

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ANÁLISE EM MICROSCOPIA CONFOCAL DA VIABILIDADE BACTERIANA
APÓS A REMOÇÃO TOTAL DE TECIDO CARIADO**

ALESSANDRA CRISTINA DAMO

Porto Alegre

2010

ALESSANDRA CRISTINA DAMO

**ANÁLISE EM MICROSCOPIA CONFOCAL DA VIABILIDADE BACTERIANA
APÓS A REMOÇÃO TOTAL DE TECIDO CARIADO**

Trabalho de Conclusão apresentado à Comissão de Graduação do
Curso de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como pré-requisito para obtenção do Grau de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marisa Maltz

Porto Alegre

2010

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Resumo | 04 |
| Abstract | 05 |
| Introdução | 06 |
| Materiais e Métodos | 07 |
| Considerações éticas..... | 07 |
| Procedimento clínico..... | 07 |
| Coleta da amostra..... | 08 |
| Análise da viabilidade bacteriana..... | 08 |
| Resultados | 10 |
| Discussão | 12 |
| Conclusões | 14 |
| Referências | 15 |

ARTIGO

Análise em Microscopia Confocal da Viabilidade Bacteriana Após a Remoção Total de Tecido Cariado

*Alessandra Cristina Damo¹, Luciana Bitello Firmino², Marcelo Lazzaron Lamers³,
Clarissa Fatturi Parolo⁴, Marisa Maltz⁵*

¹Aluna do curso de Graduação em Odontologia da FO-UFRGS*, Porto Alegre, Brasil e bolsista de iniciação científica, FAPERGS*, Porto Alegre, Brasil;

²Mestranda do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, FO-UFRGS*, Porto Alegre, Brasil;

³ Professor Adjunto do Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS-UFRGS**, Porto Alegre, Brasil

⁴ Professora Adjunta do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, FO-UFRGS*, Porto Alegre, Brasil;

⁵ Professora Titular do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, FO-UFRGS*, Porto Alegre, Brasil;

*Faculdade de Odontologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

** Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vivo*, a quantidade e a viabilidade bacteriana após a remoção total de tecido cariado através da Microscopia de Varredura a Laser Confocal (MVLC). Foram selecionados 4 pacientes apresentando lesão de cárie restrita a superfície oclusal de molares permanentes localizadas radiograficamente em terço médio de dentina. Nesses dentes foi realizada a remoção total de tecido cariado (RTTC) e selamento provisório da cavidade. Durante o atendimento clínico foi coletada uma amostra dentina inicial e uma amostra de dentina após a RTTC, que foram transportadas com RTF para análise MVLC. As amostras foram coradas com

SYTO9 e iodeto de propídeo. A quantidade bacteriana foi classificada com os escores: 0= ausência de bactérias e de + até ++++ de acordo com a quantidade e a viabilidade bacteriana nos escores: 0 = sem viabilidade; 1 = < 10% ; 2 = >10% a 50%<; 3 = >50% a 90%<; 4 = >90%. A dentina cariada superficial apresentou grande quantidade de bactérias ++++, porém a taxa de viabilidade bacteriana foi < 10%. Após a remoção total de tecido cariado as amostras de dentina apresentaram uma diminuição na quantidade de bactérias (+ até +++), observando-se um aumento na proporção de bactérias viáveis (de < 10% até >50% a <90%). O método de Microscopia de Varredura a Laser Confocal, além de mostrar a quantidade de bactérias presentes após a RTTC, diferenciou as bactérias viáveis das não viáveis. Podendo ser utilizado na avaliação das terapias clínicas de atividade cárie.

PALAVRAS-CHAVE: Remoção total de dentina cariada; viabilidade bacteriana; microscopia confocal.

Abstract

The aim of this study was to evaluate *in vivo* the amount and bacterial viability after complete removal of caries using Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Four patients were selected with carious lesions restricted to the occlusal surface of permanent molars located radiographically in the middle third of dentin. In total removal of caries (RTTC) was performed temporary followed by sealing of the cavity. During clinical treatment, dentin samples were collected before and after RTTC, which were transported with RTF for analysis in CLSM. The samples were stained with propidium iodide and SYTO9. The bacterial quantity was scored from + to ++++ and the bacterial viability scores were: 0 = no viability, 1 = < 10%; 2 = >10% to 50%<; 3 = >50% to 90%<; 4 = >90%. The dentine surface showed a great amount bacteria ++++, but the rate of bacterial viability was <10%. After the complete removal of carious tissue samples of dentin showed a decrease in the amount of bacteria (+ to +++), however observed an increase in the proportion of viable bacteria (<10% and >50% to 90%<). Was observed the method of Confocal Laser Scanning Microscope besides showing the amount of bacteria present

after the RTTC, was able to differentiate viable bacteria from non-viable. This can be used in the evaluation of clinical therapies for bacterial carious.

KEYWORDS: Complete removal of carious dentin; bacterial viability; confocal microscopy

Introdução

A odontologia restauradora tradicional baseia-se na remoção total de tecido cariado (RTTC) como sendo um passo essencial no tratamento de lesões de cárie dentinária (Weerheijm *et al.* 1999). O objetivo deste método é a remoção de toda dentina amolecida, descolorida e infectada para prevenir a atividade cariogênica e propiciar uma base bem mineralizada da dentina para a colocação do material restaurador (Thompson *et al.*, 2008). Assim o critério mais utilizado para guiar a remoção do tecido cariado é baseado na dureza, sendo este considerado critério subjetivo (Nyvad; Fejerskov, 1986; Iost *et al.*, 1995).

A remoção de toda dentina cariada através do critério clínico de dureza não assegura a remoção total dos microrganismos. Estudos como o de Iost *et al.* (1995), não encontraram relação entre dureza residual do tecido dentinário e a contaminação bacteriana após a completa remoção de dentina pelo critério de dureza. MacGregor, Marsland e Batty (1956) em seus estudos bacteriológicos e histológicos, concluíram que 49% das cavidades tratadas apresentavam presença bacteriana, mesmo após a remoção completa de tecido cariado. Achados semelhantes foram observados por Shovelton e colaboradores (1968) em estudos histológicos, onde encontraram 36% de contaminação bacteriana após a remoção de todo o tecido amolecido. Mais recentemente, estudos utilizando cultivo observaram então 25-50% das amostras com microrganismos viáveis após a remoção de todo o tecido amolecido da cavidade de cárie (Orhan *et al.* 2008; Lula *et al.* 2009).

No entanto, a técnica de cultivo pode subestimar o número de microrganismos devido à existência de espécies bacterianas não cultiváveis em ambientes artificiais e a sensibilidade da técnica laboratorial (Banerjee, Yasseri *et al.*, 2002; Hoefel, Grooby *et al.*, 2003; Saegeman, De

Vos *et al.*, 2007). Barnejee e colaboradores (2002) demonstraram em seu método, utilizando microscopia de fluorescência, a existência de uma maior quantidade de bactérias em dentina cariada quando comparado ao método tradicional de cultivo de células. Eles observaram a presença de $0,34 \times 10^6$ colônias de bactérias por miligrama de dentina após a remoção total de tecido cariado. Já nos trabalhos com cultivo observaram crescimento ao redor de 10^3 UFC (unidades formadoras de colônia) por miligrama de dentina (Orhan *et al.* 2008; Lula *et al.* 2009).

A Microscopia de Varredura a Laser Confocal (MVLC) tem sido utilizada para análises de viabilidade bacteriana de biofilmes dentais (Zaura-Arite, Van Marle *et al.*, 2001; Vitkov, Hannig *et al.*, 2005). Zapata e colaboradores (2008) em estudo avaliando a possibilidade de detecção microbiana *in situ* de bactérias vivas e mortas, concluíram ser a MVLC uma técnica efetiva na determinação da viabilidade bacteriana na dentina infectada (Zapata, Bramante *et al.*, 2008). Segundo Sunde e colaboradores (2003), a MVLC permite reconstrução tridimensional e, através da possibilidade de seccionamento óptico, permite a observação e localização exata da distribuição espacial de bactérias (Sunde, Olsen *et al.*, 2003).

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade bacteriana *in vivo* na dentina superficial e após a remoção total de tecido cariado de molares permanentes, através da Microscopia de Varredura a Laser Confocal.

Materiais e Métodos

Este estudo clínico transversal qualitativo constitui-se de uma amostra de 4 molares permanentes com lesão de cárie restrita a superfície oclusal, localizadas radiograficamente em terço médio de dentina, provenientes de quatro pacientes que procuraram atendimento na Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Considerações Éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRGS e os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Procedimento Clínico

Os pacientes foram submetidos aos seguintes procedimentos clínicos: 1) anestesia e isolamento absoluto do campo operatório; 2) acesso à lesão com broca de alta rotação; 3) remoção de amostra de dentina com colher de dentina 4) remoção de tecido infectado com colher de dentina; 5) remoção total de tecido cariado das paredes circundantes e da parede pulpar com broca esférica de baixa rotação 6) desinfecção do campo operatório com álcool iodado 0,05% ao redor do dente; 7) lavagem da cavidade com soro fisiológico, e secagem com bolinha de algodão autoclavada; 8) coleta de amostra de dentina com colher de dentina para análise; 9) proteção da parede pulpar, com cimento de hidróxido de cálcio (Dycal[®], Dentisply, Rio de Janeiro, Brasil) 10) Selamento da cavidade com cimento de ionômero de vidro (Vitromolar[®], DFL, Rio de Janeiro, Brasil).

Coleta da amostra

As amostras de dentina foram coletadas por meio de colher de dentina estéril compatível com o tamanho da cavidade e armazenadas em tubos de reação com 50 µl de meio de transporte reduzido (RTF) (Loesche, 1972).

Análise da viabilidade bacteriana

A amostra de dentina coletada foi transportada ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS), em recipiente de isopor com gelo. As amostras foram removidas dos tubos de reação através de filtração (filtro de papel esterilizado) e foram colocadas em aparatos de base de lamínula de vidro com 20 mm de diâmetro e espessura de 0,17 mm.

Para a determinação da viabilidade bacteriana, foi utilizado o kit “Life/ Death” (BacLight[™] kit L- 13152; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Este kit é composto por dois marcadores de ácidos nucleicos: SYTO9 e o iodeto de propídeo. O SYTO9 (excitado a 488 nm e emitido a 525 nm) penetra tanto nas bactérias viáveis quanto nas não-viáveis, enquanto o iodeto de propídeo (excitado a 488 nm e emitido a 560nm) penetra somente em bactérias com membrana plasmática danificada. Desta forma, a bactéria que incubada na presença dos dois

marcadores, simultaneamente, fluorescerá na cor verde, se viável, e na vermelha, se inviável (Vitkov, Hannig *et al.*, 2005). A quantidade de corante utilizada foi na proporção de 1:1, sendo o volume final de 50 μ l

Foi realizada uma análise topográfica da amostra de dentina, através de cortes. Os cortes foram feitos na espessura de 0,50 μ m. Foram feitas imagens de 2 campos da dentina inicial com aumento de 60x, com espessura total de 20 μ m, totalizando 40 cortes. Após foi realizado um zoom de 3x em cada campo selecionado. Nas amostras de remoção total de tecido cariado foram feitas imagens de 4 campos considerados significativos em relação ao número de bactérias no aumento de 60x, com espessura total de 20 μ m, totalizando 40 cortes. Após, foi realizado o zoom de 3x de três áreas consideradas mais significativas em relação ao número de bactérias viáveis. Um único pesquisador treinado realizou a classificação dos campos com bactérias. Estas áreas de zoom foram utilizadas para confirmação de visualização bacteriana.

As amostras foram analisadas através da visualização da fluorescência das células bacterianas coradas utilizando-se a Microscopia de Varredura a Laser Confocal (Zaura-Arite, Van Marle *et al.*, 2001; Vitkov, Hannig *et al.*, 2005; Zapata, Bramante *et al.*, 2008). O microscópio utilizado foi o Olympus FV 1000[®], da marca Olympus-Europa. O software para aquisição de imagens foi o Olympus Fluoview Versão 1.7, sendo as objetivas de análise UPL SAPO 60 x OIL, para o aumento de 60x, e para a de 40x, VPL FLN 40x OIL. Os comprimentos de onda utilizados para análise foram AlexaFluor 488, para análise do verde e AlexaFluor 546 para análise do vermelho.

As imagens obtidas pela microscopia foram visualizadas através do programa OLYMPUS FV 1000 Viewer 2.0[®], da marca Olympus-Europa, bem como analisadas pelo programa ImageJ[®]. Utilizando-se destes softwares, foi realizada uma análise qualitativa.

As amostras foram analisadas de acordo com os dois critérios abaixo

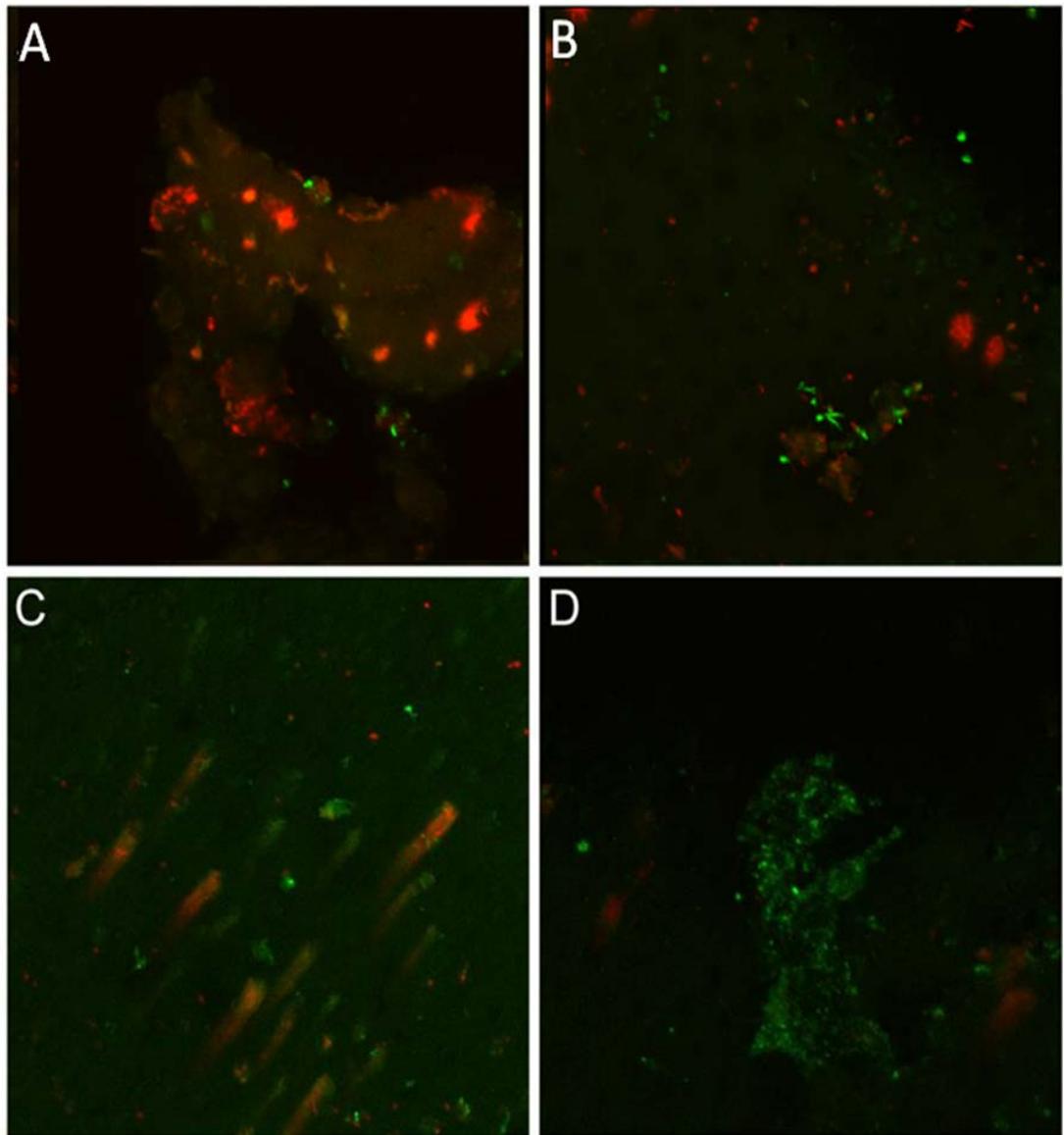
Tabela 1: Critérios para a análise da viabilidade bacteriana em dentina

| Score | Porcentagem de bactérias presentes viáveis |
|-------|--|
| 0 | Ausência |
| 1 | < 10% |
| 2 | >10% e 50%< |
| 3 | >50% e <90% |
| 4 | >90% |

Tabela 2: Critério para análise da quantidade de bactérias:

| Escore | Quantidade de bactérias |
|--------|-------------------------|
| 0 | Ausência |
| + | Muito poucas |
| ++ | Poucas |
| +++ | Regular |
| ++++ | Muitas |

Logo abaixo, estão figuras que mostram exemplos de imagens que ilustram os escores utilizados no trabalho



**Figura 1: Proporção de bactérias viáveis em relação ao total de bactérias:
1.A= < 10% ; 1.B= >10% e 50%< ; 1.C= >50% e 90%< ; 1.D= >90%.**

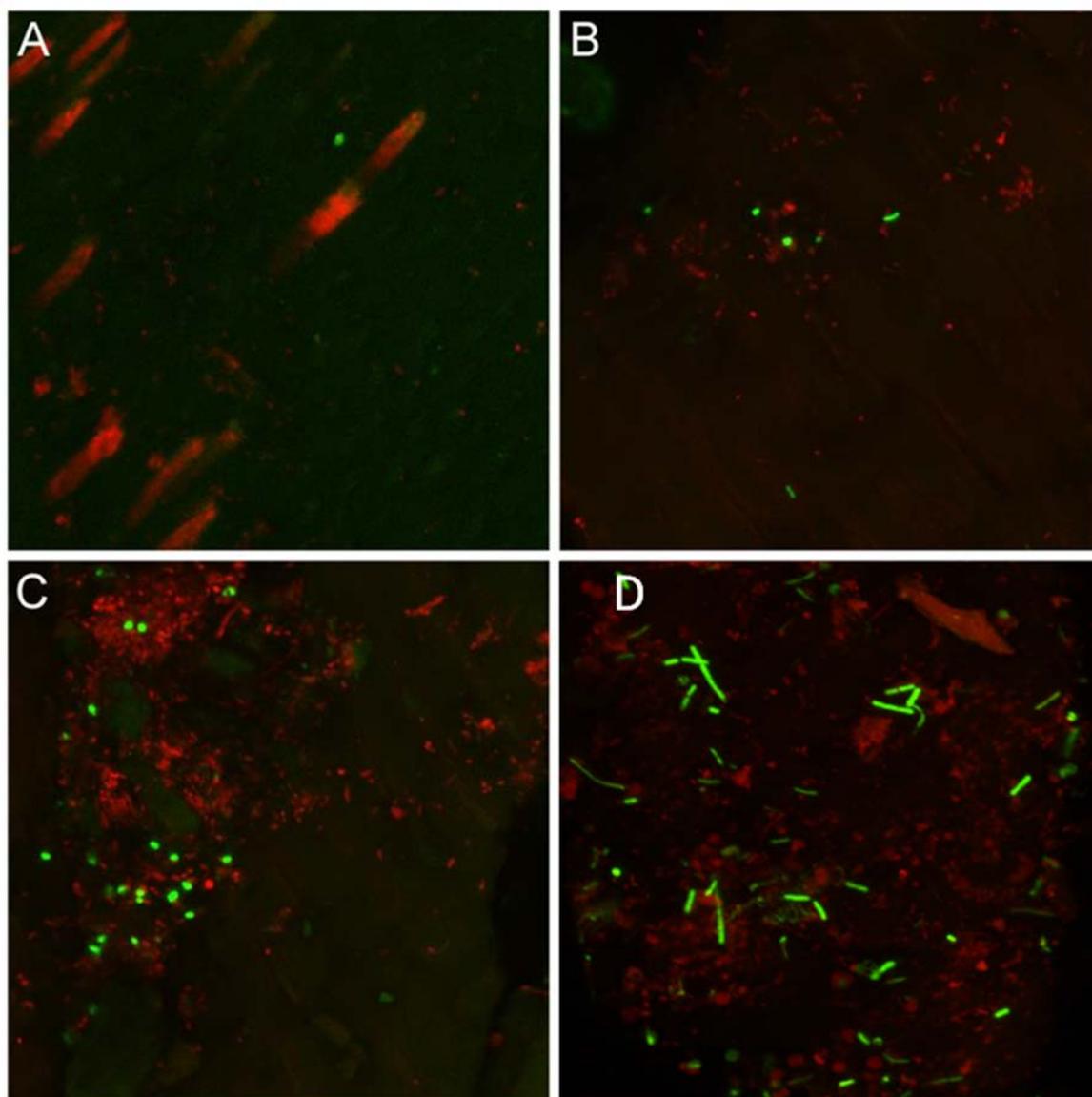


Figura 2: Quantidade de bactérias presentes na dentina.

2. A= + ; 2.B= ++; 2.C= +++; 2.D= ++++.

Resultados

A tabela 3 mostra a quantidade total de bactérias encontradas e a viabilidade bacteriana presente nas amostras de dentina inicial e após a remoção total de tecido cariado.

Tabela 3: Análise da presença e viabilidade bacteriana na dentina inicial e após a remoção total de tecido cariado (RTTC).

| Número de amostras | Quantidade total de bactérias | Viabilidade Bacteriana Viáveis\ Total |
|--------------------|-------------------------------|--|
| Dentina Inicial | | |
| 1 | ++++ | 1 |
| 2 | ++++ | 1 |
| Após RTTC | | |
| 1 | + | 2 |
| 2 | ++ | 1 |
| 3 | +++ | 3 |
| 4 | ++ | 2 |

A dentina cariada superficial apresentou grande quantidade de bactérias +++++, porém a taxa de viabilidade bacteriana foi < 10%. Após a remoção total de tecido cariado as amostras de dentina apresentaram uma diminuição na quantidade de bactérias (+ até +++), observando-se um aumento na proporção de bactérias viáveis (de < 10% até >50% a 90%<).

Discussão

A remoção total de tecido cariado é considerada o padrão-ouro no tratamento de lesões cáries. Entre seus objetivos está propiciar uma base bem mineralizada da dentina para posterior restauração da cavidade (Thompson *et al.*, 2008). Entretanto, mesmo utilizando-se a técnica de remoção total de tecido cariado, objetivando prevenir a atividade cariogênica, bactérias ainda persistem (Lula *et al.* 2009; Orhan *et al.* 2008).

Lula e colaboradores (2009), utilizando em seu estudo o cultivo de bactérias em amostras de dentes decíduos, demonstraram após a RTTC um crescimento bacteriano em 50% das amostras. Já no estudo de Orhan *et al.* (2008), utilizando dentes permanentes analisados igualmente através da técnica de cultivo, o crescimento bacteriano após a RTTC foi para 25,6%

das amostras. Ao analisarmos os resultados do presente estudo, verificamos que todos os dentes submetidos a RTTC, ou seja 100% da amostra, apresentaram bactérias viáveis. Estes resultados demonstram o quanto o método de microscopia confocal é mais sensível na detecção de bactérias.

Em seu estudo utilizando microscopia de fluorescência, Barnejee e colaboradores (2002) demonstraram a existência de uma maior quantidade bacteriana em dentina cariada quando comparado aos métodos convencionais de cultivo de células. Nesse trabalho as células bacterianas deveriam ter sua membrana celular mantida e certo grau de metabolismo intracelular para que as mesmas fossem detectadas. Esse método é melhor para a análise de viabilidade bacteriana do que o cultivo demonstrando um aumento na ordem de 100 vezes. Entretanto é caro e laborioso. O método confocal, a semelhança do método FISH (microscopia de fluorescência *in situ*) detecta as bactérias não cultiváveis. A vantagem adicionais do MVLC associado ao uso do corante “Life an Dead” são possibilitar a visualização da proporção entre bactérias vivas e mortas e a organização espacial das mesmas na dentina. Essa informação é útil no estudo da patogenia da doença cárie assim como de métodos de terapia clínica da atividade cariogênica.

Conclusão

O método de Microscopia de Varredura a Laser Confocal, além de mostrar a quantidade de bactérias presentes após a RTTC, diferenciou as bactérias viáveis das não viáveis. Podendo ser utilizado na avaliação das terapias clínicas de atividade cariogênica.

A técnica de MVLC demonstrou que após a remoção total de tecido cariado todas as amostras apresentaram viabilidade bacteriana.

Referências

- Banerjee, A., M. Yasseri, *et al.* A method for the detection and quantification of bacteria in human carious dentine using fluorescent in situ hybridisation. J Dent, v.30, n.7-8, Sep-Nov, p.359-63. 2002.
- Going, R. E., W. J. Loesche, *et al.* The viability of microorganisms in carious lesions five years after covering with a fissure sealant. J Am Dent Assoc, v.97, n.3, Sep, p.455-62. 1978
- Hoefel, D., W. L. Grooby, *et al.* Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. J Microbiol Methods, v.55, n.3, Dec, p.585-97. 2003
- Iost Hi, C. J., Rodrigues Hh, Rocca Ra. Dureza e contaminação bacteriana da dentina após remoção da lesão de cárie. Rev ABO Nac v.3, n.1, p.25-9. 1995
- Loesche WJ. Hockett RN, Syed SA. The predominant cultivable flora of tooth surface plaque removed from institutionalized subjects. Arch Oral Biol, v.17, p.1311-1326, 1972.
- Lula, E. C., V. Monteiro-Neto, *et al.* Microbiological analysis after complete or partial removal of carious dentin in primary teeth: a randomized clinical trial. Caries Res, v.43, n.5, p.354-8. 2009.
- Macgregor a, M. E., Batty I. Experimental studies of dental caries. I. The relation of bacterial invasion to softening of the dentin. Br Dent J v.101, n.7, p.230-5. 1956
- Nyvad, B.; Fejerskov, O. Active Root Surface Caries Converted into Inactive Caries as a Response to Oral Hygiene. Scand. J. Dent. Res., v. 94, no.3, June, p. 281-284, 1986.
- Orhan, A. I., F. T. Oz, *et al.* A clinical and microbiological comparative study of deep carious lesion treatment in deciduous and young permanent molars. Clin Oral Investig, v.12, n.4, Dec, p.369-78. 2008
- Saegeman, V. S., R. De Vos, *et al.* Flow cytometric viability assessment and transmission electron microscopic morphological study of bacteria in glycerol. Microsc Microanal, v.13, n.1, Feb, p.18-29. 2007.
- Shovelton, D. S. A study of deep carious dentine. Int Dent J, v.18, n.2, Jun, p.394-404. 1968.
- Sunde, P. T., I. Olsen, *et al.* Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. Microbiology, v.149, n.Pt 5, May, p.1095-102. 2003

Thompson, V., R. G. Craig, *et al.* Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: a critical review. J Am Dent Assoc, v.139, n.6, Jun, p.705-12. 2008.

Vitkov, L., M. Hannig, *et al.* Ex vivo gingival-biofilm consortia. Lett Appl Microbiol, v.41, n.5, p.404-11. 2005

Zapata, R. O., C. M. Bramante, *et al.* Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. J Endod, v.34, n.10, Oct, p.1198-201. 2008

Zaura-Arite, E., J. Van Marle, *et al.* Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. J Dent Res, v.80, n.5, May, p.1436-40. 2001.

Weerheijm KL, Kreulen CM, de Soet JJ, Groen HJ, van Amerongen WE: Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-year in vivo effects. Caries Res; n.4, Jun, p. 130–134. 1999.