***AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ULTRA-SOM EM
CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO NA ADESÃO À
DENTINA E NAS CARACTERÍSTICAS DENTINÁRIAS***

EDUARDO BRESCIANI

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Bauru, da Universidade de São Paulo, como
parte integrante dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Odontologia, área de
concentração Dentística

Bauru

2007

***AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ULTRA-SOM EM
CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO NA ADESÃO À
DENTINA E NAS CARACTERÍSTICAS DENTINÁRIAS***

EDUARDO BRESCIANI

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Bauru, da Universidade de São Paulo, como
parte integrante dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Odontologia, área de
concentração Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro

Co-orientadora: Profa. Dra. Mathilde C. Peters

Bauru

2007

B753a

Eduardo Bresciani

Avaliação da influência do ultra-som em cimentos de ionômero de vidro na adesão à dentina e nas características dentinárias/

Eduardo Bresciani – Bauru, 2007

115 p. : il. ; 29,7cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB em 29 de setembro de 2004

Nº do processo: 127/2004

DADOS CURRICULARES

Eduardo Bresciani

Filiação	Hélio Bresciani e Odilete Bordenalli Bresciani
10/02/1974	Nascimento - Campinas – SP
1994 – 1997	Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Bauru – USP – SP
1998 – 2000	Curso de Especialização em Odontopediatria, no Hospital de Reabilitações de Anomalias Craniofaciais HRAC-USP, Bauru – SP
2001 – 2003	Curso de Pós-Graduação em Dentística Restauradora, em nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP – SP
2003 – 2007	Curso de Pós-Graduação em Dentística Restauradora, em nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP – SP
1997 –	Cirurgião-Dentista da Prefeitura Municipal de Bauru
2005 – 2006	Adjunct clinial lecturer na Universidade de Michigan, MI – EUA
Associações	CROSP – Conselho Regional de Odontologia do Estado de São Paulo IADR – International Association for Dental Research SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica Michigan Board of Dentistry – Licença acadêmica limitada junto à Universidade de Michigan – Departamento CRSE.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	v
LISTAS DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	001
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	007
3. PROPOSIÇÃO.....	023
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	027
5. RESULTADOS.....	051
6. DISCUSSÃO.....	067
7. CONCLUSÕES.....	081
APÊNDICES.....	085
ANEXOS.....	097
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
ABSTRACT.....	113

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 01	Esquema do preparo dos dentes até obtenção dos palitos	32
Figura 02	Materiais utilizados para a etapa laboratorial	32
Figura 03	Seqüência da etapa clínica realizada no baseline	37
Figura 04	Seqüência da etapa clínica - controle de três meses	39
Figura 05	Curva padrão obtida por PCR para transformação do valores Ct das amostras	49

GRÁFICOS

Gráfico 01	Extensão e atividade das lesões cariosas	55
Gráfico 02	Dureza clínica da dentina	55
Gráfico 03	Umidade clínica da dentina	56
Gráfico 04	Coloração clínica da dentina	56
Gráfico 05	Média e dp de DNA bacteriano para bactérias totais	58
Gráfico 06	Média e dp de RNA bacteriano para bactérias totais	59
Gráfico 07	Proporção 3m/baseline e dp - DNA e RNA (bactérias totais)	60
Gráfico 08	Média e dp da expressão metabólica relativa por célula	61
Gráfico 09	Média e dp de DNA bacteriano de <i>Lactobacilos</i>	64
Gráfico 10	Proporção 3m/baseline) e dp - DNA (<i>Lactobacilos</i>)	64
Gráfico 11	Porcentagem de <i>Lactobacilos</i> sobre bactérias totais	65

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos testados em relação ao material e o ultra-som	30
Tabela 2	Média e dp dos da microtração em cada grupo testado	53
Tabela 3	Porcentagem dos tipos de fratura em cada grupo	53

LISTA DE ABREVIATURAS

IM – Intervenção Mínima

ART – Tratamento restaurador atraumático (do inglês - Atraumatic Restorative Treatment)

CIV – Cimento de ionômero de vidro

CIVs – cimentos de ionômero de vidro

US – ultra-som

US-D – Ultra-som aplicado de forma direta

US-I – Ultra-som aplicado de forma indireta

S-US – Sem aplicação de ultra-som

dp – desvio-padrão

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês – Polymerase chain reaction)

p – Probabilidade

SiC – Significant caries index

LASER – Ligth amplification by stimulated emission of radiation

KHN – escala de dureza Knoop

rpm – rotações por minuto

DNA – ácido desoxirribonucléico

RNA – ácido ribonucléico

DNAc – ácido desoxirribonucléico complementar

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

DNases – enzimas que destroem o DNA

RNases – enzimas que destroem o RNA

BHI – Brain and heart infusion

CFU – unidade formadora de colônia

ATTC – American type of culture collection

L - litro

ml – mililitros (10^{-3} L)

μl – microlitros (10^{-6} L)

PBS – solução tampão de fosfato

A única coisa que vale a pena é fixar o olhar
com mais atenção no presente;
o futuro chegará sozinho, inesperadamente.
É tolo quem pensa no futuro antes de pensar
no presente.

N V GOGOL (escritor russo)

Dedico este trabalho, que não se resume somente neste volume escrito, mas sim, todo o processo pelo qual fui requisitado para chegar até esta fase, a minha esposa **ANA LUIZA** que abriu mão de tudo, me acompanhou e me acompanha em um sonho; a minha filha **LAURA** que se comportou como adulta nas fases difíceis (e foram muitas) e aos meus **PAIS** que sempre me incentivaram para a busca do saber; especialmente ao meu pai que não está mais presente para ver mais esta conquista — amo muito vocês.....

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha esposa Ana Luiza e a minha filha Laura

*Vocês foram as únicas pessoas que estiveram o tempo todo comigo nesta
dura jornada do doutorado*

*Sofremos juntos, crescemos juntos, vocês tiveram que me aturar muito,
mas com certeza estaremos prontos para outros desafios, pois sem desafios,
a vida perde a graça.....*

*BUSSY-RABUTIN dizia “Quando não se ama demais, não se ama o
suficiente”*

*AMO VOCÊS O **SUFICIENTE***

*Aos meus pais, Hélio e Odilete que sempre colocaram seus filhos acima
de tudo. Sei que nossas realizações são as suas também. Meu pai não está
mais presente, mas com certeza estaria muito orgulhoso de mais esta
conquista..... Ela é de vocês também.....*

*Aos meus irmãos, Ângela, Giovanna e Fábio, companheiros de todas as
horas, boas e difíceis, com quem sempre pude contar.*

*A minhas cunhadas, Ciça e Carô, pela presença constante e agradável. E
a Carô especialmente por sempre me ajudar, cuidando bem da Laura, sem
esquecer das comidas maravilhosas.*

*A minha sogra, Lucimar, minha segunda mãe em Bauru, para a qual
não tenho palavras para agradecer por tudo. Minha vida foi muito mais
amena graças a seus préstimos – sempre serei grato...*

A Deus, por colocar pessoas tão especiais em minha vida.

Não tenho a pretensão de achar palavras que possam resumir todo meu agradecimento para a minha orientadora - Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro.

Pessoa de extrema competência, caráter e dedicação. Agradeço todas as oportunidades oferecidas (e foram muitas), a confiança em mim depositada e a todos ensinamentos, não só de Odontologia, mas também lições de vida que certamente carregarei comigo por toda minha existência.

Agradeço ainda o respeito e carinho para comigo em fases difíceis vividas durante o doutorado.

Graças a sra, o meu sonho de ter uma vivência no exterior foi concretizado

MUITO OBRIGADO

To Dr Peters - thank you for all the opportunities and all the efforts you made to bring me to Ann Arbor. That year was unforgettable regarding all aspects. Thanks to consider me as a friend and to provide me a better understanding and view of the world

Agradecimentos

Aos professores Drs. Carlos Eduardo Francischone, Eduardo Batista Franco, José Carlos Pereira, José Mondelli, Maria Teresa Atta, Rafael Francisco Lia Mondelli e Ricardo Marins de Carvalho, do Departamento de Dentística, pelos ensinamentos e estímulos constantes pela busca do conhecimento.

A Terezinha de Jesus Esteves Barata, pela demonstração de amizade incondicional, pelos favores, favores e mais favores prestados. Acho que precisarei de muito tempo e dedicação para pagar tudo a você. Eu sei que você fez tudo de coração, e falando em coração, que tamanho tem o seu????

Deve ser gigante.... Torço, com todas as minhas forças, para que você seja feliz sempre.....

A Ticiane, pela convivência, pela divisão de tarefas (eu sempre saí ganhando neste ponto) e principalmente pela amizade que começou no doutorado, mas continuará pela vida fora.

A Anuradha, que me deu muitos empurrões para o estágio no exterior, além dos dias de desabafo..... Pode contar comigo sempre

À toda turma do doutorado, Ana Raquel, Angélica, Anuradha, Diego, Fabiano, Flávia, Leonardo, Luís, Margarete, Sérgio e Terezinha pela amizade e compreensão.

A turma do doutorado opção materiais dentários, Anderson, Sérgio e Renato.

*A Dani e ao Heitor, pela amizade e pelos momentos agradáveis de
descontração que passamos juntos...*

*Às secretárias do Departamento de Dentística Ângela, Clélia Rita e da
Diretoria, Valéria e Eloísa pela pronta disposição em sempre ajudar. A Eloísa
Turbiani, pela demonstração de amizade e companheirismo, principalmente em
momentos difíceis...*

*A Dona Cleusa da pós-graduação, que me ajudou muito na fase experimental
deste estudo. Que saudade dos sábados na clínica..... e dos bolos também – é
claro!!*

*A direção da EE Ada Cariane, pela disponibilidade e colaboração para a
realização deste estudo.*

*A Sueli Yanase – minha tia do coração - pela ajuda e torcida sempre
presentes, desde o início e principalmente antes da fase do estágio no exterior.*

*A todos nossos amigos brasileiros de Ann Arbor, sem os quais não poderíamos
dividir momentos ruins e principalmente momentos bons, enquanto longe do Brasil.*

Nas horas difíceis é que encontramos verdadeiros amigos.

*Muito obrigado – Fábio e Tatiana – Joni, Carol e crianças – Silavana Beltrami
– Miesher e Monique – Vini, Alexandra e crianças.*

Acknowledgments

Many thanks to Fang Gu, for all the teachings and microbiological knowledge you provided me. I know this kind of help is not very common abroad, that is why your help is even more appreciated. Thanks for sharing with me good and difficult times. Although we are far away from each other, I will always consider you as a good friend.

To Keith Dobracki, thanks for all the help and advices you gave me in order to make the cultural transition softer. Thanks for the patience, rides, winter clothes and friendship.

To all people in the lab, You Ning, Hangtao and Ricardo, thanks for the good moments and for sharing with me all your expertise.

To Dr Fenno, thanks for letting me use your lab facilities, even knowing my major was not in microbiology. Thanks for the discussions and improvement of my research.

To Dr Phreeta Kanjirath, for sharing with me all her X-ray subtraction expertise and for the good moments.

Thanks to Marian and Susan, department secretaries, for the constant support.

Thanks to Dr. Dennison and Dr. Fasbinder for letting me use your lab facilities and for being so prompt to help.

To Dr Nör, for all the advices and mainly for letting me be a listener in your molecular biology classe.

To Dr McLean, for all shared moments in the Clinical foundation I course. Thanks to the instructors: Sumant Ram, Fang Gu, Alexandra, Elizabeta, Jonny and all the students. This feeling of teaching is amazing.....

Thanks to Natalie Putnam, Dmitry Vodopyanov and Katie Miettunem for being so kind and patient while doing lab research. Thanks for the English improvement you provided me...

Agradeço ainda :

À Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB, da Universidade de São Paulo, através de seu diretor Prof. Dr. Luís Fernando Pegoraro e da presidente da comissão de Pós-graduação Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru, em especial aos do Departamento de Dentística, aos da seção de pós-graduação e aos da biblioteca, pela dedicação e paciência com que realizam seu trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa sanduíche, sem a qual seria impossível meu estágio na Universidade de Michigan

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE

Avaliou-se diferentes formas de aplicação do ultra-som (US) sobre a microtração de CIVs (Ketac Molar Aplicap, Ketac Molar Easymix e Fui IX GP) à dentina; e o potencial clínico de restaurações de CIV (Ketac Molar) com US remineralizarem a dentina e seu efeito sobre a flora bacteriana por meio PCR em tempo real, após período de três meses. Na parte laboratorial, foram selecionados 45 terceiros molares extraídos e confeccionadas cavidades para acomodar material, que aleatoriamente recebeu US diretamente (US-D), ou indiretamente (US-I) ou ainda não recebeu (S-US). Os espécimes foram reservados por 1 semana, submetidos ao teste de microtração e os dados analisados por ANOVA 2-critérios. Na parte clínica, 32 pacientes (idade média 13,8) receberam 90 restaurações com CIV, CIV com ultra-som e resina composta, aleatoriamente. A dentina afetada foi avaliada de acordo com a cor, umidade e dureza e uma amostra foi colhida para quantificação de bactérias totais e *Lactobacilos*. Após três meses, as restaurações foram removidas e nova caracterização clínica e amostragem realizadas. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Friedman e Mann-Witney para os critérios clínicos e ao teste de procedimento de medidas repetidas – SAS, para o número de bactérias ($p<0,05$). Os resultados mostraram que o ultra-som influenciou na adesão dos CIVs, sendo $US-D<S-US<US-I$. Após três meses de estudo clínico, a dentina apresentou-se dura e seca com maior frequência. A coloração não apresentou mudanças significantes. O número de bactérias totais não foi influenciado pelo tipo de tratamento restaurador. Mais da metade das amostras não mostrou níveis detectáveis de *Lactobacilos* e nenhuma atividade foi observada. Concluiu-se que o método de aplicação indireta do US deve ser o escolhido. O tipo de tratamento restaurador não influenciou na redução de bactérias residuais, nem na atividade metabólica, embora a dentina apresentasse características clínicas compatíveis com paralisação do processo carioso.

PALAVRAS-CHAVE: Cimentos de ionômero de vidro. Ultra-som. Ensaio clínico. Reação em cadeia da polimerase. Cárie dentária.

/ INTRODUÇÃO

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical line intersecting. The horizontal line is composed of several overlapping, slightly wavy black strokes. The vertical line is also composed of several overlapping, slightly wavy black strokes, creating a textured, hand-drawn appearance.

1. INTRODUÇÃO

Embora a doença cárie tenha diminuído nas últimas décadas em países industrializados, esta ainda representa um problema público a ser solucionado em várias comunidades⁵³. Em países sub-industrializados, a incidência desta doença não diminuiu significativamente e o seu tratamento na maioria das vezes não é realizado devido à falta de condições financeiras dos pacientes para a realização do tratamento convencional¹⁵. Nestes casos, a extração dental é o tratamento mais comumente realizado^{20,31}. Mesmo nos países industrializados, onde os índices da doença são menores, a partir de um novo índice denominado SiC (sinificant caries index)¹⁰, pode-se determinar que em regiões ou segmentos específicos, a doença ainda se apresenta com alta incidência. Nestes grupos menos privilegiados, pertencentes a sociedades mais desenvolvidas, o planejamento público deve ser diferenciado e o tratamento restaurador da doença cárie ainda se faz necessário, situação esta, semelhante a de um país sub-industrializado.

Estas observações nos levam a conclusão de que em todos os países a necessidade de tratamento restaurador ainda se faz presente, se não em grande escala, pelo menos em grupos específicos e bem delimitados.

Na busca de alternativas mais modernas e atuais e ainda de tratamento restaurador, a intervenção mínima apresenta-se como opção eficiente, pois preconiza um tratamento restaurador menos invasivo, baseado no conhecimento do processo carioso e na disponibilidade de materiais adesivos que permitem uma manipulação mais seletiva, removendo-se menos tecido dentário, tanto sadio como doente.

O conceito de intervenção mínima não é novo e desde a década de 70, HANDELMAN et al.^{29,30} já estudavam a paralisação de lesões incipientes de esmalte somente com a aplicação de selantes, sem realização de preparos cavitários. Nesta filosofia, o conceito descrito por Black de “extensão para prevenção” deve ser substituído por “prevenção da extensão”, conservando assim, mais estrutura dentária sadia ou passível de remineralização.

A remoção de dentina acometida pela cárie na intervenção mínima apóia-se na definição de dentina afetada e infectada, inicialmente descrita por MASSLER, em 1967⁵² e mais tarde reportada por FUSAYAMA, em 1979²² e também no conhecimento do potencial de remineralização desta dentina desmineralizada,

desde que um vedamento da lesão com a cavidade bucal seja obtido. Segundo FUSAYAMA, em 1979²², a dentina infectada é representada pela parte superficial da lesão, que se apresenta amolecida, repleta de microorganismos e diretamente em contato com a cavidade bucal. A outra camada é a afetada, caracterizada por ser uma dentina desmineralizada e que mantém sua estrutura básica. Esta última apresenta-se relativamente livres de bactérias e os túbulos dentinários estão suportados por matriz de colágeno.

Vários autores^{34,50,56,57,59,60,61,68,71,85,90,91} relatam haver uma diminuição na flora bacteriana, após o selamento da lesão com a cavidade bucal e o trabalho de MERTZ-FEIRHURST et al., em 1998⁵⁶, com 10 anos de observação evidenciou que a restauração bem selada possui um grande potencial para paralisação de lesões de cárie.

Essa diminuição do número de bactérias, frequentemente observada em trabalhos clínicos, possui validação científica, graças, em parte, à metodologia de biópsia de dentina descrita na literatura³⁹. Neste trabalho, a impregnação de dentina às lâminas da broca, utilizada em baixa velocidade, provou ser um método eficiente, reproduzível e confiável para amostragem de dentina e posterior quantificação de bactérias.

Nos estudos de IM, a diminuição da flora bacteriana quase sempre é observada por meios de cultura – plaqueamento. Entretanto, com a introdução de novas técnicas de biologia molecular (PCR), comprovadas cientificamente por serem mais sensíveis e específicas^{47,64}, observa-se uma série de trabalhos na literatura que estudaram os microorganismos presentes na cavidade bucal e nas lesões cariosas^{24,51}. Ainda não há trabalhos que verificam a diminuição quantitativa da flora bacteriana após realização do tratamento minimamente invasivo utilizando-se desta tecnologia.

Em relação ao segundo fator importante da intervenção mínima, os materiais restauradores adesivos, sabe-se que as resinas compostas apresentam adesão micromecânica aos tecidos dentários e comumente são o material de escolha para a IM. Já os CIVs possuem adesão química às estruturas dentárias^{18,32,49,54,65}, porém as propriedades mecânicas do material limitam sua utilização em restaurações de dentes posteriores, principalmente em regiões de esforços mastigatórios. Com o aparecimento do ART, surgiram materiais

convencionais que possuem características mecânicas melhoradas, são os CIV de alta viscosidade. Estes CIV apresentam maior concentração de ácido, ácido liofilizado no pó e menor tamanho das partículas de vidro²⁷.

Os resultados de ART, mesmo que com materiais de características mecânicas superiores, ainda restringem a utilização dos CIV de alta viscosidade em regiões de grandes esforços mastigatórios e em cavidade compostas e complexas^{20,21,72}. Para solucionar este problema, vários autores estudaram modificações nos CIV para melhoria principalmente de suas características mecânicas^{45,46,88}. Todos estes trabalhos trazem novamente alguma alteração de formulação destes materiais ou inclusão de novas partículas, ou substâncias, que de alguma forma melhoravam mecanicamente o material. Porém, um grupo de pesquisadores verificou a melhoria das propriedades mecânicas dos CIV somente com a indução da presa inicial com aplicação de o ultra-som^{41,84}, obtida comumente com o equipamento utilizado para raspagem de tártaro.

A partir de então, estudos vem sendo desenvolvidos sobre os efeitos da utilização da o ultra-som sobre as diversas propriedades dos CIVs e um deles demonstrou um aumento na força de adesão do material com a dentina¹⁹, o que provavelmente resulta também em um melhor vedamento da cavidade, essencial para a intervenção mínima.

Além da melhoria das propriedades dos CIVs com a utilização da o ultra-som, estes ainda possuem vantagens sobre as resinas compostas pois liberem íons fluoreto, não só para o meio bucal, como também para as paredes da cavidade, sendo então considerados materiais anticariogênicos⁷⁹.

Levando-se em consideração todo o embasamento já comprovado em relação à Intervenção Mínima, em relação à adesão química das resina compostas e dos CIV ao dente, do potencial anticariogênico dos CIVs, assim como a metodologia de biópsia de dentina³⁹ e análise por PCR^{24,51}, torna-se viável a verificação de diferentes métodos de aplicação do ultra-som sobre a adesão destes materiais a dentina, uma vez que o vedamento da cavidade é essencial na IM; e ainda a influência desta aplicação o ultra-som para a melhoria do CIV, sobre a dentina desmineralizada e compará-los com as restaurações de CIV sem o ultra-som e restaurações de resina composta. Esta comparação será realizada a partir das características clínicas da dentina cariada e das alterações da microbiota depois de um período de realização das restaurações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar a redação e o entendimento e a leitura sobre o assunto, o item revisão de literatura foi dividido nos subitens a seguir:

2.1 - INTERVENÇÃO MÍNIMA

Nas últimas décadas, o processo da cárie dentária se tornou mais compreendido, devido a um grande número de pesquisas nesta área. Atualmente, o processo de desmineralização e remineralização, a progressão da doença e a importância do papel das bactérias e do flúor já estão bem delimitados. Estes conceitos impulsionam a Odontologia a desenvolver novas tendências, criando filosofias que incorporam técnicas restauradoras mais preventivas e menos invasivas. Dentre elas pode-se citar a intervenção mínima (IM).

Este termo, intervenção mínima, está relacionado a uma vasta área dentro da cárie dentária, e compreende desde o acesso ao risco do paciente até a prevenção e o controle da doença (paralisação e prevenção da progressão)^{58,59,60,61,70,71,85}. No passado, a doença cárie era tratada com uma excisão cirúrgica e tecido sadio era sacrificado, devido às técnicas e aos materiais restauradores disponíveis. Com o conhecimento do processo carioso e o surgimento dos materiais restauradores adesivos, a prevenção da doença e a conservação de estrutura dentária se tornaram possíveis⁷¹.

Dentro desta filosofia, a cárie de esmalte sem cavidade deve ser monitorada com o intuito de não se realizar a excisão cirúrgica, e sim, promover uma paralisação e conseqüente remineralização da lesão^{58,59,61}. Nesta etapa do tratamento dentro da IM, torna-se imprescindível a conscientização do paciente sobre os métodos de higienização bucal e sobre seu papel no controle da doença, evitando-se o aparecimento de novas lesões. Se a lesão de esmalte não for controlada e uma cavitação for observada ou se o paciente se apresentar para tratamento em fases já avançadas da doença, a etapa restauradora deve ser realizada^{58,59,61,71,85}. Com o advento dos materiais adesivos, o conceito de Black de “extensão para prevenção” deve ser substituído na filosofia da IM por “prevenção da extensão”, e uma maior quantidade de estrutura dentária será conservada^{58,59,60,71,85}. Uma política recente da Federação Dentária Mundial sugere que há quatro princípios

básicos que devem ser aplicados para preencher a descrição da IM^{58,85}, que são: controle da doença através da redução da flora oral cariogênica, remineralização de lesões iniciais, realização de procedimentos minimamente invasivos, se necessário e reparar para não substituir restaurações definitivas.

Esta necessidade para confecção de preparos pequenos na IM, estimulou novos procedimentos como: preparos cavitários por oscilação, a utilização de produtos químicos e o uso do laser⁷⁰. Dentre os métodos utilizados para o preparo, seguindo a filosofia da IM, tem-se os métodos mecânicos (Instrumentos manuais, rotatórios e oscilatórios), químico-mecânicos (CarisolvTM), cinéticos (abrasão a ar) e os hidrocinéticos (LASER)^{58,70}. Além da realização de um preparo cavitário mais conservador, a remoção de dentina acometida pela lesão cariosa também é seletiva, sendo a dentina infectada removida e a afetada (desmineralizada) mantida para posterior remineralização^{60,71}. Alguns trabalhos também relatam a não remoção de dentina acometida pela lesão, sendo assim um método menos invasivo ainda. Nestes, os principais fatores para a paralisação da doença cárie são o controle da microbiota bucal, a remoção do biofilme sobre as estruturas dentárias e o selamento das cavidades⁶.

De todos esses métodos minimamente invasivos de preparo de cavidades acima relatados, dar-se-á ênfase ao método mecânico, no qual instrumentos rotatórios e manuais são utilizados para a remoção de esmalte sem suporte e dentina infectada. Este conceito está relacionado a não remoção de tecido desmineralizado com pouca quantidade de bactéria que pode sofrer uma reversão através da remineralização⁸⁵.

Segundo FUSAYAMA, em 1979²², a lesão de cárie ativa consiste de duas áreas: a camada infectada e a afetada. A camada infectada é representada pela parte superficial da lesão, que se apresenta amolecida, repleta de microorganismos e diretamente em contato com a cavidade bucal. É constituída de esmalte e dentina desestruturados. A outra camada, a afetada, está logo abaixo da camada infectada e consiste de dentina desmineralizada que mantém sua estrutura básica. Esta se apresenta relativamente livre de bactérias e os túbulos dentinários ainda estão suportados por matriz de colágeno²².

BANERJEE et al.², em 2001, reportam não haver uma delimitação visível entre a dentina afetada e a infectada e este fator pode levar a uma

subjetividade durante a remoção da primeira camada, variando de operador para operador, quando da utilização da técnica da IM^{6,37}. Neste trabalho os autores relatam a importância de um selamento da restauração para o monitoramento das bactérias, prevenindo uma re-agudização do processo carioso^{6,37}. Relatam ainda que há alguns fatores que podem ser observados para determinar a remoção da dentina infectada, porém, todos se mostrando muito subjetivos. Dentre eles tem-se: a coloração, que é um fator subjetivo e sem aparente correlação com a penetração bacteriana; a dureza, que segundo os autores é um fator subjetivo sendo variável de operador para operador; a análise de bactérias e a utilização de corantes, sendo que este último se difunde muito e propicia uma remoção excessiva de dentina. Segundo os autores, há quatro passos que devem ser seguidos para paralisar a progressão da lesão cariosa. São eles: restauração da integridade do dente, melhorando o controle do biofilme; remoção da dentina infectada, remoção da nutrição das bactérias e utilização de materiais cariostáticos. Os autores concluíram que estes fatores são subjetivos e que a relevância está no selamento da restauração e conseqüentemente, no acompanhamento da mesma.

Para tentar suprir esta subjetividade da limitação entre dentina afetada e infectada, há vários estudos na literatura, sobre a eficiência de diferentes métodos de remoção de dentina cariada.

SMALES; FANG, em 1999⁷⁸, avaliando *in vitro* a eficiência da remoção de dentina cariada na JAD através de dois métodos, escavação manual e por meio de brocas, chegaram a conclusão de que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao tecido pigmentado restante. Porém, quando da utilização de corantes, a remoção por brocas se mostrou mais efetiva que a escavação manual, embora as implicações clínicas não devam ser tão importantes. Segundo KIDD; RICKETTS; BEIGHTON⁴⁰, em 1993, através de um estudo clínico e microbiológico, conclui-se que toda dentina amolecida da JAD deve ser removida, pois há grande quantidade de microorganismos, porém, não se verifica esta necessidade para a remoção completa de dentina pigmentada.

Talvez em todos estes estudos, a determinação de remoção eficiente de tecido cariado tenha sido correlacionada comparando-se a remoção feita com o uso de brocas convencionais. Neste sentido, métodos considerados ineficazes podem ser eficientes para a remoção somente de dentina infectada. Na tentativa de

se resolver este problema e ainda servir como um método padronizado de remoção de dentina infectada, surgiu no mercado um sistema de brocas de polímero, chamado SmartPrep System – SSWhite. Esta broca, de acordo com as informações técnicas do fabricante, remove somente dentina infectada e quando esta chega em dentina afetada, se torna desgastada e sem corte devido à dureza parecida com a desta camada. Desta forma, esta broca de polímero representa um sistema auto limitante para remoção de dentina infectada.

O primeiro relato da utilização deste tipo de instrumento foi observado na literatura em 2003. Neste estudo⁸, a broca de polímero não removeu dentina de dentes sadios. Em dentes com lesão cariada, a remoção da dentina cariada foi realizada até um ponto auto-limitante determinado pela broca. Após a utilização deste tipo de broca, a dentina se apresentou livres de bactéria e não pigmentada quando da utilização de corantes. De acordo com dois estudos^{68,75}, a dentina remanescente se apresenta com dureza em torno de 17 a 25 KHN, após a utilização desta broca. Estes valores, quando comparados com dados da literatura, apresentam-se inferiores aos já existentes, por volta de 30KHN^{23,66}. Apesar destes valores inferiores, CELIBERTI; FRANCESCUT; LUSSI em 2006¹³, demonstraram que a dentina remanescente, da remoção com a broca de polímero, coincidiu com a extensão da lesão, previamente determinada por microscopia confocal. Neste estudo ainda, somente os valores de coincidência obtidos quando da utilização de escavação manual foram superiores e a broca de baixa rotação produziu a cavidade com maior sobrepreparo.

Ainda em relação à broca de polímero, há dados na literatura que relatam haver uma diminuição na adesão da dentina após utilização deste sistema⁷⁶. Esta diminuição é maior que 50% quando da comparação com a utilização de brocas carbide. Estes dados são importantes quando se utiliza a IM em cavidades compostas e complexas, pois em cavidades oclusais, todas as margens estarão em esmalte sadio e conseqüentemente a adesão será satisfatória.

A técnica da intervenção mínima não é nova e relatos a partir da década de 70 começam a surgir na literatura. HANDELMAN; BUONOCORE; SCHOUTE, em 1973²⁸ e H

ANDELMAN; WASHBURN; WOPPERER, em 1976³⁰ relatam a

redução da atividade bacteriana de lesões cariosas seladas após um período de 6 meses e 2 anos de controle clínico, respectivamente. Após 4 meses²⁸ e 2 anos³⁰ de controle, o número de bactérias totais viáveis reduziu cerca de 100 e 2.000 vezes, respectivamente. GOING et al.²⁶, em 1978 avaliaram bactérias totais e bactérias cariogênicas, como *S. Mutans*, *S. Sanguis* e *Lactobacilos*, após 5 anos do selamento da cavidade. Estas reduziram significativamente, cerca de 100 vezes, quando comparadas com o grupo controle. A utilização de selante neste estudo²⁶ mostrou uma reversão de lesões ativas para inativas, em cerca de 90% das lesões estudadas. Outro estudo⁹⁰ porém, quando da avaliação do selamento de lesões ocultas em dentina, observou-se que apesar do número de bactérias ser, em média, 100 vezes menor quando comparado a lesões não tratadas, a presença de 10^3 bactérias remanescentes é um fator preocupante para se indicar esta técnica.

Em um estudo mais recente⁶⁷, no qual técnicas de PCR convencional foram utilizados, observou-se que após 5 meses de realização das restaurações, a microflora apresentava-se mais homogênea e com menor número de espécies. Os *lactobacilos* foram encontrados inicialmente, porém, não mais detectados no controle de 5 meses.

No estudo de MCDONALD e SHEIHAM em 1994⁵⁵, avaliou-se, por meio de radiografias, a paralisação das lesões cariosas em grupos que receberam restaurações, associadas ou não à aplicação de soluções cariostáticas. Observou-se que a realização de restaurações, com ou sem aplicação de soluções cariostáticas, promoveu uma maior paralisação das lesões quando da comparação da utilização de somente soluções cariostáticas, sugerindo que o selamento da cavidade é essencial para este processo.

Segundo MALTZ et al.⁵⁰, após 6 – 7 meses de estudo, a densidade das lesões aumentou significativamente, fato este observado por meio de subtração radiográfica, indicando paralisação do processo carioso e conseqüente remineralização. Neste estudo, também foi observado que o número de bactérias totais e cariogênicas reduziu significativamente, assim como a dentina, que se apresentou mais dura, seca e marrom escura. Em outro estudo⁷³, não foi observado aumento de densidade das lesões, porém estas não progrediram em 75% dos casos. Esta diferença de resultados, pode estar no fato de que este último⁷³ se utilizou de avaliação visual das radiografias.

Vários trabalhos na literatura relatam o sucesso da IM por meio de acompanhamentos clínicos de selantes e restaurações. HANDELMAN et al.²⁹ em 1987, verificaram o comportamento clínico, por meio de retenção, de selantes realizados sobre lesões incipientes de cárie em esmalte. O sucesso foi semelhante aos selantes realizados em dentes sadios. Um trabalho clássico na literatura sobre a IM é o de MERTZ-FEIRHURST et al.⁵⁶, que compararam três tipos de tratamento. Foram realizadas restaurações de resina composta e amálgama. No grupo das resinas, somente se realizou um bisel em esmalte, permanecendo toda dentina amolecida. O tratamento realizado com amálgama foi o convencional, com remoção de toda a dentina cariada, com ou sem selamento superficial. Depois de dez anos, as duas técnicas que receberam o selante superficial, tanto o grupo da resina quanto do amálgama, obtiveram resultados promissores e o grupo que não se realizou remoção completa de tecido cariado (resina composta) apresentou um grande potencial para paralisar a lesão cariosa.

Trabalhos que utilizam materiais tidos como cariostáticos, como os CIVs também são empregados nesta técnica de IM. Segundo WEERHEIJM et al.⁸⁹, em 1999, a utilização de CIV reduziu a microflora de forma significativa após dois anos e esta redução foi maior que quando comparada àquela observada no grupo que recebeu amálgama.

Os trabalhos de IM estão apoiados na não remoção de tecido desmineralizado e/ou infectado e na realização de restaurações adesivas. A remineralização, diminuição de bactérias e conseqüente paralisação também podem ser observados em trabalhos de tratamento expectante^{6,7}, nos quais a mesma metodologia é aplicada, somente diferenciando da IM pela remoção do tratamento inicial, após certo intervalo, para a realização do tratamento convencional.

2.2 - MICROBIOLOGIA DA DENTINA CARIADA

Muitos estudos presentes na literatura descrevem a variedade de microorganismos encontrados na placa bacteriana ou biofilme em pacientes com diferentes condições bucais, desde livres de doença até apresentando cárie dentária

ou doença periodontal. Como a microbiota do biofilme é diferente da microbiota encontrada na dentina cariada⁴⁴, devido a própria presença da cavidade, e como este estudo analisou a microbiota da dentina cariada em diversas situações, este tópico da revisão da literatura ficará restrito a revisão de trabalhos que estejam relacionados com a descrição da microbiota dentinária, excluindo assim, o trabalhos que descrevem a população do biofilme.

Desde 1916, estudos utilizando-se o cultivo de dentina cariada, observaram que as bactérias presentes nesta região eram na maioria acidogênicas (produtoras de ácido) e acidúricas (tolerantes ao meio ácido), com predominância de bastonetes gram-positivos. A partir do cultivo destas bactérias em meio seletivo ácido com pH inicial igual a 5, observou-se a presença de *Lactobacilos* com grande incidência. A partir de então, se pensou que o causador principal da doença cárie eram essas bactérias e grande número de pesquisas foram realizadas sobre o papel dessas bactérias no processo carioso. Esta época é denominada na literatura por *era do Lactobacilos*. Posteriormente, descobriu-se que o iniciador da lesão cariosa em esmalte é o *S. Mutans*, que produz proteínas extracelulares que são fundamentais na adesão do biofilme ao dente e, conseqüentemente no início da desmineralização do esmalte dentário⁴³.

A partir do momento em que há cavidade em esmalte ou esmalte e dentina, as bactérias do biofilme adjacente não são mais representativas da flora cariogênica encontrada na dentina cariada. A lesão de dentina torna-se um sítio retentivo onde os baixos pHs predominam, e estes por sua vez, além de solubilizar minerais e desnaturar colágeno, alteram, ou selecionam o microambiente. Somente os microorganismos mais acidúricos sobrevivem, especialmente os *Lactobacilos*. No entanto, o aumento do número de *Lactobacilos*. é uma conseqüência da formação da cavidade, contribuindo para o progresso da lesão, classificando-os, desta forma, como agentes secundários da doença cárie.

A partir da observação de vários estudos na literatura sobre a microbiota da dentina cariada^{4,5,14,38,43,44,51,62,63,67} pode-se concluir que esta apresenta-se muito variada e uma grande diversidade de bactérias e em diferentes números são isoladas. Além desta grande diversidade disposta na literatura, ainda deve-se observar que dependente da região da dentina cariada observada (infectada ou afetada), a microbiota pode ser diferente⁸¹.

Apesar desta variedade, os *Streptococos Mutans*, os *Lactobacilos* e os *Actinomyces* são as bactérias gram-positivas geralmente encontradas^{4,12,14,44,51,67}. Ainda há estudos que relatam a presença de bactérias gram-negativas, geralmente a *Prevotella*^{4,63}. Há relato⁵ que os *Lactobacilos* não sejam uma bactéria secundária em relação à cárie dentária, pois atualmente foram substituídas por *Bifidobacterium ssp*.

É importante destacar que estas bactérias são frequentemente observadas na maioria dos estudos e podem servir como marcadores que apontam a presença ou não da lesão cariosa naquela camada de dentina analisada.

Apesar de serem classificados como agente etiológicos secundários da lesão, os *lactobacilos* estão presentes na dentina cariada dos estudos presentes na literatura, e este fator justifica o estudo destes microorganismos para se determinar a dentina cariada e sua atividade. Os valores de *Lactobacilos* encontrados na dentina cariada variam muito na literatura, podendo chegar até 50% das bactérias observadas¹⁴.

2.3 - MATERIAIS RESTAURADORES - CIV₂ e

RESINAS COMPOSTAS NA INTERVENÇÃO MÍNIMA

O material preconizado para a IM é um material que possa promover um vedamento adequado da dentina afetada com o meio bucal. Geralmente são utilizados materiais adesivos, principalmente as resinas compostas^{26,28,30,73}. Vários estudos demonstram a diminuição da quantidade de microorganismos após este vedamento^{26,28,30,73} fator este que promoverá uma paralisação da lesão. Mesmo sem se utilizar um material adesivo, porém, aplicando-se uma base de cimento de hidróxido de cálcio, relata-se haver uma diminuição significativa no número de bactérias e uma paralisação da lesão^{7,50}. O único inconveniente, nestes casos, é a necessidade de outra intervenção para substituição das restaurações, após certo período.

No ART (tratamento restaurador atraumático)²⁰, diferentemente da IM, o material utilizado é o cimento de ionômero de vidro (CIV), o qual possui

adesividade química^{18,32} e propriedades cariostáticas, pela liberação e reincorporação de flúor^{25,65}. Estas trocas ocorrem tanto para o meio bucal, quanto para as paredes cavitárias⁷⁹. Este não é o único íon liberado, segundo SMALES et al.⁷⁹, em 2005, a presença de íons fluoreto e estrôncio foi observada na dentina desmineralizada adjacente à restauração.

Apesar desta vantagem os CIVs, geralmente os que apresentam geleificação convencional, mesmo sendo de alta viscosidade²⁷, apresentam desvantagem em relação às características mecânicas¹⁸, o que muitas vezes impossibilita sua utilização em cavidades que recebem esforços mastigatórios²¹.

Para se tentar suprir esta deficiência, vários autores relatam a incorporação de partículas na composição destes materiais, com o objetivo de se obter propriedades mecânicas melhoradas.

YLI-URPO et al.⁸⁸, relataram que a incorporação de vidro bioativo promoveu uma redução da força de compressão e da dureza superficial do material e conseqüentemente, a sua utilização está indicada em locais onde as características mecânicas não serão tão requisitadas. Já com a incorporação de fibras de vidro reativas em 20% do volume, LOHBAUER et al.⁴⁵, em 2004, relatam um aumento de 140% em relação à fratura. Estes aumento em relação à fratura, também é observado quando da incorporação de hidroxiapatita⁴⁶. Neste último caso, a adesividade e a liberação de flúor não apresentaram alterações significantes.

Estes trabalhos trazem alguma modificação em relação à formulação desses materiais, geralmente com a incorporação de componentes inorgânicos a sua composição. Porém, um grupo de pesquisadores⁸³ observou que a indução da presa inicial dos CIVs, com a utilização de ultra-som, poderia trazer benefícios às características mecânicas do material, sem mudança em suas formulações originais.

O emprego do ultra-som na Odontologia data do início da década de 50, quando a indústria lançou de forma experimental um triturador de dentes extraídos. Desde então, o ultra-som tem sido muito aplicado na Odontologia, como

por exemplo, na periodontia, na endodontia, para realização de preparo cavitário, na remoção de coroas totais, dentre outras. Entretanto, apenas recentemente, os seus efeitos físicos no meio em que se aplica têm sido estudados e compreendidos⁴².

Um transdutor presente dentro do aparelho de ultra-som converte oscilações elétricas em vibrações mecânicas que resultam em ondas. Essas ondas são essencialmente a propagação mecânica de energia através de um meio. Nos líquidos as ondas se propagam de forma longitudinal, pois a energia é dissipada dentro do fluido. Nos sólidos, esta é dissipada de forma transversal. Nos tecidos duros do corpo humano, podem ocorrer os dois tipos de ondas, ao contrário dos tecidos moles, onde são transmitidas apenas ondas longitudinais, pois as transversais são dissipadas em forma de calor⁴².

Quando as ondas de ultra-som encontram uma interface, tal como ocorre no dente / restauração, parte delas são refletidas para o meio original e, o restante propaga a uma velocidade dependente das propriedades de transmissão do meio⁴².

As ondas de ultra-som provocam alterações no sistema biológico no qual estão sendo aplicadas. Uma melhor compreensão dessas alterações pode permitir o conhecimento dos efeitos e limitações da utilização do ultra-som na Odontologia. Essas modificações podem ser devido ao calor, a atividade de cavitação, a corrente acústica ou à radiação⁴².

Vários trabalhos foram realizados para analisar a influência do ultra-som sobre a polpa, uma vez que energia acústica é introduzida no dente quando o ultra-som é aplicado. Os trabalhos dispostos na literatura empregaram a metodologia com utilização do ultra-som para a realização de cavidades. Há resultados que relatam nenhuma alteração no tecido pulpar⁵⁷; outros relatam alterações mínimas¹¹ sem significância para o tecido pulpar e, por fim, um trabalho relatou que quando emprega-se pressão de aproximadamente 2 kg, o ultra-som poderia causar reações pulpares severas, até necrose³⁵.

A ação do ultra-som na condensação de materiais não é recente. Desde 1958, já se estudava a aplicação do ultra-som na condensação do amálgama⁷⁷. Em relação aos CIVs, o estudo pioneiro realizado por ARCORIA. et al.¹, em 1992, utilizou o ultra-som empregado para limpeza de instrumentais, objetivando-se avaliar a redução de bolhas dos cimentos de ionômero de vidro, por

meio de teste de resistência flexural. Os resultados mostraram que a o resistência flexural dos CIVs manipulado manualmente não sofreu influência do ultra-som, enquanto que o este interferiu nos CIVs manipulados mecanicamente, diminuindo a quantidade de bolhas inseridas e aumentando assim, a resistência flexural.

Segundo KLEVERLAAN et al., em 2004⁴¹, há quatro mecanismos pelos quais o ultra-som pode melhorar as propriedades mecânicas dos CIVs. São eles: a conversão da reação ácido-base dos CIVs é otimizada pelo aumento de temperatura ocasionada pela força cinética oriunda do ultra-som; a mistura entre as partículas inorgânicas e o ácido polialcenóico é melhorada devido à quebra de cadeias maiores inicialmente formadas; a diminuição de bolhas resulta em um material mais compactado e por fim, a proporção pó/líquido é aumentada, pois o aumento de temperatura propicia evaporação de parte do líquido. Estes efeitos foram analisados e confirmados por TOWLER; CROWLEY; HILL, em 2003⁸⁴, quando da observação do material já geleificado, por meio de microscópio de varredura.

Os dados presentes na literatura relatam melhoria nas propriedades mecânicas do material. Nestes estudos, a força de compressão medida na superfície onde o ultra-som foi aplicado diretamente, é aumentada após 15 minutos da manipulação inicial, Após um dia da aplicação do ultra-som, o aumento da compressão observado está em torno de 15%⁸⁶ – 20%⁴¹ em comparação com a geleificação convencional. Após 28 dias, esta diferença cai para 12%⁴¹. Estes dados, inicialmente maiores e gradativamente menores com o passar do tempo, são explicados pela reação inicial mais acelerada, pela maior compactação do material e ainda pela redução da inclusão de bolhas. A dureza superficial, analisada por nanoindentação, aumentou cerca de 1500%⁸³. Esta melhoria podem ser atribuída tanto pelo ultra-som quanto pelo aumento de temperatura provocado do contato entre a ponta do equipamento e a superfície do material. A microdureza Knoop (KHN) também foi observada, quando da utilização do ultra-som, e os dados mostram um aumento significativo em diferentes intervalos de tempo avaliados (15 minutos, 1 hora, 12 e 24 horas)⁴⁸, tanto para os CIVs produzidos no Brasil quanto para os importados. Neste último, após 24 horas, alguns CIVs já não se apresentavam superiores em relação à dureza superficial, fato este explicado pela reação convencional completa do grupo controle. Todos estes trabalhos aplicaram o

ultra-som de forma direta sobre a superfície do material. Há ainda relatos na literatura³ que não observaram influências do ultra-som na tração diametral dos CIVs testados. Este fato é esclarecido pela reação mais rápida do material, que consequentemente gera um material mais friável precocemente, porém sem alterar a coesão do material.

A elevação de temperatura dos CIVs, com presa convencional, foi estudada por KANCHANAVASITA, PEARSON, ANSTICE³⁶, em 1995, e para o Fuji II, foi de 1 a 2,4°C. Resultados similares foram observados em outro estudo⁴¹, no qual a temperatura elevou 1°C para a presa convencional e 13°C para a o CIV com presa induzida por ultra-som. Esta grande elevação de 13°C pode ter sido causada pelo longo tempo de aplicação do ultra-som, que neste caso foi de 45 segundos.

Segundo FAGUNDES et al.¹⁹, em 2006, a adesão de CIV com presa induzido por ultra-som foi superior quando comparada a de CIV com presa convencional, após o período de 24 horas. Os resultados da resistência à tração para os CIVs convencionais foram de 2,21 e 1,85 MPa sem ultra-som e 3,33 e 2,19 MPa com ultra-som, para o Fuji II e Ketac Fil Plus respectivamente. Para o CIV de alta viscosidade (Ketac Molar), os valores foram 2,10 e 2,65 MPa, sem e com ultra-som respectivamente.

2.4 - PCR - DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS CARIOGÊNICOS

A técnica da reação em cadeia pela polimerase – PCR (do inglês polymerase chain reaction) foi idealizada na década de 80 e fornece uma alternativa mais rápida e menos cara para se clonar organismos cuja sequência do genoma já é conhecida. Está baseada na utilização da enzima DNA polimerase para copiar um molde de DNA (sequência de nucleotídeos), em ciclos repetidos de replicação. A enzima é guiada para a sequência a ser copiada por oligonucleotídeos iniciadores curtos (primers) que são hibridizados ao DNA molde no início e no final da sequência de DNA desejada. Dentre as várias aplicações, destaca-se a detecção de microorganismos, partindo-se de pequenas quantidades disponíveis na amostra, a utilização na medicina forense e para

diagnóstico de doenças genéticas.

O trabalho pioneiro utilizando-se desta técnica (PCR convencional) para detecção de bactérias presentes na cavidade oral foi publicado em 1993⁸², e identificou o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em pacientes com infecção sistêmica, abscessos localizados ou periodontite. Ainda diferenciou estas bactérias de seus relativos próximos, os *Haemophilus aphrophilus*. Em estudos relacionados com a detecção de microorganismos relacionados à cárie dentária, vários relataram a diversidade de bactérias encontradas^{14,62,63}. Dentre estes microorganismos encontrados, os *Lactobacilos*, na maioria das vezes foram as bactérias predominantes, variando de 21⁵⁴ a 50%¹⁴ da constituição da microflora presente, dado este não confirmado por outro estudo⁴, no qual a *Bifidobacterium*, de acordo com os autores, foi a bactéria secundária relacionada com a doença cárie.

Ainda se observou que os *Streptococos mutans* podem estar presentes em alta frequência em algumas lesões, porém quase indetectáveis em outras⁵⁴. Segundo CHHOUR et al., em 2005¹⁴, lesões cariosa que não apresentavam altos índices de *Lactobacilos* estavam associadas a uma grande quantidade de bactérias da família da *Prevotellaceae*. Segundo BEIGHTON em 2005⁵, os *Streptococos mutans* são um bom marcador para se avaliar o processo carioso. Porém, esta determinação está relacionada com a presença desta bactéria na saliva de pacientes de alto risco. Em contrapartida, os trabalhos acima citados confirmam que os *Lactobacilos* podem ser estes marcadores, quando da análise de dentina cariada.

Em outro estudo relata-se a presença de bactérias gram-negativas, geralmente *Prevotella*⁶³, em associação à lesão cariosa.

A tecnologia do PCR em tempo real utilizada para quantificar bactérias da cavidade oral foi inicialmente empregada em um estudo publicado em 2000⁴⁷. Esta técnica foi reportada como sensível, eficiente e confiável para a quantificação de bactérias totais e *Porphyromonas gingivalis*, mesmo em amostras complexas. Outro estudo na literatura realizado por NADKARNI et al.⁶⁴, em 2002, confirma esta alta sensibilidade da técnica, no qual o nível de bactérias totais em dentina cariada foi de 40 vezes maior quando da utilização do PCR em tempo real, em relação aos métodos convencionais de plaqueamento.

A partir destes, vários outros estudos^{4,51}, empregando esta metodologia para quantificação de bactérias foram realizados e a microbiota presente na saliva e/ou biofilme foi, na maioria das vezes, analisada. Os dados geralmente encontrados com o PCR em tempo real estão na casa dos 10^9 , em se tratando de bactérias anaeróbias^{4,51}.

BYUN et al., em 2004¹², relatam quantidades de *Lactobacilos* detectados na ordem de 10^7 a 10^8 , em cada miligrama de dentina cariada de lesões avançadas. Este número foi obtido dividindo-se a quantidade de DNA obtido pelo tamanho genômico das cópias destas células. Neste estudo, os primers utilizados produzem clones com tamanho adequado para a utilização em PCR, aproximadamente 100 bases pareadas (bp), porém, a comprovação de reação cruzada com outras bactérias presentes nas lesões cariosas, não foi realizada. Outro trabalho que verificou a presença de *Lactobacilos* está relatado na literatura¹⁷, e este por sua vez, realizou testes de cópia cruzada e comprovou que os primers utilizados são eficazes para a detecção dos *Lactobacilos*, mesmo quando há cepas intimamente relacionadas com estas bactérias.

Por fim, o único trabalho da literatura que comparou bactérias presentes em dentina para se avaliar um determinado tratamento foi realizado por TOI; BONECKER; CLEATON-JONES, em 2003⁸¹, no qual o número de bactérias detectadas, *S. Mutans* e *Lactobacilos*, após escavação manual foi estatisticamente reduzido. Neste estudo, duas camadas distintas de dentina foram comparadas. Não há trabalhos na literatura que avaliam a microflora de dentina após a utilização de tratamento minimamente invasivo. Segundo MUNSON et al., em 2004⁶², a detecção de bactérias inativas seria um problema da utilização do PCR em tempo real.

3 PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

De acordo com as observações relatadas anteriormente, torna-se necessário analisar o efeito do ultra-som sobre os CIV em dois estudos distintos. O primeiro, laboratorial, objetivando determinar a influência de diferentes maneiras de aplicação do ultra-som sobre a resistência à microtração do material com a dentina. O segundo estudo, clínico, avaliando-se a influência da aplicação do ultra-som nas restaurações de CIV, sobre a dentina desmineralizada adjacente à restauração e compará-las com dados de dentina sobre restaurações de resina composta e de CIV com geleificação convencional. Este segundo estudo analisará tanto as características clínicas, quanto os aspectos microbiológicos (bactérias totais e *Lactobacilos*) desta dentina.

De acordo com esta proposição, têm-se as seguintes hipóteses nulas:

Estudo Laboratorial:

HIPÓTESE NULA 1: Não haverá diferenças entre os diferentes métodos de aplicação do ultra-som para acelerar a presa inicial dos CIVs e a geleificação convencional.

HIPÓTESE NULA 2: Não haverá diferenças entre os diferentes tipos de CIV testados.

Estudo Clínico:

HIPÓTESE NULA 3: Não haverá diferenças em relação às características clínicas da dentina afetada entre o baseline e após três meses da realização das restaurações, nos três grupos testados.

HIPÓTESE NULA 4: Não haverá diferenças entre a flora bacteriana inicial e após o período de três meses, nos três grupos testados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Etapa Laboratorial – teste de microtração para verificar a influência do ultra-som na adesão dos CIVs à dentina

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, sob o processo nº H03-00002148-I, obtido em 11/07/2003 (ANEXO A).

Quarenta e cinco terceiros molares hígidos extraídos, não apresentando irregularidades ou trincas de esmalte, foram selecionados para o estudo. Estes dentes receberam redução das cúspides utilizando-se uma politriz com lixa de gramatura 120, até planificação da superfície oclusal, sem necessariamente expor dentina. Este passo foi realizado visando padronizar a confecção da cavidade na máquina de preparo e também a aplicação do ultra-som. Em seguida estas superfícies foram polidas com lixas de papel de gramatura 600.

Dois terços das raízes dos dentes, aproximadamente 10 mm, foram removidos. A câmara pulpar foi limpa com colher de dentina para remoção dos restos pulpar; condicionada com ácido fosfórico a 37% e restaurada com sistema adesivo (Prime & Bond NT – Dentsply) e compômero (Dyract Plus – Dentsply), com o intuito de facilitar o manuseio dos espécimes depois da obtenção dos palitos (Figura 01).

Cavidades foram preparadas nas superfícies planificadas para melhor acomodação do CIV a ser inserido, uma vez que a o ultra-som poderia deslocar o material. Essa cavidade foi padronizada em uma máquina de preparo de espécimes (IOWA specimen preparation machine), utilizando-se alta rotação com refrigeração e brocas carbide 245. As dimensões das cavidades eram: 2 mm de profundidade, 4,5 mm de extensão e 4,5 mm de largura, padronizando-se assim, a quantidade de CIV a ser inserido (Figura 01).

Desde a obtenção dos dentes até anteriormente à fase dos procedimentos restauradores, estes permaneceram armazenados em solução salina de azido de sódio a 0,1%.

Os dentes foram divididos aleatoriamente em três grupos de quinze dentes cada, de acordo com o material a ser testado, Ketac-Molar Aplicap – KMA (3M – ESPE / lote #225305), Ketac-Molar Easymix – KME (3M - ESPE / lote #232403), e Fuji IX GP – FIX (GC Corp-Japão / lote# 0509291). Estes grupos de diferentes materiais foram novamente divididos em três grupos de cinco dentes cada, de acordo com a aplicação ou não de o ultra-som, sendo sem aplicação (S-US), aplicação indireta (US-I) e aplicação direta (US-D). A distribuição dos grupos pode ser visualizada na tabela a seguir:

Tabela 01: Grupos testados em relação ao material e o ultra-som.

Grupo	Material	Aplicação do ultra-som	Sigla dos grupos
G1	Ketac Molar Aplicap	Sem	KMA – S-US
G2	Ketac Molar Aplicap	Indireta	KMA – US-I
G3	Ketac Molar Aplicap	Direta	KMA – US-D
G4	Fuji IX GP	Sem	FIX – S-US
G5	Fuji IX GP	Indireta	FIX – US-I
G6	Fuji IX GP	Direta	FIX – US-D
G7	Ketac Molar EasyMix	Sem	KME – S-US
G8	Ketac Molar EasyMix	Indireta	KME – US-I
G9	Ketac Molar EasyMix	Direta	KME – US-D

As cavidades foram condicionadas com bolinha de algodão embebida em condicionador de dentina, friccionando-se por 10 segundos em todas as paredes da cavidade. Para os grupos KMA e KME, o condicionador de dentina utilizado foi o Ketac conditioner (3M - ESPE) e para o FIX, o Dentin conditioner (GC Corp - Japão), seguindo-se as recomendações dos respectivos fabricantes. As cavidades foram lavadas com bolinha de algodão embebidas em água e secas com papel absorvente, tomando-se o cuidado para manter a cavidade úmida antes do preenchimento.

Os materiais foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante (trituração por 10 segundos para o KMA e FIX e manipulação manual no KME, na proporção, em peso, pó:líquido de 4,5:1. A inserção na cavidade foi

realizada de forma a evitar inclusão de bolhas). Para isto, no grupo KME, o material foi inserido na cavidade com o auxílio de pontas e seringa centrix, pois os demais materiais já se apresentavam sob a forma encapsulada. Após o preenchimento da cavidade, o material foi protegido com vaselina sólida e o conjunto dente/preenchimento recebeu ou não o ultra-som de acordo com o grupo ao qual pertencia.

A aplicação do ultra-som foi realizada com o Cavitron® SPS da Dentsply, na potência média (15 a 20 KHz) e sem utilização da irrigação. No grupo que recebeu indiretamente, a ponta do aparelho foi aplicada nas faces vestibular e lingual do dente por 10 segundos. No caso de aplicação direta, a ponta do instrumento foi aplicada por 20 segundos sobre o material de preenchimento.

Os dentes foram então acondicionados por sete dias em temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e com umidade relativa de 100%.

Após uma semana, os espécimes foram preparados para a realização dos testes. Estes receberam cortes, que resultaram em palitos de dimensões aproximadas de 1 mm de espessura e 1 mm de largura, em uma máquina de corte (LOW SPEED DIAMOND WHEEL SAW – MODEL 650 / SOUTH BAY TECHNOLOGY - SBT – INC; CA – USA (Figura 02 A) com disco em baixa velocidade e com refrigeração, obtendo-se em média de 5 a 8 palitos por espécime.

Os palitos foram acoplados na máquina de teste DILLON (Figura 02 B), com auxílio de cola Zapit e spray acelerador (Dental Ventures of America, Inc. / CA – EUA) (Figura 02). Os espécimes foram testados utilizando-se célula de carga de 20 Kgf a uma velocidade de 1,0 mm/segundo.

Os dados obtidos da fratura do palito foram anotados em planilhas do Excel, as dimensões individuais de cada palito medidas com paquímetro digital (Figura 02 D) e os resultados transformados em MPa a partir da fórmula:

$$MPa = \frac{Kgf}{\text{área}} \times 9,98$$

Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA a dois critérios, com nível de significância de 5%.

As fraturas foram observadas com auxílio de um estéreomicroscópio (NI-150, Nikon Inc., Melville, NY, USA) com aumento de 50 X. Os tipos de fratura: fratura adesiva entre dentina e CIV; fratura coesiva no CIV e fratura coesiva na dentina foram analisados descritivamente por meio de porcentagem.

Figura 01: Esquema representativo do preparo dos dentes até obtenção dos palitos.

Figura 02: A: Máquina de corte utilizada para obtenção dos palitos; B: Máquina de teste; C: Cola para fixação dos palitos à máquina de testes; D: Paquímetro digital.

Etapa Clínica— determinação da influência de diferentes tipos de materiais restauradores e da utilização da o ultra-som nas características clínicas da dentina e na flora bacteriana

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, sob o processo nº. 127/2004, obtido em 29 de setembro de 2004 (ANEXO B).

Foram selecionados 32 pacientes com idade entre 10 e 16 anos de idade, que apresentavam pelo menos uma e no máximo quatro lesões cáries em dentina, na superfície oclusal, de molares permanentes.

Os critérios para inclusão no estudo foram:

- ✓ presença de lesão cáries em dentina em molares permanentes;
- ✓ ausência de dor espontânea e fístula e
- ✓ cavidades circundadas por esmalte, preferencialmente oclusais.

Os critérios de exclusão foram:

- ✓ presença de fístula e/ou dor espontânea;
- ✓ possibilidade de envolvimento pulpar;
- ✓ presença da lesão cáries em superfícies proximais;
- ✓ presença de lesão somente em esmalte, sem envolvimento da dentina

Os dois últimos critérios foram considerados com o auxílio de imagens radiográficas.

Os responsáveis pelos pacientes selecionados assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para que estes pudessem ser incluídos no estudo (APÊNDICE A).

Uma radiografia interproximal do(s) dente(s) em questão foi(ram) realizada(s) para confirmação se o dente preenchia ou não os requisitos clínicos de inclusão no estudo (Figura 03 A).

Anteriormente aos procedimentos clínicos propriamente ditos, foram preenchidas fichas de anamnese e de CPOS dos pacientes (APÊNDICES B e C).

Os pacientes receberam, inicialmente, uma profilaxia profissional. Em seguida, o paciente recebeu anestesia na região do dentes a ser tratado e este foi isolado com auxílio de isolamento absoluto (Figura 03 C). O dente foi novamente limpo com auxílio de escovas de Robinson e água (Figura 03 D), para se remover placa bacteriana – película adquirida, ou qualquer tipo de contaminação que não tivesse sido removida durante a profilaxia inicial. O dique de borracha e o grampo ao redor do dente envolvido foram limpos com bolinha de algodão embebida em clorexidina a 0,12% (PERIOGARD) (Figuras 03 E e F), para se ter uma assepsia do campo, tomando o cuidado de não englobar a superfície oclusal do dente e a lesão nesta assepsia, uma vez que a determinação da flora bacteriana seria estudada. A abertura cavitária, compreendendo remoção do esmalte sem suporte foi realizada com o auxílio de brocas carbide #330 estéreis em alta velocidade e com refrigeração (Figura 03 G). Após acesso à lesão, a dentina foi qualificada (Figura 03 H) de acordo com suas características clínicas (cor, umidade e dureza), seguindo os critérios descritos por KIDD et al., em 1993³⁹, e os dados foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE D). A dentina poderia ser de acordo com a dureza: mole (fácil penetração da sonda) de consistência média (penetração da sonda após pressão firme) e dura (semelhante ao tecido sadio adjacente); poderia ainda ser úmida (umidade exsudada após penetração da sonda na dentina) ou seca (sem umidade após penetração da sonda na dentina) e em relação à cor, esta poderia ser amarela, marrom clara e marrom escura, de acordo com escala de cor desenvolvida para este fim. Em seguida, a dentina mais superficial, infectada, foi removida com brocas especiais de polímero (SmartPrep System– SSWhite) (Figuras 03 J, K e L), que possuem dureza semelhante a da dentina afetada. Segundo orientações do fabricante, como estas brocas apresentam dureza similar a da dentina afetada, estas se tornam sem corte ao atingir esta camada e consequentemente param de remover dentina neste estágio. Nova determinação das características clínicas da dentina foi realizada (Figura 03 M).

A amostragem para realização do teste de biologia molecular foi obtida com a utilização de uma broca carbide esférica #4, esterilizada e acoplada a um motor de baixa rotação de 350 rpm (Endo Plus –VK DRILLER) (Figura 03 I). A biopsia foi realizada seguindo os critérios descritos por KIDD et al., em 1993³⁹, onde se padroniza a quantidade de amostra pela impregnação de dentina somente nas lâminas da broca. Para facilitar a impregnação de dentina nas lâminas da broca,

uma solução salina estéril de tampão de fosfato foi utilizada para umedecer a broca antes da biópsia (Figura 03 N e O). Após realização da biópsia e confirmação que toda a broca estava impregnada com amostra de dentina, esta foi removida do motor com pinça reta estéril e introduzida em microtubos estéreis, livres de RNAses e DNAses, contendo 1ml do reagente RNA protect bacteria reagent (Qiagen, Inc.) (Figuras 03 P e Q). Este reagente isola e estabiliza RNA bacteriano antes mesmo da digestão da parede celular. O local da biópsia foi anotado para que a nova amostra de dentina que seria colhida no controle de 3 meses não fosse realizada no mesmo local, evitando quantificação de bactérias onde a camada de dentina superficial foi removida pra análise inicial.

A etapa restauradora compreendeu a aplicação de uma fina camada de vaselina sobre a dentina afetada (Figura 03 R), na parede de fundo da cavidade, utilizando-se um microbrush e tomando-se cuidado para deixar as paredes circundantes e o esmalte livres de vaselina. A vaselina foi empregada para evitar dano à camada dentinária a ser analisada durante a remoção da restauração após o período de três meses. O tipo de material utilizado para o procedimento restaurador foi sorteado, sendo resina composta (RC), cimento de ionômero de vidro (CIV) ou cimento de ionômero de vidro com ultra-som (CIV + US). Os procedimentos para o grupo RC compreenderam: condicionamento com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos; aplicação de adesivo Single bond em duas camadas, secagem com jatos de ar; fotopolimerização por 20 segundos; restauração com Filtek Supreme – 3M ESPE, em incrementos e fotopolimerização por 20 segundos de cada incremento. No grupo CIV (Ketac Molar – 3M ESPE (Figura 03 S), o esmalte foi condicionado com ácido poliacrílico, lavado e seco com bolinhas de algodão (Figura 03 T); o material foi inserido com auxílio de pontas (Figura 03 U) e a proteção superficial inicial foi realizada com vaselina sólida. No grupo CIV + US, os passos foram semelhantes ao do grupo CIV, acrescentando a aplicação da o ultra-som após a proteção superficial inicial (Figura 03 Y). Para a o ultra-som utilizou-se o miniPiezon - EMS, Suíça (Figura 03 V), em potência média (~20 kHz) por 20 segundos, sendo 10 na vestibular e os 10 restantes na lingual do dente em questão (Figuras 03 X₁ e X₂). O ultra-som indireto foi aplicado em estrutura dentária, na expectativa de que as ondas se propagassem até o material e propiciassem melhor adaptação e adesão do mesmo às estruturas dentárias. Em todos os grupos, depois de realizada as restaurações, a oclusão foi verificada e possíveis excessos removidos (Figura 03 Z).

No final de cada período de atendimento dos pacientes, os microtubos refrigerados contendo a solução estabilizadora e a amostra de dentina, foram agitados por um minuto em aparelho de agitação (VORTEX), a fim de se remover das brocas toda dentina coletada e promover uma dispersão da amostra fazendo com que toda ela estivesse em contato com a solução estabilizadora. As brocas foram removidas dos microtubos com pinças estéreis e livres de RNases e DNases e estes foram congelados a -70°C até a etapa de realização dos testes de biologia molecular.

Após três meses os pacientes retornaram e as restaurações foram avaliadas clinicamente conforme o adaptação marginal, utilizando-se um explorador. As restaurações foram removidas com brocas carbide em alta velocidade e com refrigeração (Figura 04 B), tomando-se cuidado para não contaminar e nem remover acidentalmente a dentina antes da determinação das características clínicas e da biópsia. A parte mais profunda da restauração foi removida com auxílio de uma cureta de dentina estéril (Figura 04 C), fazendo-se movimento de alavanca. Nova coleta de dados sobre as características da dentina (Figura 04 D) e novas biópsias de dentina (Figura 04 E) foram realizadas seguindo os critérios já descritos na fase inicial do projeto. Os dados foram anotados nas fichas dos pacientes (APÊNDICE D).

Os pacientes receberam os tratamentos convencionais das lesões com restaurações de resina composta (Figura 04 F) e foram dispensados. Todo tipo de tratamento restaurador que não estivesse incluído no estudo foi realizado neste período de 3 meses entre o baseline e o controle.

Figura 03_{A-Z}: Etapa clínica realizada no baseline para o grupo de CIV + US. A – radiografia interproximal inicial. B e C – aspecto clínico inicial e dente isolado. D – dente recebendo limpeza com água e escova de Robinson. E e F – limpeza com clorexidina a 0,12% e posterior secagem. G – remoção de esmalte sem suporte com brocas carbide # 330. H – aspecto da cavidade aberta. I – Motor de baixa velocidade utilizado para remoção seletiva de cárie. J, K e L – Broca de polímero utilizada, SmartPrep e caso clínico. M – Aspecto clínico após utilização da broca. N e O – Procedimentos para a biopsia da dentina. P e Q - Reagente utilizado para conservação da amostra e etapa clínica. R – aplicação de vaselina com microbrush no fundo da cavidade. S – Material restaurador utilizado nos grupos CIV e CIV + US. T – Condicionamento da cavidade. U – Realização da restauração. V e X – Equipamento de ultra-som utilizado e seqüência clínica. Y – Proteção superficial inicial com vaselina. W e Z – Aspecto da restauração finalizada.

Figura 04_{A - F}: Etapa clínica - controle de três meses. A- Limpeza inicial. B – Remoção da restauração. C – Remoção final da restauração com curetas estéreis. D – Caracterização da dentina. E- Biopsia. F – Restauração com resina composta.

Processamento das amostras – Biologia molecular

O processamento das amostras e dentina colhidas foi realizado junto a Universidade de Michigan, no departamento de Cariologia, Ciências Restauradoras e Endodontia, sob a supervisão da Dra. Mathilde C. Peters e orientação da Dra. Fang Gu e do Dr. Christopher Fenno.

A etapa laboratorial para quantificação da flora bacteriana será descrita em três diferentes protocolos para facilitar sua descrição.

1. CRESCIMENTO DE *LACTOBACILOS CASEI* E QUANTIFICAÇÃO POR MEIO DE PLAQUEAMENTO PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO A SER UTILIZADA NAS DETERMINAÇÃO POR PCR E RT-PCR EM TEMPO REAL.

Esta etapa compreendeu na construção de uma curva padrão com DNA de *Lactobacilos Casei* conhecido a ser utilizada em cada bateria de determinações de DNA das amostras utilizando-se o PCR real time.

A cepa ATCC 15008 de *Lactobacilos casei* foi obtida de estoque congelado a -70°C e uma pequena quantidade removida com bastão previamente flambado e estéril e colocada em infusão de BHI (BD, Franklin Lakes, NJ) para crescimento. A infusão de meio de crescimento e bactéria foram levadas para a câmara anaeróbica a 37°C , e permaneceram neste local até a solução começar a turvar-se (36 horas), indicando crescimento bacteriano em fase exponencial. Após esse período, a cultura de bactéria e solução de crescimento foram removidas da câmara e 10ml da solução foi centrifugada para extração de DNA bacteriano. Este volume foi determinado para se ter uma quantidade adequada de DNA extraído, uma vez que a lise de bactérias Gram positivas não é muito eficiente.

Para o plaqueamento foram coletados 100 μl e preparou-se a bateria de diluição em série até $1/10^8$.

A distribuição da diluição pode ser visualizada no quadro a seguir:

Tubo	Conteúdo	Diluição
Tubo 1	✓ 100µl sem diluição	1
Tubo 2	✓ 100µl tubo 1 ✓ 900µl PBS	1/10
Tubo 3	✓ 100µl tubo 2 ✓ 900µl PBS	1/10 ²
Tubo 4	✓ 100µl tubo 3 ✓ 900µl PBS	1/10 ³
Tubo 5	✓ 100µl tubo 4 ✓ 900µl PBS	1/10 ⁴
Tubo 6	✓ 100µl tubo 5 ✓ 900µl PBS	1/10 ⁵
Tubo 7	✓ 100µl tubo 6 ✓ 900µl PBS	1/10 ⁶
Tubo 8	✓ 100µl tubo 7 ✓ 900µl PBS	1/10 ⁷
Tubo 9	✓ 100µl tubo 8 ✓ 900µl PBS	1/10 ⁸

Cem microlitros (100µl) de cada uma das três últimas concentrações da solução seriada foram obtidos para cada plaqueamento, realizado em placas de Agar com BHI. O processo foi feito em duplicata e as CFU contadas depois de 5 dias em câmara anaeróbia a 37⁰C. Os dados obtidos foram aproximados para total de bactéria ativa, com o objetivo de se formar a curva padrão.

Os resultados do plaqueamento nos mostraram que 87 CFU foram obtidas da diluição 1/10⁶, 6 CFU da 1/10⁷ e 0 CFU da diluição 1/10⁸. Estes dados nos indicam que a diluição e o plaqueamento foram realizados de forma correta e os dados obtidos de CFU são confiáveis. A partir destes dados, parte-se para a determinação do número de bactérias da curva padrão. Tem-se que em 0,1ml há 87

$\times 10^6$ bactérias, ou seja $8,7 \times 10^7$, ou melhor, aproximadamente 1×10^8 . Em 10 ml há então 1×10^{10} bactérias, ou seja, uma concentração de 1×10^9 bact/ml. Como dispunha-se 10 ml de solução, o número total de DNA extraído foi de aproximadamente 10^{10} bactérias. A extração produziu 100 μ l de DNA contendo 1×10^{10} bactérias. Como cada amostra para curva padrão era de 1 μ l, a concentração para cada microlitro utilizado sem diluição foi de 1×10^8 . A partir destes dados construiu-se a curva padrão contendo três a quatro diluições em: 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 bactérias, por meio de diluições 1/10.

2. EXTRAÇÃO DE DNA E RNA

Esta etapa compreendeu a extração de DNA e RNA bacteriano presentes nas amostras congeladas -70°C e foi realizada de acordo com os protocolos a seguir:

PRECAUÇÕES TOMADAS PARA SE TRABALHAR COM RNA

Cuidado especial deve ser tomado quando se trabalha com RNA devido a sua instabilidade química e à presença de RNases que podem estar ativadas mesmo após fervura ou autoclavagem prolongada.

- Ao se trabalhar com RNA, utilizar luvas todo o tempo e ter um espaço do laboratório reservado para esta finalidade.
- Aplicar inativadores de RNases (RNase Away, Molecular Bioproduct, #7000) na superfície das bancadas, pipetas e outros equipamentos.
- Utensílios de vidro devem ser aquecidos a $180-200^\circ\text{C}$ por pelo menos 4 horas (autoclavagem não é suficiente para inativar as RNases).
- Utilizar utensílios de plástico e reagentes, como pontas de pipeta e água, livres de RNases.
- Sempre manter a amostra de RNA no gelo quando do preparo do experimento.
- Evitar exposição prolongada do RNA a altas temperaturas ($> 65^\circ\text{C}$), pois esta pode afetar a integridade do RNA.

LISE BACTERIANA:

A lise bacteriana foi realizada utilizando-se somente pontas de pipetas livres de DNases e RNases e com microtubos próprios para utilização com amostras de RNA, a partir do seguinte protocolo:

- (1) As células bacterianas contidas na amostra foram agregadas através de centrifugação em microcentrífuga, em velocidade máxima (15 000 rpm) por 15 minutos.
 - (2) Durante o processo de centrifugação, separou-se a solução de 0,1% de MDPB (metacriloiloxidodecilpiridínio), conservada em refrigerador a 4°C. As soluções aliquotadas das enzimas concentradas (20x) acondicionadas a -20°C também foram separadas para o preparo da solução tampão B. Para cada amostra foram necessários 200 µl de 0,1% MDPB, 20 µl de lisozima, 20 µl de mutanolisina, 20 µl de lisostaphina e 4 µl de ACP (Achromopeptidase).
 - (3) Após centrifugação das amostras, retirou-se o sobrenadante cuidadosamente para não desprezar amostra e resuspendeu-se o precipitado em 136 µl de solução tampão A (4 ml 1 M Tris; pH 8,0; 0,8ml; 0,5M EDTA, pH 8,0; 2,4ml Triton X-100 e 92,8ml água deionizada estéril).
 - (4) A ponta do sonificador foi limpa com álcool 70% e depois com RNase Away para se remover possíveis contaminações com RNases. As amostras foram colocadas em gelo e iniciou-se a sonificação utilizando a potência 40 em três períodos de 10 segundos com intervalos de 10 segundos entre eles. Este cuidado foi realizado para evitar o aquecimento das amostras. A ponta do sonificador foi limpa entre cada amostra com álcool 70% e RNase Away.
 - (5) 264 µl de solução tampão B foram adicionados e incubados a 37°C por 1 hora.
 - (6) Decorrida 1 hora, as amostras foram centrifugadas em velocidade máxima (15 000 rpm) por 15 minutos em temperatura ambiente. Reservou-se o precipitado.
- O sobrenadante foi dividido em duas porções, sendo $\frac{3}{4}$ (300 µl) para a precipitação de RNA e $\frac{1}{4}$ (cerca de 100 µl) para a precipitação de DNA.

EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração de DNA foram utilizados kits de extração - DNeasy® Tissue Kit da Qiagen Inc., Valencia, CA – USA (lotes # 41522177 e # 41525290), seguindo-se o protocolo :

- (1) A solução tampão TE (10 mM Tris-Cl, pH 7,5 e 1mM EDTA, pH8,0) foi acrescentada à amostra (aproximadamente 90 µl de TE), para se regularizar o volume até 180 µl.
- (2) Adicionaram-se 25 µl de proteinase K e 200 µl de solução tampão AL (evitando a adição de proteinase K diretamente à solução tampão AL). Misturou-se por agitação no vortex e incubou-se por 30 minutos a 70°C.
- (3) 200 µl de álcool etílico (96 – 100%) foram adicionados e misturados por agitação no vortex.
- (4) A mistura foi pipetada para uma coluna de centrifugação do DNeasy kit, esta sobre um tubo de coleta de 2 ml e centrifugou-se a 8000 rpm. O filtrado foi descartado.
- (5) O tubo de coleta de 2 ml foi substituído por um novo e 500 µl de solução tampão AW1 foram adicionados. Centrifugou-se a 8 000 rpm por um minuto e o filtrado novamente descartado.
- (6) O tubo de coleta de 2 ml foi substituído por um novo e 500 µl de solução tampão AW2 foram adicionados. Centrifugou-se a 13 000 rpm por três minutos e o filtrado descartado.
- (7) A coluna de centrifugação foi colocada sobre um microtubo de 1,5 ml e 100 µl de solução tampão AE foram adicionados. O conjunto foi incubado em temperatura ambiente por um minuto e centrifugou-se por 1 minuto a 8 000 rpm.
- (8) O filtrado é o DNA extraído e deve ser reservado a -20°C para posterior análise de PCR.

PRECIPITAÇÃO DE RNA

Para a precipitação de RNA foram utilizados kits - RNeasy® Mini Kit da Qiagen Inc., Valencia, CA – USA (lote # 41523635), seguindo-se o protocolo:

- (1) Acrescentou-se água livre de DNase e RNase (ultra pure distilled water DNase, RNase free – Invitrogen Corp. Lote # 1289514) para regularizar o volume até 450 µl (aproximadamente 150 µl).
- (2) 250 µl de álcool etílico (96 – 100 %) foram adicionados à solução e misturados por meio de pipetagem.
- (3) A amostra (cerca de 700 µl), incluindo qualquer precipitado que possa ter formado, foi colocada em minicolunas de Rneasy Kit acopladas a tubos de coleta de 2 ml. Esta etapa foi realizada em duas vezes e a amostra dividida em duas porções para se evitar o contato da solução com a tampa da mini coluna. A centrifugação também foi realizada duas vezes para processar a amostra toda. O tubo foi gentilmente fechado, tomando-se o cuidado de não espirrar amostra ou tocar no interior da tampa da coluna. A centrifugação foi realizada por 15 segundos a 10 000 rpm e o filtrado foi descartado. O tubo de coleta de 2 ml pode ser mantido.
- (4) 700 µl de solução tampão RW1 proveniente do kit foram adicionados na coluna de centrifugação. O tubo foi gentilmente fechado e centrifugado por 15 segundos a 10000 rpm. O filtrado e o tubo de coleta foram descartados.
- (5) A mini coluna foi transferida para um novo tubo de coleta e 500 µl de solução tampão RPE foram adicionados. Fechou-se o tubo gentilmente e centrifugou-se por 15 segundos a 10 000 rpm para lavar a coluna. O filtrado foi descartado.
- (6) A mini coluna foi transferida para um novo tubo de coleta e 500 µl de solução tampão RPE foram adicionados a coluna. Fechou-se o tubo gentilmente e centrifugou-se por 2 minutos a 10 000 rpm para secar a membrana de sílica gel. O filtrado foi descartado e segundo o fabricante dos kits, nesta etapa o RNA precipitado está na membrana

de sílica gel.

- (7) A mini coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml fornecido pelo kit e 30 μ l de água desprovida de RNase foram adicionados diretamente sobre a membrana de sílica. Centrifugou-se a 10 000 rpm por um minuto. O filtrado é o RNA precipitado.
- (8) A conversão do RNA precipitado em DNAC pode ser iniciada ou o RNA precipitado pode ser reservado em freezer a -70°C .

CONVERSÃO DE RNA EM DNAC

Como o RNA possui pouca estabilidade, este foi transcrito em DNAC, para facilitar o manuseio e o processo de quantificação, de acordo com os seguintes passos:

- (1) Para eliminação de contaminação por DNA:
- ✓ 8 μ l de RNA (precipitado seguindo o protocolo acima), 1 μ l de solução tampão de DNase I - 10 x (200 mM Tris – HCL pH 8,4, 500 mM KCl e 20 mM MgCl_2) e 1 μ l de DNase I (Grau de amplificação, 1 unidade por μ l) foram combinados e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente.
 - ✓ A enzima foi inativada adicionando-se 1 μ l de EDTA 25 mM e aquecendo-se por 10 minutos a 65°C (OBS: Uma unidade de DNase I deve ser necessária para tratar 10 μ g de RNA).
- (2) Os seguintes componentes foram adicionados em tubos para PCR de 0,2 ml, livres de RNases:
- ✓ 1 μ l de Random Hexomers;
 - ✓ 1 μ l de dNTP mix (10 mM cada);
 - ✓ 5 μ l de água livre de RNases;
 - ✓ 5 μ l do RNA gerado no passo 1.

Os três primeiros componentes foram preparados em forma de mistura mestre para todas as amostras.

Observação: A partir do passo 2, as amostras são processadas em duplicata.

- (3) A mistura foi aquecida por 5 minutos a 65⁰C e depois resfriada em gelo por 40 minutos (havia um programa pré-estabelecido na iCyclerPCR machine, chamado RT1 dentro da pasta fg).

A cada tubo foram adicionados:

- ✓ 4 µl 5 x Solução tampão Strand;
- ✓ 2 µl 0,1M DTT;
- ✓ 1 µl RNaseOUT

Esta mistura pode ser preparada anteriormente para todas as amostras.

- (4) A mistura foi incubada a temperatura ambiente (25⁰C) por 2 minutos.

Adicionou-se 1 µl de Superscript II RT e misturou-se por meio de pipetação em uma das amostras da duplicata. Na outra amostra, controle sem-RT (para determinar se houve ou não contaminação com DNA), adicionou-se 1 µl de água livre de RNases e Dnases.

- (5) Incubou-se por 10 minutos a 25⁰C, 50 minutos a 42⁰C e 15 minutos a 70⁰C (havia um programa pré-estabelecido na iCyclerPCR machine, chamado RT2 dentro da pasta fg). A amostra obtida corresponde ao RNA transformado em DNAc.

Observação: O DNAc pode ser congelado para posterior utilização ou analisado por meio de PCR imediatamente. Um controle sem transcriptase reversa (controle sem-RT) deve ser realizado para cada amostra processada para se determinar se houve contaminação de DNA durante o processamento do RNA.

3. PCR E RT-PCR – TEMPO REAL.

SEQUENCIA PARA REALIZAÇÃO DE PCR E RT-PCR QUANTITATIVOS EM TEMPO REAL:

- (1) A solução mestre para todas as amostras (96 por placa) foi preparada, desde que a análise seja utilizando-se o mesmo par de primers. Para cada amostra foram utilizados:

- ✓ 10 µl de 2 x Sybr Green Master Mix;
- ✓ 1 µl de primer F;
- ✓ 1 µl de primer R e
- ✓ 7 µl de água estéril livre de Rnases.

Esta mistura mestre foi calculada para todas as amostras, lembrando que cada amostra é analisada em triplicata, ou seja deve-se calcular a quantidade de solução mestre multiplicando-se o número de amostras, mais a curva padrão e o controle negativo por três. Para a placa cheia, são realizadas 96 reações.

A mistura mestre deve ser mantida sempre em gelo para não haver degradação da enzima Taq polymerase.

Para cada processamento, deve haver uma série de amostras de DNA extraídos de soluções com número de bactérias conhecido (curva padrão) e um controle negativo utilizando-se água no lugar de amostra. Todas as amostras devem ser processadas em triplicata para evitar o erro de pipetagem ou contaminação nos dados finais obtidos.

(2) Processamento do PCR em Tempo Real:

Colocou-se a placa de 96 células no gelo. 19 µl de solução mestre foram adicionados em cada orifício e posteriormente adicionou-se 1 µl de amostra (DNA gerado na extração de DNA (PCR quantitativo)) ou DNAC (RT-PCR quantitativo) gerado a partir da precipitação do RNA). As amostras em triplicata devem estar em células adjacentes. O processamento do PCR foi iniciado por meio de programada pré-ajustado na iCycler machine. O ciclo utilizado foi: 15 minutos a 95°C; 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, sendo estes três últimos repetidos por quarenta vezes; 8 minutos a 72°C; 1 minuto a 95°C; 10 segundos decrescendo em cada temperatura, iniciando em 95°C e terminando em 25°C e finalizando a 4°C até remoção do DNA amplificado da máquina.

Para se determinar a quantidade de bactéria total na amostra, foram

utilizados os primers CX 440 (5'-TTGGGTAAAGTCCCGC-3') e CX 441 (5'-ATCCCCACCTTCCTCC-3') desenvolvidos com base na região conservativa do 16S rDNA. (C. Shelburne, comunicação pessoal)

Para quantificação de *Lactobacilos*, os primers específicos para determinação: LbLMA1-rev (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') e R16-1 (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3') foram utilizados¹⁷.

A partir dos dados das quantidades iniciais (starting quantities SQ – valores Ct) da curva padrão (figura 05), obtém-se uma equação da reta e a partir desta, utilizando-se de regressão linear, os dados analisados são convertidos em número de DNA (número de bactérias) ou RNA (atividade metabólica). Para cada sequência de análise deve utilizar a curva padrão, pois mínimas interferências na detecção de fluorescência podem ocorrer.

Figura 05: Gráfico obtido da análise da curva padrão para transformação do valores Ct das amostras em valores correspondentes a números de bactérias.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da etapa laboratorial foram analisados pelo teste de ANOVA a dois critérios, com nível de significância de 5%. O tipo de fratura observado foi analisado descritivamente por meio de porcentagem.

Os dados das características clínicas da dentina foram submetidos ao teste de Friedman e Mann-Whitney para comparações entre os tipos de tratamento. Os dados referentes aos testes de biologia molecular foram submetidos ao Procedimento de Medidas Repetidas para as bactérias totais e para os dados das amostras detectáveis com *Lactobacilos*; para análise de *Lactobacilos* em todas as amostras, o teste de McNemar foi utilizado (SAS v.9.12, SAS, Cary, NC). Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical line intersecting. The horizontal line is composed of several overlapping, slightly offset strokes, giving it a layered appearance. The vertical line is also composed of several overlapping, slightly offset strokes, creating a similar layered effect. The lines are black and extend across the width and height of the page.

5. RESULTADOS

De acordo com a metodologia empregada, os dados obtidos do estudo laboratorial podem ser visualizados na tabela 02.

Tabela 02: Média e desvio-padrão (dp) dos dados do teste de microtração de cada grupo testado.

Material \ MTBS – MPa	S-US ± dp	US I ± dp	US D ± dp
Ketac Molar Aplicap	5,702 ± 2,759	5,962 ± 1,505	3,65 ± 2,734
Fuji IX GP	4,811 ± 1,577	7,198 ± 2,566	3,774 ± 1,202
Ketac Molar EasyMix	4,852 ± 1,308	6,258 ± 2,672	4,039 ± 1,758

Utilizando o teste ANOVA a dois critérios tem-se que a utilização do ultra-som influenciou estatisticamente os resultados, sendo que $US-D < S-US < US-I$ ($p < 0,0001$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tipos de materiais testados ($p = 0,8495$) e nem na interação material restaurador / o ultra-som ($p = 0,3812$).

A tabela três mostra a distribuição dos tipos de fratura observados em cada grupo.

Tabela 03: Porcentagem dos tipos de fratura observadas em cada grupo

GRUPOS	FRATURA ADESIVA – CIV/DENTINA (%)	FRATURA COESIVA NO CIV (%)
KM Easymix sem US	78.1	21.9
KM Easymix + US indireto	48.1	51.9
KM Easymix + US direto	73.9	26.1
KM Aplicap sem US	64.0	36.0
KM Aplicap + US indireto	57.1	42.9
KM Aplicap + US direto	82.4	17.6
FIX GP sem US	70.6	29.4
FIX GP + US indireto	43.5	56.5
FIX GP + US direto	83.3	16.7

Pode-se observar que nos grupos onde a aplicação do ultra-som foi realizada indiretamente, a porcentagem de fraturas coesivas no CIV foi maior. Estes dados também são confirmados por maiores valores de força de microtração observados.

Resultados do estudo clínico

A idade média dos 32 jovens incluídos neste estudo foi de $13,8 \pm 1,5$.

O CPOS da população estudada foi $6,31 \pm 3,89$, sendo que o componente cariado correspondeu a 74,3% do índice obtido.

Dois pacientes, nos quais haviam sido realizadas 6 restaurações, se recusaram a comparecer ao acompanhamento de 3 meses. As restaurações não foram substituídas e os responsáveis foram notificados quanto à necessidade de substituição das mesmas. Dentre as seis restaurações não acompanhadas, duas pertenciam ao grupo das resinas compostas (RC), três ao do cimento de ionômero de vidro (CIV) e apenas uma ao grupo do cimento de ionômero de vidro com o ultra-som (CIV + US).

As lesões cariosas foram caracterizadas radiograficamente no baseline ,segundo à extensão, como moderada ($< 50\%$ da extensão da dentina) ou extensa ($> 50\%$ da extensão da dentina) e ainda clinicamente como ativas ou paralisadas. Os dados obtidos desta avaliação estão dispostos no gráfico 01. O eixo “y” representa o número de lesões avaliadas e o eixo “x”, as características observadas de acordo com a extensão e atividade da lesão.

Gráfico 01: Extensão e atividade das lesões estudadas de acordo com os diferentes grupos.

Os dados clínicos das características da dentina nos seguintes momentos: 1) após a abertura da cavidade (dentina infectada), 2) após remoção da dentina com a broca de polímero – SmartPrep - SSWhite (dentina afetada) e 3) após os três meses de controle podem ser observados nos gráficos a seguir (02, 03 e 04):

Gráfico 02: Dureza clínica da dentina infectada, afetada e da dentina após três meses do tratamento. Distribuição de acordo com o tipo de restauração. Eixo “y” representado por porcentagem de lesões avaliadas.

Gráfico 03: Umidade clínica da dentina infectada, afetada e da dentina após três meses do tratamento. Distribuição de acordo com o tipo de restauração . Eixo “y” representado por porcentagem de lesões avaliadas.

Gráfico 04: Coloração clínica da dentina infectada, afetada e da dentina após três meses do tratamento. Distribuição de acordo com o tipo de restauração. Eixo “y” representado por porcentagem de lesões avaliadas.

Pode-se verificar no gráfico 01, que as lesões incluídas neste estudo apresentavam-se na sua maioria com extensão moderada, ou seja, com envolvimento menor que 50% da espessura da dentina, medida esta obtida por meio de radiografias interproximais e que na grande maioria estas lesões estavam ativas.

Em relação à dureza e umidade da dentina, pode-se observar que após o uso da broca de polímero, a maioria das lesões apresentava-se com consistência média e úmidas. Depois de três meses, este quadro mudou e a maioria das lesões apresentava-se dura e seca. Esta mudança, tanto para a dureza ($p < 0,001$), quanto para a umidade ($p < 0,001$), foi estatisticamente significativa nos três grupos testados (Friedman). Em relação a coloração, esta apresentava-se mais escurecida inicialmente, se tornou mais amarelada depois da utilização da broca de polímero e após três meses se apresentou com cerca de 42% das lesões amareladas, 44% das lesões marrom claro e 14% marrom escuro. Apesar das alterações observadas na coloração, os dados não foram estatisticamente significante ($p > 0,05$ para todas as comparações individuais dentro de cada grupo - Friedman).

Os três grupos se comportaram semelhantemente entre si, quanto às alterações ocorridas em relação à cor, à umidade e à dureza, nos três períodos testados ($p > 0,05$ em todos as comparações – Mann-Whitney).

Para a etapa de processamento utilizando-se técnicas de biologia molecular tem-se os seguinte resultados:

O processamento das amostras seguiu os protocolo já descrito no item material e métodos, tomando-se o cuidado de processar a extração de DNA e RNA e quantificar as amostras por par, ou seja, sempre realizando o baseline e o controle de três meses da mesma lesão na mesma bateria de processamento. Este cuidado foi realizado pois como a análise dos dados seria realizada pela diferença entre o controle de três meses e o baseline, qualquer desvio ocorrido do protocolo estabelecido não incluiria erros deste processamento nas diferenças obtidas, pois ambas as amostras passariam pela mesma seqüência de análise.

Para adequada compreensão, os dados obtidos da quantidade

de DNA bacteriano estão relacionados com o número de bactérias presentes na amostragem, sem se determinar sua atividade. Os dados referentes ao RNA clonado (DNAC), estão relacionados ao número de RNAm produzido pelas bactérias. Estes valores determinam a atividade bacteriana da lesão.

Como os dados referentes ao DNA e ao RNA analisam a mesma população bacteriana e podem variar independentemente, pareceu interessante determinar a atividade metabólica média das bactérias nas amostras dividindo-se o número de DNAC (que indica se as bactérias estavam ativas metabolicamente) pelo número de DNA obtidos (número de bactérias na amostra). O valor obtido foi chamado de expressão metabólica por célula.

Ainda para a avaliação dos dados, a razão 3 meses – baseline foi determinada, tanto para o DNA quanto para o RNA bacteriano, para se verificar a influência dos diferentes tipos de tratamento após três meses de controle. Esta razão indica as alterações (aumento, diminuição ou estabilidade) de DNA e RNA ocorridas após três meses do tratamento em uma mesma lesão cariosa.

RESULTADOS OBTIDOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE BACTÉRIAS TOTAIS:

O número de bactérias totais (DNA bacteriano) nos três tipos de tratamento e nos dois períodos de avaliação pode ser visualizado no gráfico 05.

Gráfico 05: Média e dp de DNA bacteriano para bactérias totais, em função dos diferentes tipos de restauração e do tempo avaliado.

Não houve diferenças estatisticamente significante no DNA bacteriano dos três grupos testados de acordo com o tipo de tratamento ($p=0,1062$) e de acordo com o tempo avaliado ($p=0,3712$). Também não houve diferenças nos níveis de DNA bacteriano entre os três grupos no baseline ($p=0,4649$) e no controle de três meses ($p=0,2183$).

O número de RNA detectado de bactérias totais (DNAc) nos três tipos de tratamento e nos dois períodos de avaliação pode ser visualizado no gráfico 06, por meio da média e desvio padrão.

Gráfico 06: Média e dp de RNA bacteriano para bactérias totais, em função dos diferentes tipos de restauração e do tempo avaliado.

Não houve diferenças estatisticamente significante no RNA bacteriano dos três grupos testados de acordo com o tipo de tratamento ($p=0,4131$) e de acordo com o tempo avaliado ($p=0,2785$). Também não houve diferenças nos níveis de RNA entre os três grupos no baseline ($p=0,3744$) e no controle de três meses ($p=0,7541$).

A alteração tanto de DNA quanto de RNA (DNAc) bacteriano entre o baseline e o controle de três meses foi calculado pela razão entre os dados obtidos no controle de três meses sobre o inicial. A razão obtida pode ser observada no gráfico 07.

Gráfico 07: Proporção 3 meses / baseline e dp tanto de DNA quanto RNA bacteriano para bactérias totais, em função dos diferentes tipos de restauração.

Não houve diferença estatisticamente significativa nas alterações entre o baseline e o controle de 3 meses tanto no DNA ($p=0,8952$) quanto no DNAC (RNA) ($p=0,2233$) para os três grupos estudados. Individualmente, também não foram observadas diferenças entre as alterações de DNA e DNAC respectivamente nos grupos CIV ($p=0,5001$; $P=0,5868$), CIV + US ($p=0,4682$; $p=0,2377$) e RC ($P=0,8485$; $p=0,9531$).

A expressão metabólica por célula das bactérias totais está demonstrada a seguir no gráfico 08, e foi calculada pela razão do RNA sobre o DNA bacteriano.

Gráfico 08: Média da expressão metabólica relativa por célula e desvio padrão nos diferentes tipos de tratamento nos diferentes períodos avaliados.

Não houve diferenças estatisticamente significante de acordo com o tratamento restaurador realizado ($p=0,7473$) e nem com o tempo de avaliação ($p=0,1729$) em relação à expressão metabólica por célula.

RESULTADOS OBTIDOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE *LACTOBACILOS*:

Os dados obtidos utilizando-se primers específicos para detecção de *Lactobacilos* terão parte da análise de forma descritiva pois 53% das amostras analisadas no baseline e 63% no controle de três meses não apresentavam DNA ou este estava abaixo do nível de detecção do método utilizado, o qual correspondia a 10^2 células.

Os dados a seguir relatados estão relacionados ao DNA bacteriano, ou seja, ao número de células de *Lactobacilos*, uma vez que em nenhuma amostra foram obtidos níveis detectáveis de RNA, sugerindo nenhuma atividade metabólica deste tipo de bactéria cariogênica tanto inicialmente quanto no controle de três meses.

A descrição dos dados referentes ao DNA será dividida nos diferentes grupos testados.

✓ GRUPO CIV:

- Neste grupo, doze amostras (44,4%) das vinte e sete analisadas apresentaram níveis detectáveis de DNA bacteriano de *Lactobacilos*.
- Destas 12, somente uma não apresentou nível detectável após o período de três meses.
- Em contrapartida, uma amostra que não apresentou nível detectável de *Lactobacilos* no baseline, o apresentou no controle de três meses ($1,42 \times 10^3$).

✓ GRUPO CIV + US:

- Treze amostras (46,4%) das vinte e oito analisadas apresentaram níveis detectáveis de DNA bacteriano de *Lactobacilos*.
- Destas 13, quatro não apresentaram níveis detectáveis após o período de três meses.
- Uma amostra que não apresentou nível detectável de *Lactobacilos* no baseline, o apresentou no controle de três meses ($1,29 \times 10^4$).

✓ GRUPO RC:

- Treze amostras (50%) das vinte e seis analisadas apresentaram níveis

detectáveis de DNA bacteriano de *Lactobacilos*.

- Destas 13, seis não apresentaram níveis detectáveis após o período de três meses.
- Duas amostras que não apresentaram níveis detectáveis de *Lactobacilos* no baseline, o apresentaram no controle de três meses ($8,88 \times 10^2$ e $5,15 \times 10^3$).

Como grande parte das amostras apresentaram níveis não detectáveis de *Lactobacilos*, não foi possível realizar um teste estatístico paramétrico e mesmo sabendo que um teste não paramétrico não teria o mesmo poder, optou-se por realizá-lo incluindo-se todas as amostras. O teste McNemar (SAS 9.1.3 para Windows – SAS Institute, 2002-2003 #747) foi utilizado, levando-se em consideração o número de amostras detectáveis e comparando-se com o número não detectável. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos testados em relação ao tipo de tratamento realizado ($p=0,8682$), em relação ao tempo de avaliação ($p=0,0615$) e também em relação à interação tempo e tipo de tratamento ($p=0,0662$). Também não foram encontradas diferenças entre o número de amostras detectáveis entre o baseline e o controle de três meses nos três grupos testados ($p=0,3173$, $p=0,1797$ $p=0,0956$, para CIV, CIV + US e RC, respectivamente).

Com este tipo de comparação realizado perdeu-se o efeito de cada tratamento nas alterações de DNA após o período de três meses. Também se verificou que para o teste estatístico ter poder 80%, utilizando-se esta metodologia de análise, cada grupo teria que contar com 75 amostras.

Com isto, optou-se por avaliar somente os pares de amostras que possuíam níveis detectáveis de DNA. Os dados foram transformados em logaritmo para se obter uma distribuição normal e em seguida o teste t - pareado foi utilizado. Não houve diferença estatisticamente significativa tanto no que se diz respeito ao tipo de tratamento ($p=0,3360$) ou ao efeito do tempo de avaliação ($p=0,0886$). Também não foram observadas diferenças no DNA bacteriano dos três grupos testados tanto no baseline ($p=0,9861$) quanto no controle de três meses ($p=0,1428$).

O gráfico 09 reporta dados referentes aos *Lactobacilos* somente das amostras com níveis detectáveis destas bactérias.

Gráfico 09: Média e desvio padrão de DNA bacteriano de *Lactobacilos* das amostras que apresentaram níveis detectáveis destas bactérias.

As alterações depois de três meses foram calculadas pela proporção de DNA aos três meses com o DNA inicial e podem ser observadas no gráfico 10.

Gráfico 10: Média e desvio-padrão da proporção de DNA bacteriano (3 meses / baseline), das amostras que apresentaram níveis detectáveis de

Lactobacilos.

Não houve diferenças nas alterações de DNA entre os três grupos testados ($p=0,5696$). Individualmente, estas alterações também não foram significantes dentro de cada grupo ($p= 0,7399$, $p=0,6311$ e $p=0,3520$ para os grupos CIV, CIV + US e RC, respectivamente)

Com o objetivo de se obter uma melhor visualização do quadro geral de *Lactobacilos* em relação a população de bactérias totais, optou-se por realizar a proporção desses dois dados em cada amostra que apresentou níveis detectáveis de *Lactobacilos*, tendo assim a % de *lactobacilos* no número total de bactérias. O gráfico 11 mostra esta proporção nos três grupos estudados, lembrando-se que somente os pares (baseline e três meses) com números detectáveis puderam ser incluídos nesta transformação.

Gráfico 11: Porcentagem de *Lactobacilos* nos diferentes grupos e tempos estudos.

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Desde a década de 70, HANDELMAN et al. já estudavam a longevidade de selantes resinosos realizados sobre dentina cariada^{28,29}. Seus estudos comprovaram que microorganismos remanescentes sob as restaurações se tornavam-se inativos em períodos precoces, propiciando uma técnica menos invasiva. Após aproximadamente 3 décadas, ainda depara-se com muita resistência em relação à técnica da IM.

A primeira etapa deste estudo, a fase laboratorial, foi realizada para determinar qual método de aplicação do ultra-som, direta ou indiretamente ao material, apresentaria melhores resultados de adesão às estruturas dentárias. Os dados apresentados na literatura estão relacionados com a aplicação direta do ultra-som sobre o material que, além do efeito de ondas propagadoras, ainda promove um aumento da temperatura superficial do material, conferindo melhores características mecânicas de dureza superficial⁸³ e de compressão^{41,86}. Segundo KLEVERLAAN et al., em 2004⁴¹, a aplicação diretamente sobre o material promove melhoria em quatro aspectos diferentes: o aumento da temperatura melhora a eficiência da reação; o ultra-som promove melhorias entre as partículas e cadeias polialcenóicas e ainda pode aumentar a superfície reativa total por meio de quebra de partículas já unidas entre si; a melhora da mistura por meio da oscilação diminui bolhas no corpo do material, resultando num material mais compacto e por fim, a proporção pó/líquido é aumentada uma vez que a temperatura promove evaporação do líquido. TOWLER et al., em 2003⁸⁴ já haviam confirmado a quebra dos aglomerados e a conseqüente maior área de reatividade, determinando uma reação mais eficiente dos componentes do cimento, resultando em um corpo sólido final mais compacto. Porém, não se sabe qual o efeito da aplicação indireta do ultra-som sobre a adesão do CIV com a dentina. Há um trabalho na literatura¹⁹ verificando a adesão dos CIVs à dentina, porém o método de aplicação do ultra-som é misto, sendo direto – indireto, apoiando-se sobre o material e sobre o molde utilizado para obtenção do corpo de prova. Os resultados deste estudo mostraram melhorias estatisticamente significante quando da utilização do ultra-som, porém não se sabe se há diferenças entre a aplicação direta ou indireta isoladamente.

Há trabalhos na literatura que avaliaram a adesão de CIVs a dentina por meio de teste de microtração. Os dados observados na literatura são de 9⁹, 12^{16,87} e 14^{80,87} MPa e se apresentam superiores aos dados obtidos neste estudo, quando da polimerização convencional (aproximadamente 5 MPa). Uma das possíveis explicações, para os valores inferiores encontrados, está no fato de não se usar uma superfície planificada para a acomodação do material de preenchimento e sim, uma cavidade em dentina, simulando uma situação clínica e, principalmente, padronizando a aplicação do ultra-som. As forças de contração de presa são liberadas com maior dificuldade em uma cavidade quando comparada a uma superfície lisa, gerando mais tensões na interface. Talvez pelo fato da metodologia utilizada neste estudo, em que uma cavidade foi realizada em substituição à planificação da superfície, não seja adequada uma comparação com os valores presentes na literatura. Os dados aqui relatados também não podem ser encarados como inferiores, mas sim, como sendo mais realistas do ponto de vista clínico, trazendo assim, maior aplicabilidade. Como os diferentes grupos que receberam ou não ultra-som neste estudo passaram pelo mesmo processamento, esta comparação se torna viável entre estes grupos.

Contrariamente ao estudo de adesão do CIV com utilização do ultra-som de FAGUNDES et al. 2006¹⁹, este trabalho obteve resultados negativos quando da aplicação direta do ultra-som sobre o material, porém, resultados favoráveis foram obtidos quando da aplicação em estrutura dentária. A aplicação diretamente sobre o material resultou em valores de adesão inferiores ao grupo que não recebeu nenhum tipo de interferência; este por sua vez resultou em valores inferiores ao grupo que recebeu o ultra-som indiretamente ao material, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Uma das explicações para esta observação está relacionada à utilização de cavidade preparada em dentina e preenchida com CIV. A utilização do ultra-som sobre o material promoveu uma aceleração da presa inicial na superfície do preenchimento e o restante teve uma presa mais lenta. Esta massa abaixo da superfície já endurecida e ainda confinada a uma cavidade sofreu a reação de presa de forma lenta, porém como esta estava confinada no interior do preenchimento, as forças de contração da geleificação não foram liberadas adequadamente, gerando tensões na interface dentina/CIV. Este fato justifica os menores valores observados neste grupo e também nos índices maiores de fratura adesiva. Esta influência foi de tal magnitude que os resultados de adesão se

mostraram inferiores estatisticamente aos dois outros grupos. O grupo que recebeu o ultra-som indiretamente ao preenchimento resultou em valores superiores de adesão, em relação aos dois outros grupos, sendo esta superioridade estatisticamente significativa. Estes dados estão de acordo com as observações de KLEVERLAAN et al., em 2004⁴¹ e TOWLER et al., em 2003⁸⁴, de que os efeitos do ultra-som resultaram em melhor compactação do material e melhor interação das partículas inorgânicas com a matriz. A partir desta observação, subentende-se que o ultra-som atravessa a estrutura dentária e chega até o material, propiciando uma melhor interação deste com as paredes da cavidade. Ainda tem-se o aumento da temperatura, que neste caso é bem menor do que a aplicação direta, pois parte das ondas ultrapassaram estrutura dentária e parte se transformaram em calor⁴².

Uma outra observação interessante está relacionada com os tipos de fratura observados. Pode-se verificar que no grupo que recebeu o ultra-som diretamente sobre o material, as fraturas adesivas predominaram (cerca de 80%), enquanto que no grupo com aplicação indireta de US, as fraturas coesivas no CIV ocorreram com aproximadamente 50% de frequência. Se só fraturas adesivas fossem observadas no grupo com aplicação indireta do US, talvez os valores de adesão fossem maiores. Neste trabalho, os valores obtidos em cerca de 50% dos espécimes, mediu a força coesiva do material e não propriamente a adesão do material com a dentina.

A segunda etapa do estudo compreendeu a parte clínica, determinando-se a influência da aplicação do ultra-som nas restaurações de CIV sobre a dentina desmineralizada e na flora bacteriana presente na cavidade.

As características clínicas observadas inicialmente revelam que a grande maioria das lesões apresentavam-se moderadas, ou seja, com extensão de até metade da espessura da dentina e ativas. Estes dados foram consequência dos critérios de inclusão e exclusão determinados previamente. Lesões cariosas mais extensas, que apresentassem algum tipo de sensibilidade pulpar, foram excluídas, evitando-se assim, o risco de inclusão de dentes apresentando a polpa já em estado irreversível de inflamação. A utilização da IM em cavidades profundas não está contra-indicada, porém estes critérios foram adotados para se padronizar ao máximo o tipo de lesão a ser tratada. Há relatos na literatura da utilização da IM, por meio da escavação gradual (tratamento expectante) da dentina cariada, em cavidades muito profundas^{6,50}. Nestes estudos, foi observado que este tipo de procedimento diminui as chances de exposição pulpar durante a remoção final de tecido cariado quando comparado ao tratamento convencional, além de propiciar um tempo para a paralisação da lesão cariosa, promovendo geralmente endurecimento das lesões.

Em relação à dureza clínica da dentina, pode-se observar que a grande maioria das lesões apresentava inicialmente dentina infectada amolecida. Após a utilização da broca de polímero a consistência predominante foi média, enquanto que a grande maioria foi classificada como endurecida após o período de três meses. No estudo de MALTZ et al., em 2002⁵⁰, 80% das lesões apresentavam consistência dura e 16% consistência média após 6-7 meses. Talvez as lesões do presente estudo, que apresentaram consistência média após três meses, ainda não tivessem chegado ao estágio de total endurecimento devido ao tamanho das lesões, que eram extensas. Estas lesões eram similares entre si em relação ao tamanho e à distribuição deste tecido com consistência média, geralmente próximo às paredes laterais.

Similarmente à dureza, a umidade foi característica, sendo predominantemente úmida inicialmente e predominantemente seca após o período de três meses. Após o período de três meses, a caracterização foi facilitada pela remoção da dentina remanescente com brocas de baixa rotação convencionais, pois esta resultou em um pó de dentina, quando estava seca e pequenos aglomerados

quando ainda estava úmida. Outros estudos também obtiveram dentina seca após o vedamento da cavidade por algum tempo^{6,50}, sugerindo paralisação da lesão.

Em relação à coloração, esta se apresentava marrom clara inicialmente, tornado-se mais amarelada após a remoção seletiva do tecido cariado e após três meses mostrava-se mais homogênea entre os grupos, apresentando cerca de 42% das lesões amareladas, 44% das lesões marrom claro e 14% marrom escuro. Alguns trabalhos relatam não haver correlação entre a coloração da dentina e a presença de bactérias^{39,40,74}. Porém outros estudos relatam haver uma paralisação da lesão associada ao selamento da cavidade, promovendo escurecimento, aumento da dureza e redução de bactérias detectáveis^{6,50,74}. No presente estudo, as lesões não estavam mais escurecidas, concordando com WEERHEIJM et al., em 1993⁹¹. Isto provavelmente pelo curto espaço de tempo avaliado em comparação com outros estudos, que tiveram em média o dobro do período (6 meses) para se promover a remineralização da lesão.

Em contrapartida, WEERHEIJM et al., em 1993⁹⁰, verificaram não haver alteração de cor, consistência e quantidade de bactérias após o período de 3 anos de acompanhamento.

Ao se remover dentina infectada, ou seja, desnaturada e repleta de microorganismos, assume-se que a conduta é realizada por se considerar de suma importância a ausência de bactérias na dentina³⁸. Porém, há comprovações científicas que se a lesão for selada, esta é paralisada^{6,26,28,30,73}. Neste estudo optou-se por remover a dentina infectada para se obter uma padronização inicial das lesões envolvidas no estudo. O método de escolha foi a utilização de uma broca de polímero que se torna sem corte ao se alcançar a dureza da dentina afetada (aproximadamente 20 a 30 KHN²³). A dureza da dentina após utilização deste sistema de remoção de cárie variou de 17⁷⁵ a 25⁶⁸KHN. Por outro lado, a adesão à dentina remanescente da utilização desta broca é cerca de três vezes menor que a da dentina normal⁷⁶, porém este não é um fator importante para este estudo, uma vez que o selamento da cavidade foi obtido às custas de esmalte sadio. Para cavidades complexas e compostas, este dado é importante, uma vez que esmalte sadio nem sempre estará disponível em toda a cavidade e invariavelmente haverá pontos de adesão em dentina e / ou cemento no ângulo cavo-superficial.

Os critérios clínicos são auxiliares para se determinar a paralisação da

lesão ou podem ser referência para se parar a remoção de tecido cariado, sempre levando-se em consideração subjetividade deste método. Estes devem ser aliados a métodos mais modernos como a fluorescência e/ou quantificação de bactérias para se determinar a paralisação ou não da lesão².

Em se tratando de biologia molecular, vários tópicos merecem discussão.

O primeiro deles diz respeito ao método escolhido para determinação do número e atividade metabólica das bactérias. Não há método melhor ou pior para a quantificação de bactérias, mas sim, métodos com certas vantagens e desvantagens em relação a outros. Comparando-se o método de biologia molecular com o plaqueamento pode-se ressaltar que o plaqueamento resulta em valores inferiores, pois várias bactérias, mesmo que ativas, podem não crescer em meios de cultura, ou ainda, os meios seletivos podem não selecionar somente um tipo de bactéria. Este método ainda é sensível às variações do operador em relação ao preparo das placas, a temperatura do bastão e/ou contaminação do meio durante a distribuição da amostra, contagem. O tempo necessário para obtenção dos dados é maior que quando comparado ao PCR. As técnicas de biologia molecular por sua vez são dispendiosas, minuciosas, mas podem detectar todo DNA bacteriano presente na amostra, com graus de sensibilidade e especificidade altos, apesar de detectar também, DNA de bactérias inativas⁶². Para solucionar este fato, o RT-PCR detecta quais bactérias estão ativas metabolicamente.. Por estes motivos e pela falta de estudos de IM com quantificação de bactérias por meio de PCR, esta técnica foi escolhida para o presente estudo.

A construção da curva-padrão também é um tópico a ser discutido e a partir desta, várias observações determinadas. A curva-padrão deste estudo foi determinada por diluição seriada, na escala 10, de solução contendo número conhecido de DNA de *Lactobacilo casei*. O número de bactérias atribuído a cada diluição vem de dados obtidos por plaqueamento ou por densidade. Dependendo do método utilizado, o número obtido pode ser diferente. No caso do plaqueamento, o número seria menor quando comparado com dados referentes à densidade⁴⁴. Isto porque, a quantificação bacteriana por densidade é aproximadamente 100 vezes

maior que por plaqueamento, o que é explicado pelo simples fato de algumas bactérias não crescerem quando plaqueadas⁴⁴. Como neste estudo a curva padrão foi construída com valores obtidos de plaqueamento, comparações com resultados presentes na literatura devem seguir este mesmo protocolo ou ainda, se levar em consideração essa diferença de 100 vezes na quantidade de bactéria.

Em relação ao protocolo de extração de DNA e RNA, há tópicos que merecem discussão.

A lise bacteriana seguiu o protocolo já determinado pelo laboratório do Dr. Christopher Fenno, utilizando-se o MDPB (metacriloiloxidodecilmiridínio), que facilita a quebra da membrana celular de células gram positivas³³; e utilizando-se também enzimas como lisosima, lisostaphina, mutanolisina e ACP (Achromopeptidase). Este protocolo demonstrou resultados de lise bacteriana melhorada, principalmente em relação ao *Streptococos*, que é uma célula gram positiva⁶⁹. Como neste estudo se trabalhou com outra bactéria gram positiva, o *Lactobacilos*, o mesmo protocolo foi seguido, permitindo assim, futuras comparações entre os trabalhos realizados no mesmo departamento.

A extração de DNA e RNA seguiu protocolos já determinados pela Qiagen Inc., empresa responsável pelas minicolunas utilizadas para este fim.

Decidiu-se por fazer a detecção de *Lactobacilos* pois, apesar de não estarem relacionados com o início do processo carioso, estes são presentes na cavidade bucal de pacientes que apresentavam lesões cariosas e ainda, são geralmente encontrados em amostras de dentina cariada, sendo uma das bactérias mais predominantes^{6,14,28,38,39,40,44,50}, chegando até 50% das espécies encontradas¹⁴. Antes mesmo da descoberta que o iniciador da lesão era o *S. Mutans*, acreditava-se que os *Lactobacilos* tinham este papel, pois sempre eram encontrados em amostras de dentina cariada^{43,44}. Esta época é relatada na literatura como era dos *Lactobacilos*.

Para a determinação por meio do PCR em tempo real, foram utilizados os primers CX440 e CX441 do 16S rRNA para as bactérias totais, gerando clones de aproximadamente 100 base pareadas. Para os *Lacobacilos* foram utilizados os primers LbLMA1-rev e R16-1, produzindo clones de aproximadamente 258 bases

pareadas¹⁷. O tamanho ideal a ser copiado está por volta de 100 bases pareadas. Cópias muito maiores que este valor sofrem algum tipo de prejuízo durante a fase exponencial de clonagem, pelo aumento do tempo dos ciclos utilizados ou pelo nível de detecção que pode estar prejudicado para a amostra utilizada. Para este estudo, o par de primers escolhidos não seria ideal se somente o tamanho da cópia formada fosse observado. Outro par de primers que gerariam 100 bases pareadas foi testado¹², porém apresentando reação cruzada com *Streptococcus mutans*, inviabilizando sua utilização. O nível de detecção final para os *Lactobacilos* foi de 100 bactérias, em torno de 100 vezes mais sensível que quando da utilização do plaqueamento.

A 21-mer primer LbLMA1-rev foi única sequência *Lactobacilos*-específica identificada¹⁷. Outro primer foi utilizado, o R16-1, que é universal e proveniente da região terminal do 16S rRNA, conservativa em várias bactérias, inclusive nos *Lactobacilos*. Apesar dos autores não analisarem as 85 espécies e 15 subespécies de *Lactobacilos*, estes verificaram que o *Lactobacillus fructosus* não foi detectado com estes primers, e que 23 espécies foram detectadas, incluindo *L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, geralmente encontrados em lesões cariosas. Por este motivo, se optou por utilizar este par de primers para a detecção de *Lactobacilos* neste estudo.

Em relação aos resultados obtidos do PCR em tempo real para avaliação de bactérias totais, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada em relação tanto ao DNA quanto ao RNA, quando da comparação do baseline entre os diferentes grupos, da comparação entre os dados de três meses entre os diferentes grupos e ainda, as diferenças após três meses em cada grupo comparando-se entre si. Os dados, tanto do baseline quanto do controle de três meses sofreram transformações logarítmicas, pois a variação entre as lesões cariosas se apresentou muito grande, mesmo após o período de três meses, fato este observado no grande desvio-padrão obtido, geralmente maior que a média de cada grupo. Contrariamente ao que se esperava com a utilização da broca de polímero, não foi observada padronização das lesões em relação à população de microorganismos, que apresentou-se bem variada, com necessidade de transformação dos dados em base logarítmica para se ter uma distribuição normal da quantidade de bactérias nas amostras. Observou-se neste estudo uma remoção

efetiva de *Lactobacilos* após a utilização da broca de polímero, fato este também relatado por outro estudo⁸.

Estes dados obtidos neste estudo, são contrários a todos os trabalhos de IM^{26,28,30,73,919} ou tratamento expectante^{6,7,50} que analisaram a microbiologia da dentina após um período de realização do tratamento, quando da utilização do plaqueamento para a determinação do número de bactérias. Esta é uma das diferenças de metodologia que inviabiliza a comparação entre estudos. Isto não significa que os trabalhos da literatura apresentaram resultados melhores, estes só foram analisados de forma diferente. Há relatos na literatura que observam em média um diferença de 100 vezes entre dados de plaqueamento e PCR^{51,64}.

Segundo RICKETS et al. em 1995⁷⁴, após avaliar lesões de esmalte até lesões envolvendo 2/3 da dentina, observou que a presença de bactérias estava correlacionada com a consistência mole e a umidade da dentina, porém não correlacionada com os diferentes parâmetros de coloração. Neste estudo observou-se uma mudança da consistência e da umidade da dentina após 3 meses, resultando em uma dentina mais dura e mais seca. Apesar desta observação, os números de bactérias detectados, tanto bactérias totais quanto *Lactobacilos* não sofreram nenhuma alteração significativa. Uma das explicações para esta diferença pode estar na técnica utilizada para a detecção de bactéria, onde no estudo de RICKETS o plaqueamento foi utilizado enquanto que neste, técnicas de biologia molecular foram utilizadas.

Como não há trabalho que tenha analisado a IM por meio de biologia molecular, torna-se inviável uma comparação numérica. Segundo MUNSON et al.⁶², em 2004, para a utilização de técnicas de biologia molecular deve-se levar em consideração a possibilidade de se superestimar os dados pela possível inclusão de bactérias que, apesar de detectadas, não se apresentam mais viáveis.

A expressão metabólica por célula não apresentou diferenças entre o baseline e três meses e nem entre os diferentes grupos. Nos trabalhos apresentados na literatura, como a utilização do plaqueamento foi absoluto, não era necessário transformações de dados, pois os dados obtidos já se referiam à quantidade de

bactérias ativas que poderiam crescer em determinado meio de cultura. Neste sentido, a redução de bactérias totais é relatada em vários estudos^{26,28,30,50,73,91}. A avaliação da camada infectada e da camada afetada, utilizando-se da tecnologia de PCR, em relação à diminuição de bactérias cariogênicas, tem mostrado uma redução efetiva quando da remoção da dentina infectada⁸¹. Saliente-se que nesse trabalho foram avaliadas duas camadas distintas, diferentemente do presente estudo em que a mesma camada foi avaliada em diferentes períodos de avaliação

Este estudo concorda com as observações de WEERHEIJM et al em 1993⁹¹, em que nenhuma diferença no efeito de restaurações de resina composta e CIV sobre o número de bactérias totais foi observado. Porém, há relatos na literatura, que os íons fluoreto e estrôncio foram observados por meio de análise de EPMA (electron probe microanalysis) no assoalho de cavidades restauradas com CIV⁷⁹. Como o fluoreto tem seu potencial cariostático comprovado na literatura, esperava-se que este tipo de material promovesse redução bacteriana maior que o grupo RC. Ainda há relatos² que as trocas iônicas entre as paredes de fundo de uma cavidade e os CIV ocorrem apoiadas pelo fluxo positivo de fluidos provenientes da polpa. Porém, não se sabe por quanto tempo este processo pode ocorrer, e o simples fato de esta dentina apresentar íons provenientes do CIV, não se sabe se esta impregnação ocorreu somente durante o processo de presa inicial do material. O efeito do selamento é considerado mais importante que o efeito da utilização de substâncias cariostáticas isoladamente⁵⁵.

Os dados referentes aos *Lactobacilos* mostram que quase 60% das amostras não possuíam esta bactéria e que 100% das amostras não apresentavam atividade metabólica destas bactérias. Possivelmente a utilização da broca de polímero foi eficaz na remoção de dentina infectada contendo a maioria das bactéria cariogênicas. Não há trabalhos na literatura que comprovem a eficácia desta broca neste sentido, porém, em trabalhos realizados no mesmo departamento da Universidade de Michigan, e seguindo o mesmo protocolo, com diferença da não remoção de dentina infectada, observou-se a presença de *Lactobacilos* e *Streptococos mutans* em todas as amostras clínicas de dentina infectada. A atividade metabólica também foi verificada em todas as amostra no baseline.

Ainda em relação à presença de *Lactobacilos*, nem a utilização do

ultra-som, nem o tipo de material testado influenciou esta quantificação. Talvez, se a dentina infectada não fosse removida inicialmente e a quantidade de *Lactobacilos* fosse alta, poderia se verificar alguma influência. A partir dos dados restritos obtidos em relação a esta bactéria, restou a realização de testes estatísticos não paramétricos e testes paramétricos com os 40% aproximadamente, de lesões com níveis detectáveis desta bactéria.

No presente estudo, não houve diferenças entre a utilização de CIV ou resina composta como material restaurador. A influência do CIV com a sua liberação de flúor não pode ser citada uma vez que se utilizou vaselina no assoalho da cavidade para posterior remoção da restauração. Esta pode ter influenciado na liberação de fluoretos para o assoalho da cavidade.

Apesar do aumento da força adesiva relatada na parte laboratorial deste estudo, o ultra-som não produziu nenhum efeito, de acordo com a metodologia empregada, na etapa clínica, sobre a flora bacteriana quando comparado ao grupo que não recebeu este tipo de aceleração da presa inicial do material. Mesmo não havendo esta diferença, como as características mecânicas e de adesão são melhoradas e ainda o grupo com US comportou-se semelhantemente ao grupo RC, este método de ativação deve ser indicado.

7 CONCLUSÕES

A decorative graphic consisting of a horizontal line with a thick, dark, irregular stroke in the center, and a vertical line on the right side with a similar thick, dark, irregular stroke.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos as seguintes conclusões podem ser destacadas:

Em relação à etapa laboratorial, a hipótese nula 1 foi rejeitada, enquanto que a 2 foi aceita. Isto porque o ultra-som influenciou a adesão positiva, quando aplicado indiretamente, ou negativamente, quando aplicado diretamente, e ainda não havendo influência dos diferentes CIVs testados.

Em relação à etapa clínica, a hipótese nula 4 foi aceita, pois não houve diferenças entre a flora bacteriana inicial e final e ainda entre as diferenças depois de três meses nos três grupos testados. Ainda a aplicação do ultra-som não promoveu diferenças nas características clínicas e microbiológicas em relação aos outros grupos estudados. A hipótese nula 3 foi parcialmente aceita, pois a coloração da dentina após três meses não foi diferente do baseline, fato este não observado quando da comparação da dureza e da umidade, as quais se apresentaram com características de paralisação da lesão, diferentemente do observado no baseline.

Nas condições que este trabalho foi realizado, conclui-se que o ultra-som quando usado para acelerar a presa inicial de CIVs, deve ser aplicado de forma indireta ao material, desta forma não trazendo prejuízos à adesão da restauração e consequentemente, se comportando clinicamente semelhante às resinas compostas ou CIV sem este tipo de indução de presa, no que se refere às características da dentina remanescente e à flora bacteriana presente nesta dentina.

APÊNDICES

APÊNDICE A – CARTA DE INFORMAÇÃO E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (14)3235-8000 – FAX (14)3223-4679
Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários
e-mail : dep-demd@fob.usp.br – Fone: (14) 3235-8266

Carta de Informação ao paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto de Pesquisa: Biologia Molecular da dentina afetada após tratamento restaurador com cimentos de ionômero de vidro e ultra-som.

Pesquisador Responsável: CD Eduardo Bresciani / Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro

Objetivo: O objetivo deste estudo será investigar o potencial de remineralização da dentina afetada quando da realização de restaurações de cimento de ionômero de vidro ativados ou não por ultra-som.

Métodos e duração do projeto: Este estudo irá avaliar um novo método de restauração para o tratamento da cárie. Irá ser realizada uma restauração (obturação) em seus dentes com cárie e o material utilizado será um material que libera flúor. Este material pode tomar presa mais rápido (endurecer) e pode se adaptar melhor se utilizarmos um aparelho de ultra-som (vibração). Para se verificar este fato, tiraremos uma radiografia inicial e colheremos um pouco da cárie de seu dente antes da restauração. Depois de três meses a restauração será removida e nova coleta de material realizada. Você receberá tratamento convencional deste dente depois da remoção do primeiro tratamento. Todos os dentes que apresentem cárie e não entrem no estudo serão tratados aqui na Faculdade de Odontologia de Bauru. Durante o tratamento serão realizadas fotos de seu dente. Para participar deste estudo, você precisará comparecer na faculdade duas vezes, uma inicial e outra depois de três meses. Depois de finalizado o estudo daremos continuidade ao seu tratamento de acordo com suas necessidades e disponibilidade da clínica.

Riscos: Não há nenhum risco com o tratamento realizado neste estudo além daqueles envolvidos em um tratamento de dentes de rotina. A única diferença é que a cárie de seus dentes será tratada em duas etapas (inicialmente e três meses após) e utilizaremos um aparelho que promoverá vibração em seus dentes por 15 segundos, para melhor adaptação do material.

Benefícios: Novos métodos têm sido desenvolvidos para promover a remineralização de dentes. Com este tratamento você terá grande possibilidade de um reparo natural do seu dente. Uma maior quantidade de dente poderá ser preservada, quando comparado com os métodos tradicionais.

Compensação por doença ou dano: Se algum dano for causado durante o procedimento, o dentista irá proporcionar ao paciente imediato atendimento de primeiros socorros. Adicional atendimento médico, se necessário, será providenciado pela Universidade. A Universidade não dará nenhuma

recompensa a pessoa que tiver algum dano durante o procedimento.

Documentação: Uma cópia deste formulário será guardada com nossa documentação do estudo e você receberá outra cópia. Se você tiver alguma pergunta sobre o estudo, seus direitos, ou qualquer dano que você acha que pode ter sido causado pelo estudo, você pode entrar em contato com a Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro ou o CD Eduardo Bresciani (telefone: 14-3235-7688).

Confidencialidade: Seu nome não será publicado em nenhum momento do estudo. Seus registros serão confidenciais, segundo leis federais, estaduais e locais.

Participação: Participar do estudo é completamente de sua escolha. Você poderá desistir a qualquer momento e por qualquer motivo. Isso não afetará suas chances de tratamento na Faculdade de Odontologia de Bauru. Você será tratado normalmente nas clínicas da Universidade.

Consentimento: Eu li e entendi todas as informações citadas acima. O dentista que estava me tratando se ofereceu para responder qualquer pergunta em relação ao estudo.

Termo de Consentimento Livre e esclarecido

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o(a) senhor(a) _____, portador da cédula de identidade nº _____ SSP/____, representante legal do(a) menor _____, grau de parentesco _____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo(s) profissionais em seus mínimos detalhes, e ciente dos procedimentos que serão realizados, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e do explicado, dá o seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa “Restaurações minimamente invasivas de lesões cáries iniciais na superfície proximal de dentes posteriores” ou permite que o menor do qual é responsável participe da pesquisa.

Fica claro que o paciente e/ou representante legal, podem a qualquer momento retirar o seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar da pesquisa e ciente que todo o tratamento realizado torna-se informação confidencial e será guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética em Odontologia).

Por estar de acordo, assino o presente termo.

Bauru, ____ de _____ de 200__.

Nome por extenso do responsável pelo paciente

Nome por extenso do paciente

Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro- Pesquisadores Responsáveis
CD Eduardo Bresciani

APÊNDICE B – FICHA DE ANAMNESE DO PACIENTE

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (14)3235-8000 – FAX (14)3223-4679
Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários
e-mail : dep-demd@fob.usp.br –Fone: (14) 3235-8266

FICHA DE ANAMNESE

Nome: _____
Endereço: _____ Fone: _____
Data de nascimento: _____

1- Está atualmente em tratamento médico?	Sim	Não	Não sei
2- Teve ou tem problemas cardíacos?	Sim	Não	Não sei
3- Está tomando algum medicamento?	Sim		
Qual? _____		Não	Não sei
4- Foi submetido à cirurgia nos últimos dez anos?	Sim	Não	Não sei
5- Tem tido desmaios ou tonturas?	Sim	Não	Não sei
6- Já teve hemorragia após extração dentária?	Sim	Não	Não sei
7- É alérgico ou teve reação alérgica à anestesia dentária?	Sim	Não	Não sei
8- Já teve reação alérgica com algum medicamento?	Sim	Não	Não sei
9- Já teve febre reumática?	Sim	Não	Não sei
10- Teve ou tem Tuberculose ou outro problema pulmonar?	Sim	Não	Não sei
11- É diabético?	Sim	Não	Não sei
12- Já foi alguma vez tratado de anemia?	Sim	Não	Não sei
13- Você tem problemas com pressão?	Sim	Não	Não sei
14- Já fez tratamento quimioterápico?	Sim	Não	Não sei
15- Apresenta algum outro problema? Especifique.	Sim	Não	Não sei

Declaração do paciente

Eu entendo que estou sendo aceito para exame dentário e minha aceitação para tratamento depende exclusivamente do interesse didático e das viabilidades de tratamento por parte dos estudantes.

Se for aceito para o tratamento, eu autorizo o aluno e o professor a administrar anestesia local e realizar todo o tratamento dentário planejado.

É de meu entendimento que deverei comparecer aos horários estabelecidos. Também permito que sejam fotografados os casos de interesse e que as fotografias possam ser usadas em publicações técnicas odontológicas.

Assinatura do paciente ou responsável

Bauru, _____ de _____ de 2004.

APÊNDICE C – FICHA INICIAL DO PACIENTE – CPOS

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73

PABX (14)3235-8000 – FAX (14)3223-4679

Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

e-mail : dep-demd@fob.usp.br –Fone: (14) 3235-8266

Paciente : _____

Iniciais do Paciente: _____

CPOS

	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8	
M																	M
O																	O
D																	D
B																	B
L																	L

M																	M
O																	O
D																	D
B																	B
L																	L
	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8	

C _____ P _____ O _____ S _____

0 hígido

1 cariado

2 restaurado

3 perdido por cárie

4 perdido por outra razão

5 selado

9 excluído

APÊNDICE D – FICHA DE CARACTERIZAÇÃO DA DENTINA

FICHA DE CARACTERIZAÇÃO DA DENTINA AFETADA

Paciente – Nº Dente: _____ Iniciais do Paciente: _____

Radiografia

Data do Raio-X _____
AAAA / MM / DD

a. Cárie: Grupo Caries: ☐ 1 ☐ 2
1 = moderada ($\leq 50\%$ de dentina coronária envolvida)
2 = extensa ($\geq 50\%$ de dentina coronária envolvida)

Tratamento Clínico => Características da Lesão

a. Descrição da dentina: **PRE-OPERATÓRIA**

Atividade -lesão: ☐ Ativa ☐ Paralisada
consistência: ☐ Mole ☐ Média ☐ Dura
umidade: ☐ Úmida ☐ Seca
coloração: ☐ Amarela ☐ Marrom claro ☐ Marrom escuro

Remoção de cárie e biopsia => Características da lesão

b. . Descrição da dentina: **PÓS-BIÓPSIA**

consistência: ☐ Mole ☐ Média ☐ Dura
umidade: ☐ Úmida ☐ Seca
coloração: ☐ Amarela ☐ Marrom claro ☐ Marrom escuro

Fase Restauradora

Campo seco obtido e mantido? ☐ Sim ☐ Problemático

OPERADOR: _____ DATA: _____
DD / MM / AAAA

Remoção da Restauração – 3 meses => Características da lesão

c. . Descrição da dentina: **PÓS-REMOÇÃO DA RESTAURAÇÃO**

consistência: ☐ Mole ☐ Média ☐ Dura
umidade: ☐ Úmida ☐ Seca
coloração: ☐ Amarela ☐ Marrom claro ☐ Marrom escuro

OPERADOR: _____ DATA: _____
DD / MM / AAAA

OBSERVAÇÕES

APÊNDICE E – SOLUÇÕES UTILIZADAS

- ✓ 10X PBS, pH 7,0 (Solução tampão de fosfato)

NaCl (Cloreto de sódio)	80 g
KCl (Cloreto de potássio)	2 g
Na ₂ HPO ₃ (Fosfato dibásico de sódio)	11.6g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato monobásico de potássio)	2 g
dd H ₂ O (água destilada)	~970 ml / para 1L

- pH calibrado em 7,0 com 4N KOH (~1ml)
- autoclavar e reservar em temperatura ambiente

- ✓ BHI infusão

37 g de pó para cada litro de água destilada

- ✓ BHI placas

BHI base - pó 26 g

Agar 2,5g

Água destilada 1 L

Suspender os ingredientes em água e aquecer sob agitação.

Autoclavar a 121⁰C por 15 minutos.

Esperar esfriar até 45⁰C e distribuir em placas de Petri

Armazenar por até 6 meses em refrigerador.

- ✓ Tampão TE

10 mM Tris-Cl e 1mM EDTA; pH = 8,0

- ✓ Lisozima (Sigma L-6876) – 20X

Dissolver 400mg/ ml água livre de RNases

- ✓ Mutanolisina (Sigma M-9901) – 20X

Dissolver 5KU/ ml água livre de RNases

- ✓ Lisostaphina (Sigma, L-7386) – 20X

Dissolver 100U/ ml água livre de RNases

- ✓ ACP (Sigma A-3547) – 20X

Dissolver 75mg/ ml água livre de RNases

✓ Tampão A – 4 X

20mM Tris (pH 8.0)	0,4845g
2mM EDTA	0,1488g
1.2% Triton X-100 em água livre de RNase	2,4 ml
qsp 50ml	
esterilizar por filtração (filtro de 0,2µM) e armazenar a 4°C	

✓ Tampão B

MDPB 0,1%	200µl
Lisosima	20µl
Mutanolisina	20µl
Lisostaphina	20µl
ACP	4µl

ANEXOS

ANEXO A - DOCUMENTO DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE DE MICHIGAN

eResearch**M**

[Mathilde Peters](#) | [My Home](#) | [Logoff](#)

All Studies

[All Studies](#) > [Microtensile Bond Strength \(MTBS\) Testing of Dental Adhesives](#)

Current State

Approved

[View Study](#)

[Printer-Friendly Version](#)

My Activities

[Post Correspondence](#)

Create New Submission

[New Adverse Event/ORIO](#)

[New Amendment](#)

[New Continuing Review](#)

Microtensile Bond Strength (MTBS) Testing of Dental Adhesives

(H03-00002148-I)

[Pre-Submission](#) [Cancer Review](#) [Ancillary Review](#) [GCRC Review](#) [IRB Review](#) **[Approved](#)**

Study Team Member	Study Team Role	Department	Accepted Role?	CO ₁	Edit Rights	PEERRS Human Subjects?
Mathilde Peters	PI	Cariology, Restor Sci & Endo	N/A	no	yes	yes
Doreen Graden	Other	Cariology, Restor Sci & Endo	N/A	no	no	no

Approval Date: 7/11/2003

Expiration Date: 1/1/3000

Staff Owner:

GCRC ID:

GCRC Study Type:

[Correspondence](#) [Documents](#) [Amendments](#) [Continuing Reviews](#) [AE/ORIO](#) [Notes](#) [Reports](#)

Study Team Correspondence

The query produced no results.

ANEXO B - DOCUMENTO DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 127/2004

Bauru, 16 de março de 2007.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada referente ao Estudo de Caso encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa **“Biologia molecular da dentina afetada após tratamento restaurador com cimentos de ionômero de vidro e ultra-som”** de autoria de Eduardo Bresciani, sob sua orientação foi novamente analisado e considerado **APROVADO** em reunião deste Colegiado realizada no dia **28 de fevereiro de 2007**.

Solicitamos que ao término do trabalho, seja enviado a este Colegiado um relatório final para parecer do trabalho concluído o qual será utilizado para publicação em revista científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

Profª Drª Maria Fidela de Lima Navarro
Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

Eduardo Bresciani

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arcoria CJ et al. Bending strength of Fuji and Ketac glass ionomers after sonication. *J Oral Rehabil* 1992; 19: 607-13.
2. Banerjee A, Watson TF, Kidd EAM. Dentine caries: take it or leave it? *SADJ* 2001; 56: 186-192.
3. Barata TJE et al. Effect of ultrasonic setting on the mechanical properties of GICs. *J Dent Res* 2005; 84, special issue A: abstract #540.
4. Becker MR et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1001-9.
5. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk and groups and its role in caries process. *Comm Dent Oral Epidemiol* 2005; 33: 248-55.
6. Bjørdal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res* 2000; 34: 502-8.
7. Bjørdal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res* 1997; 31: 411-7.
8. Boston DW. New device for selective dentin caries removal. *Quint Int* 2003; 34: 678-85.
9. Botelho MC. The microtensile bond strength of Fuji IX glass ionomer cement to antibacterial conditioned dentin. *Oper Dent* 2005; 30: 311-7.
10. Bratthall D. Introducing the Significant Caries Index together with a proposal for a new global oral health goal for 12-year-olds. *Int Dent J* 2000; 50: 378-84.
11. Butt BG, et al. Ultrasonic removal of tooth structure: a histopathologic evaluation of pulpal response in monkeys after ultrasonic cavity preparation. *J Am Dent Assoc* 1957; 55: 32-6.
12. Byun R, Nadkarni MA, Chour K, Martin E, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clinical Microbiol* 2004; 42: 3128-36.
13. Celiberti P, Francescut P, Lussi A. Performance of four dentine excavation methods in deciduous teeth. *Caries Res* 2006; 40: 117-23.
14. Chhour K, Nadkarni MA, Byun R, Martin E, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 843-9.

15. Chironga L, Manji F. Dental caries in 12-year old urban and rural children in Zimbabwe. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989; 17: 31-3.
16. Choi K, Oshida Y, Platt JA, Cochran MA, Matis Bas, Yi K. Microtensile bond strength of glass ionomer cements to artificially created carious dentin. *Oper Dent* 2006; 31: 590-7.
17. Dubernet S, Desmaures N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology letters* 2002; 214: 271-5.
18. Ewoldsen N, Covey D, Lavin M. The physical and adhesive properties of dental cements used for atraumatic restorative treatment. *Spec Care Dentist* 1997; 17: 19-24.
19. Fagundes TC, Barata TJE, Bresciani E, Cefaly DFG, Carvalho CAR, Navarro MFL. Influence of ultrasonic setting on tensile bond strength of glass-ionomer cements to dentin. *J Adhes Dent* 2006; 8: 401-7.
20. Frencken JE et al. Atraumatic restorative treatment (ART): rationale, technique, and development. *J Public Health Dent* 1996; 56: 135-40.
21. Frencken JE, Makoni F, Sithole WD. ART restorations and glass-ionomer sealants in Zimbabwe: survival after 3 years. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26: 372-81.
22. Fusayama T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Oper Dent*. 1979; 4: 63-7.
23. Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. Relationship between hardness, discoloration, and microbial invasion in carious dentin. *J Dent Res* 1966; 45: 1033-46.
24. Galaviz, LAA; Medina DCA, Garcia ICE. Detection of potentially cariogenic strains of *Streptococcus Mutans* using polymerase chain reaction. *J Clin Pediatr Dent*. 2002; 27:47-52.
25. Gao W, Smales RJ, Gale MS. Fluoride release/uptake from newer glass-ionomer cements used with ART approach. *Amer J Dent* 2000; 13: 201-4.
26. Going RE, Loesche WJ, Grainger DA, Syed SA. The viability of microorganisms in carious lesions five years after covering with a fissure sealant. *J Amer Dent Ass* 1978; 97: 455-62.
27. Guggenberger R, May R, Stefan KP. New trends in glass-ionomer chemistry. *Biomaterials* 1998; 19: 479-83.
28. Handelman SL, Buonocore MG, Schoute PC. Progress report on the effect of a fissure sealant on bacteria in dental caries. *J Amer Dent Ass* 1973; 87: 1189-91.

29. Handelman SL, Leverett DH, Espeland M, Curzon J. Retention of sealants over carious and sound tooth structure. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987;15: 1-5.
30. Handelman SL, Washburn F, Wopperer R. Two-year report of sealant effect on bacteria in dental caries. *J Amer Dent Ass* 1976; 93: 967-70.
31. Horowitz AM. Introduction to the Symposium on minimal intervention techniques for caries. *J Public Health Dent* 1996; 56: 133-4.
32. Hosoya Y, García-Godoy F. Bonding mechanism of Ketac-Molar Aplicap and Fuji IX GP to enamel and dentin. *Am J Dent* 1998; 11: 235-9.
33. Imazato S, Kinomoto H, Torii M, Russel RR, McCabe JF. Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. *J Dent Res* 1997; 76: 768-72.
34. Ismail AI. Reactor paper: minimal intervention techniques for dental caries. *J. Public Health Dent* 1996; 56: 155-60.
35. Jensen JR, Sausen RE. Ultrasonic applications with heavy pressure. *North-West Den* 1957; 36: 310-315. apud Street EVA. Critical evaluation of ultrasonics in dentistry. *J Prosthet Dent* 1959; 9: 132-41.
36. Kanchanasavita W, Pearson GJ, Anstice HM. Temperature rise ion-leachable cements ring setting time. *Biomaterials* 1995; 16: 1261-5.
37. Kidd EAM. Caries removal and the pulpo-dentinal complex. *Dent Update* 2000; 27: 477-82.
38. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004; 83: C35-38.
39. Kidd EAM, Joyston-Bechal, MS, Beighton, D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Res* 1993; 27:402-8.
40. Kidd EAM, Rickets DNJ, Beighton D. Criteria for caries removal at the enamel-dentin junction: a clinical and microbiological study. *Br Dent J* 1996; 180: 287-91.
41. Kleverlaan CJ, van Duinen RNB, Feilzer AJ. Mechanical properties of glass ionomer cements affected by curing methods. *Dental Materials* 2004; 20: 45-50.
42. Laird WRE, Walmsley. Ultrasound in dentistry. Part 1 – biophysical interactions. *J Dent* 1991; 19: 14-7.
43. Loesche WJ. Cárie dental – Uma infecção tratável. Tradução José Carlos Borges Teles, Milton de Uzeda, Wilson Chagas de Araújo. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993. 349p.

44. Loesche WJ, Syed SA. The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentin. *Caries Res* 1973; 7: 201-6.
45. Lohbauer U, Frankenberger R, Clare A, Petschelt A, Greil P. Toughening of dental glass ionomer cements with reactive glass fibers. *Biomaterials* 2004; 25: 5217-25.
46. Lucas ME, Arita K, Nishino M. Toughness, bonding and fluoride-release properties of hydroxiapatite-added glass ionomer cement. *Biomaterials* 2003; 24: 3787-94.
47. Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 2000; 38 :2362-5.
48. Machado RQP. Influência do ultra-som na microdureza de cimentos de ionômero de vidro. Bauru, 2004. 33p. Monografia (Especialização) -Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
49. Maldonado A et. al. An in vitro study of certain properties of a glass ionomer cement. *J Amer Dent Assoc* 1978; 96: 785-91.
50. Maltz M, Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int* 2002; 33: 151-9.
51. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentin by culture and real-time PCR: Association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1698-704.
52. Massler M. Pulpal reactions to dental caries. *Int Dent J* 1967; 17: 441-60.
53. Matthesen M et al. Dental health of children and adults in Guinea-Bissau, West Africa. *Community Dent Healt* 1990; 7: 123-33.
54. Mc Lean JW. Status report on the glass ionomer cements. *J Amer Dent Assoc* 1978; 96: 785-91.
55. McDonald SP, Sheiham A. A clinical comparison of non-traumatic methods of treating dental caries. *Int Dent J* 1994; 44: 465-70.
56. Mertz-Fairhurst EJ et al. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Amer Dent Assoc* 1998; 129: 55-66.
57. Mitchel DF, Jensen JR. Preliminary report on the reaction of the dental pulp to cavity preparation using an ultrasonic device. *J Am Dent Assoc*, 1957; 55: 57-62.
58. Mount GJ. Minimal treatment of the carious lesion. *Int Dent J* 1991; 41: 55-9.

59. Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: a new concept for operative dentistry. *Quintessence Int* 2000; 31: 527-33.
60. Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: advanced lesions. *Quintessence Int* 2000; 31: 621-9.
61. Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: early lesions. *Quintessence Int* 2000; 31: 535-46.
62. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3023-9.
63. Nadkarni MA et al. Carious dentine provides a habitat for a complex array of novel *Prevotella*-like bacteria. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5238-44.
64. Nadkarni MA, Martin E, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002; 148: 257-66.
65. Navarro MFL, Pascotto RC. *Cimentos de Ionômero de Vidro*. Série 2 . Editoras Artes Médicas Ltda - 1998.
66. Ogigawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res* 1983; 62: 7-10.
67. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EAM, Beighton D. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restoration. *Applied Enviro Microbiol* 2005; 71: 2467-72.
68. Peters MC. SmartPrep instruments: self-limiting endpoint for caries removal?. *J Dent Res* 2005; 84 special issue A, abstract #2031.
69. Peters MC, Lacin T, Dobracki W, Gu F, Bresciani E, Imazato S, Fenno JC. Optimization of Nucleic Acid Extraction from Carious Dentin. *J Dent Res* 2005; 84 special issue B: abstract #425.
70. Peters MC, McLean ME. Contemporary techniques and material: an overview. *J. Adhes. Dent.* 2001;3:17-31.
71. Peters MC, McLean ME. Minimal intervention and concepts for minimally invasive cavity preparations. *J. Adhes. Dent.* 2001; 3: 7-16.
72. Phantumvanit P et al. Atraumatic restorative treatment (ART): a three-year community field trial in Thailand - survival of one-surface restorations in the permanent dentition. *J. Public Health Dent* 1996; 56: 141-5.
73. Ribeiro CCC, Baratieri LN, Perdigão J, Baratieri NMM, Ritter AV. A clinical, radiographic, and scanning electron microscopic evaluation of adhesive

- restorations on carious dentin in primary teeth. *Quintessence Int* 1999; 30: 591-9.
74. Rickets DN, Kidd EA, Beighton D. Operative and microbiological validation of visual, radiographic and electronic diagnosis of occlusal caries in non-cavitated teeth judged to be in need of operative care. *Br Dent J* 1995; 179: 214-20.
75. Schilke R, kleine R, Bauss O. Dentin hardness after caries removal with polymer versus carbide burs. *J Dent Res* 2005; special issue 84, abstract #2025.
76. Silva NRFA, Carvalho RM, Pegoraro LF, Tay FR, Thompson VP. Evaluation of a self-limiting concept in dentinal caries removal. *J Dent Res* 2006; 85: 282-6.
77. Skinner EW, Mizera GT. Condensation of amalgam with ultrasonic vibration, *J Prosthet Dent* 1958; 8: 183-94.
78. Smales RJ, Fang DT. In vitro effectiveness of hand excavation of caries with the ART technique. Atraumatic restorative treatment. *Caries Res* 1999; 33: 437-40.
79. Smales RJ, Ngo HC, Yip KH, Yu C. Clinical effects of glass ionomer restorations on residual carious dentin. *Amer J Den* 2005; 18: 188-93.
80. Tay FR, Smales RJ, Ngo H, Wei SH, Pashley DH. Effect of different conditioning protocols on adhesion of a GIC to dentin. *J Adhes Dent* 2001; 3 :153-67.
81. Toi CS, Bönecker M, Cleaton-Jones PE. Mutans streptococci strains prevalence before and after cavity preparation during Atraumatic restorative treatment. *J Dent* 2003; 31: 423-8.
82. Tonjun T, Haas R. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by leukotoxigenase-specific hybridization and polymerase chain reaction assays *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1856-9.
83. Towler MR, Bushby AJ, Billington RW, Hill RG. A preliminary comparison of the mechanical properties of chemically cured and ultrasonically cured glass ionomer cements, using nano-indentation techniques. *Biomaterials* 2001; 22: 1401-6.
84. Towler MR, Crowley CM, Hill RG. Investigation into the ultrasonic setting of glass ionomer cements Part I Postulated modalities. *J Mater Science Letters* 2003; 22: 539-41.
85. Tyas MJ et al. Minimal intervention dentistry – a review. *Int Dent J* 2000; 50: 1-12.
86. Twomey E, Towler MR, Crowley CM, Doyle J, Hampshire S. Investigation into the ultrasonic setting of glass ionomer cements – Part II Setting times and compressive strengths. *J Mater Sci letters* 2004; 39: 4631-2.
87. Yip HK, Tay, FR, Ngo HC, Smales RJ, Pahley DH. Bonding of contemporary glass ionomer cement to dentin. *Dent Mater* 2001; 17: 456-70.

88. Yli-Urpo H, Lassila LVJ, Narhi T, Vallittu PK. Compressive strength and surface characterization of glass ionomer cements modified by particles of bioactive glass. *Dent Mater* 2005; 21: 201-9.
89. Weerheijm KL, Kreulen CM, Soet JJ, Groen HJ, van Amerongen WE. Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-year in vivo effects. *Caries Res* 1999; 33: 130-4.
90. Weerheijm KL, Soet JJ, van Amerongen WE, Graaff J. Sealing of occlusal hidden caries lesions: an alternative for curative treatment? *J Dent Child* 1992; 59: 263-8.
91. Weerheijm KL, Soet JJ, van Amerongen WE, Graaff J. The effect of glass-ionomer cement on carious dentin: An in vivo study. *Caries Res* 1993; 27: 417-23.
92. Weerheijm KL, Groen HJ. The residual caries dilemma. *Community Dent. Oral Epidemiol* 1999; 27: 436-41.

ABSTRACT

The image features a minimalist abstract design. A thin horizontal line and a thin vertical line intersect at the center. Overlaid on these lines is a thick, dark, irregular horizontal stroke that spans most of the width of the page. The word "ABSTRACT" is written in a thin, elegant, cursive script, centered horizontally and positioned just above the thick dark stroke.

ABSTRACT AND KEY WORDS

Evaluation of ultrasound influence on glass ionomer cement (GIC) regarding its adhesion to dentin and the clinical dentin characteristics

The microtensile bond strength of GICs (Ketac Molar Aplicap, Ketac Molar Easymix and Fuji IX GP), receiving different patterns of ultrasound (US), was evaluated. The clinical potential of GIC (Ketac Molar) restorations with US, in remineralizing dentin and their effects on the microflora were also evaluated. Forty-five extracted third molars were selected for the laboratorial study, and cavities were performed for the GIC filling, which received direct US (D-US), indirect US (I-US) or no US excitation (N-US). After one week, the microtensile test was performed. The obtained data was analyzed using 2-way ANOVA test ($P<0.05$). Thirty-two patients (mean age of 13.8) were selected for the clinical study and 90 restorations were randomly performed with GIC, GIC plus US or composite resin (CR). The affected dentin was assessed by color, humidity and hardness and a dentin sample was obtained for total bacteria and *Lactobacilli* quantification, using real time PCR. After 3 months, the restorations were removed and new dentin characterization and sampling performed. Clinical data were analyzed by Friedman and Mann-Whitney tests. Bacterial counts were analyzed by Repeated Measurements Procedure ($P<0.05$ for all tests). Results showed statistical significant influences of the US on the GIC adhesion to dentin, being $D-US < N-US < I-US$. After three months of clinical trial, the dentin was scored more frequently as hard and dry. Color was not statistical different in both evaluation periods. The number of total bacteria was not influenced by the type of treatment. *Lactobacilli* were detected in less than 50% of the samples and presenting no metabolic activity. It was conclude that I-US should be the choice protocol to achieve better adhesion. Although the treated lesions presented clinical characteristics of arrested caries, the type of restoration did not influence the residual bacteria, neither their metabolic activity.

KEYWORDS: Glass ionomer cements. Ultrasonics. Clinical trial. Polymerase chain reaction. Dental caries.