
EFECTO DEL FLUORURO DIAMINO DE PLATA EN CARIES INDUCIDA EN RATAS WISTAR

THE EFFECT OF SILVER DIAMINE FLUORIDE ON CARIES INDUCED IN WISTAR RATS

SUSANA VANEGAS¹, ASTRID GODOY¹, LEONIDAS URDANETA², DANIELA OLÁVEZ³,

KARLA PADRÓN³, EDUVIGIS SOLÓRZANO⁴

RESUMEN. Introducción: la caries dental es considerada un problema de salud pública, para su tratamiento se han propuesto diversos biomateriales, entre ellos el uso de la mezcla de fluoruro+nitrato de plata, llamada Fluoruro Diamino de Plata (FDP) con propiedades cariostáticas, remineralizantes y bactericidas utilizado en dientes primarios. Son pocos los estudios que valoran la respuesta del tejido dentario luego de aplicarlo, es por ello que el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del FDP en caries inducidas en ratas Wistar. **Métodos:** se hizo inducción de caries dental en molares de ratas Wistar, inoculándolos con *S. mutans* CVCM656, manteniendo dieta rica en sacarosa durante 12 semanas. Diagnosticadas las caries y distribuidas en grupos control (C1,C2) y experimental (E1,E2), se removió dentina reblandecida de los molares y se topificaron con FDP al 3,8% solo los molares de los grupos experimentales. Finalmente se hizo valoración clínica y toma de muestra para estudio histológico a las 7 y 13 semanas posteriores al tratamiento. **Resultados:** los grupos control registraron aumento del número de lesiones cariosas y progresión de su severidad, mientras que los grupos experimentales no revelaron cambios en estos parámetros, mostrando superficies dentinarias duras y oscuras, el reporte histológico determinó aumento en el espesor de predentina únicamente en los molares de los grupos experimentales. **Conclusiones:** el protocolo de inducción de caries en ratas Wistar fue exitoso; asimismo, el tratamiento con FDP inactivó los procesos cariosos sin que progresaran en severidad ni aumentara el número de caries, siendo estos resultados extrapolables a los humanos.

Palabras clave: caries dental, dientes primarios, Fluoruro Diamino de Plata (FDP), modelo animal.

Vanegas S, Godoy A, Urdaneta L, Olávez D, Padrón K, Solórzano E. Efecto del Fluoruro Diamino de Plata en caries inducida en ratas Wistar. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2014; 26(1): 76-88.

Abstract. Introduction: dental caries is considered a public health problem. Various biomaterials have been suggested for treating it, including fluoride+silver nitrate mix, known as silver diamine fluoride (SDF) which contains cariostatic, remineralizing, and bactericide properties and is used on primary teeth. Only a few studies have assessed the response of dental tissue when this substance is applied; the objective of this study was therefore to determine the effect of SDF on caries induced in Wistar rats. **Methods:** dental caries was induced in Wistar rats' molars by inoculating them with *S. mutans* CVCM656 and feeding them a sucrose-rich diet for 12 weeks. Once caries were diagnosed and sorted out into control groups (C1, C2) and experimental groups (E1, E2), softened dentine was removed from molars; only the molars from experimental groups received a topical application of 3.8% SDF. Finally, clinical assessment was performed and samples were collected for histological study 7 and 13 weeks after treatment. **Results:** the control groups experienced an increased number of carious lesions and progression in severity, while the same parameters in the experimental groups remained unchanged, showing hard dark dentine surfaces. The histological report showed increased predentine thickness in molars from the experimental groups only. **Conclusions:** the protocol of caries induction in Wistar rats was successful. Treatment with SDF deactivated the carious processes, arresting not only severity progression but also the increase in number of caries; these findings may be extrapolated to humans.

Key words: dental caries, primary teeth, Silver Diamine Fluoride (SDF), animal model.

Vanegas S, Godoy A, Urdaneta L, Olávez D, Padrón K, Solórzano E. The effect of Silver Diamine Fluoride on caries induced in Wistar rats. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2014; 26(1): 76-88.

-
- 1 Odontólogo. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. Ejercicio privado de la profesión.
 - 2 Licenciado en Bioanálisis. Magister Scientiae en Microbiología Clínica, Grupo de Investigaciones Biopatológicas/Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular. Profesor de la cátedra de Microbiología Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
 - 3 Odontólogo. Grupo de Investigaciones Biopatológicas/Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular. Profesora de la cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
 - 4 Odontólogo. Doctora en Antropología Biológica. Grupo de Investigaciones Biopatológicas/Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular. Profesora de la cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

-
- 1 DMD. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Dentist in private practice.
 - 2 BA in Bioanalysis. Magister Scientiae in Clinical Microbiology, Biopatology Research/Comprehensive Laboratory of Cellular and Molecular Biology Research Group. Adjunct Microbiology Professor, School of Dentistry, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
 - 3 DMD. Biopatology Research/Comprehensive Laboratory of Cellular and Molecular Biology Research Group. Adjunct Histology Professor, School of Dentistry, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
 - 4 DMD. PhD in Biologic Anthropology. Biopatology Research/Comprehensive Laboratory of Cellular and Molecular Biology Research Group. Adjunct Histology Professor, School of Dentistry, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

RECIBIDO: AGOSTO 13/2013-ACEPTADO: ABRIL 22/2014

SUBMITTED: AUGUST 13/2013-ACCEPTED: APRIL 22/2014

INTRODUCCIÓN

La caries dental como patología de cavidad bucal, es considerada un problema de salud pública. Si bien no representa un peligro potencial para la vida, trae consecuencias importantes, bien sea estéticas, funcionales, dolor, infecciones a distancia y la eventual pérdida dentaria si no es tratada a tiempo. El desarrollo de la caries dental, según la tríada etiológica de Keyes modificada, implica tres factores mantenidos en el tiempo: un hospedador susceptible, una microbiota cariogena localizada en la biopelícula dental y un sustrato adecuado, suministrado por la dieta que sirva de fuente de energía a los microorganismos,¹ y, asimismo, la relación con factores ambientales, socioeconómicos, culturales y genéticos, entre otros.

Tradicionalmente el tratamiento de la caries implicaba terapias poco conservadoras, siguiendo los principios de extensión por prevención diseñados por Black, en los que se involucraba mayor desgaste de tejido dentario sano con el fin de aumentar la retención mecánica del material restaurador. Como alternativa terapéutica se ha propuesto el tratamiento mínimamente invasivo, que ha evolucionado paralelamente con el desarrollo de nuevos biomateriales y que está siendo utilizado en dientes primarios cavitados con la finalidad de mantener la vitalidad pulpar, lo que facilita conservar el espacio, permitiendo el proceso natural de exfoliación y recambio dentario.²

De los materiales más utilizados en la prevención de caries se pueden mencionar los fluoruros, cuyo principal mecanismo de acción es su efecto post-eruptivo, que incluye inhibición de la desmineralización, promoción de la remineralización y actividad antibacteriana.³ Su vía de administración más común es la tópica a través de enjuagues, geles, barnices, dentífricos, colutorios, seda dental, pasta profiláctica y goma de mascar que contienen fluoruro en distintas concentraciones.³ Otras formas de administración masiva son la fluoración del agua de consumo público y los programas de fluoración de la sal de consumo.⁴

INTRODUCTION

As pathology of the oral cavity, dental caries is considered a public health problem. Although it does not represent a potential life hazard, it brings about considerable aesthetic and functional consequences, as well as pain, infections, and eventually, tooth loss if not treated on time. Development of tooth decay, according to Keyes' triad of modified etiology, involves three factors maintained over time: a susceptible host, cariogenic microbiota located on dental biofilm, and a suitable substrate provided by the diet, which serves as a source of energy to microorganisms;¹ in addition, caries is related to environmental, socio-economic, cultural, and genetic factors, to name just a few.

Traditionally, tooth decay treatment has included not-too-conservative therapies, following the principles of extension by prevention designed by Black, which implied greater destruction of healthy dental tissue in order to increase the restorative material's mechanical retention. Minimally invasive treatment has been proposed as alternative therapy, which has evolved in parallel with the development of new biomaterials and is being used in primary cavitated teeth in order to maintain pulp vitality, enabling space conservation and allowing the natural process of exfoliation and tooth replacement.²

Among the materials used for tooth decay prevention are fluorides, whose main mechanism of action is their post-eruptive effect, which includes demineralization inhibition, re-mineralization stimulation, and antibacterial activity.³ They are mostly applied topically via rinses, gels, varnishes, toothpaste, mouthwash, dental floss, prophylactic toothpaste, and chewing gums that contain fluoride in different concentrations.³ Other forms of massive administration are fluoridation of public drinking water and programs of fluoridation of salt for consumption.⁴

Tomando en consideración las características de los fluoruros, se ha propuesto recientemente el uso de una mezcla de fluoruro con nitrato de plata, llamada Fluoruro Diamino de Plata (FDP) para el control de la caries en dientes primarios.⁵ El FDP es una solución tópica cariostática con propiedades remineralizantes y bactericidas que ha sido utilizado en la práctica odontológica de algunos países de América, África y Europa para tratar caries del esmalte y dentina en infantes, de manera no invasiva, siendo su concentración más efectiva al 38%.⁶

Entre las propiedades más resaltantes que se atribuyen al FDP están: aumentar la resistencia del esmalte dental, inhibir la formación de biopelícula dental, disminuir la producción ácida de los microorganismos en la dentina cariada, así como también reducir la proliferación de *S. mutans* y obliterar los canalículos dentinarios expuestos.^{6,7} Por tal motivo, se establece una acción cariostática al impedir el proceso de caries; aunado a esto se ha reportado que la solución de FDP presenta un efecto antimicrobiano, siendo empleado para la asepsia de conductos radiculares, y se ha demostrado *in vitro* que impide la degradación de colágeno en la dentina desmineralizada.⁸

Debido a las propiedades que se le atribuyen y su relativo bajo costo, el FDP resulta ideal para la aplicación masiva,⁵⁻⁹ ya que permite el tratamiento atraumático de la caries especialmente en poblaciones infantiles de zonas rurales o suburbanas, donde el acceso a la atención odontológica es limitado. Asimismo, se han reportado estudios sobre el efecto cariostático del FDP al 38% en dientes primarios, desde el punto de vista clínico y radiográfico;⁹⁻¹¹ sin embargo, pocos estudios valoran estructuralmente la respuesta de los tejidos dentarios luego de aplicar el biomaterial.¹² Es por ello que el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del FDP sobre caries inducidas en ratas Wistar, utilizando este modelo experimental por presentar características histológicas similares al humano,¹³ lo que permitió evaluar clínica e histológicamente la reacción de los tejidos dentarios al exponerlos al FDP.

Taking into account the characteristics of fluorides, a mixture of fluoride and silver nitrate, known as silver diamine fluoride (SDF), has recently been suggested to control caries in primary teeth.⁵ SDF is a topical cariogenic solution with re-mineralizing and bactericidal properties that has been used in the dental practice of some American, African and European countries to treat children's enamel and dentin caries in a non-invasive manner; its most effective concentration is 38%.⁶

Among the most important properties attributed to SDF are: increase resistance of tooth enamel, inhibit dental biofilm formation, decrease acid production of microorganisms in carious dentin, reduce proliferation of *S. mutans*, and obliterate the exposed dentinal tubules.^{6,7} Therefore, it produces a cariogenic action by blocking decay progression; in addition, it has been reported that the SDF solution has an antimicrobial effect, so it is used for root canals asepsis, and *in vitro* studies have shown that it prevents collagen degradation in demineralized dentin.⁸

Due to these properties and its relatively low cost, SDF is ideal for massive application,⁵⁻⁹ since it allows non-traumatic tooth decay treatment, especially in children populations in rural or suburban areas, where access to dental care is limited. Also, some studies have reported the cariogenic effect of 38% SDF in primary teeth, from a clinical and radiographic perspective;⁹⁻¹¹ however, few studies have structurally assessed dental tissues response after applying this biomaterial.¹² Therefore, the objective of the present study was to determine the effect of SDF on caries induced in Wistar rats. This experimental model was used because its histological features are similar to those of humans,¹³ and this allowed to clinically and histologically assess the reaction of dental tissues when exposed to SDF.

MÉTODOS

En la presente investigación de tipo descriptiva con diseño experimental, la muestra estuvo constituida por 40 dientes cariados, luego de la inducción del proceso carioso en 108 molares, pertenecientes a 9 ratas machos de la línea Wistar, con un peso comprendido entre 200 y 250 g, suministradas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA) y mantenidas en sus instalaciones durante el desarrollo del experimento, el cual estuvo enmarcado en los lineamientos éticos establecidos para el manejo de animales de experimentación,¹⁴ y fue avalado por el comité de ética del BIOULA.

Inducción de caries dental en los modelos animales

Previa sedación de las 9 ratas Wistar aplicando 0,5 ml de Ketamina (LabMalgene) por vía intraperitoneal, a una dosis de 5 mg/kg, se evaluó clínicamente la cavidad bucal de cada animal para verificar la ausencia de procesos cariosos. Seguidamente se procedió a limpiar la superficie oclusal de los molares (superiores e inferiores) utilizando cepillos para tomar muestras citológicas, para luego inocular cada molar con la capacidad de colonias de la cepa *S. mutans* CVCM 656, que podía recoger un microaplicador estéril, haciendo una aplicación a la vez y reinoculando con la misma cepa pasadas 24 horas. Adicionalmente, se les suministró a los animales una dieta rica en sacarosa, colocando 15% de azúcar en 500 ml de agua de consumo diario, durante las doce semanas del proceso de inducción de caries.

Durante esta fase de inducción de caries, en aquellos animales que presentaron cualquiera de los síntomas de dolor, tales como pelaje erizado, falta de aseo, alguna pigmentación en los ojos, que no consumían alimento o agua, se aplicó Meloxicam (Vivax) de 1,0 ml por vía subcutánea, 1 vez al día durante 3 días. De igual manera se hicieron dos análisis de sangre para asegurar que no existiera compromiso sistémico por el suministro de azúcar durante esta etapa. Para ello, después de un ayuno nocturno de 12 horas, se obtuvo una muestra de

METHODS

The sample of this descriptive experimental study consisted of 40 decayed teeth after inducing carious process in 108 molars of 9 Wistar male rats, weighing between 200 and 250 g. The rats were provided by the Universidad de Los Andes Animal Laboratory (BIOULA) and maintained in its facilities during the course of the experiment, which followed the ethical guidelines established for the management of experimental animals,¹⁴ and was endorsed by the Ethics Committee of BIOULA.

Induction of dental caries in animal models

After sedating 9 Wistar rats by intraperitoneally applying 0.5 ml of ketamine (LabMalgene) with doses of 5 mg/kg, the oral cavity of each animal was clinically assessed to verify the absence of carious processes. Next, the occlusal surfaces of upper and lower molars were cleansed, brushes were used to take cytological samples, and each molar was inoculated with colonies of *S. mutans* CVCM 656 strain, collected with a sterile brush, making an application at a time and re-inoculating with the same strain 24 hours later. Additionally, the animals were fed a sucrose-rich diet, adding 15% sugar in 500 ml of water for daily consumption during the twelve weeks of the caries induction process.

During this caries induction phase, animals that showed symptoms of pain, such as bristly fur, lack of cleanliness, any kind of eye pigmentation, or that were not consuming food or water, were applied 1.0 ml Meloxicam (Vivax) subcutaneously once a day for 3 days. Similarly, two blood tests were taken to verify the absence of any systemic conditions due to the sugar supply during this stage. To do this, after a 12-hour overnight fasting, a sample of

sangre venosa de la punta de la cola para determinar glicemia (valores normales de referencia ≤ 126 mg/ dL).

Evaluación clínica de la caries dental post-inducción

A las doce semanas de inducción del proceso carioso, se procedió a evaluar nuevamente la cavidad bucal de las ratas Wistar, para determinar el número de molares cariados en cada animal y clasificarlos según el Sistema Internacional para la Detección y Evaluación de Caries (ICDAS, por sus siglas en inglés),¹⁵ registrando los datos obtenidos en la ficha destinada para tal fin. De acuerdo con las caries obtenidas tanto en esmalte como en dentina, se distribuyeron intencionalmente los 9 animales en cuatro grupos de estudio, dos controles (C1 con 2 animales y C2 con 3 animales) y dos experimentales (E1 y E2 con 2 animales cada uno), de manera que en cada grupo había 10 molares cariados con diferentes grados de severidad.

Fase de tratamiento

El FDP (Laboratorios NAF) comercialmente disponible al 38% fue diluido en agua destilada 1:10 y empleado al 3,8%, debido al reporte presentado por Gotjamanos y Maque, quienes señalan lesiones del esmalte dental de ratas Sprague-Dawley consistentes con fluorosis generalizadas, seis semanas después del tratamiento con FDP al 4%.⁶ Es así como, previa realización del protocolo de sedación, se procedió a remover la dentina reblandecida de todos los molares cariados de los 4 grupos de estudio, utilizando un explorador para luego hacer topificaciones con FDP al 3,8% durante 3 minutos, usando un micro-aplicador estéril, y luego una torunda estéril impregnada con agua destilada, procedimiento que se llevó a cabo en los molares de los animales pertenecientes a los grupos experimentales (E1 y E2). Los animales de los grupos control no recibieron ningún tratamiento. Todos los animales se mantuvieron con alimentación *ad libitum* y fue suspendido el suministro de azúcar al 15% en el agua de consumo, con la finalidad de eliminar el sustrato del proceso de inducción.

blood from tip tails was obtained to determine blood sugar level (normal values ≤ 126 mg / dL).

Clinical evaluation following dental caries induction

Twelve weeks after induction of the carious process, the oral cavities of Wistar rats were assessed again to determine the number of decayed molars in every animal and to classify them according to the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS);¹⁵ the obtained data were recorded in a form specifically designed for this purpose. According to the obtained caries in enamel and dentin, the 9 animals were intentionally distributed in four study groups, two control groups (C1 with 2 animals and C2 with 3 animals) and two experimental groups (E1 and E2 with 2 animals each), so that each group had 10 decayed molars with varying degrees of severity.

Treatment phase

A commercial presentation of 38% SDF (NAF laboratories) was diluted in distilled water 1:10 and used at a concentration of 3.8% because of the report by Gotjamanos and Maque, who mention dental enamel lesions in Sprague-Dawley rats consistent with generalized fluorosis six weeks after treatment with 4% SDF.⁶ Following the sedation protocol, the softened dentin from all decayed molars of the four study groups was removed using a probe and then the samples received a topical application of 3.8% SDF for 3 minutes, using a sterile micro-applicator and a sterile swab soaked with distilled water. This procedure was performed on the molars of animals from the experimental groups (E1 and E2). Animals in the control groups were not treated. All animals were fed *ad libitum* and the supply of 15% sugar in water was suspended in order to remove the substrate of the induction process.

Los animales de los grupos C1 y E1 fueron nuevamente evaluados clínicamente a las siete semanas posteriores al tratamiento, y sacrificados utilizando Halotano BP 100% (Omicron) inhalado en una cámara de vidrio de 3 a 5 minutos. Por su parte, los animales de los grupos C2 y E2 se evaluaron a las trece semanas, siendo igualmente sacrificados siguiendo las normas de bioética para el manejo de animales de experimentación.

Estudio histológico

Para el procesamiento histológico de las muestras se disecaron los maxilares utilizando bisturí con hoja #15, y micromotor portátil (Thumb) con discos de bordes de diamante, obteniéndose cuatro fragmentos de cada cuadrante por animal, que se fijaron en formol al 10% en frascos color ámbar debidamente rotulados, durante 48 horas. Posteriormente, se desmineralizaron con ácido nítrico al 8% y se procesaron siguiendo la técnica histológica de rutina, haciendo cortes transversales y longitudinales de un grosor que osciló entre 0,5 a 2 μm en sentido mesio distal, coloreando con hematoxilina-eosina para, finalmente, observar los cortes al microscópico óptico triocular (LEICA®, modelo DNR-HC) con cámara incorporada.

Análisis estadístico

Los datos de la observación clínica de las caries se recolectaron en fichas y se analizaron con el programa estadístico SPSS v.17, haciendo estadística descriptiva y prueba X^2 (*Chi-Cuadrado*), para determinar la asociación de las variables del estudio y establecer la significancia estadística. Los hallazgos histológicos solo se describieron según lo observado.

RESULTADOS

De los 108 molares inoculados con la cepa de *S. mutans* CVCM 656, a las 12 semanas del proceso de inducción de caries, se diagnosticaron 40 molares con lesiones

Animals in groups C1 and E1 were clinically evaluated again seven weeks after treatment and slaughtered using 100% Halothane BP (Omicron) inhaled in a glass chamber for 3 to 5 minutes. On the other hand, animals from groups C2 and E2 were evaluated thirteen weeks after treatment and sacrificed in a similar way, following the bioethics rules for handling experimental animals.

Histological study

For histological processing, the samples' jaws were dissected using a scalpel blade #15 and a portable micromotor (Thumb) with diamond edge discs, obtaining four fragments of each quadrant by animal, which were inserted in 10% formalin in amber bottles properly labeled for 48 hours. Then they were demineralized with 8% nitric acid and processed according to a routine histological technique, making transverse and longitudinal cuts of 0.5 to 2 μm in thickness in mesial-distal direction. The samples were colored with hematoxylin-eosin and observed on an optical trinocular microscope (LEICA®, model DNR-CH) with a built-in camera.

Statistical analysis

The data obtained from the clinical observation of caries were collected on forms and analyzed with the statistical program SPSS v. 17, applying descriptive statistics and X^2 test (Chi square) to determine the association of the study's variables and to establish statistical significance. The histological findings were described according to the observations.

RESULTS

Twelve weeks after the caries induction process, 40 molars of the 108 that were inoculated with the *S. mutans* CVCM 656 strain were diagnosed with

cariosas, que representa el 37% del total de dientes tratados. Las caries identificadas fueron clasificadas considerando el grado de severidad, siguiendo los parámetros de la ICDAS, como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Inducción de caries. Frecuencias de procesos cariosos según la clasificación ICDAS

Descripción clínica de la caries	Código ICDAS ¹	Frecuencia
	1	0
Esmalte opaco y sin brillo	2	4
Esmalte fracturado	3	16
Sombra en dentina subyacente	4	16
Cavidad con dentina visible	5	4
Extensa cavidad con dentina visible	6	0
Total	-----	40

1 Sistema Internacional para la Detección y Evaluación de Caries

Los grupos C1 y E1 fueron evaluados clínicamente a la semana siete posterior al tratamiento, observándose que en el grupo C1 (cavidades NO tratadas con FDP) caries que inicialmente habían sido clasificadas 3 según ICDAS, incrementaron su severidad a 4, mientras que en el grupo E1 (cavidades tratadas con FDP) no hubo aumento del número de lesiones existentes ni progresión de la severidad de las mismas (tabla 2). Asimismo, se logró distinguir la presencia de dentina reblandecida en las muestras del grupo C1, a diferencia de los molares cariados del grupo E1, en los cuales se observó superficie dura y de color oscuro.

carious lesions, representing 37% of the total number of treated teeth. The identified caries were classified considering the degree of severity, following the ICDAS parameters as shown in table 1.

Table 1. Caries induction. Frequency of carious processes according to the ICDAS classification

Clinical description of caries	Code ICDAS ¹	Frequency
	1	0
Opaque dark enamel	2	4
Fractured enamel	3	16
Shade in underlying dentin	4	16
Cavity with visible dentin	5	4
Extensive cavity with visible dentin	6	0
Total	-----	40

1. International Caries Detection and Assessment System

Groups C1 and E1 were clinically evaluated seven weeks after treatment, noting that in group C1 (cavities not treated with SDF) the caries that had initially been classified 3 according to ICDAS increased to 4 in severity, while in group E1 (cavities treated with SDF) there was no increase in the number of existing lesions nor progression in their severity (table 2). Also, presence of softened dentin was observed in samples from group C1, unlike the decayed molars from group E1, which showed a hard dark surface.

Tabla 2. Relación cronológica de incidencia y progresión de caries según código ICDAS*

Grupo	Inducción Caries						Semana 7 Post Tratamiento						Semana 13 Post Tratamiento					
	Lesiones cariosas código ICDAS						Lesiones cariosas código ICDAS						Lesiones cariosas código ICDAS					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
C1	0	1	4	4	1	0	0	1	1	7	1	0						
E1	0	1	4	4	1	0	0	1	4	4	1	0						
C2	0	1	4	4	1	0							0	0	8	6	5	1
E2	0	1	4	4	1	0							0	1	4	4	1	0

* Sistema Internacional para la Detección y Evaluación de Caries

Table 2. Chronological relation of caries incidence and progression according to ICDAS code*

Group	Caries induction						Week 7 Post-treatment						Week 13 Post-treatment					
	Cariou lesions ICDAS code						Cariou lesions ICDAS code						Cariou lesions ICDAS code					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
C1	0	1	4	4	1	0	0	1	1	7	1	0						
E1	0	1	4	4	1	0	0	1	4	4	1	0						
C2	0	1	4	4	1	0							0	0	8	6	5	1
E2	0	1	4	4	1	0							0	1	4	4	1	0

* International Caries Detection and Assessment System

En la semana 13 se hizo la evaluación clínica de los grupos C2 y E2, donde se evidenció que el grupo C2 presentó 10 nuevas lesiones cariosas, 8 de las cuales fueron a nivel de esmalte (severidad 3) y 2 a nivel de dentina (severidad 4 y 5). Además 5 de las caries reportadas al inicio como 2, 3, 4 y 5, progresaron en severidad a 4, 5 y 6 con presencia de dentina reblandecida (figura 1). El grupo E2 se mantuvo sin cambios en el número de lesiones cariosas y en la progresión de las cavidades existentes, observándose las superficies dentinarias duras y de color oscuro (tabla 2). La prueba *Chi-Cuadrado* (X^2) demostró significancia estadística en la asociación entre efectividad del FDP y proceso carioso en ambas evaluaciones clínicas, a la semana siete con un valor $p = 0,000$ y a la semana trece con un valor $p = 0,003$.

The clinical evaluation of groups C2 and E2 was done by week 13, noting that group C2 presented 10 new carious lesions, 8 of which were on enamel (severity 3) and 2 on dentin (severity 3 and 5). In addition, 5 caries initially reported as 2, 3, 4 and 5 progressed to 4, 5 and 6 in severity with presence of softened dentine (figure 1). Group E2 remained unchanged in number of carious lesions and in progression of existing cavities, showing hard dark dentine surfaces (table 2). The Chi-square test (X^2) showed statistical significance in terms of SDF effectiveness-carious process association in both clinical evaluations, with a p-value = 0.000 by week seven and a p-value = 0.003 by week thirteen.



Figura 1. Mandíbula disecada de una muestra del grupo C2. Se observan los molares cariados. La flecha indica una caries que progresó de ICDAS 3 a ICDAS 4 en las 13 semanas de experimento

Figure 1. Dissected jaw of a sample from group C2. Molars are decayed. The arrow indicates a caries that progressed from ICDAS 3 to ICDAS 4 during the 13 weeks of the experiment

Desde el punto de vista histológico, no se observaron diferencias entre los grupos control y experimental a nivel de tejidos duros; sin embargo se destaca la reacción del tejido pulpar en las muestras estudiadas de ambos grupos, donde se evidenció aumento de la celularidad, especialmente de tipo plasmocitos, prevalencia de infiltrado inflamatorio de tipo crónico (polimorfonuclear), fibrosis y angiogénesis. Por otra parte, es importante resaltar que los grupos E1 y E2 mostraron la presencia de una capa de predentina de mayor espesor que en los molares de los grupos control (figura 2), que se evidencia tanto en la primera como en la segunda evaluación histológica, mientras que en los molares cavitados no tratados con FDP el espesor de la predentina se observó sin cambios, al menos hasta las 13 semanas después de la eliminación del proceso carioso.

From the histological point of view, there were no differences between control and experimental groups in terms of hard tissue; however, it is important to mention the reaction of pulp tissue in the studied samples of both groups as it showed increased cellularity (plasmocytes in particular), prevalence of chronic inflammatory infiltrate (polymorphonuclear), fibrosis and angiogenesis. It is also important to highlight that groups E1 and E2 showed a thicker predentine layer compared to that of molars in control groups (figure 2), which was evident in both the first and the second histological evaluations, while in the cavitated molars not treated with SDF, predentine thickness remained unchanged, at least until 13 weeks after removing the carious process.

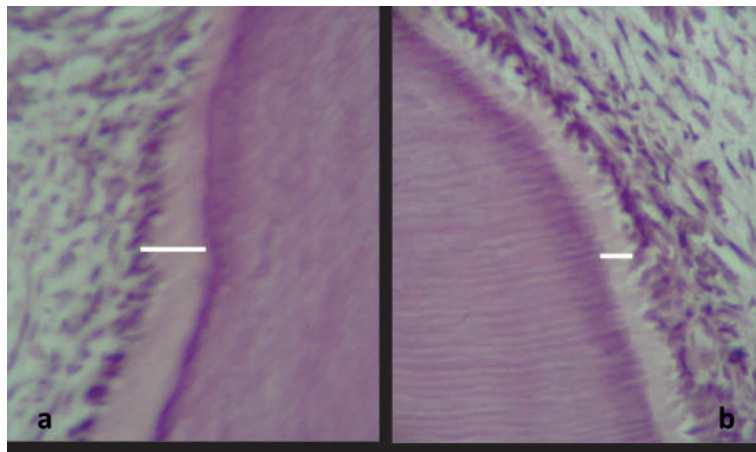


Figura 2. Preparados histológicos de complejo pulpo-dentinario. a) Muestra del grupo E2. b) Muestra del grupo C2. Las líneas blancas indican el espesor de la predentina, observándose el mayor espesor de predentina de la muestra experimental en comparación con la muestra control a las 13 semanas de experimento. Coloración H&E. Aumento 40X

Figure 2. Histological preparations of the pulp-dentin complex. a) group E2 sample. b) group C2 sample. The white lines indicate predentine thickness; note greater predentine thickness in the experimental sample compared to the control sample at week 13 of the experiment. Color H & E. Increase 40 X

DISCUSIÓN

En esta investigación planteamos un protocolo para la inducción de caries en ratas Wistar, que consistió en inocular en las caras oclusales de los molares de cada animal una porción de la cepa de *S. mutans* CVCM656,

DISCUSSION

In this study, we performed a caries induction protocol in Wistar rats by inoculating a portion of the *S. mutans* CVCM 656 strain in the occlusal side of each animal's molars

se mantuvo una dieta *ad libitum* y azúcar al 15% en el agua de consumo diario durante doce semanas continuas, se obtuvo el 37% de caries en distintos grados de severidad, según la clasificación ICDAS y en ambos maxilares. Resultados satisfactorios considerando que el protocolo es bastante sencillo y en un tiempo relativamente corto, si lo comparamos con los propuestos por otros autores.¹⁶⁻¹⁸

En el protocolo desarrollado en este trabajo no se evidenció ninguna patología de tejidos blandos ni periodontales, además quedó demostrado que el suministro de azúcar fue el adecuado, ya que no indujo ninguna alteración sistémica, como diabetes mellitus. Asimismo, es importante resaltar que en el grupo control de la fase de tratamiento, las caries progresaron en número y severidad de la lesión, independientemente de la dieta, lo que sustenta el supuesto de que, luego de instalarse el proceso carioso, no es indispensable el sustrato cariogénico.

La caries dental sigue siendo el problema más importante de la odontología y, a lo largo del tiempo, se han propuesto diferentes terapéuticas dirigidas a promover la menor pérdida de tejido dentario sano, especialmente con el uso de maniobras operatorias mínimamente invasivas y la aplicación de sustancias cariostáticas como el FDP al 38%, que ha sido utilizado como coadyuvante para minimizar la pérdida prematura de la dentición temporal afectada por lesiones cariosas y próxima a su etapa de exfoliación normal.

El uso del FDP, fundamentalmente en la dentición primaria, ha sido motivo de controversias entre los autores. Hay quienes sustentan y fomentan su uso,^{3, 6-8} mientras hay otros que lo desestiman por toxicidad e irritación de tejidos blandos, entre otros factores adversos.⁶ En este sentido, se puede referir el estudio hecho por Llodra y colaboradores,⁹ en el cual analizaron la eficacia del FDP al 38%, demostrando una disminución de la media de nuevas lesiones por superficie en dentición temporal y de primeros molares permanentes en el grupo topificado con el FDP. En el presente estudio, utilizando un modelo animal, se observó que todos los molares que fueron tratados con el FDP

plus an *ad libitum* diet and 15% sugar in daily drinking water for twelve continuous weeks, obtaining 37% of caries in various degrees of severity according to the ICDAS classification, in both jaws. These results are satisfactory, considering that the protocol is quite simple and was conducted in a relatively short time, compared with those proposed by other authors.¹⁶⁻¹⁸

The protocol used in this study did not produce soft or periodontal tissue pathologies and it demonstrated that the sugar supply was adequate, since it did not produce any systemic change, such as diabetes mellitus. It is also important to highlight that during the treatment phase of the control group, the caries progressed in number and severity regardless of diet, which supports the assumption that the cariogenic substrate is not essential after inducing the carious process.

Tooth decay is still the most important problem in dentistry; different therapies have been proposed over time seeking little loss of healthy dental tissue, especially by using minimally invasive operative movements and by applying cariostatic substances such as 38% SDF, which has been used to minimize premature loss of temporary teeth affected by carious lesions, close to their stage of normal exfoliation.

The use of SDF has been controversial among authors, especially if used in primary dentition. There are those who support and encourage it,^{3, 6-8} while others reject it due to its toxicity and soft tissue irritation, among other adverse factors.⁶ In this direction, it is important to mention the study by Llodra et al,⁹ who analyzed the effectiveness of 38% SDF, showing an average decrease in new lesions per surface in temporary dentition and permanent first molars in the group treated with topical SDF. By using an animal model, the present study showed that all the molars treated with SDF

presentaron un tejido dentario endurecido, al menos durante las 13 semanas del experimento, y no se reportaron nuevas lesiones cariosas, mientras que en los molares del grupo control se evidenció el incremento de la severidad de las lesiones y se detectaron nuevos procesos cariosos. Estos resultados suponen la efectividad del FDP como agente cariostático, apoyando a aquellos autores que promueven su uso.

Desde el punto de vista histológico, se observó, a las 7 y 13 semanas en el tejido pulpar, un aumento de la celularidad, prevalencia de infiltrado inflamatorio polimorfonuclear, fibrosis y angiogénesis, tanto en las muestras del grupo experimental como control, lo que representa una reacción de tipo inflamatoria como respuesta defensiva de la pulpa ante la injuria del proceso carioso,¹⁹ quedando claro, por lo tanto, que este hallazgo no es atribuible al uso del FDP.

Asimismo, el estudio histológico reportó un aumento significativo del espesor promedio de la predentina, que, por limitaciones técnicas, no pudo ser cuantificado, pero que fue evidente solo en las muestras tratadas con FDP, lo que sugiere una posible deposición de dentina reparativa en un menor tiempo que en molares sin tratamiento no reportados en la literatura. Sin embargo, en un estudio hecho por Elizondo y colaboradores,¹⁰ en el cual compararon clínica y radiográficamente los efectos del hidróxido de calcio y del FDP al 38% en caries dentinarias de dientes primarios, observaron radiográficamente, a los tres y seis meses posteriores al tratamiento, aumento del espesor y densidad del tejido dentinario, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas con el grupo tratado con hidróxido de calcio, pero que podría sustentar lo reportado en nuestro estudio. En todo caso, se sugiere profundizar en este supuesto. Finalmente, en ambos grupos se observó infiltrado inflamatorio crónico que supone una respuesta tisular normal ante la noxa (caries).

experienced hardened dental tissue, at least during the 13 weeks of the experiment, and no new carious lesions were reported, while molars in the control groups showed increased lesion severity and new carious processes. These results demonstrate the effectiveness of SDF as a cariostatic agent and support the authors who promote its use.

From the histological point of view, 7 and 13 weeks after initiating the study we observed increased cellularity in pulp tissue, prevalence of polymorphonuclear inflammatory infiltrate, fibrosis and angiogenesis in both the experimental and control samples, which means an inflammatory reaction as a defensive response of the pulp to the lesion produced by the carious process;¹⁹ it is therefore clear that this finding is not attributed to the use of SDF.

Also, the histological study reported a significant increase in the average thickness of the predentine, which could not be quantified due to technical limitations but that was only evident in the samples treated with SDF, which suggests a possible deposit of reparative dentin in less time than in untreated molars not reported in the literature. However, the study by Elizondo et al,¹⁰ who clinically and radiographically compared the effects of calcium hydroxide and 38% SDF on caries in primary teeth, showed increased dentin tissue thickness and density three and six months after treatment, with no statistical significant differences in the group treated with calcium hydroxide, but this may support the findings of our study. In any case, we recommend making additional studies on this issue. Finally, both groups showed chronic inflammatory infiltrate which suggests a normal tissue response to noxa (caries).

CONCLUSIONES

En conclusión, la estandarización del protocolo de inducción de caries dental en ratas Wistar fue exitosa en las condiciones metodológicas que se manejaron en este trabajo. Asimismo, se demostró que el tratamiento con FDP inactivó los procesos cariosos establecidos sin que progresaran en severidad las lesiones, ni aumentara el número de caries, al menos en las 13 semanas después de su aplicación, considerando que estos resultados pueden ser extrapolables a humanos, que minimiza la formación de nuevas lesiones cariosas y la progresión de las cavidades existentes. Se sugiere su uso como una estrategia para el control de caries dental en dientes primarios cavitados (que involucre esmalte y dentina), con la finalidad de mantener la vitalidad pulpar hasta su recambio natural.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, financiamiento código O-276-12-03-F

CORRESPONDENCIA

Eduvigis Solórzano
Edificio del Rectorado
Calle 24, entre Avenidas 2 y 3
Facultad de Odontología
Universidad de Los Andes,
Mérida (5101), Venezuela
Tel/Fax. (58) 274-2402383
Correo electrónico: eduvigis@ula.ve

CONCLUSIONS

In conclusion, the standardization of the protocol of dental caries induction in Wistar rats was successful under the methodological conditions used in this study. In addition, this study showed that treatment with SDF inactivated the induced carious processes, stopped progression in lesion severity and blocked increase in number of cavities, at least 13 weeks after its application; these findings can be extrapolated to humans, as it minimizes the formation of new carious lesions and the progression of existing cavities. We suggest its use as a strategy to control dental caries in cavitated primary teeth (involving enamel and dentine), in order to keep pulp vitality until its natural replacement.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare having no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

To Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) of Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, funding code O-276-12-03-F

CORRESPONDING AUTHOR

Eduvigis Solórzano
Edificio del Rectorado
Calle 24, entre Avenidas 2 y 3
School of Dentistry
Universidad de Los Andes
Mérida (5101), Venezuela
Tel/Fax. (58) 274-2402383
Email address: eduvigis@ula.ve

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Liébana J. Microbiología oral. 2.^a ed. Granada: Mc Graw Hill Interamericana; 2002.
2. Rojas F. Algunas consideraciones sobre caries dental, fluoruros, su metabolismo y mecanismos de acción. *Act Odont Ven* 2008; 46(4): 1-11.
3. Swan E. Fluoride supplements and dietary sources of fluoride. *J Can Dent Assoc* [Internet]. 2000; 66: 362-363 [Consultado 2012 Jun 2] Disponible en: <http://www.fluoridation.com/cda-fluoride.htm>
4. Organización Mundial de la Salud. Publicación de una revisión de guías para la calidad del agua potable con el fin de prevenir brotes epidémicos y enfermedades relacionadas con el agua. Centro de prensa [Internet] [Consultado 2012 Jun 23]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr67/es/index.html>
5. Gomes R, Vasconcellos M, Rastelli M, Cziusniak G, Wambier D. Diaminofluoreto de prata: umarevisão de literatura. *Ci Biol Saúde* 2006; 12(2): 45-52.
6. Gotjamanos T, Ma P. Potential of 4 per cent Silver Fluoride to induce fluorosis in rats: clinical implications. *Aust Dent J* 2000; 45(3): 187-192.
7. Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Lo EC. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18(6): e824-e831.
8. Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL, Lo EC, Chu CH. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. *J Dent* 2013; 41(9): 809-817.
9. Llodra J, Rodriguez A, Ferrer B, Menardia V, Ramos T, Morato M. Efficacy of silver diamine fluoride for caries reduction in primary teeth and first permanent molars of schoolchildren: 36-month clinical trial. *J Dent Res* 2005; 84(8): 721-724.
10. Elizondo M, Lucas G, Rosa G. Estudio preliminar del efecto del hidróxido de calcio y del fluoruro diamino de plata al 38% en el tratamiento de las caries dentinarias profundas en molares primarios. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Univ Nac Nordeste*. 2004 [Internet] [Consultado 2012 Jun 9]. Disponible en: www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/3-Medicina/M-054.pdf
11. Yee R, Holmgren C, Mulder J, Lama D, Walker D, Van W. Efficacy of silver diamine fluoride for arresting caries treatment. *J Dent Res* 2009; 88(7): 644-647.
12. Knight G, McIntyre J, Craig G, Mulyani, Zilm P, Gully N. An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of desmineralized dentine to *Streptococcus mutans*. *J Aust Dent* 2005; 50(4): 242-245.
13. Ramalho SA, Daruge E, De La Cruz B, Francesquini Jr L, Francesquini, MA, Daruge Jr E et al. La importancia del peritaje en el estudio comparativo histomorfológico del esmalte, dentina y cemento de dientes humanos y otros animales. *Acta Odontol Venez*. 2006. 44(1). [Internet] [Consultado 2012 Jun 17] Disponible en: http://www.actaodontologica.com/ediciones/2006/1/peritaje_histomorfologico_esmalte_dentina_cemento.asp
14. Ministerio del poder popular para ciencia, tecnología e industrias intermedias. Fondo nacional de ciencia, tecnología e innovación. Código de ética y bioseguridad. 3.^a ed. Ediciones del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación: Caracas; 2012 [Internet]: [Consultado 2013 May 24]. Disponible en: http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/biolanimlab/archivos/codigo_fonacit_2008.pdf
15. Braga M, Mendes F, Ekstrand K. Detection activity assessment and diagnosis of dental caries lesions. *Dent Clin North Am* 2010; 54(3): 479-493.
16. Ooshima T, Sumi N, Izumitani A, Sobue S. Maternal transmission and dental caries induction in Sprague-Dawley rats infected with *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol* 1988; 32(8): 785-794.
17. Ooshima T, Yoshida T, Aono W, Takei T, Izumitani A, Sobue S et al. Changes with time in the oral microflora and dental caries induction in hyposalivated rats fed on sucrose diet. *Microbiol Immunol* 1992; 36(12): 1223-1231.
18. Tanzer JM, Grant LP, McMahon T, Clinton D, Eanes ED. Simultaneous caries induction and calculus formation in rats. *J Dent Res* 1993; 72(5): 858-864.
19. Gómez M, Campos A. *Histología y embriología bucodental*. 2.^a ed. Madrid: Panamericana; 2007.