas são ditas contaminadas (HURST, NUCKOLLS e FRISBIE, 1953; BRÄNNSTRÖM *et al.*,

1980). Entretanto, a prevalência e a extensão da contaminação em lesões inativas é bastante discutida. FRISBIE e NUCKOLLS (1947) verificaram bactérias em lesões de lenta progressão. BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) e SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN (1985) observaram poucos casos de lesões inativas contendo bactérias no seu interior. THYLSTRUP e QVIST (1987) não observam presença de bactérias em lesões inativas sendo a invasão superficial tubular constatada somente em presença de cavitação com direta exposição da dentina à biomassa bacteriana. A penetração bacteriana é sugerida, por alguns, como indicativa de tratamento invasivo devido ao risco da continuidade do processo carioso (FRISBIE e NUCKOLLS, 1947; BRÄNNSTRÖM *et al.*, 1980).

A análise da presença e extensão da penetração bacteriana no interior de lesões com superfície não rompida poderá esclarecer a história natural da doença cárie e a possibilidade ou não da paralisação do processo em presença de infecção tecidual. Dessa forma, a proposta do trabalho é avaliar a presença de microrganismos em lesões não cavitadas ativas e inativas.

## **Materiais e Métodos**

### *Lesões Não Cavitadas Ativas*

Dez blocos de esmalte foram preparados a partir de terceiros molares não erupcionados e mantidos em solução de formalina a 4%, pH 7,0 por um período mínimo de um mês. Blocos de 4x4x3 mm foram cortados do terço médio dos dentes. Os espécimes de esmalte foram inseridos em aparelhos removíveis palatinos, deixando-se um milímetro de recessão da superfície externa do acrílico até a camada

externa do bloco. Uma tela plástica foi fixada sobre os blocos a fim de facilitar a retenção de placa sobre os mesmos. Dois participantes utilizaram os aparelhos removíveis, contendo cinco blocos cada, durante cinquenta dias. O desafio cariogênico foi realizado gotejando-se, fora da boca, uma solução de sacarose a 15%, oito vezes ao dia, por cinco minutos. Após, os blocos eram lavados com água estéril sem flúor e retornavam à cavidade oral. Durante o período do experimento os participantes não utilizaram dentifrício fluoretado, mantendo apenas o acesso a água de abastecimento público fluoretada. Ao fim do período experimental, os blocos foram removidos do aparelho, limpos com gaze estéril e fotografados (AF Zoom Nikkor, Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Os participantes assinaram consentimento informado, e o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### *Lesões Não Cavidadas Inativas*

A amostra foi constituída de doze dentes extraídos em clínicas odontológicas de Porto Alegre, armazenados em solução de formalina a 4%, pH 7,0. Os dentes apresentavam uma ou mais lesões em superfícies lisas como aspecto brilhoso, esbranquiçado ou pigmentado. Foram utilizados 7 pré molares, 2 caninos, 2 molares e 1 incisivo. Os dentes foram removidos da solução de armazenamento, limpos com escova dental e fotografados (AF Zoom Nikkor, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Esses foram também examinados em microscópio estereoscópico a fim de se evitar a inclusão de dentes com cavitação da superfície. As coroas foram separadas das raízes através de disco de diamante (Buehler ®, nº11-14243, Lake Bluff, IL, USA)

acoplado em cortadeira (ISOMET<sup>TM</sup> Low Speed Saw, Buehler®, Lake Bluff, Illinois, USA) com velocidade de 150 rpm. Um corte foi realizado separando as metades mesial e distal, ou vestibular e lingual, de acordo com a localização das lesões não cavitadas.

#### *Clivagem das Amostras*

As lesões ativas e inativas foram fraturadas tendo como guia uma canaleta contra-lateral realizada em dentina. Para tanto, utilizou-se disco de diamante (Buehler®, nº11-14243, Lake Bluff, IL, USA) estéril em cortadeira (ISOMET<sup>TM</sup> Low Speed Saw, Buehler®, Lake Bluff, Illinois, USA) sob refrigeração constante com água destilada igualmente estéril. Após a realização das canaletas, as amostras foram sonificadas por 15 segundos em recipiente contendo água destilada estéril, através de processador ultrassônico (VibraCell<sup>TM</sup>®; Sonics & Material Inc., Connecticut, EUA), com o objetivo de remover a lama dentinária. Em seguida, apoiando a superfície da lesão em gaze esterilizada, procedeu-se a clivagem com instrumento estéril. Imediatamente após, os dentes e blocos foram imersos em solução fixadora de glutaraldeído tamponado com fosfato, tendo concentração final de 2% e pH 7,0, por uma semana, a temperatura de 4°C. O volume de fixador usado foi aproximadamente cinco vezes superior ao volume da peça coletada.

#### *Preparação para Microscopia Eletrônica de Varredura*

O excesso do fixador foi removido através de lavagem em solução tampão de fosfato dibásico a 0,1 M, diluída em água destilada estéril, na proporção de 1:1, através de 3 trocas consecutivas de trinta minutos cada. A desidratação foi realizada

em gradientes crescentes de acetona da seguinte forma: acetona 30% por 10 minutos, acetona 50% por 10 minutos, acetona 70% por 10 minutos, acetona 90% por 10 minutos, acetona 90% por 20 minutos, acetona 100% por 10 minutos, acetona 100% por 20 minutos. A secagem das amostras foi realizada em aparelho de ponto crítico (Critical Point Dryer da Balzers CPD030, Holand). A fixação das peças à base de alumínio foi feita através de fita dupla face (3M do BRASIL LTDA, São Paulo, Brasil) procurando manter a superfície a ser analisada paralela à base. Após esses procedimentos, as amostras foram metalizadas com ouro em uma fina e homogênea camada de aproximadamente 15 nm (Sputter Coater da Balzers SCD050, Holand). Ambos os fragmentos da mesma lesão foram analisados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL 5800, Tokyo, Japan) com 20 kV. A MEV foi utilizada por possibilitar não só a análise de detalhes estruturais, mas também o reconhecimento de microrganismos (BRÄNNSTRÖM *et al.*, 1980).

#### *Posição das Bactérias*

A posição das bactérias no interior do tecido foi aferida em milímetros em relação a superfície externa do esmalte no microscópio eletrônico de varredura.

#### *Medidas de Área da Lesão*

A metalização foi retirada através de desgaste com discos abrasivos flexíveis sof-lex pop-on (3M do BRASIL LTDA, São Paulo, Brasil), com granulação correspondente à penúltima escala de abrasividade em ordem decrescente da mesma. Após essa etapa, as lesões foram coradas com vermelho ácido a 1% durante 10 segundos e lavados pelo mesmo tempo (FUSAYAMA, 1979).

As amostras foram fotografadas na mesma magnificação (X 50) com filme KodaK ASA 400 em microscópio óptico com câmara acoplada (Examet, Union Optical Co, Tokyo, Japan). As fotos foram digitalizadas, juntamente com uma régua, a fim de permitir a calibragem das medidas. A área da lesão foi obtida utilizando o programa Image Tool 2.0, traçando-se o contorno da lesão e medindo-se a área.

### *Análise Estatística*

Os dados da distribuição dos tipos microbianos nas lesões ativas e inativas foram analisados através da média das percentagens e do desvio padrão.

Na comparação entre o número de microrganismos por área de lesão, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-whitney para amostras não pareadas através do Software Statistical Package for Social Science (SPSS), versão 8.0.

As amostras foram classificadas em três níveis crescentes de contaminação. Vinte por cento da amostra foi sorteada para recontagem em dois momentos de aferição, com intervalo de seis meses. Os valores do número de microrganismos foram comparados através dos testes de correlação de Pearson e teste não paramétrico de Wilcoxon.

## **Resultados**

A análise em MEV revelou microrganismos nas lesões não cavitadas ativas e inativas. As bactérias foram encontradas isoladas ou formando colônias. Essas eram compostas por microrganismos de mesma morfologia ou de morfologia distinta.

O coeficiente de correlação da recontagem das amostras foi de 0,993 ( $p < 0,001$ ) e o teste de Wilcoxon não mostrou diferença entre as duas contagens (0,398).

#### *Lesões Não Cavitadas Ativas*

As lesões formadas *in situ* durante cinquenta dias com exposição freqüente à sacarose, apresentaram características de atividade com superfície esbranquiçada e opaca (Figura 1). Observou-se desmineralização envolvendo a quase totalidade da área externa em todos os dez blocos.

As lesões ativas apresentaram diferentes graus de contaminação variando de 7 a 704 bactérias por lesão (Figura 2).

As formas bacterianas encontradas foram de cocos (31,60%  $\pm$  30,33), bacilos (68,31%  $\pm$  30,5), espiraladas (0,05%  $\pm$  0,15) e filamentosas (0,05%  $\pm$  0,15). Os bacilos e cocos compreenderam mais de 99% dos microrganismos encontrados, sendo os bacilos os mais prevalentes.

A análise em microscopia óptica demonstrou desmineralização restrita ao esmalte. A penetração bacteriana nessas lesões também se encontrou confinada ao esmalte. A profundidade de penetração variou entre 0,001mm a 1,787mm (Figuras 3A e 3B).

Foram identificados, a partir da superfície externa do esmalte, canais de acesso para as bactérias em direção ao interior do tecido (Figuras 4A e 5A).

Foi observada a presença de fímbrias ou fios de adesão entre as bactérias, e entre essas e o esmalte (Figuras 5B e 6). Em alguns casos, notaram-se bactérias no interior de lacunas de reabsorção no esmalte dentário (Figura 4B).



### *Lesões Não Cavidadas Inativas*

Foram analisadas quatorze lesões não cavidadas formadas *in vivo*, com tempo de progressão e de inativação desconhecidos e apresentando diferentes extensões de desmineralização. Três lesões eram pigmentadas (Figura 7A), e, as demais, brancas (Figura 8A). Microrganismos estavam presentes em todas as lesões examinadas, com distribuição variada (Figura 9).

As formas bacterianas encontradas foram de cocos (48,72%  $\pm$  43,99), bacilos (46,97%  $\pm$  40,87), espiraladas (1,07%  $\pm$  3,81), filamentosas (1,80%  $\pm$  3,99) (Figura 10). Em algumas lesões, observou-se a presença de leveduras (1,44  $\pm$  4,43) (Figura 8B). Assim como nas lesões ativas, os cocos e bacilos foram as formas microbianas mais prevalentes.

A análise em microscopia óptica demonstrou desmineralização, na maioria dos dentes, em esmalte. A profundidade de penetração nesse tecido variou entre 0,007mm a 1,642 mm. Alguns dentes, entretanto, mostraram desmineralização abrangendo a dentina. A penetração bacteriana envolvendo a dentina foi observada em cinco amostras. A localização das bactérias, nesse tecido, foi em região intertubular (Figura 7B e7C) e intratubular (Figura 11).

A partir das medidas de área de lesão foi possível avaliar a diferença da contaminação das lesões ativas e inativas. Nessa análise foram incluídos somente as superfícies com contaminação bacteriana em esmalte e cuja área interna tenha sido evidenciada pelo corante (n=21). A Figura 12 mostra a mediana e os quartis do número de microrganismos por área nos dois tipos de lesão. A contaminação das lesões ativas e inativas não foi estatisticamente significativa (p=0,089).

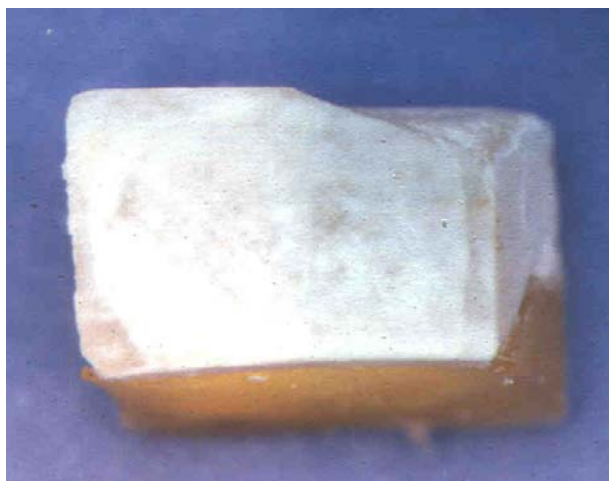


Figura 1: Bloco de esmalte desmineralizado através de modelo *in situ*.

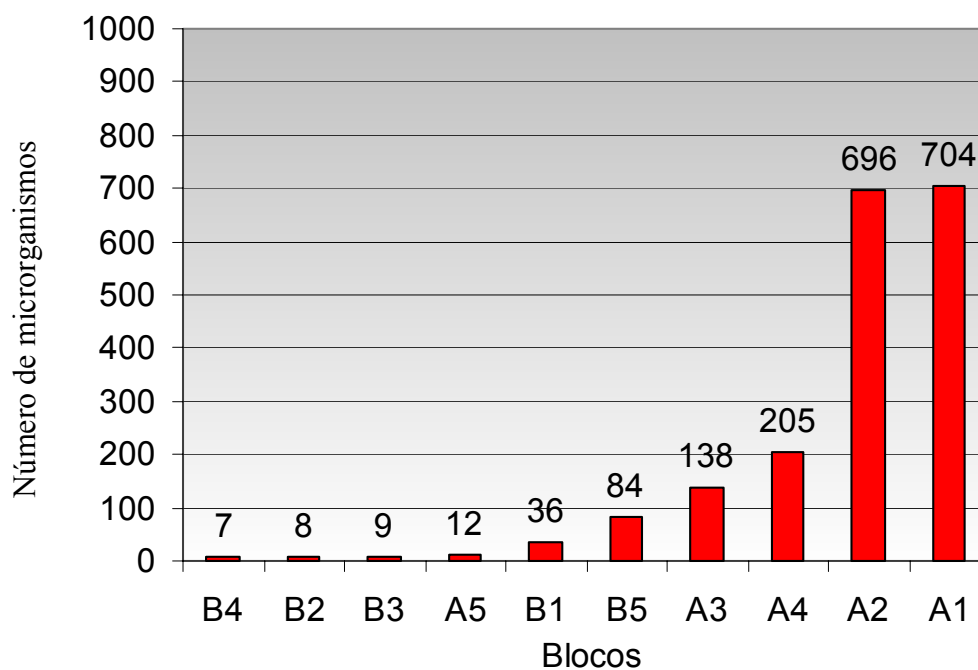


Figura 2: Número de bactérias encontradas em lesões ativas formadas *in situ* em blocos de esmalte usados por dois indivíduos (A e B).

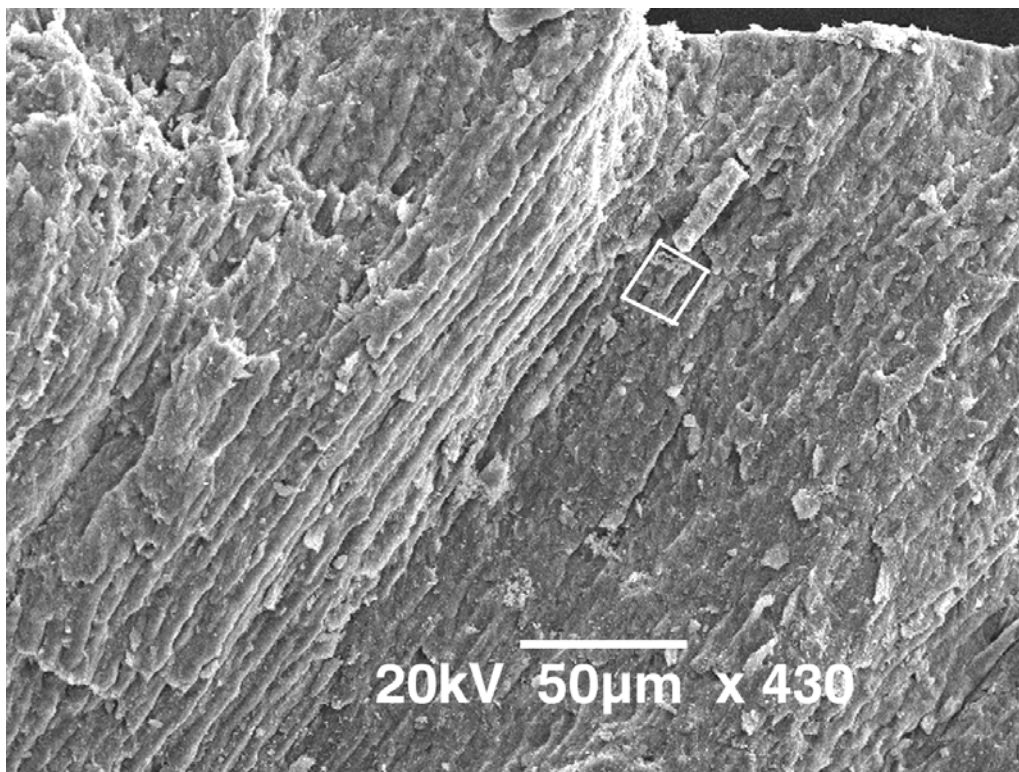


Figura 3A: Visão geral do esmalte em lesão ativa (Bloco da Figura 1). Marcação da região em que foram encontradas as bactérias da Figura 3B.

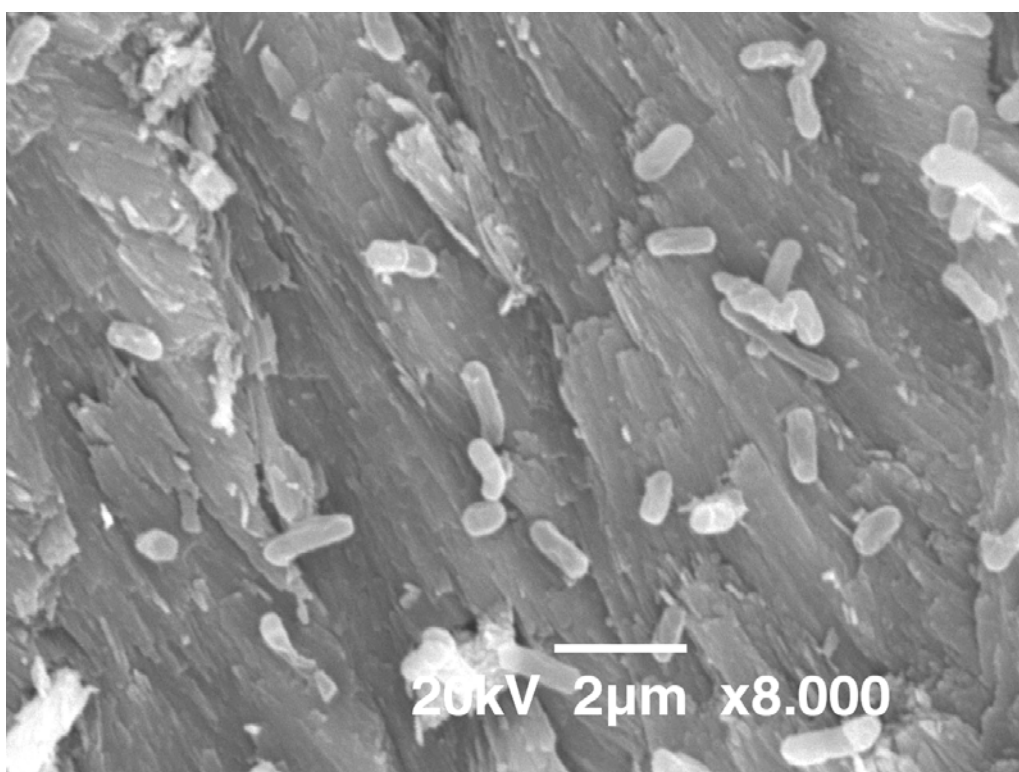


Figura 3B: Bactérias na área demarcada na figura 3A. Pode-se notar a presença de bactérias de diferentes tamanhos. Distância em relação à superfície de 0,102 mm.

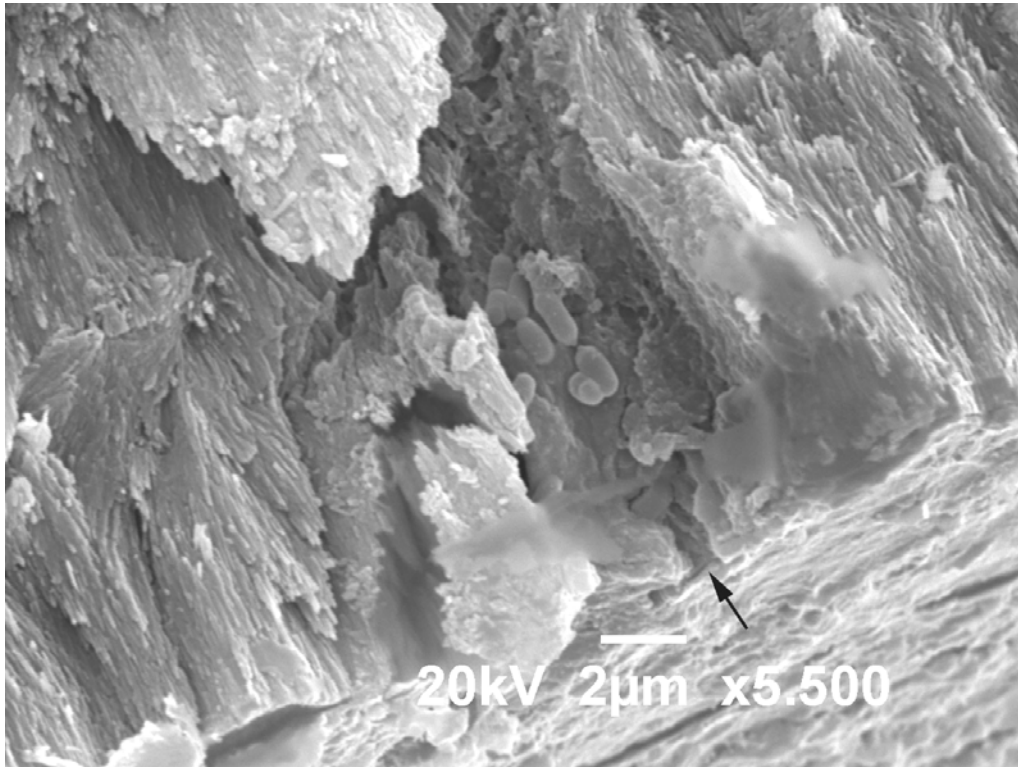


Figura 4 A: Microrganismos no esmalte próximo a superfície da lesão ativa. Seta demonstra canal da superfície para o interior do esmalte com presença bacteriana.

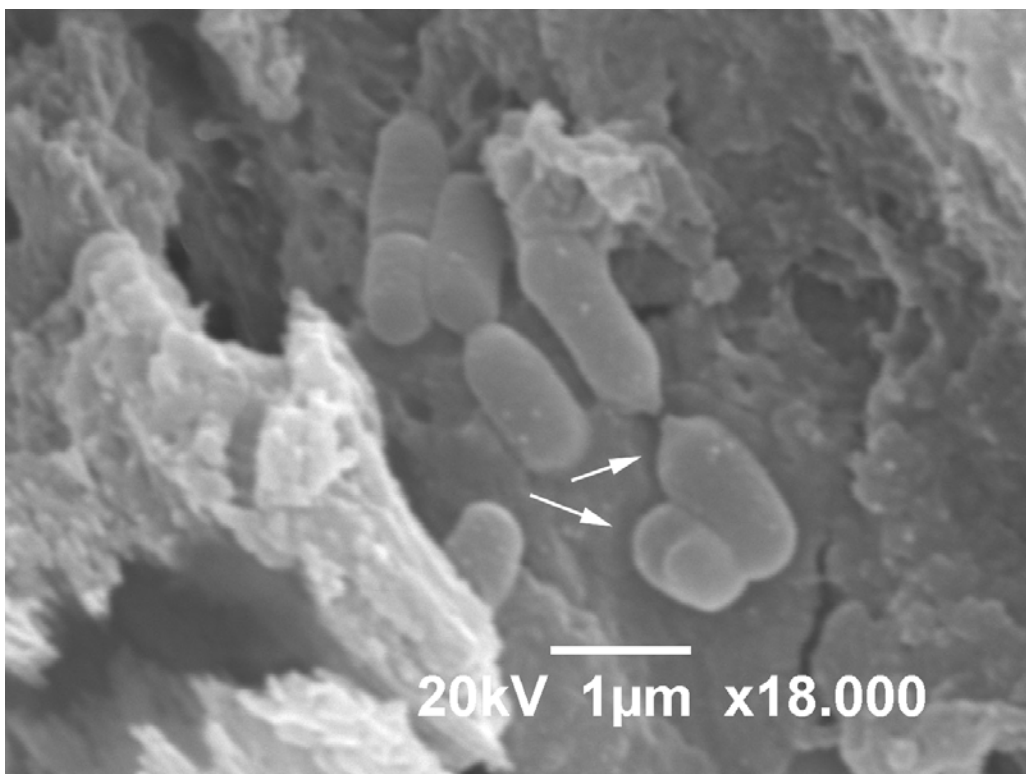


Figura 4 B: Maior aumento da figura 4A. Setas indicam lacunas no esmalte onde foram encontrados bacilos.

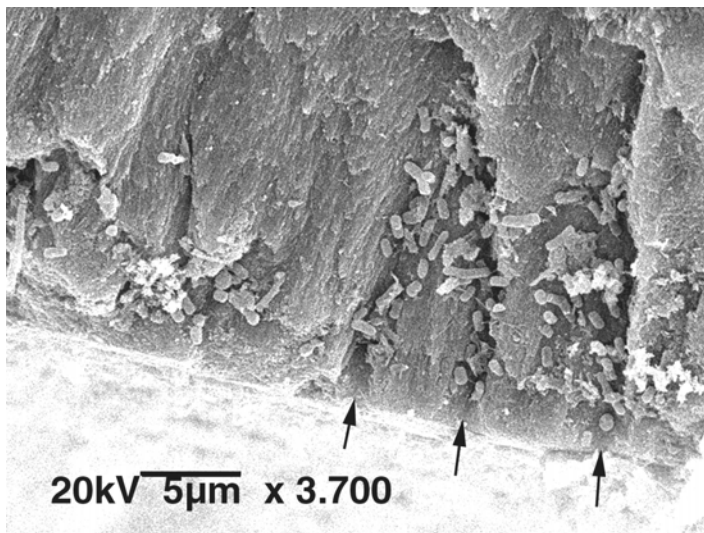


Figura 5A:  
Colônia de  
bactérias próximo  
à superfície.  
Canais de  
desmineralização  
levando até o  
interior do  
esmalte.

Figura 5B:  
Maior aumento  
da figura 5A.  
Presença de fios  
entre as  
bactérias e o  
dente (setas).

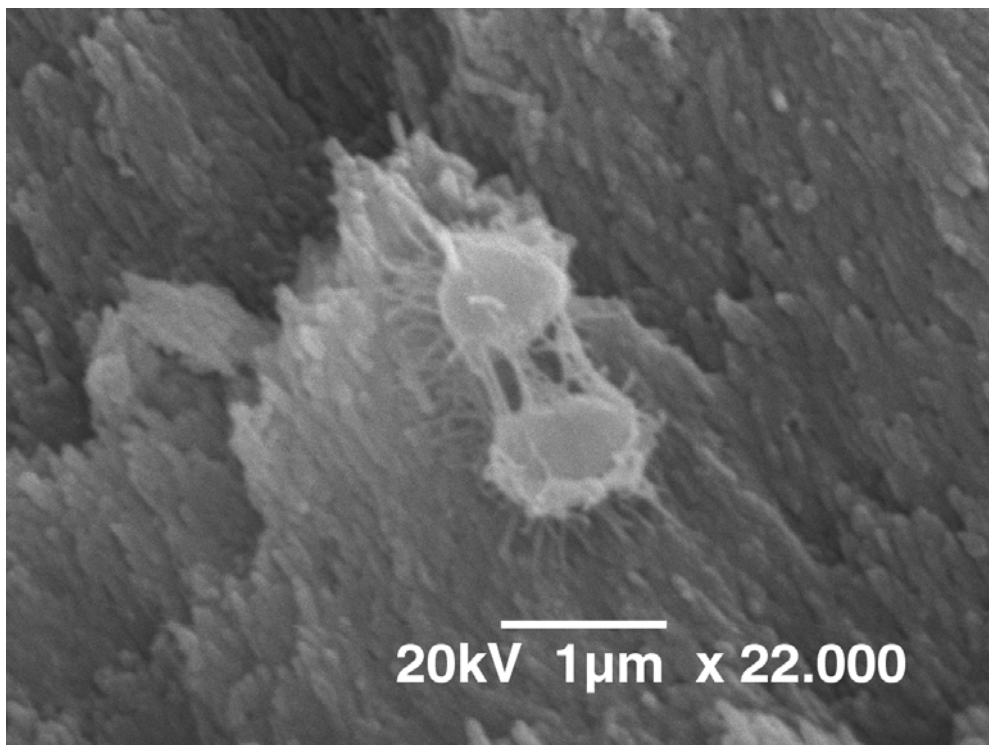
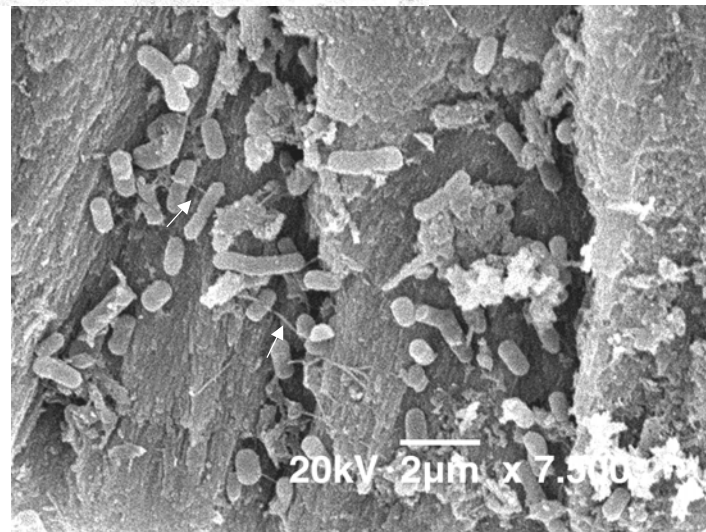


Figura 6: Cocos unidos uns aos outros e ao dente através de fimbrias e fios de adesão.



Figura 7A: Dente com lesão inativa pigmentada

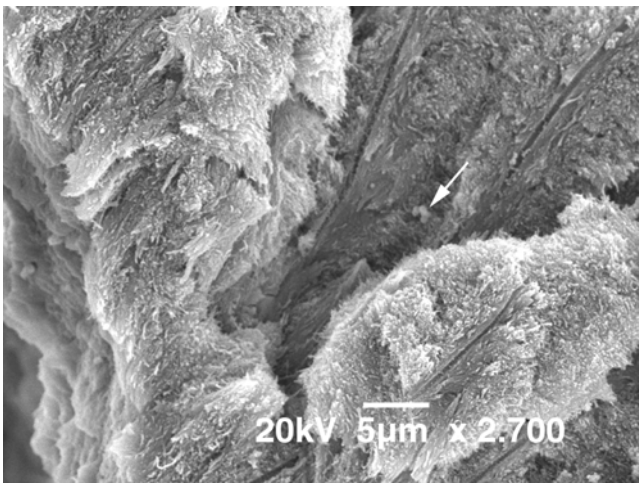


Figura 7 B: Cocos indicados pela seta em dentina intertubular.

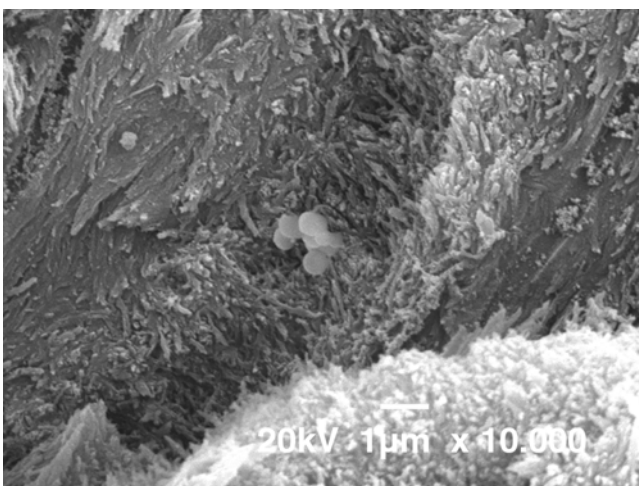


Figura 7 C: Cocos formando colônia. Maior aumento da figura 7B.



Figura 8A: Dente com lesão inativa

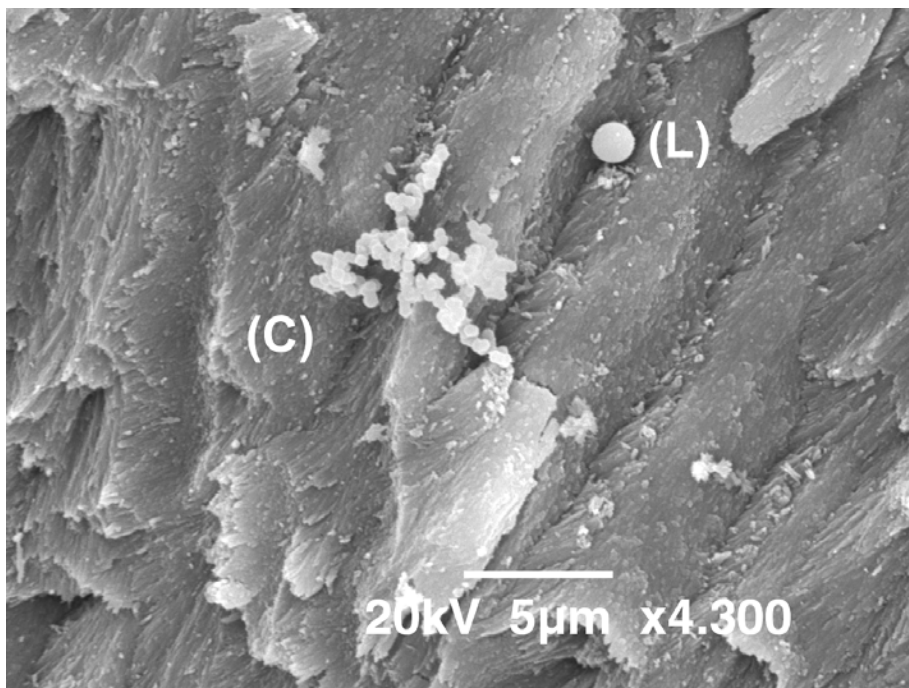


Figura 8 B: Colônia de cocos (c) e levedura (L) no interior do esmalte da lesão inativa da figura 8A.

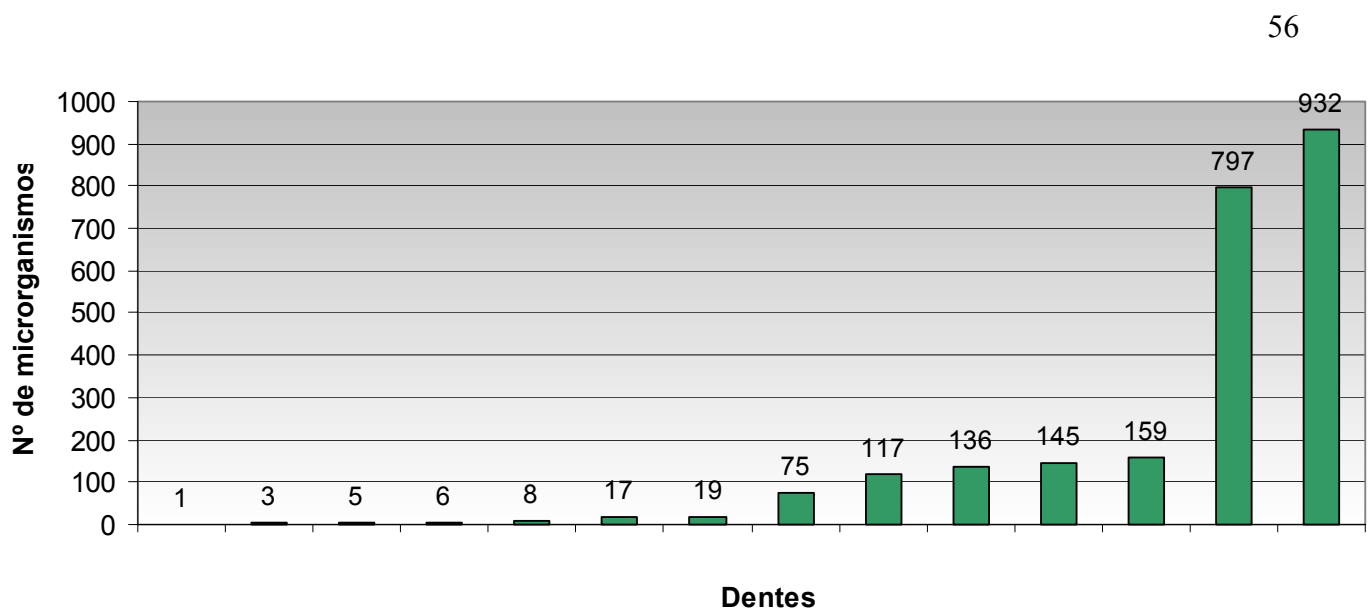


Figura 9: número de microrganismos encontrados em quatorze lesões inativas formadas *in vivo*.

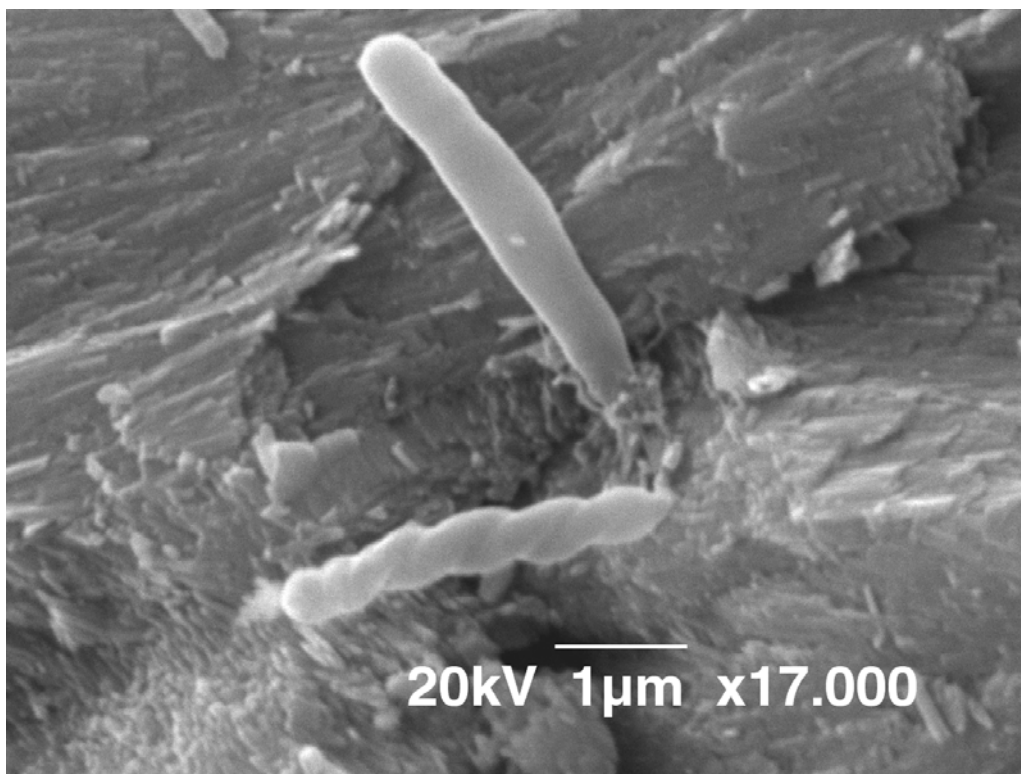


Figura 10 : Microrganismos de formas espiralada e filamentosa em esmalte de lesão inativa.



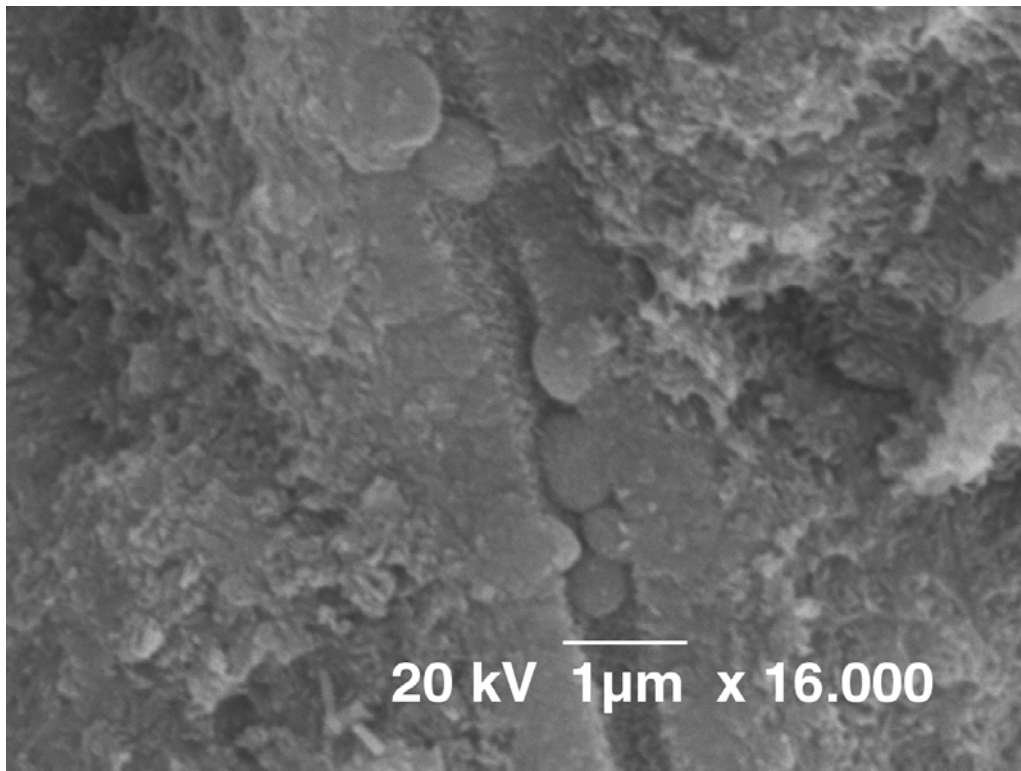


Figura 11: Cocos no interior do túbulo dentinário em lesão inativa

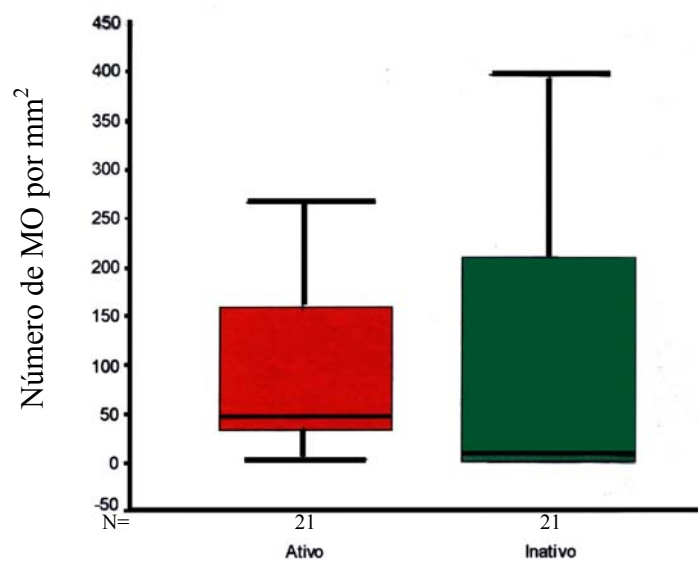


Figura 12 : Mediana e quartis do número de microrganismos por mm<sup>2</sup> nas lesões ativas e inativas com contaminação em esmalte.

## Discussão

O estudo demonstrou que lesões de cárie não cavitadas ativas e inativas apresentam microrganismos no seu interior.

As bactérias mais prevalentes encontradas foram cocos e bacilos. As formas filamentosas e espiraladas estavam presentes em menor proporção. SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN (1985) encontraram cocos e bacilos em sete lesões não cavitadas estudadas sendo essas as formas bacterianas preponderantes. BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980), através de MEV, observaram a presença de cocos, bastonetes e filamentos como integrantes da microbiota no interior da lesão não cavitada. Para FRISBIE e NUCKOLLS (1947), os primeiros microrganismos invasores em lesões cariosas pareciam ser cocos. Com o avanço da lesão em esmalte, os cocos deixam de predominar dando lugar a uma microbiota mais variada, com presença de organismos filamentosos. Leveduras são identificadas, em MEV, como estruturas esféricas maiores que os cocos (LIE, 1977). Microrganismos com uma descrição semelhante a de LIE (1977) foram detectados nas amostras de lesões inativas.

No interior das lesões, os microrganismos apresentavam-se isolados ou formando colônias. O mesmo achado foi observado por SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN (1985) e LUOMA, LUOMA e PELTTARI (1984) na análise de lesões não cavitadas. Cocos formando diplococos estavam presentes somente nas lesões ativas. BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) também constataram microrganismos em divisão na profundidade da lesão. LIE (1977), estudando a formação de placa supragengival, discute a presença de divisão celular como um indicativo de atividade de crescimento bacteriano.

A via de penetração das bactérias para o interior das lesões com preservação da superfície (lesão não cavitada) tem sido extensivamente discutida. Em algumas amostras, canais oriundos da superfície em direção ao interior do esmalte apresentam-se preenchidos por microrganismos indicando uma possível porta de entrada bacteriana. BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) encontraram poros de 10-20  $\mu\text{m}$  de profundidade da superfície para o interior da lesão que poderiam ser uma rota para a entrada de microrganismos. Segundo LUOMA, LUOMA e PELTTARI (1984) as bactérias seriam capazes de penetrar o esmalte através de irregularidades de desenvolvimento ou mesmo defeitos na superfície. SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN (1985) não encontraram orifícios focais contendo bactérias na superfície do esmalte que indicassem essa estrutura anatômica como a responsável pela penetração bacteriana. GOTTLIEB (1944) acredita que a lamela poderia servir como caminho para as bactérias da superfície do esmalte até a dentina. SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN (1985) não identificaram lamelas no esmalte dentário de lesões incipientes analisadas em MEV, o que sugere a não exigência do envolvimento dessa estrutura na contaminação das amostras estudadas. No presente trabalho, em vinte e quatro lesões examinadas não foram observadas lamelas nas zonas contaminadas. BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) observaram que os microrganismos presentes no interior do tecido seguiam a orientação dos prismas do esmalte. Esse achado parece demonstrar que os canais para invasão bacteriana podem situar-se entre os prismas e o esmalte interprismático, onde a resistência ao ácido produzido pelas bactérias é menor (BRÄNNSTRÖM *et al.* 1980). O espaço alargado entre os prismas em lesões não cavitadas (PALAMARA *et al.*, 1992) apresenta tamanhos variados de 0,3  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  em comparação a tamanhos de 0,05

$\mu\text{m}$  a  $0,2 \mu\text{m}$  no esmalte hígido (HAIKEL, FRANK e VOEGEL 1983). Os poros criados com o processo de desmineralização apresentam tamanhos suficientes para permitir a entrada de bactérias no interior do tecido, como evidenciado nas Figuras 4B e 5A.

Em algumas bactérias observam-se estruturas unindo-as entre si e ao tecido dentário (Figuras 5B e 6). Durante a formação da placa supragengival, LIE (1977) visualizou em MEV material extracelular produzido pelas bactérias formando fios que as unem entre si e ao próprio dente. PERRONE, GFELL e GREGORY (1997) encontraram fímbrias na superfície celular de estreptococos do grupo mutans através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) com aproximadamente 100-200 nm de comprimento. Nessas fímbrias, a adesina P1 estava presente caracterizando sua função de adesividade.

As bactérias presentes no esmalte são capazes de destruí-lo, criando lojas no tecido dentário (Figura 4B). Vários trabalhos encontraram bactérias encravadas no prisma do esmalte, assim como lojas vazias indicando a remoção do microrganismo durante a clivagem da amostra (LUOMA, LUOMA e PELTTARI 1984; BRÄNNSTRÖM *et al.*, 1980; SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN 1985). BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) compara a ação dessas bactérias no interior do tecido com a de osteoclastos dentro das lacunas de Howship removendo o tecido ósseo. A presença de lacunas no interior do esmalte dentário é uma evidência da capacidade das bactérias em destruir diretamente a apatita dental (SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN, 1985).

Apesar de trabalhos mostrarem penetração bacteriana em lesões de cárie clinicamente não cavitadas (SEPPÄ, ALAKUIJALA e KARVONEN 1985;

LUOMA, LUOMA e PELTTARI, 1984; BRÄNNSTRÖM *et al.*, 1980), geralmente se associa a invasão bacteriana ao estágio de cavitação (MJÖR e SILVERSTONE, 1993). LUOMA, LUOMA e PELTTARI (1984) discutem o fato de lesões não cavitadas em dentes humanos encontrarem-se geralmente não contaminadas quando analisadas em microscopia. Esse fato pode ser explicado em virtude da labilidade das bactérias no interior do tecido. Para esses autores, a autólise dos microrganismos tende a destruir o arcabouço das bactérias mortas, que não mais são identificadas no tecido dentário. As bactérias só seriam visualizadas nas fases agudas da lesão. No entanto, as amostras estudadas em MEV demonstraram bactérias mesmo em lesões inativas. Contudo, deve-se salientar que a técnica de MEV não permite avaliar a viabilidade e a vitalidade bacterianas, e há a possibilidade de estarmos avaliando apenas o arcabouço de bactérias mortas. LIHOSSIER, GAJARDO e OLAVARRIA (1996), estudando a paleomicrobiologia de remanescentes bacterianos preservados em cálculo dental de população primitiva (500-12.000 anos) observaram, em MEV, formas bacterianas bacilares, filamentosas, espiraladas e cocoides que, em MET, apresentavam apenas suas paredes celulares mantidas.

Contradizendo os achados de BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) e THYLSTYRUP e QVIST (1987), foi encontrado um número não estatisticamente diferente de bactérias no interior das lesões ativas e inativas. A clivagem das amostras, utilizada no presente estudo, permite a análise de apenas um plano das lesões. Portanto, essa quantificação não é representativa do número total de microrganismos existentes e foi utilizada somente com o objetivo de comparação da prevalência de bactérias nas lesões ativas e inativas.

A invasão bacteriana das lesões não cavitadas inativas em cinco dos casos estudados atingiu a dentina. As bactérias foram encontradas na dentina intertubular (Figuras 7B e 7C), isoladas ou formando colônias, e no interior dos túbulos dentinários (Figura 11). Para FRISBIE e NUCKOLLS (1947), a invasão inicial em dentina se daria no interior dos túbulos para, depois, com a desmineralização da dentina peritubular, atingir a dentina intertubular. Os autores acreditavam, em 1947, que a contaminação das lesões não cavitadas restritas ou inativas apresentavam progressão lenta porém com aumento contínuo da área da lesão até envolver, finalmente, a dentina. Nesse tecido, devido ao maior conteúdo orgânico, a progressão seria rápida. A manutenção da camada superficial mais rígida não impediria a continuação do processo a partir do centro de infecção. A remoção de tecido dentário tem sido recomendada sempre que as bactérias se encontrarem dentro da lesão (WOLINSKY, 1994). Essa preocupação também é demonstrada por BRÄNNSTRÖM *et al.* (1980) quando discute a capacidade das bactérias na junção amelo dentinária (JAD) em se espalhar lateralmente. Os autores afirmam que os clínicos deveriam, portanto, sempre ter presente a importância de remover as estruturas afetadas na JAD para reduzir o risco de cárie secundária. Essa afirmativa considera a remoção das bactérias do interior do tecido como única possibilidade de paralisação do processo. Entretanto, observações clínicas, já em 1966, demonstraram que lesões não cavitadas podem ser controladas permanecendo como lesões inativas ou, até mesmo, desaparecendo (BACKER DIRKS, 1966). Mais recentemente, estudos clínicos demonstraram que a superfície rugosa e esbranquiçada de lesões não cavitadas ativas podem modificar sua textura e aspecto (HOLMEN, ÅRTUN e THYLSTRUP, 1987), diminuir de tamanho (ÅRTUN e THYLSTRUP, 1986) ou desaparecer.

### **Conclusões**

- A contaminação dos tecidos dentários pode ocorrer antes da lesão apresentar-se cavitada.
- Foram observados microrganismos tanto em lesões não cavitadas ativas como nas inativas.
- A penetração bacteriana, nas lesões não cavitadas, pode atingir a dentina.

### Referências Bibliográficas

- ARTUN, J.; THYLSTRUP, A. Clinical and scanning electron microscopic study of surface changes of incipient caries lesions after debonding. **Scand J Res**, Copenhagen, v.94, n.3, p.193-201, June 1986.
- BACKER DIRKS, O. B. Posteruptive changes in dental enamel. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.45, n.3, p.503-511, May 1966.
- BRÄNNSTRÖM, M. et al. Invasion of microorganisms and some structural changes in incipient enamel caries. **Caries Res**. Basel, v.14, n.5, p.276-284, Sep/Oct. 1980.
- FRISBIE, H.; NUCKOLLS, J. Caries of the enamel. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.26, n.3, p.181-202, June 1947.
- FUSAYAMA, T. Two layers carious dentin diagnosis and treatment. **Oper Dent**, Washington, v.4, n.2, p.63-70, Spring. 1979.
- GOTTLIEB, B. Dental caries, **J. Dent. Res.**, St Louis, v. 23, n.16, p.141-150. 1944.
- HAIKEL, Y.; FRANK, R. M.; VOEGEL, J. C. Scanning electron microscopy of the human enamel surface layer of incipient carious lesions. **Caries Res**. Basel, v.17, n.1, p.1-13, Jan-Feb. 1983.
- HOLMEN, L.; THYLSTRUP, A.; ÅRTUN, J. Surface changes during the arrest of active enamel carious lesions in vivo: a scanning electron microscope study. **Acta Odont Scand**, Oslo, v.45, n.6, p.383-390, 1987.
- HURST, V.; NUCKKOLS, J.; FRISBIE, E. In vitro studies on the initiation of enamel caries II. Failure of certain bacteria to penetrate the enamel in nonacid environment. **Oral Pathology**, St. Louis, v.6, n.10, p.1236-1238, Oct. 1953.
- LIE, T. Early dental plaque morphogenesis. **J. Periodontal Res**, Munksgaard, v.12, n.2, p.73-89, Mar. 1977.
- LINOSSIER, A.; GAJARDO, M.; OLAVARRIA, J. Paleomicrobiological study in dental calculus: streptococcus mutans, **Scanning Microscopy**, Chicago, v.10, n.4, p.1005-1014. 1996.
- LUOMA, A. R.; LUOMA, H.; PELTTARI, A. Microbial invasion and subsurface colonization of rat enamel in early fissure caries observed by scanning electron microscopy. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.92, n.2, p.120-126, Apr. 1984.
- PALAMARA, J. et al. Ultrastructure of the intact surface zone of white spot and brown spot carious lesions in human enamel. **J Oral Pathol**, Oxford, v.15, n.1, p.28-35, Jan. 1992.



PERRONE, M.; GFELL, L.E.; GREGORY, R.L. Evaluacion de los niveles de la adhesina p1 em fimbrias de Streptococcus Mutans aisladas de pacientes susceptibles y resistentes a la caries dental. **Acta Odont. Venezolana**, Caracas, v.35, n.1, p.16-24, Enero/Abril 1997.

SEPPÄ, L.; ALAKUIJALA, P.; KARVONEN, I. A scanning electron microscopi study of bacterial penetration of human enamel in incipient caries. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.30, n.8, p.595-598, Aug. 1985.

SILVERSTONE, L.M.; MJÖR, I. Cárie dental. In: HÖRSTED.; BINDSLEV, P.; MJÖR, I. **Dentística Operatória Moderna**. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1993. 306p. Cap.2, p.16-54 .

THYLSTRUP, A.; QVIST, U. Principal enamel and dentine reactions during caries progression. In: THILSTRUP, A.; LEACH, S.A.; QUIST, U. Dentine reactions in the oral cavity. Oxford: IRL Press, 1987, p.293-300.

WOLINSKY, L.E. Caries and cariology. In: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M.G. Oral microbiology and immunology. Philadelphia: Saunders,1994. 477p. Cap.27, p.341-359.

**ANEXO 1**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Odontologia  
Programa de Pós Graduação  
Mestrado em Clínica Odontológica: Cariologia**

***Consentimento Informado***

- I- Justificativa e objetivo: O objetivo da pesquisa é avaliar ao microscópio eletrônico de varredura a penetração bacteriana em lesões não cavitadas
- II- Procedimentos que serão realizados: Os participantes utilizarão aparelho ortodôntico removível com 5 janelas de 4X4X3 em acrílico onde será colocado um bloco de esmalte. Sobre essas janelas será colocada uma fina tela plástica para retenção de placa sobre os blocos
- III- Riscos ou desconfortos: Pode haver desconforto pelos horários que devem ser seguidos de gotejamento de sacarose fora da boca sobre os blocos
- IV- Benefícios esperados: Obtenção de lesões ativas de cárie
- V- Acompanhamento e Assistência: os participantes do estudo receberão atendimento odontológico no caso de necessidade durante o período do experimento

Pelo presente consentimento informado, declaro que fui orientado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coação, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente projeto de Pesquisa.

Fui informado

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa,
- da liberdade de me retirar da pesquisa a qualquer momento
- da segurança de que não serei identificado e que as informações concedidas com respeito a minha privacidade não serão reveladas
- do compromisso de proporcionar informações atualizadas obtida durante o estudo, ainda que essa possa afetar a minha vontade em continuar participando;

Os pesquisadores responsáveis pela pesquisa são Prof. Marisa Maltz e Clarissa Fatturi

Participante:

Assinatura

Data:

Esse consentimento será impresso em duas cópia sendo um de propriedade do participante da pesquisa e a Segunda de propriedade do pesquisador responsável