

CRISTIANE DUQUE

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE MATERIAIS
PROTETORES DO COMPLEXO DENTINO-PULPAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como pré-requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas, Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling

Araraquara

2005

CRISTIANE DUQUE

**Avaliação biológica de materiais protetores do complexo
dentino-pulpar**

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do Título de Doutor

Presidente e Orientador: Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Beatriz Costa

3º Examinador: Prof. Dr. Carlos Estrela

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Denise Madalena Palomari Spolidorio

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro

1º Suplente: Prof. Dr. José Carlos Pettorossi Imparato

2º Suplente: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

3º Suplente: Prof^a. Dr^a. Ângela Cristina Cilense Zuanon

DADOS CURRICULARES
CRISTIANE DUQUE

Nascimento 04/11/1977, Monte Alto, S.P

Filiação Doraci Fenerick Duque

Paulo Carlos Duque

1996 a 1999 Graduação em Odontologia pela Faculdade de
Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP

2000 a 2002 Especialização em Odontopediatria no Hospital de
Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - USP - Bauru

2002 a 2005 Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de
Concentração Odontopediatria, nível Doutorado na Faculdade
de Odontologia de Araraquara - FOAr -UNESP

Associações Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas - APCD

Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO

A **Deus e aos seus mensageiros**, por sempre me proporcionarem saúde, proteção e força, imprescindíveis durante toda a vida e em mais esta jornada.

À minha maravilhosa mãe **Doraci**, exemplo de dedicação, carinho e amor. Mulher forte e corajosa, pois mesmo diante dos obstáculos, conduziu nossas vidas pelo caminho do bem e da verdade. Obrigada por sempre acreditar em mim e incentivar todos os meus sonhos.

Ao meu pai **Paulo** pela generosidade e paciência que marcaram sua breve trajetória nesta vida e trouxeram harmonia para nossa família. Longas e sinuosas caminhadas podem nos levar a grandes reencontros...

Ao meu amado, **Luís Fernando**, pelo apoio, carinho e compreensão. Ao seu lado, encontrei tranquilidade e segurança que me mantiveram firme durante toda esta jornada. Acredito que nosso sólido e sereno amor será sempre a base para todas as nossas conquistas.

À minha querida sogra, **Sonia**, minha segunda mãe. Obrigada por me acolher em seu lar, por estar sempre pronta a me ouvir e estimular-me na busca dos meus objetivos.

À minha querida orientadora, **Profa. Josimeri**, grande exemplo para toda a comunidade científica de honestidade e dedicação à pesquisa. Acima de tudo é uma pessoa meiga, bondosa e amiga. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos, pelos seus ricos ensinamentos e por sempre acreditar em minhas idéias.

Ao amigo **Prof. Carlos Alberto** pelo apoio e atenção. Sua postura como pessoa e mestre demonstraram que reconhecimento e respeito somente são adquiridos com muita seriedade e dedicação ao trabalho. Agradeço os conselhos e conhecimentos transmitidos durante esta minha jornada.

À minha grande conselheira **Profa. Denise**, por todo carinho e atenção durante esses anos de convivência. Pesquisadora dinâmica e generosa, acolhe a todos em seu laboratório com muito entusiasmo e boa vontade. Você é um exemplo de determinação e trabalho. Agora sigo os passos da Microbiologia, em razão de seus ensinamentos e incentivo. Obrigada.

À minha querida “irmãzinha” **Thais**. Além de companheira de trabalho, você é realmente a amiga de todas as horas. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me ajudando, me ouvindo, enfim participando de todos os momentos importantes da minha vida.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, representados pela digníssima Diretora Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérice Marcantonio e pelo Vice - Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP representados pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Luiz Gandini Junior e Vice-Chefe Prof^a. Dr^a. Ângela Cristina Cilense Zuanon.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fabio César Braga de Abreu e Lima, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

À Coordenação da Pós - Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP, representadas pelos Professores Doutores Rita de Cássia Loiola Cordeiro e Mauricio Tatsuei Sakima.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão das bolsas de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio à pesquisa.

Às famílias Duque e Talora, em especial minhas queridas avó Iria e tia Vilma, que estão sempre presentes torcendo pelo meu êxito.

À amiga Nancy Tomoko Sacono pelos momentos de convívio e auxílio na realização deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Ana Flávia, Andréia, Daniela V, Daniela R e Fabíola. Mesmo à distância, nossa amizade se mantém muito forte.

Às minhas amigas de sempre, Karinhinha e Ju Rico pelo intenso carinho e convívio durante todos esses anos.

Às minhas eternas amigas do Centrinho: Bia, Cleide, Marcinha e Lucimara, que contribuíram para minha formação como Odontopediatra, além de me presentear com seu carinho e dedicação. Nunca esquecerei vocês!

A Andréia Cristina Celli, Carina Bento Luis Macera e Maria da Glória Vieira Celli pela amizade, carinho e apoio técnico-laboratorial.

Ao Centro de Procriação de Macacos-Prego do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, representado pelo Prof. José Américo de Oliveira.

À Tia Elisa e Márcia pela amizade e auxílio na realização deste trabalho.

Ao querido amigo Marcelo Boriollo, pela atenção e auxílio na confecção e compreensão dos dendrogramas.

Às minhas amigas de curso: Andreza, Cris Motisuki, Luciana, Renata e Juliana. Obrigada por todos os momentos de aprendizado e alegria.

A todos meus amigos da Pós-Graduação: Carmem, Célia, Emi, Érika, Fábio, Fernanda, Hermes, Jonas, Junia, Juju Gondim, Juçaíra, Michele, Murilo, Paula, Pedro, Simone e Ticiane pelos ótimos anos de convivência.

Aos estagiários da Odontopediatria atuais e anteriores: Ana Luiza, Camila, Damye, Elcilaine, Érica, Fabiano, Giovana, Indri, Licia, Michele, Milena, Natália, Patrícia, Renata, Sabrina, Thais, Vanessa.

Aos meus queridos amigos de laboratório: Aline, Betinho, Caio, Carol, Danilo, Débora, Emileine, Ewerton, Flávia, Giovani, Josiane, Ju Derceli, Karin, Isis, Mari, Lorena, Mariana S, Nara, Nicole, Sabrina, Tati. Obrigada pelos momentos de descontração, com responsabilidade, é claro.

A todos os funcionários da biblioteca pela amizade e atenção: Adriano, Ceres, Eliane, Maria Helena, Maria Inês, Maria José, Marley, Odete e Silvia.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP, Toninho, Edson (*in memoriam*), Pedrinho, Dulce, Silvia, Soninha, Celinha, Taninha, Regina, Cris e Odete, por nos auxiliarem sempre.

Aos funcionários da Secretaria de Pós - Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP, Mara, Rosângela, Vera, Sylvia e Alexandre pela atenção que sempre nos dispensaram em todos os momentos.

Ao nosso querido amigo Thiago de Mello Menezes, que em sua breve passagem nos presenteou com sua alegria e amizade.

Às minhas amigas de Bauru: Consuelo, Crissen, Ingrid, Juliana, Janete, Letícia, Karina, Suzana, Thalia, Virgínia, que sempre me apoiaram na escolha deste caminho.

Aos professores e funcionários desta Faculdade, em especial Prof. Luis Carlos Spolidorio e José Zuanon, pela amizade e atenção.

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

PREFÁCIO

Esta tese será apresentada na forma de quatro artigos intitulados:

Artigo 1 - “Atividade inibitória de cimentos de ionômero de vidro sobre bactérias cariogênicas” - Parte deste trabalho está publicada em: Duque, C.; Negrini, T.C.; Hebling, J.; Spolidorio, D.M.P. Inhibitory activity of glass-ionomer cements on cariogenic bacteria. *Oper. Dent.*, Seattle, v.30, n.5, p.636-640, Sept./Oct., 2005.

Artigo 2 - “Dentinogênese reacional após aplicação de materiais forradores e moléculas bioativas da matriz dentinária em cavidades profundas preparadas em dentes de macacos” - Aceito para publicação no dia 04.10.2005 pelo *Journal of Oral Rehabilitation*.

Artigo 3 - “Avaliação clínica e microbiológica de lesões profundas em dentina antes e após remoção incompleta da cárie dentária” - Será submetido para publicação no *Caries Research*.

Artigo 4 - “Polimorfismo genético de cepas de *Streptococcus mutans* associadas à remoção incompleta da cárie dentária” - Será submetido para publicação no *Oral Microbiology and Immunology*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	16
INTRODUÇÃO.....	19
PROPOSIÇÃO.....	25
Artigo 1 - “Atividade inibitória de cimentos de ionômero de vidro sobre bactérias cariogênicas”	26
Resumo.....	28
Relevância clínica.....	29
Introdução.....	29
Materiais e Métodos	30
Resultados.....	32
Discussão.....	33
Conclusão.....	36
Agradecimentos	36
Referências	37
Tabelas e Figuras.....	41
Artigo 2 - “Dentinogênese reacional após aplicação de materiais forradores e moléculas bioativas da matriz dentinária em cavidades profundas preparadas em dentes de macacos”	43
Resumo.....	45
Introdução.....	46
Materiais e métodos.....	48
Resultados.....	52
Discussão.....	53
Agradecimentos	59
Referências	59
Tabelas e Figuras.....	64
Artigo 3 - “Avaliação clínica e microbiológica de lesões profundas em dentina antes e após remoção incompleta da cárie dentária”	72
Resumo.....	74
Introdução.....	75
Materiais e métodos.....	76
Resultados.....	81
Discussão.....	83
Agradecimentos.....	91
Referências	91
Tabelas.....	97

Artigo 4 - “Polimorfismo genético de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> associadas à remoção incompleta da cárie dentária”	102
Resumo	104
Introdução	105
Materiais e métodos	107
Resultados	111
Discussão	114
Agradecimentos	117
Referências	117
Tabelas e Figuras	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
CONCLUSÃO	138
REFERÊNCIAS	
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Amplicons - produto resultante de amplificação por PCR

AP-PCR - *Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase com primers arbitrários).

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)

BMP - *Bone morphogenetic protein* (proteína óssea morfogenética)

CIV - cimento de ionômero de vidro

CIVMR - cimento de ionômero de vidro modificado por resina

DNA - ácido desoxiribonucleico

DNA *ladder* - padrão de peso molecular

dNTP - Trifosfatos de desoxirribonucleotídeos

EDR - Espessura de dentina remanescente

EDRa - Espessura de dentina reacional

EDTA - Ácido etileno diamino tetra-acético

ESDP - *EDTA soluble dentin proteins* (proteínas dentinárias solúveis em EDTA)

GtfB - glicosiltransferase B

H/E - Hematoxilina e eosina

HCl - ácido clorídrico

HEMA - 2 - hidroxí-etil-metacrilato

HF - ácido fluorídrico

IAL - Instituto Adolfo Lutz

KCl - cloreto de potássio

Log - logaritmo

mg - miligramas

MgCl₂ - cloreto de magnésio

MLEE - multilocus enzyme eletrophoresis (eletroforese da enzima multilocus)

mm - milímetro

mM - milimolar

mW/cm² - Milliwatts por centímetro quadrado

°C - Grau Celsius

p - nível de significância estatística

pb - pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pH - potencial hidrogeniônico

p.p.m - partes por milhão

Primers - oligonucleotídeo que inicia uma reação de polimerização a partir de sua hibridização com a cadeia molde à qual é complementar.

r.p.m. - rotações por minuto

SB-20 - Ágar Sacarose Bacitracina

SM - estreptococcus grupo mutans

Ssm - *Simple Matching* (coeficiente de similaridade)

Taq DNA polymerase - enzima DNA polimerase de *Termophilus aquaticus*.

TBE - tampão tris-borato-EDTA

TE - tampão tris-HCl e EDTA

TGF- β - *Transforming growth factor* - β (fator transformador de crescimento- β)

U - Unidades

UFC - Unidades formadoras de colônia

UPGMA - Algoritmo de agrupamento (*unweighet pair-group method with mathematic average*)

V - volts

μ g - micrograma

μ l - microlitro

μ m - micrometro

μ M - micromolar

% - porcentagem

ng - nanogram

INTRODUÇÃO

A manutenção da vitalidade do tecido pulpar é fundamental para a vida funcional do dente, devendo ser considerada prioridade na escolha das estratégias de tratamento odontológico. Tal importância é explicada pelo fato de que as células pulpares, além de manterem a homeostase tecidual após o desenvolvimento dentário, também controlam as reações de defesa em resposta a uma injúria tecidual e os eventos de reparo que levam à regeneração dentinária (SMITH⁴⁹). Além disso, a presença do fluido que percorre os túbulos dentinários é fundamental para a manutenção da sensibilidade (BRÄNNSTRÖM e ASTRÖM⁷) e propriedades mecânicas da dentina (MARSHALL et al. ³⁴).

Em condições normais, o tecido pulpar apresenta-se protegido de agressões externas pelo seu isolamento anatômico (BAMMANN e ESTRELA²). Entretanto, sempre que a dentina é exposta por perda de esmalte ou cimento, a polpa é colocada em risco devido à alta permeabilidade desse tecido, conferida pela presença dos túbulos dentinários (PASHLEY et al.⁴²). Essa permeabilidade aumenta com a proximidade do tecido pulpar, devido ao maior diâmetro e densidade tubular, facilitando a difusão de resíduos metabólicos, enzimas e toxinas bacterianas, provenientes do processo carioso (BERGENHOLTZ⁴) e de componentes tóxicos liberados pelos materiais restauradores (COSTA et al.¹⁰).

Para evitar irritação ou até danos irreversíveis ao tecido pulpar, causados pela difusão desses agentes tóxicos, materiais denominados protetores pulpares são indicados para forramento de cavidades profundas, com reduzida espessura de dentina remanescente (menos de 0,5 mm) (HILTON²³). Esses materiais devem ser biocompatíveis quando aplicados em dentina, sendo capazes de permitir e/ou

estimular a reparação tecidual (COSTA et al.¹⁰), além de promoverem um bom selamento da interface dente-restauração, diminuindo a possibilidade de microinfiltração bacteriana (BRÄNNSTRÖM e VOJINOVIC⁸).

Dentre os materiais protetores pulpare, o cimento de hidróxido de cálcio é o mais utilizado, apesar de seu mecanismo de ação ainda não ser completamente elucidado (NIRSCHL e AVERY⁴⁰; SCHRÖDER⁴⁶). Alguns autores sugeriram que a ação antibacteriana desse cimento, associada à sua alcalinidade, poderia impedir a progressão do processo carioso (FISHER¹⁶; TRONSTAD e BIRKELAND⁵³). Entretanto estudos *in vitro* têm apresentado resultados contraditórios em relação à atividade antibacteriana desses cimentos, os quais vão desde nenhum ou mínimo efeito (ESTRELA et al.¹³; McCOMB e ERICSON³³) até a inibição marcante de algumas bactérias bucais (BARKHORDAR e KEMPLER³; FORSTEN e SÖDERLING¹⁸). Além disso, o cimento de hidróxido de cálcio apresenta algumas propriedades desfavoráveis, como alta solubilidade, baixa resistência à compressão e ausência de adesão ao substrato dentinário (COX e SUZUKI¹¹; FREEDMAN et al.¹⁹).

Atualmente, o cimento de ionômero de vidro está sendo indicado para proteção pulpar indireta em virtude de sua capacidade de adesão à estrutura dentinária, coeficiente de expansão térmica e módulo de elasticidade apropriados, além da liberação de flúor e biocompatibilidade quando aplicado sobre a dentina (MOUNT³⁷; MITRA³⁶; COSTA et al.⁹). A atividade antibacteriana do cimento de ionômero de vidro também foi demonstrada em alguns estudos *in vitro* (McCOMB e ERICSSON³³; LOYOLA-RODRIGUEZ et al.³¹; MEIERS e MILLER³⁵; HERRERA et al.²², DUQUE et al.¹²).

A busca por materiais biológicos, que possam induzir o reparo tecidual sem provocar irritação pulpar, vem estimulando o emprego de moléculas bioativas denominadas fatores de crescimento, TGF- β (transforming growth factor- β), presentes na matriz dentinária, as quais podem estar envolvidas na regulação da formação dentária, bem como na cura e regeneração tecidual (HU et al.²⁴). A superfamília TGF- β compreende um grupo de subfamílias de fatores tais como TGF- β (isoformas TGF β 1, - β 2, - β 3 e - β 5) e BMP - bone morphogenetic protein (isoformas BMP-2, BMP-3, BMP- 4, BMP- 5, BMP - 6, BMP- 7 e BMP- 8) (NAKASHIMA et al.³⁸). Em dentina profunda, esses fatores de crescimento poderiam se difundir por meio dos túbulos dentinários e estimular células odontoblásticas a sintetizarem matriz de dentina reacional (SLOAN e SMITH⁴⁷; SMITH et al.⁵⁰). Diversos estudos “in vivo” têm demonstrado os efeitos de extratos de matriz dentinária, contendo essas moléculas bioativas, sobre a indução da dentinogênese reacional (RUTHERFORD et al.⁴⁴; SMITH et al.⁵⁰; SMITH et al.⁵¹).

Uma importante propriedade do material protetor pulpar é apresentar atividade antibacteriana, principalmente quando utilizado sobre a dentina contaminada em dentes com indicação de tratamento pulpar indireto. Esse procedimento visa a remoção parcial da cárie, com o intuito de evitar a exposição do tecido pulpar, em dentes com lesão de cárie profunda e ausência de patologias pulpares/periapicais irreversíveis (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY¹).

Para o tratamento pulpar indireto, é preconizada a reabertura do dente, alguns meses após o procedimento, para remoção da dentina cariada remanescente, devido à possibilidade de desenvolvimento de infecção pulpar, pela presença de bactérias residuais (BJORNDAL et al.⁶). Alguns autores, contudo, têm sugerido a realização do tratamento em uma única sessão, pois relataram alta prevalência de sucesso clínico e

radiográfico (FITZGERALD e HEYS¹⁷; FAROOQ et al.¹⁵; FALSTER et al.¹⁴), além de redução significativa no número de colônias bacterianas presentes na dentina residual (LEUNG et al.²⁷, BJORN DAL e LARSEN⁵; MALTZ et al.³²), após meses de acompanhamento do tratamento. Segundo MALTZ et al.³², os resultados microbiológicos indicaram que a remoção superficial da cárie, o forramento com um material antibacteriano e o selamento da cavidade reduziram o metabolismo e o crescimento bacteriano, desacelerando a progressão da lesão e favorecendo a resposta do complexo dentino-pulpar.

Estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos são microrganismos oportunistas que habitam comumente a cavidade bucal e expressam sua patogenicidade em condições ambientais favoráveis. São encontrados freqüentemente na dentina cariada (LOESCHE e SYED³⁰), podendo ser facilmente detectados por meio de métodos microbiológicos. Com base nas diferenças bioquímicas, antigênicas e genéticas, os estreptococos grupo *mutans* foram divididos em espécies, entre as quais, *Streptococcus mutans* (sorotipos c,e, f) e *Streptococcus sobrinus* (sorotipos d, g) podem ser encontradas em humanos (HAMADA e SLADE²¹). A distinção entre essas espécies pode ser importante, pois tais microrganismos apresentam diferenças durante a colonização inicial e em seus mecanismos de virulência (GIBBONS et al.²⁰; LOESCHE²⁹).

Para a identificação de espécies bacterianas bucais, são rotineiramente utilizados testes bioquímicos. Entretanto, apesar das propriedades fenotípicas microbianas parecerem estáveis, tais testes dificilmente são satisfatórios para identificar todos os isolados bacterianos (LIEBANA et al.²⁸). Atualmente, com o avanço da Biologia Molecular, técnicas como PCR (reação em cadeia da polimerase) podem identificar e caracterizar cepas isoladas de microrganismos, com maior sensibilidade que as técnicas de cultura convencionais (IGARASHI et al.²⁵).

TOI et al.⁵² determinaram a prevalência de estreptococcus grupo *mutans* e lactobacilos, antes e imediatamente após a remoção parcial da dentina cariada e verificaram redução no número de colônias bacterianas após tal procedimento. Esses autores utilizaram a técnica de PCR para identificar cepas de *Streptococcus mutans* na dentina remanescente, além de verificar diversidade genética entre essas cepas utilizando o método do AP-PCR (reação em cadeia da polimerase com *primers* arbitrários). Outros estudos, utilizando o mesmo método de identificação, determinaram diferentes padrões genotípicos de *S. mutans* ou de *S. sobrinus* isolados de amostras de saliva ou biofilme dentário (SAARELA et al.⁴⁵; NASCIMENTO et al.³⁹; SPOLIDORIO et al.⁴⁸). A distribuição e persistência de *Streptococcus mutans* em diferentes sítios dentários na mesma cavidade bucal foram verificadas por REDMO-EMANUELSSON et al.⁴³

Em procedimentos de remoção parcial de cárie, estudos têm demonstrado a sobrevivência de estreptococos bucais, mesmo após meses ou anos da remoção parcial da cárie e selamento dentário (BJORNDAL et al.⁶; KREULEN et al.²⁶; WEEIRHEIJM et al.⁵⁴; BJORNDAL e LARSEN⁵), sugerindo a existência de cepas resistentes ao tratamento. PADDICK et al.⁴¹ detectaram distintas linhagens de *Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii*, após cinco meses da remoção parcial da cárie dentária, embora com reduzida diversidade genotípica/fenotípica em comparação às linhagens isoladas anteriormente ao tratamento. Embora a resistência de cepas de *Streptococcus mutans* também tenha sido demonstrada após procedimentos de remoção parcial de cárie dentária (TOI et al.⁵²), na literatura ainda não foram verificados estudos em que a análise genética dessas cepas tenha sido realizada, após meses do tratamento pulpar indireto.

PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar, por meio de vários experimentos, a compatibilidade biológica e atividade antibacteriana de materiais forradores cavitários.

PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

Artigo 1 - Avaliar comparativamente a atividade inibitória de dois cimentos de ionômero de vidro convencionais recomendados para o tratamento restaurador atraumático e dois CIVMR utilizados como forradores cavitários sobre algumas bactérias cariogênicas.

Artigo 2 - Investigar os efeitos da aplicação de um extrato de proteínas dentinárias solúveis em EDTA (ESDP), um cimento de ionômero de vidro modificado por resina e um cimento de hidróxido de cálcio como agentes forradores em cavidades dentinárias profundas, considerando a deposição estimulada de dentina reacional.

Artigo 3 - Avaliar a efetividade clínica e microbiológica do tratamento pulpar indireto utilizando dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e um cimento de hidróxido de cálcio, após três meses de tratamento, além de identificar as espécies *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* presentes nas amostras de dentina cariada antes e após o tratamento, por meio de PCR.

Artigo 4 - Determinar o polimorfismo genético de cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de lesões de cárie antes e após três meses de sua remoção parcial.

Artigo 1

**Atividade inibitória de cimentos de
ionômero de vidro sobre bactérias
cariogênicas**

Atividade inibitória de cimentos de ionômero de vidro sobre bactérias cariogênicas*Inhibitory activity of glass-ionomer cements on cariogenic bacteria***Autores:** C Duque, TC Negrini, J Hebling, DMP Spolidorio

Cristiane Duque, DDS, pós-graduanda em Odontopediatria, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Thais de Cássia Negrini, DDS, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araraquara, São Paulo, Brasil.

* Josimeri Hebling, DDS, PhD, professora associada, Departamento de Clínica Infantil, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Denise Madalena Palomari Spolidorio, BS, PhD, professora associada, Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Título reduzido: Atividade antibacteriana de cimentos de ionômero de vidro

Short title: *Antibacterial activity of glass ionomer cements*

* **Autor correspondente:** Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil. 14.801-903; e-mail: jhebling@foar.unesp.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade inibitória dos cimentos de ionômero de vidro: Vitrebond (3M ESPE), Ketac Molar (3M ESPE), Fuji IX (GC América) e Fuji Lining LC (GC America) sobre *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. acidophilus* e *A. viscosus* utilizando o teste de difusão em ágar. Os inóculos foram obtidos por meio da semeadura das cepas bacterianas padrão em caldo BHI e incubação a 37° C por 24 horas. Em placas de Petri foram preparadas camadas base contendo 15 ml de BHI ágar acrescido de 300 µl da suspensão bacteriana selecionada. Seis poços medindo 4 mm de diâmetro foram confeccionados em cada placa e completamente preenchidos com um dos materiais teste. Para os cimentos Fuji Lining LC e Vitrebond, os testes foram realizados sob duas condições: com e sem fotoativação no meio de cultura. Uma solução de digluconato de clorexidina a 0,2% foi utilizada como grupo controle. Os experimentos foram repetidos doze vezes para cada material, cepa bacteriana e condição de fotoativação. Após a incubação das placas a 37° C, por 24 horas, os halos de inibição formados ao redor dos poços foram medidos. Este estudo confirmou significativa atividade antibacteriana para dois cimentos de ionômero de vidro convencionais e dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina. Vitrebond apresentou a melhor atividade antibacteriana contra *S. mutans* e *S. sobrinus*, independente da condição de fotoativação. Entretanto, a atividade inibitória contra *A. viscosus* do Vitrebond foi similar à clorexidina 0,2% e a fotoativação reduziu sua atividade contra *L. acidophilus*.

Relevância clínica

Este estudo demonstrou que os cimentos de ionômero de vidro, especialmente o Vitrebond, independente da sua condição de fotoativação, apresentou um efeito inibitório marcante sobre as bactérias cariogênicas.

Introdução

Eventos indesejáveis, tais como cárie secundária (Bergenholtz et al., 1982; Brännström, 1984) e injúria pulpar (DeSchepper, White & von der Lehr, 1989a), são freqüentemente associados à presença de bactérias residuais após a remoção da dentina cariada e/ou ao ingresso de novos microrganismos na interface dente-restauração, por microinfiltração. O uso de materiais restauradores, especialmente aqueles aplicados em contato direto com o substrato dentinário contaminado, que possuam atividade antibacteriana pode dificultar a entrada de novas bactérias através da interface dente-restauração, além de prevenir que microrganismos remanescentes continuem suas atividades metabólicas.

A remoção incompleta da cárie dentária é preconizada nas técnicas de tratamento pulpar indireto e tratamento restaurador atraumático. Nesses procedimentos, os cimentos de ionômero de vidro são utilizados em contato direto com o tecido cariado remanescente para promover sua remineralização e reduzir a viabilidade das bactérias residuais (Botelho, 2003), prevenindo conseqüentemente a ocorrência de lesões de cárie secundária (Donly & Ingram, 1997). Além da atividade antibacteriana, esses materiais devem também apresentar biocompatibilidade quando aplicados sobre o complexo dentino-pulpar (Costa et al., 2003a).

Os cimentos de ionômero de vidro são capazes de inibir *in vitro* o crescimento de algumas espécies de bactérias bucais (DeSchepper et al., 1989a,b; Scherer, Lippman &

Kaim, 1989; Loyola-Rodriguez et al., 1994; Meiers & Miller, 1996; Herrera et al., 2000) devido ao seu baixo pH inicial e/ou capacidade de liberação de flúor (McComb & Ericson, 1987; DeSchepper et al., 1989a). O mesmo efeito inibitório tem sido demonstrado por uma nova geração desses materiais conhecida como cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMR). Esses cimentos apresentam melhores propriedades mecânicas devido à incorporação de monômeros resinosos hidrofílicos, principalmente 2-hidroxietildimetacrilato (HEMA), além da superior adesão à estrutura dentinária (Mathis & Ferrance, 1989), sem perder os benefícios dos cimentos de ionômero de vidro convencionais, como a liberação de flúor (Meiers & Miller, 1996; Friedl et al., 1997; Herrera et al., 2000). Além disso, alguns autores sugerem que os CIVMR apresentam melhores propriedades antibacterianas quando comparados aos convencionais (Meiers & Miller, 1996; Herrera et al., 2000).

Dessa forma, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar comparativamente a atividade antibacteriana de dois cimentos de ionômero de vidro convencionais recomendados para o tratamento restaurador atraumático e dois CIVMR utilizados como forradores cavitários contra as seguintes bactérias cariogênicas: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces viscosus*.

Materiais e Métodos

Os materiais utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 1. A atividade antibacteriana de cada material foi avaliada para as seguintes bactérias: *Streptococcus mutans* (ATCC # 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC # 27607), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC # IAL-523) e *Actinomyces viscosus* (T14V # IAL.5) utilizando o teste de difusão em ágar. Cepas bacterianas indicadoras foram semeadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion - BHI™, Difco Laboratories, Detroit, MI), por 48 h, a 37° C, de acordo com as

características fisiológicas de cada microrganismo. As bactérias resultantes foram novamente semeadas em 5 ml de caldo BHI, por 24 horas, a 37° C, para obtenção de uma suspensão, denominada inóculo (turbidez 0.5 da escala MacFarland -- aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC por ml de meio de cultura).

Em cada placa de Petri esterilizada, foi preparada uma camada-base contendo 15 ml do meio de cultura BHI ágar, acrescido de 300 µl de cada inóculo. Após a solidificação do meio de cultura, seis poços, medindo 4 mm de diâmetro, foram confeccionados em pontos eqüidistantes de cada placa, com o auxílio de canudos plásticos previamente desinfetados em álcool 70% por 24 horas. Os poços foram completamente preenchidos com um dos materiais-teste (Tabela 1), utilizando uma seringa Centrix (DFL Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, Brasil). Para cada material e cepa bacteriana foram confeccionados doze poços (6 por placa). Todos os materiais foram manipulados, sob condições assépticas, de acordo com as instruções do fabricante. Para os cimentos Vitrebond e Fuji Lining LC, os testes foram realizados sob duas condições: com e sem fotoativação do cimento no meio de cultura, totalizando 24 poços para cada material e cepa bacteriana (12 poços para cada condição). A fotoativação foi realizada por 30 segundos, utilizando um aparelho fotopolimerizador (Optilux 500, Demetron Research Co, Danbury, CT, EUA - 450mW/cm²). Como controle positivo, um microlitro de digluconato de clorexidina a 0,2% na forma aquosa foi aplicado em discos de papel (n=12), também apresentando 4 mm de diâmetro.

As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas, para pré-difusão dos materiais e depois incubadas a 37° C, por 24 horas. Os halos de inibição foram medidos em milímetros, utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo, SP, Brasil). Todas as medidas foram determinadas a partir de dois pontos opostos localizados nos limites mais externos do halo de inibição formado ao redor de cada

poço, incluindo a medida do diâmetro do poço. Essas medidas foram repetidas três vezes e obteve-se a média para cada poço/disco. Os resultados foram submetidos aos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis para comparar os halos de inibição obtidos pelos materiais contra as bactérias avaliadas. Testes complementares de Mann-Whitney (Testes de Wilcoxon rank-sum) foram realizados para identificar as diferenças entre os pares de materiais. Todos os testes estatísticos foram conduzidos a um nível de significância de 5%.

Resultados

A Tabela 2 e a Figura 1 mostram as médias e os desvios-padrão dos halos de inibição obtidos para cada material, de acordo com a cepa bacteriana. Todos os cimentos de ionômero de vidro formaram halos de difusão que não foram considerados como representativos da atividade antibacteriana. Essa atividade foi considerada somente quando um verdadeiro halo de inibição estava presente, associado ou não ao halo de difusão. Dentre os materiais avaliados neste estudo, Vitrebond apresentou os melhores efeitos inibitórios, exceto para *A. viscosus*, quando obteve resultados estatisticamente similares aos da clorexidina (grupo controle). Fuji Lining LC apresentou seus maiores halos de inibição contra *S. mutans* e *L. acidophilus*, que foram similares aos obtidos para Clorexidina e Ketac Molar. Entretanto, a fotoativação reduziu sua atividade inibitória deste material sobre *S. sobrinus* e *L. acidophilus*. O mesmo ocorreu com o Vitrebond somente para *L. acidophilus*. Entre os cimentos convencionais, Ketac Molar apresentou os maiores halos de inibição, exceto para *S. sobrinus*, quando seus resultados foram estatisticamente similares ao do Fuji IX.

Discussão

O teste de difusão em ágar é um método aceito para diferenciar inicialmente a atividade antibacteriana dos materiais, entretanto apresenta algumas limitações. Uma delas é a impossibilidade de determinar se o resultado obtido para um material específico refletiu seu efeito bactericida ou somente bacteriostático. Além disso, é extremamente difícil comparar dados de inibição bacteriana obtidos em diferentes estudos utilizando essa técnica, mesmo quando se trata do mesmo material, por causa das variáveis envolvidas (Tobias, Browne & Wilson, 1985), como o tipo de meio de cultura e o número de microrganismos inoculados.

Os resultados deste estudo indicaram que todos os cimentos de ionômero de vidro avaliados apresentaram atividade antibacteriana, inibindo o crescimento das bactérias cariogênicas selecionadas. Essa propriedade antimicrobiana tem sido relacionada ao baixo pH inicial, liberação de flúor ou a outros componentes químicos encontrados no pó dos cimentos de ionômero de vidro (DeSchepper, Trasher & Thurmond, 1989b; Scherer et al., 1989; Loyola-Rodriguez et al., 1994).

Além de facilitar a remineralização dos tecidos dentários durante os processos cíclicos de desmineralização e remineralização, o flúor atua sobre microrganismos cariogênicos, alterando seu estado fisiológico. Os três principais mecanismos de inibição do crescimento bacteriano pelo flúor são: a adesão direta de F^-/HF a enzimas e outras proteínas bacterianas, a formação de complexos flúor-metal e a ação como um carreador de prótons transmembrana (Marquis, Clock & Mota-Meira, 2003). Altas concentrações de flúor, variando de 0,16 a 0,3 mol/l podem inibir o crescimento bacteriano (Bowden, 1990).

A liberação de flúor pelos CIVMR é maior que a dos cimentos convencionais como Ketac Molar e Fuji IX (Vermeersch, Leloup & Vreven, 2001). Esse achado poderia

ser justificado pelo fato da proporção pó-líquido afetar o padrão de liberação de flúor (Forsten, 1995). Uma menor proporção pó-líquido aumenta a solubilidade e a liberação desse íon. Neste estudo, Vitrebond e Fuji Lining LC foram manipulados em uma relação pó-líquido de 1,4/1,0 por peso, enquanto que para Ketac Molar e Fuji IX foram 3,6/1,0 e 3,5/1,0, respectivamente. A maior proporção pó-líquido melhora as propriedades mecânicas dos cimentos de ionômero de vidro convencionais para sua indicação em restaurações dentárias, entretanto dificulta a liberação de flúor.

Neste estudo, o cimento de ionômero de vidro modificado por resina, Vitrebond, obteve os maiores halos de inibição contra *S. mutans* e *S. sobrinus*, independente de sua condição de ativação. Outros estudos também têm demonstrado excelente atividade antibacteriana para o Vitrebond (DeSchepper et al., 1989a; Loyola-Rodriguez et al., 1994; Donly & Ingram, 1997; Herrera et al., 2000). Kozai et al. (2000) verificaram uma grande associação entre a liberação de flúor (em torno de 6,93mg/l no primeiro dia) e a atividade antibacteriana do Vitrebond. Em estudo de Loyola-Rodriguez et al. (1994), o CIVMR Fuji Lining LC apresentou menor liberação de flúor quando comparado ao Vitrebond, o que poderia justificar sua menor atividade inibitória contra as bactérias cariogênicas avaliadas.

Uma diferença marcante entre os cimentos de ionômero de vidro convencionais e os modificados por resina está associada à adição de monômeros hidrofílicos ao líquido dos CIVMR. Como esses monômeros são convencionalmente metacrilatos hidroxietil solúveis em água (HEMA), muitos autores atribuem a melhor atividade antibacteriana observada pelo Vitrebond à presença desse componente (Coogan & Creaven, 1993; Benderli et al., 1997). De fato, além do flúor, os CIVMR liberam outros componentes, inclusive o HEMA (Geursten, Spahl & Leyhausen, 1998). Entretanto, foi demonstrado que HEMA não apresenta efeito inibitório sobre bactérias cariogênicas

como *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. acidophilus* (Schmalz, Ergucu & Hiller, 2004).

Outros componentes químicos, como o sulfato de zinco, podem melhorar a atividade antibacteriana dos cimentos de ionômero de vidro. A adição de $ZnSO_4$ aos produtos ionoméricos aumenta significativamente a inibição do crescimento de *S. mutans* e a liberação de flúor sem interferir nas propriedades mecânicas desses materiais (Osinaga et al., 2003). O zinco é um dos componentes presentes nas partículas de vidro do Vitrebond, o qual poderia contribuir para aumentar sua atividade antibacteriana.

Quando Vitrebond é fotoativado, uma reação exotérmica é gerada, aumentando a temperatura em torno de 20° C (Bourke, Walls & McCabe, 1992). Embora essa alteração na temperatura seja significativa, parece não influenciar a atividade antibacteriana desse cimento, desde que efeitos inibitórios similares sobre o crescimento bacteriano têm sido demonstrados para sua condição química de ativação (Coogan & Creaven, 1993). Neste estudo, a condição de ativação não influenciou a atividade inibitória do Vitrebond, exceto para *L. acidophilus*. A interferência da fotoativação foi mais expressiva para o Fuji Lining LC, que teve sua atividade inibitória reduzida contra *L. acidophilus* e *S. sobrinus*.

A atividade antibacteriana do Vitrebond poderia também estar associada à presença de altos níveis de agentes tóxicos em sua composição (Coogan & Creaven, 1993). Quando avaliado sobre cultura de células, os CIVMR mostraram efeitos citotóxicos acentuados comparáveis àqueles obtidos para materiais restauradores resinosos (Costa et al., 2003b). Entretanto, quando aplicado em cavidades profundas confeccionadas em dentes humanos, o Vitrebond foi comparável ao cimento de hidróxido de cálcio, quanto à compatibilidade biológica (Costa et al., 2003a).

Ketac Molar e Fuji IX exibiram moderada atividade antibacteriana, similar ao Fuji

Lining LC, entretanto demonstraram menor capacidade inibitória que o Vitrebond e a Clorexidina 0,2%. Boeckh et al. (2002) avaliaram os efeitos de alguns materiais sobre o crescimento de *S. mutans* em testes com culturas líquidas e observaram que o Ketac Molar apresentou significativo efeito de inibição do crescimento quando foi comparado com os outros materiais. Neste estudo, exceto para *S. sobrinus*, Ketac Molar apresentou melhor atividade antibacteriana que o Fuji IX. Em relação a esse último material, em estudo de Botelho (2003), nenhuma atividade inibitória mensurável foi observada contra *S. mutans* e *L. acidophilus*, sugerindo a necessidade de incorporação de agentes antibacterianos, como a clorexidina, na composição desses cimentos.

Conclusão

Este estudo confirmou significativa atividade antibacteriana para dois cimentos de ionômero de vidro convencionais e dois CIVMR. Entre os materiais testados, o Vitrebond apresentou a melhor atividade antibacteriana sobre todas as bactérias cariogênicas utilizadas, independente da condição de fotoativação, exceto para *L. acidophilus*. Para essa cepa bacteriana em particular, a fotoativação do Vitrebond reduziu sua atividade antibacteriana ao nível do Ketac Molar, a qual foi considerada satisfatória.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Ros Randall pela revisão do artigo publicado na Revista *Operative Dentistry*, em que se baseia parte deste estudo, o qual foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (processo 131127/2002-0).

Referências

Benderli Y, Ulukapi H, Balkanli O & Kulekci G (1997) In vitro plaque formation on some dental filling materials *Journal of Oral Rehabilitation* **24(1)** 80-83.

Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ & Syed SA (1982) Bacterial leakage around dental restorations: Its effect on the dental pulp *Journal of Oral Pathology* **11(6)** 439-450.

Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A & Haller B (2002) Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro *Caries Research* **36 (2)** 101-107.

Botelho MG (2003) Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement *Caries Research* **37(2)** 108-114.

Bourke AM, Walls AW & McCabe JF (1992) Light-activated glass polyalkeonate (ionomer) cements: the setting reaction *Journal of Dentistry* **20 (2)** 115-120.

Bowden GHW (1990) Effects of fluoride on the microbial ecology of dental plaque *Journal of Dental Research* **69 (Special Issue)** 660-667.

Brännström M (1984) Communication between the oral cavity and the dental pulp associated with restorative treatment *Operative Dentistry* **9(2)** 57-68.

Coogan MM & Creaven PJ (1993) Antibacterial properties of eight dental cements *International Endodontic Journal* **26 (6)** 355-361.

Costa CAS, Giro EMA, Nascimento ABL, Teixeira HM & Hebling J (2003a) Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities *Dental Materials* **19(8)** 739-746.

Costa CAS, Hebling J, Garcia-Godoy F & Hanks CT (2003b) In vitro cytotoxicity of five glass ionomer cements *Biomaterials* **24(21)** 3853-3858.

DeSchepper EJ, White RR & von der Lehr W (1989a) Antibacterial effects of glass ionomers *American Journal of Dentistry* **2(2)** 51-56.

DeSchepper EJ, Thrasher MR & Thurmond BA (1989b) Antibacterial effects of light-cured liners *American Journal of Dentistry* **2(3)** 74-76.

Donly KJ & Ingram C (1997) An *in vitro* caries inhibition of photopolymerized glass ionomer liners *Journal of Dentistry for Children* **64(2)** 128-130.

Forsten L (1995) Resin-modified glass-ionomer cements: fluoride release and uptake *Acta Odontologica Scandinavica* **53 (4)** 222-225.

Friedl KH, Schmalz G, Hiller KA & Shams M (1997) Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth *European Journal of Oral Science* **105 (1)** 81-85.

Geurtsen W, Spahl W & Leyhausen G (1998) Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers *Journal*

of *Dental Research* **77(12)** 2012-2019.

Herrera M, Castillo A, Bravo M, Liébana J & Carrión P (2000) Antibacterial activity of resin adhesives, glass ionomer and resin-modified glass ionomer and a compomer in contact with dentin caries samples *Operative Dentistry* **25(4)** 265-269.

Kozai K, Suzuki J, Okada M & Nagasaka N (2000) In vitro study of antibacterial and antiadhesive activities of fluoride-containing light-cured fissure sealants and a glass ionomer liner/base against oral bacteria *Journal of Dentistry for Children* **67 (2)** 117-122.

Loyola-Rodriguez JP, Garcia-Godoy F & Lindquist R (1994) Growth inhibition of glass ionomer cements on mutans streptococci *Pediatric Dentistry* **16(5)** 346-349.

Marquis RE, Clock SA & Mota-Meira M (2003) Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology *FEMS Microbiology Reviews* **26(5)** 493-510.

Mathis RS & Ferrance JL (1989) Properties of glass ionomer resin composite hybrid materials *Dental Materials* **5(5)** 355-358.

Mccomb D & Ericson D (1987) Antimicrobial action of new, proprietary lining cements *Journal of Dental Research* **66(5)** 1025-1028.

Meiers JC & Miller GA (1996) Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers, and polyacid-modified composite resins *Operative Dentistry* **2(6)** 257-264.

Osinaga PWR, Grande RHM, Ballester RY, Simionato MRL, Rodrigues CRMD & Muench A (2003) Zinc sulfate addition to glass-ionomer-based cements: influence on physical and antibacterial properties, zinc and fluoride release *Dental Materials* **19(3)** 212-217.

Scherer W, Lippman N & Kaim J (1989) Antimicrobial properties of glass-ionomer cements and other restorative materials *Operative Dentistry* **14(2)** 77-81.

Schmalz G, Ergucu Z & Hiller KA (2004) Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents *Journal of Endodontics* **30(5)** 352-358.

Tobias RS, Browne RM & Wilson CA (1985) Antibacterial activity of dental restorative materials *International Endodontic Journal* **18(3)** 161-171.

Vermeersch G, Leloup G & Vreven J (2001) Fluoride release from glass-ionomer cements, compomers and resin composites *Journal of Oral Rehabilitation* **28(1)** 26-32.

Tabela 1. Materiais utilizados neste estudo.

Materiais	Classificação	Composição	Lote No.
Vitrebond (VT) (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)	Cimento de ionômero de vidro modificado por resina	Pó: vidro de fluorossilicato (Zn) Líquido: copolímero de ácido acrílico e maléico, HEMA, foto-iniciador e água.	20020314
Fuji Lining LC (FL) (GC, Tóquio, Japão)	Cimento de ionômero de vidro modificado por resina	Pó: vidro de aluminossilicato Líquido: ácido poliacrílico, HEMA.	0206041
Ketac Molar (KM) (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)	Cimento de ionômero de vidro convencional	Pó: vidro de fluossilicato Alumínio-Cálcio-Lantânio, 5% de copolímero ácido (ácido acrílico e maléico). Líquido: ácido polialcenóico, ácido tartárico e água.	L/ 119169 P/ 119862
GC Fuji IX (FIX) (GC, Tóquio, Japão)	Cimento de ionômero de vidro convencional	Pó: vidro de alumino-fluossilicato Líquido: água, ácido poliacrílico, ácido carboxílico polibásico.	0107041

Tabela 2. Média e desvio-padrão dos diâmetros dos halos de inibição (mm) avaliados após 24 horas de crescimento bacteriano.

Cepa Bacteriana	Materiais						
	Fuji IX	Ketac Molar	Fuji Lining LC	Fuji Lining LC (foto)	Vitrebond	Vitrebond (foto)	Clorexidina
<i>S. mutans</i>	11,9 ± 0,8 ^{a*}	12,7 ± 0,8 ^b	12,3 ± 1,2 ^{a,b}	12,6 ± 1,3 ^{ab}	14,5 ± 1,8 ^c	15,3 ± 1,4 ^c	12,4 ± 1,2 ^{a,b}
<i>S. sobrinus</i>	11,2 ± 0,2 ^a	11,0 ± 1,7 ^a	10,9 ± 0,6 ^a	9,1 ± 1,0 ^b	13,7 ± 1,5 ^c	12,9 ± 0,9 ^c	11,2 ± 0,9 ^a
<i>L. acidophilus</i>	10,1 ± 0,6 ^a	11,5 ± 0,7 ^b	13,6 ± 2,9 ^{bd}	8,5 ± 0,9 ^e	16,2 ± 2,2 ^c	11,6 ± 0,7 ^b	14,3 ± 0,6 ^d
<i>A. viscosus</i>	9,8 ± 0,6 ^a	11,3 ± 0,5 ^b	7,8 ± 0,7 ^d	7,6 ± 0,7 ^d	13,5 ± 1,3 ^c	15,5 ± 5,0 ^c	13,9 ± 1,2 ^c

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Mann Whitney ($p > 0,05$). Esta análise deve ser considerada separadamente para cada microrganismo.

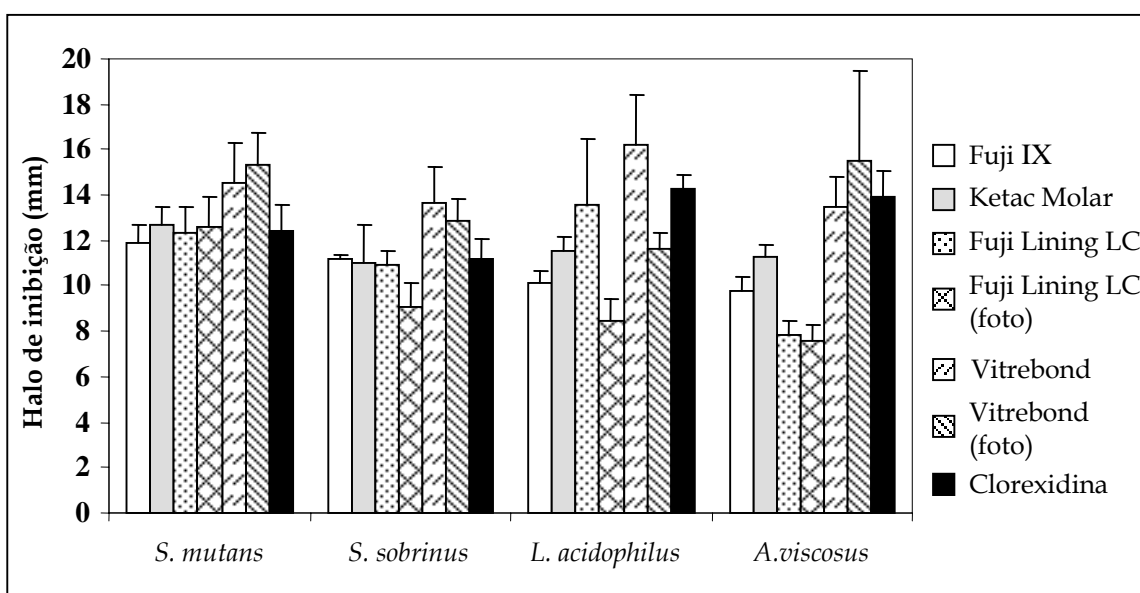


Figura 1. Gráfico de barras representativo das médias dos halos de inibição (mm) para os materiais avaliados, contra cada microrganismo (barra de erro = desvio padrão)

Artigo 2

Dentinogênese reacional após aplicação de moléculas bioativas da matriz dentinária e materiais forradores em cavidades profundas preparadas em dentes de macacos

Dentinogênese reacional após aplicação de materiais forradores e moléculas bioativas da matriz dentinária em cavidades profundas preparadas em dentes de macacos

Reactionary dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in non-human primate teeth

Autores: Cristiane Duque **1**, Josimeri Hebling **1**, Anthony J. Smith **2**, Elisa Maria Aparecida Giro **1**, Márcia de Freitas Oliveira **1**, Carlos Alberto de Souza Costa **3**.

Título reduzido: Dentinogênese reacional induzida por moléculas bioativas e materiais dentários.

Short Title: *Reactionary dentinogenesis induced by dental materials or bioactive molecules.*

1. Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.
2. Departamento de Biologia Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade de Birmingham, Birmingham, B4, 6NN, UK.
3. Departamento de Patologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente: Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling

Universidade Estadual Paulista / UNESP

Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAR

Rua Humaitá, 1680 / CEP: 14.801-903 CP: 331 – Centro. Araraquara, SP, Brasil.

Telefone: 16-3301-6334- E-mail: jhebling@foar.unesp.br

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo *in vivo* foi avaliar a resposta do complexo dentino-pulpar após a aplicação de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina, um cimento de hidróxido de cálcio e um extrato de proteínas extraídas da matriz dentinária solúvel em EDTA (ESDP - EDTA-soluble dentin proteins) em cavidades profundas preparadas em dentes de macacos. **Métodos:** Dezoito cavidades de classe V profundas foram confeccionadas em pré-molares de quatro macacos-pregos. Nos grupos 1 e 2, as paredes axiais das cavidades foram forradas com ESDP e cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond - 3M ESPE), respectivamente. No grupo 3 (controle), foi aplicado um cimento de hidróxido de cálcio (Dycal - Dentsply). Em seguida, as cavidades foram restauradas com amálgama. Após seis meses, os animais foram sacrificados e os dentes foram preparados para avaliação microscópica. Cortes seriados de seis micrometros foram corados utilizando as técnicas de H/E, tricrômico de Masson e Brown & Brenn. **Resultados:** Nenhuma resposta inflamatória foi observada para os grupos controle ou de materiais experimentais. Entretanto, em relação à deposição de dentina reacional, houve diferença entre os grupos, considerando a seguinte seqüência: ESDP (Grupo 1) > Hidróxido de cálcio (Grupo 3) > Cimento de ionômero de vidro (Grupo 2). **Conclusões:** Todos os materiais foram biocompatíveis quando aplicados em cavidades profundas. ESDP estimulou maior deposição de matriz de dentina reacional que os cimentos Vitrebond e Dycal.

Palavras-chave: Polpa, dentina, substâncias de crescimento, materiais dentários, capeamento da polpa dentária.

Introdução

O complexo dentino-pulpar tem sido reconhecido por sua capacidade de responder a uma injúria sintetizando tecido duro, o qual é caracterizado como uma deposição localizada de dentina terciária (1,2,3). Após uma injúria de grau leve, a maioria dos odontoblastos sobrevive e são induzidos a sintetizar matriz de dentina reacional. Essa indução dos odontoblastos sobreviventes leva à secreção de uma nova matriz na interface dentino-pulpar e, possivelmente, dentro dos túbulos dentinários, contribuindo para a aparência histológica de esclerose dentinária no local da injúria a qual reduz a permeabilidade dentinária (4). Com o aumento da intensidade da injúria, muitos odontoblastos primários morrem e células progenitoras/embrionárias podem se diferenciar originando uma nova geração de células semelhantes a odontoblastos responsáveis pela deposição de um tipo específico de dentina terciária, conhecida como reparadora (5,6,7). A dentinogênese reparadora é responsável pela formação de uma ponte de dentina nos locais de exposição pulpar após a aplicação do hidróxido de cálcio como agente capeador. Como consequência desse processo, ocorre a perda da continuidade dos túbulos, resultando em redução marcante da permeabilidade dentinária, a qual apresenta papel importante na determinação da resposta pulpar à cárie dentária e aos procedimentos restauradores (8). Com o objetivo de aproveitar essa capacidade regenerativa do tecido pulpar, um novo conceito de terapia tem sido baseado na estimulação da síntese de matriz dentinária pelas células pulpares e a consequente redução da permeabilidade da dentina. Tal redução poderia prevenir injúrias pulpares originárias da dissolução de materiais dentários e da difusão de componentes tóxicos (8,9) por meio dos túbulos dentinários em direção à polpa.

A matriz de dentina contém um reservatório de moléculas bioativas, incluindo membros da família TGF- β (transforming growth factor- β) e outros fatores de

crescimento que apresentam importantes propriedades de sinalização celular (10). A superfamília TGF- β compreende um grupo de sub-famílias de fatores, tais como TGF- β (isoformas TGF β 1, - β 2, - β 3 e - β 5) e BMP - *bone morphogenetic protein* (BMP-2, BMP-3, BMP- 4, BMP- 5, BMP -6, BMP- 7 e BMP- 8) (11). Esses fatores de crescimento têm sido relacionados à indução da diferenciação de células semelhantes à odontoblastos (12,13) e da sinalização de odontoblastos primários durante o reparo dentinário (14-16). Diversos estudos *in vivo* têm demonstrado os efeitos de extratos de matriz dentinária, contendo essas moléculas bioativas, tanto na dentinogênese reacional quanto na reparadora (15,17-23). Em um recente estudo (15), a aplicação do extrato de proteínas não colagenosas da matriz dentinária solúveis em EDTA (ESDP) como forrador cavitário em dentes de furões resultou na estimulação da dentinogênese reacional, caracterizada pelo aumento acentuado na deposição de matriz dentinária na região da polpa relacionada com a parede axial da cavidade. Para preparar ESDP, incisivos inferiores extraídos de coelhos da Nova Zelândia foram triturados em um dispositivo resfriado com nitrogênio líquido. ESDP foi isolada com acetato tetra diamino etileno di-sódio (EDTA) a 10%, pH 7.2, contendo 10 mM de N-etilmaleimida, 5mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil como inibidores de protease. Em seguida, foi realizada a diálise com água destilada e liofilização do preparado solúvel em EDTA. Esse extrato liofilizado de componentes da matriz dentinária deve ser utilizado diretamente para estimulação da dentinogênese reacional, sem demais purificações, que podem levar a perda da quimiotaxia ou de outros fatores necessários para a atividade morfogenética (17). Detalhes da metodologia empregada para extração das proteínas não colagenosas da dentina de coelhos utilizando EDTA foram descritas por Smith et al. (17).

Há muito tempo, o hidróxido de cálcio tem sido utilizado como agente forrador (24,25), entretanto, mais recentemente, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMR) também estão sendo indicados com esse propósito por apresentarem adequadas propriedades biológicas e mecânicas. Um estudo recente *in vivo* demonstrou que o CIVMR Vitrebond (3M ESPE), quando aplicado como agente forrador em cavidades profundas, não causa significativa resposta inflamatória ou qualquer dano ao tecido pulpar (24). Além disso, Titley et al. (26) relataram formação de cristais na embocadura dos túbulos dentinários após a aplicação do Vitrebond sobre o substrato dentinário. Esses cristais parecem obstruir parcialmente os túbulos e clinicamente podem reduzir a permeabilidade dentinária. Conseqüentemente, o objetivo do presente estudo *in vivo* foi investigar os efeitos da aplicação de um extrato de proteínas dentinárias solúveis em EDTA (ESDP), um cimento de ionômero de vidro modificado por resina e um cimento de hidróxido de cálcio como agentes forradores em cavidades dentinárias profundas, considerando a deposição estimulada de dentina reacional.

Materiais e métodos

Os cuidados e a manipulação dos animais durante os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o Guia elaborado pela *Canadian Council on Animal Care* e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Arararaquara - UNESP (Anexo 1).

Aplicação dos materiais

Dezoito cavidades profundas de classe V foram preparadas em pré-molares de quatro macacos-prego (*Cebus apella*) de 7 anos de idade, provenientes do Centro de

Reprodução de Macacos Prego do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os seguintes materiais foram utilizados como forradores cavitários: Grupo 1 - extrato de proteínas dentinárias solúveis em EDTA (ESDP); Grupo 2 - cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA); e Grupo 3 (controle) - cimento de hidróxido de cálcio (Dycal - Dentsply, Mildford, DE, USA). O extrato de proteínas dentinárias solúveis em EDTA (ESDP) obtido a partir da matriz extracelular da dentina de incisivos de coelhos foi fornecido pelo Dr. Anthony J. Smith (17). Os grupos foram intencionalmente distribuídos para que em um mesmo animal fossem utilizados todos os materiais avaliados. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitonal de tiopental sódico a 3% (Thionembutal - Aboutt Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brasil - 30 mg/kg de peso corporal), e os dentes receberam raspagem e profilaxia dentária com taça de borracha e pasta profilática em baixa rotação. Após isolamento absoluto e anti-sepsia do campo operatório com álcool-iodado a 3%, seguida da neutralização com álcool 70%, cavidades de classe V foram preparadas nas superfícies vestibulares dos pré-molares utilizando uma broca cilíndrica (#1091, KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) em alta rotação sob refrigeração abundante. A ponta ativa da broca foi limitada em 1,2 mm com um batente de resina composta, para controlar a profundidade da cavidade. Como descrito previamente por Hebling et al. (25), as brocas foram substituídas a cada 4 preparos para evitar o aquecimento dos tecidos dentários. As paredes axiais das cavidades foram regularizadas utilizando uma broca cônica invertida (#34, KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) em baixa rotação. Em seguida, as cavidades foram completamente lavadas com água destilada. Para remover a *smear layer*, as cavidades foram condicionadas com EDTA 17% 0.5 M, pH 7.2 por 30 segundos. Em seguida, o agente condicionador foi removido utilizando água destilada

e as paredes foram secas com a aplicação de suaves jatos de ar (27). Os materiais experimentais e controle foram cuidadosamente aplicados na parede axial da cavidade, preenchendo-a completamente. Dycal (Dentsply) e Vitrebond (3M ESPE) foram manipulados de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes. Para a aplicação de ESDP, aproximadamente 100µg do extrato liofilizado desse material experimental, que apresentava um aspecto granular, foram cuidadosamente inseridos na parede axial da cavidade, utilizando um aplicador de hidróxido de cálcio. Discos de metal esterilizados foram inseridos sobre a superfície dos materiais usados como forradores. Seguindo os protocolos utilizados em diversos estudos *in vivo* executados em dentes de macacos (28,29), as cavidades foram restauradas com amálgama de prata (Permite - SDI, Southern Dental Industries- Australia).

Procedimentos histológicos

Decorrido o período experimental de seis meses, os animais foram anestesiados e perfundidos com solução salina tamponada, seguida de uma solução fixadora inicial de paraformaldeído a 4% em tampão acetato de sódio (pH 6.5) e uma solução fixadora final de paraformaldeído a 4% em tampão tetraborato de sódio (pH 9.5). As mandíbulas foram removidas cirurgicamente e os dentes separados do osso alveolar com um disco diamantado em baixa rotação sob refrigeração constante. Os dentes foram desmineralizados em solução de Morse, preparada através da mistura de partes iguais de citrato de sódio a 20% (LABSYNTH Laboratory Products, Diadema, SP, Brazil) e de ácido fórmico a 50% (LABSYNTH Laboratory Products, Diadema, SP, Brazil), em água destilada. Após a desmineralização (três meses), os dentes foram submetidos aos processos de desidratação em álcoois crescentes (LABSYNTH Laboratory Products, Diadema, SP, Brazil), xilol (LABSYNTH Laboratory Products,

Diadema, SP, Brazil) e inclusão em parafina (Histosec®, MERCK, Darmstadt, Germany). Cortes histológicos seriados de seis micrometros no sentido vestibulo-lingual foram obtidos utilizando um micrótomo rotatório (“820” Spencer Microtome, Carson, CA, USA) e corados pelas técnicas de hematoxilina/eosina (H/E), tricrômico de Masson e Brown & Brenn (para detecção de bactérias). Os seguintes eventos histológicos foram avaliados: resposta celular inflamatória, desorganização tecidual, formação de tecido duro (deposição de dentina terciária) e presença de bactérias. Esses eventos foram analisados em microscópio de luz (Carl Zeiss 62774, Oberkachen – West Germany) e graduados de acordo com a intensidade da reação, conforme apresentado nas Tabelas 1- 4.

A espessura de dentina remanescente (EDR) e a espessura de dentina terciária (EDRa) foram mensuradas na lâmina que apresentava a maior deposição de dentina reacional na região da polpa relacionada com a parede axial da cavidade. Essa lâmina foi escolhida com base nas secções seriadas obtidas dos espécimes. A imagem selecionada para cada espécime foi analisada por meio de um microscópio de luz (Carl Zeiss - Jenamed 2, West Germany) acoplado a uma câmara de vídeo (SANSUNG Digital Camera SCC - 131, SANSUNG ELETRONICS CO., Ltd., Korea). As imagens foram enviadas a um microcomputador e processadas utilizando um *software* padrão (ImageLab, Softium Informática - ME, São Paulo, SP, Brasil).

Análise estatística

O teste estatístico de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar a espessura de dentina remanescente entre os três grupos, com nível de significância de 5%, considerando que a comparação direta entre esses grupos seria realizada somente se existisse similaridade em relação a essa variável (EDR).

Resultados

Espessura de dentina remanescente

As espessuras de dentina remanescente (EDR) obtidas para os espécimes de cada grupo são apresentadas na Tabela 5. A aplicação do teste estatístico de Kruskal-Wallis a esses dados revelou não haver diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Grupo 1 - Extrato de proteínas solúveis em EDTA (ESDP)

Neste longo período de avaliação (180 dias), todas as amostras exibiram discreta alteração na morfologia tecidual abaixo da parede axial da cavidade, forrada com esse material experimental. O tecido foi caracterizado pela perda da aparência fisiológica da interface dentino-pulpar e a deposição de quantidades variáveis de dentina terciária pelos odontoblastos, que mostraram um aspecto achatado (Figura 1). A deposição de dentina reacional ocorreu na região da polpa relacionada com a parede axial da cavidade. A zona central da polpa exibiu estrutura histológica normal sem nenhuma resposta inflamatória. Os valores das medianas de EDR e EDRA para esse grupo experimental foram 399,48 μ m e 74,42 μ m, respectivamente. Em dois espécimes, nos quais foram detectadas bactérias ao longo das paredes cavitárias (paredes laterais e axial), nenhuma resposta inflamatória foi observada (Tabela 5).

Grupo 2 - Cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond)

A resposta do complexo dentino-pulpar observada neste grupo experimental foi similar ao Grupo 1 (ESDP). Discreta desorganização tecidual caracterizada pela deposição de matriz dentinária e nenhuma resposta pulpar inflamatória foram

observadas para a maioria dos espécimes. Os valores das medianas de EDR e EDRA medidos para esse grupo foram 402,64 μm e 54,87 μm , respectivamente. Bactérias não foram encontradas em nenhum dos espécimes. A ausência de deposição de dentina reacional foi observada em dois dos seis espécimes em que as EDRs foram 797,26 e 476,59 μm (Tabela 5). Somente em dois espécimes, os quais apresentavam EDR de 106,0 μm e 289,07 μm , foi observada moderada deposição de matriz dentinária (Figura 2).

Grupo 3: controle - Cimento de hidróxido de cálcio (Dycal)

Para todos os espécimes, nenhuma resposta inflamatória ou presença de bactérias foi observada. O valor das medianas de EDR e EDRA medidos para o grupo foram 399,54 μm e 51,16 μm , respectivamente. A ausência de deposição de dentina reacional abaixo das cavidades foi observada em três espécimes, nos quais a EDR foi 509,58; 434,97 e 138,34 μm (Tabela 5). Nos demais, deposição moderada foi registrada (Figura 3).

Discussão

Embora o uso de agentes forradores/bases em cavidades dentinárias profundas tenha reconhecida importância devido à sua capacidade de reduzir a difusão de componentes tóxicos, originários de materiais restauradores, em direção ao tecido pulpar, as informações a respeito da eficiência de tais agentes ainda são limitadas. O presente estudo demonstrou evidência direta de que os três forradores cavitários testados são efetivos na proteção do complexo dentino-pulpar, mesmo quando esses materiais, incluindo o CIVMR - Vitrebond, foram aplicados em cavidades profundas.

É provável que a secreção de matriz dentinária em resposta aos tratamentos contribuiu para sua efetividade em proteger o tecido pulpar. Entretanto, essa resposta foi diferente para os três tratamentos, observando a seguinte ordem: ESDP > Dycal > Vitrebond, de acordo com a espessura de dentina reacional. Quando avaliada a incidência de dentinogênese terciária nos espécimes, foram verificadas também diferenças entre os grupos, seguindo a ordem ESDP (6/6) > Vitrebond (4/6) > Dycal (3/6). Embora todos os tratamentos tenham apresentado alguma atividade de dentinogênese terciária, essa apresentou incidência variável somente para os grupos Vitrebond e Dycal. A aplicação de ESDP, entretanto, resultou na maior quantidade de secreção de dentina terciária, a qual ocorreu em 100% das cavidades examinadas.

Estudos prévios demonstraram a capacidade de ESDP estimular tanto a dentinogênese reacional (15,18) quanto a reparadora (17). Foi sugerido que a presença de isoformas de TGF- β na matriz dentinária (30,31) contribui para a estimulação da dentinogênese terciária (10) e que os efeitos da ESDP na indução de células semelhantes a odontoblastos podem ser bloqueados por anticorpos anti-TGF- β (12). As formas puras recombinantes dos fatores de crescimento da família TGF- β têm também demonstrado ação estimuladora da dentinogênese terciária tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* (14,16,19-23). Neste estudo, a estimulação da dentinogênese reacional, após a aplicação de ESDP em cavidades dentinárias profundas, pode ser explicada pela presença de moléculas bioativas no extrato, incluindo fatores de crescimento da família TGF- β . O uso de ESDP como agente forrador cavitário foi escolhido com o intuito de reproduzir os possíveis efeitos de tais moléculas quando liberadas de reservatórios endógenos contidos na matriz de dentina intacta do próprio dente, durante sua dissolução.

No presente estudo, EDTA foi utilizado como agente de limpeza, antes da aplicação dos tratamentos forradores sobre a parede axial da cavidade, para remover a *smear layer* e permitir o contato direto entre os materiais experimentais e o tecido dentinário. Foi demonstrado que EDTA a 17% (pH = 7.2) aplicado em dentina por 60 segundos foi capaz de remover a *smear layer* sem causar significativa alteração morfológica na estrutura dentinária (27). Conseqüentemente, a utilização desse agente por 30 segundos, como executado neste estudo, provavelmente não tenha sido suficiente para liberar moléculas bioativas da dentina e essas se difundirem através dos túbulos dentinários em direção ao tecido pulpar.

Smith et al. (32) sugeriram que o hidróxido de cálcio apresenta leve efeito solubilizante sobre a matriz de dentina, embora não seja um agente de composição ácida. Conseqüentemente, esse cimento poderia liberar fatores de crescimento, como TGF- β 1 e causar a estimulação transdentinária de deposição de matriz de dentina pelos odontoblastos. O Vitrebond, um cimento de ionômero de vidro modificado por resina, apresenta baixo pH inicial (4 a 5.5) nas primeiras 24 horas após sua aplicação (33), o qual poderia contribuir para uma leve desmineralização superficial da dentina, imediatamente após sua aplicação sobre a parede axial dentinária. Como já foi discutido, é possível que a dentinogênese reacional observada no presente estudo para os três tratamentos forradores possa ser explicada pela liberação de fatores de crescimento e moléculas bioativas da matriz dentinária. Entretanto, a resposta menos intensa e variável verificada para os espécimes tratados com os cimentos Vitrebond e Dycal sugere que quantidades menores dessas moléculas (abaixo dos valores ótimos) estavam presentes quando comparadas ao tratamento com ESDP. Dessa forma, é possível especular que diferentes tratamentos cavitários bem como as características

dos materiais dentários aplicados como forradores podem liberar distintas quantidades de moléculas bioativas da matriz dentinária para estimular as células pulpares.

A distância de difusão das moléculas bioativas ao longo dos túbulos dentinários também pode ser considerada um parâmetro importante na avaliação do efeito estimulatório sobre odontoblastos e células pulpares. Assim, a espessura da dentina remanescente (EDR) deve ser considerada importante, pois cavidades dentinárias profundas podem favorecer a difusão dessas moléculas e a interação com as células pulpares. Nos espécimes tratados com Vitrebond ou Dycal em que a dentinogênese reacional não ocorreu, a EDR e conseqüentemente a distância de difusão foram geralmente maiores que nos espécimes que apresentavam deposição de dentina reacional. De forma geral, com o aumento da espessura da dentina remanescente abaixo das cavidades, houve uma menor deposição de dentina terciária. Esse achado histológico também foi relatado em outros estudos (18,19,34). Foi sugerido que o aumento da distância entre a cavidade e os odontoblastos modula a difusão de moléculas bioativas através dos túbulos dentinários e sua interação com os receptores no corpo da célula odontoblástica (17). A deposição de dentina reacional também pode ser causada pelos efeitos irritantes provocados durante o preparo inadequado da cavidade. Entretanto, o corte intermitente dos tecidos dentários associados com a intensa irrigação e freqüente substituição das brocas pode prevenir esse tipo de dentinogênese reacional. No presente estudo, todas as cavidades foram preparadas utilizando refrigeração constante e procedimentos clínicos padronizados para o corte tecidual. Conseqüentemente, a realização criteriosa dos preparos cavitários bem como a EDR podem explicar a ausência de deposição de dentina reacional em alguns espécimes dos grupos 2 (Vitrebond) e 3 (Dycal).

Neste estudo, bactérias foram evidenciadas somente em duas amostras no grupo 1 (ESDP). Foi demonstrado que a intensa resposta pulpar inflamatória ou mesmo comprometimento pulpar severo podem ocorrer devido aos efeitos tóxicos das bactérias e seus produtos (1). Entretanto, estudos realizados em dentes de macacos têm demonstrado ausência de diferença na resposta de cura entre as polpas capeadas imediatamente após a exposição pulpar e aquelas capeadas após exposição do tecido pulpar ao ambiente bucal por até 7 dias (28,29). Além disso, atuais investigações não têm relatado nenhuma resposta após observação de bactéria ao longo das paredes cavitárias (24,25). Aspectos similares foram observados no presente estudo quando bactérias foram evidenciadas nas paredes das cavidades. Além disso, a microinfiltração ocorreu em dois espécimes que exibiram espessa dentina remanescente, não possibilitando a ação das bactérias e de seus produtos sobre o tecido pulpar. Também, com base neste estudo, não foi possível determinar precisamente o momento do ingresso dessas bactérias através da interface, o que poderia ter ocorrido próximo do final do período experimental de avaliação. Conseqüentemente, parece que a presença das bactérias nas paredes cavitárias, que poderia agir como um agente agressivo e induzir a inflamação pulpar e/ou regular a deposição de matriz dentinária, não interferiu na resposta pulpar do ESDP aplicado como forrador cavitário.

A resposta favorável do complexo dentino-pulpar, quando cimentos de ionômero de vidro são utilizados como forradores, tem sido relatada em estudos anteriores (28,35,36,37). A ausência de microinfiltração bacteriana após aplicação do Vitrebond pode ser atribuída a sua excelente capacidade seladora ao longo das paredes cavitárias bem como sua atividade antibacteriana (33,38). As características biológicas favoráveis apresentadas pela maioria dos CIVMR, associadas as suas excelentes

propriedades físicas e mecânicas (38), têm demonstrado que esse tipo de material é considerado apropriado para ser aplicado em dentina, mesmo em cavidades muito profundas (menos que 500 μ m). Esses dados também foram confirmados por Costa et al. (9), após aplicação de Vitrebond em cavidades profundas, preparadas em dentes hígidos de humanos. Em cavidades não expostas, foi sugerido que a interação química entre os componentes do Vitrebond e o substrato dentinário podem formar *plugs* de cristais nos túbulos dentinários, que podem, por sua vez, reduzir a permeabilidade dentinária (26). Costa et al. (24) relataram que os cristais dentro dos túbulos dentinários podem prevenir a difusão dos componentes tóxicos do Vitrebond provenientes da parede axial da cavidade em direção ao espaço pulpar. Conseqüentemente, esses achados poderiam contribuir para a biocompatibilidade do Vitrebond, quando aplicado como agente forrador, mesmo em cavidades mais profundas. A secreção local de dentina reacional abaixo dos preparos cavitários poderia contribuir para esses efeitos. A biocompatibilidade do Vitrebond apresentada neste estudo pode estar relacionada à redução na permeabilidade dentinária subjacente às cavidades e à própria presença física da dentina, desde que esse material é citotóxico quando aplicado em cultura de fibroblastos humanos *in vitro*, resultando na morte celular (39) e redução do metabolismo celular quando em contato com células imortalizadas semelhantes a odontoblastos (40). Além disso, quando aplicado como agente capeador pulpar em polpas expostas mecanicamente em pré-molares humanos saudáveis, Vitrebond desencadeou uma reação pulpar inflamatória persistente associada à ausência de formação de ponte de dentina (41).

Em resumo, este estudo demonstrou que os três materiais forradores avaliados mostraram efeitos sobre a estimulação da secreção de dentina reacional e proteção do

complexo dentino-pulpar. O mecanismo dessa proteção pode ser explicado, pelo menos em parte, pelos efeitos das moléculas bioativas da matriz dentinária na estimulação da dentinogênese terciária.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Reprodução de Macacos-Prego do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP por fornecer os animais e todo suporte técnico necessário durante os procedimentos clínicos. Este estudo foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ CNPq - Brasil (Processos: 131127/2002-0 e 302575/2004-9).

Referências

1. Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *J Endod.* 1981; 7:100-104.
2. Langeland K. Tissue response to dental caries. *Endod Dent Traumatol.* 1987; 3:149-171.
3. Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dent Mater.* 2000; 16:188-197.
4. Mjör IA. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res.* 1985; 64:621-627, Special Issue.
5. Lesot H, Smith AJ, Tziafas D, Bègüe-Kirn C, Cassidy N, Ruch JV. Biologically active molecules and dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. *Cells Mater.* 1994; 4:199-218.

6. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bégüe-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995; 39:273-280.
7. Smith AJ, Murray PE, Lumley PJ. Preserving the vital pulp in operative dentistry: I A biological approach. *Dent Update* 2002; 29:64-69.
8. Mjör IA. Dentin and pulp. Reaction patterns in human teeth. Boca Raton, FL: CRC Press, 1983.
9. Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater.* 2002; 18:543-551.
10. Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.* 2003; 67:678-689.
11. Nakashima M, Toyono T, Murakami T, Akamine A. Transforming growth factor-beta superfamily members expressed in rat incisor pulp. *Arch Oral Biol.* 1998; 43:745-775.
12. Bégüe-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM. Effects of dentin proteins, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and bone morphogenetic protein-2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol.* 1992; 36: 491-503.
13. Bégüe-Kirn C, Smith A, Loriot M, Kupferle C, Ruch JC, Lesot H. Comparative analysis of TGF- β s, BMPs, IGF, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expressions during normal and in vitro induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1994; 38:405-420.
14. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentin-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol.* 1999;44:149-156.

15. Smith AJ, Tobias RS, Murray PE. Transdental stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentin matrix components. *J Dent.* 2001; 29:341-346.
16. Dobie K, Smith G, Sloan AJ, Smith AJ. Effects of alginate hydrogels and TGF- β 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connect Tiss Res.* 2002;43 : 387-390.
17. Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch, JV. In vivo morphogenetic activity of dentin matrix proteins. *J Biol Buccale* 1990; 18:123-129.
18. Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Plant CG, Browne M, Bègue-Kirn C, et al. Odontoblast stimulation in ferrets by dentin matrix components. *Arch Oral Biol.* 1994; 39:13-22.
19. Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol.* 1993; 38:571-576.
20. Rutherford B, Spangberg L, Tucker M, Charette M. Transdental stimulation of reparative dentin formation by osteogenic protein-1 in monkeys. *Arch Oral Biol.* 1995; 40:681-683.
21. Jepsen S, Albers HK, Fleiner B, Tucker M, Rueger D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J Endod.* 1997; 23:378-382.
22. Hu C-C, Zhang C, Quian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod.* 1998; 24:744-751.
23. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol.* 2002; 47:177-187.
24. Costa CAS, Giro EMA, Nascimento ABL, Teixeira HC, Hebling J. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a glass-ionomer cement and a

- bonding agent applied in deep cavities. *Dent Mater.* 2003; 19:739-746.
25. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent.* 1999; 27:557-564.
26. Titley KC, Smith DC, Chernecky R. SEM observations of the reactions of the components of a light-activated glass polyalkenoate ionomer cement on bovine dentin. *J Dent.* 1996; 24:411-416.
27. Çehreli Z, Altay N. Etching effect of 17% EDTA and a non-rinse conditioner (NRC) on primary enamel and dentin. *Am J Dent* 2000; 13:64-68.
28. Cox CF, Bergenholtz G, Fitzgerald M, Heys DR, Heys RJ, Avery JK, et al. Capping of the dental pulp mechanically exposed to oral microflora. A 5 week observation of wound healing in the monkey. *J Oral Pathol.* 1982; 11:327-339.
29. Cox CF, Bergenholtz G, Heys DR, Syed SA, Fitzgerald M, Heys RJ. Pulp capping of the dental pulp mechanically exposed to oral microflora: a 1-2 year observation of wound healing in the monkey. *J Oral Pathol.* 1985; 14:156-168.
30. Cassidy N, Faheys S, Prime S, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor- β isoforms 1-3 in human and rabbit dentin matrices. *Arch Oral Biol.* 1997; 42:219-223.
31. Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Tompkins K, et al. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent.* 2003;16:66-76.
32. Smith AJ, Garde C, Cassidy N, Ruch JV, Lesot H. Solubilisation of dentin extracellular matrix by calcium hydroxide. *J Dent Res.* 1995; 74:829 (abstr.59).
33. DeSchepper EJ, Thrasher MR, Thurmond BA. Antibacterial effects of light-cured liners. *Am J Dent.* 1989; 2:74-76.

34. Murray PE, Hafez AA, Windsor LJ, Smith AJ, Cox CF. Comparison of pulp responses following restoration of exposed and non-exposed cavities. *J Dent.* 2002;30:213-222.
35. Cox CF, White KC, Ramus DL. Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int.* 1992; 23:257-270.
36. Gaintantzopoulou MD, Willis GP, Kafrawy A. Pulp reactions to light-cured glass ionomer cements. *Am J Dent.* 1994; 7:39-42.
37. Tarim B, Hafez AA, Cox CF. Pulpal response to a resin-modified glass-ionomer material on nonexposed and exposed monkey pulps. *Quintessence Int.* 1998; 29:535-542.
38. Mathis RS, Ferrance JL. Properties of glass ionomer resin composite hybrid materials. *Dent Mater.* 1989; 5:355-358.
39. Leyhausen G, Abtahi M, Karbakhsh A, Sapotnick A, Geurtsen W. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials* 1998; 19:559-564.
40. Costa CAS, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass ionomer cements. *Biomaterials* 2003; 24:3853-3858.
41. Nascimento ABL, Fontana UF, Teixeira HM, Costa CAS. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. *Am J Dent.* 2000; 13:28-34.

Tabela 1. Resposta celular inflamatória

Escore	Descrição
0	Nenhuma ou poucas células inflamatórias na polpa, abaixo da parede axial da cavidade, caracterizando tecido conjuntivo normal.
1	Discreta quantidade de células inflamatórias com predomínio de PMN ou células mononucleares.
2	Moderada quantidade de células inflamatórias envolvendo a polpa coronária.
3	Intensa quantidade de células inflamatórias, caracterizando abscesso ou denso infiltrado celular envolvendo a polpa coronária.

Tabela 2. Desorganização tecidual

Escore	Descrição
0	Tecido normal.
1	Desorganização dos odontoblastos relacionados com a parede axial da cavidade. Porção central da polpa normal.
2	Desorganização total da morfologia do tecido pulpar.
3	Necrose da polpa coronária e/ou radicular.

Tabela 3. Formação de tecido duro (dentina reacional)

Escore	Descrição
0	Ausente
1	Discreta deposição de matriz dentinária na região relacionada à parede axial da cavidade
2	Moderada deposição de matriz dentinária na região relacionada à parede axial da cavidade
3	Intensa deposição de matriz dentinária na área relacionada à parede axial da cavidade

Tabela 4. Presença de bactérias

Escore	Descrição
0	Ausência
1	Presença nas paredes laterais da cavidade
2	Presença nas paredes laterais atingindo a parede axial
3	Presença no interior dos túbulos dentinários da parede axial e/ou sobre a polpa

Tabela 5. Espessura de dentina remanescente (EDR), espessura de dentina reacional (EDRa) e escores atribuídos a cada evento histológico de acordo com os materiais.

Material	Espécime	EDR (μm)	EDRa (μm)	Escore para os eventos histológicos			
				Resposta inflamatória	Desorganização tecidual	Formação de tecido duro	Presença de bactérias
ESDP	1	572,38	54,34	0	1	1	0
	2	474,51	42,11	0	1	1	0
	3	139,50	94,49	0	1	2	0
	4	429,08	49,26	0	1	1	2
	5	369,89	126,56	0	1	2	1
	6	245,09	138,83	0	1	2	0
Medianas		399,48	74,42				
Vitrebond	1	289,07	76,43	0	1	2	0
	2	328,70	50,08	0	1	1	0
	3	106,00	108,78	0	1	2	0
	4	797,26	0	0	0	0	0
	5	476,59	0	0	0	0	0
	6	555,89	59,67	0	1	1	0
Medianas		402,64	54,87				
Dycal	1	306,11	102,31	0	1	2	0
	2	509,58	0	0	0	0	0
	3	364,10	179,83	0	1	2	0
	4	434,97	0	0	0	0	0
	5	579,83	117,43	0	1	1	0
	6	138,34	0	0	0	0	0
Medianas		399,54	51,16				

Figura 1. Grupo ESDP. A - Relação cavidade/tecido pulpar (EDR = 139,5 μm). H/E, 32x. B - Maior aumento da figura 1A. Moderada deposição de matriz dentinária exibindo uma camada subjacente contínua de células odontoblásticas H/E 64x. C - O tecido pulpar apresenta características histológicas normais exceto pela discreta desorganização tecidual caracterizada pela deposição de dentina terciária. (EDRa = 94,49 μm), que exhibe túbulos dentinários. H/E, 125x (★ dentina remanescente; C = cavidade; P = tecido pulpar; D = dentina; setas = dentina reacional; *pointers* - túbulos dentinários).

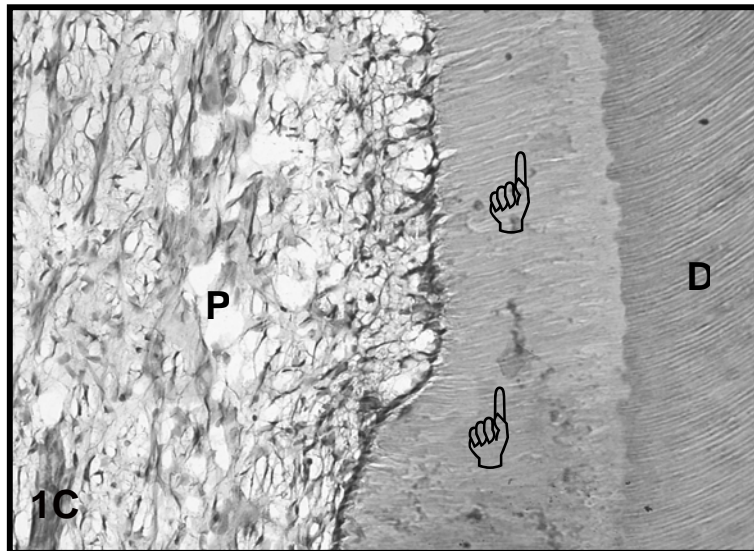
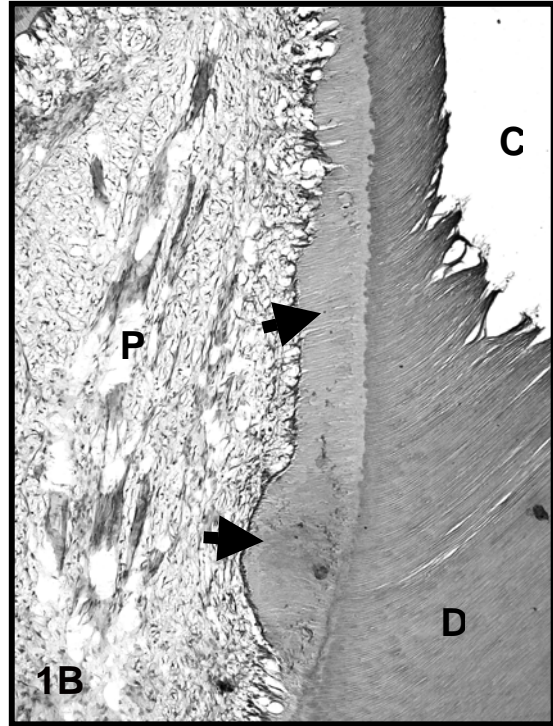
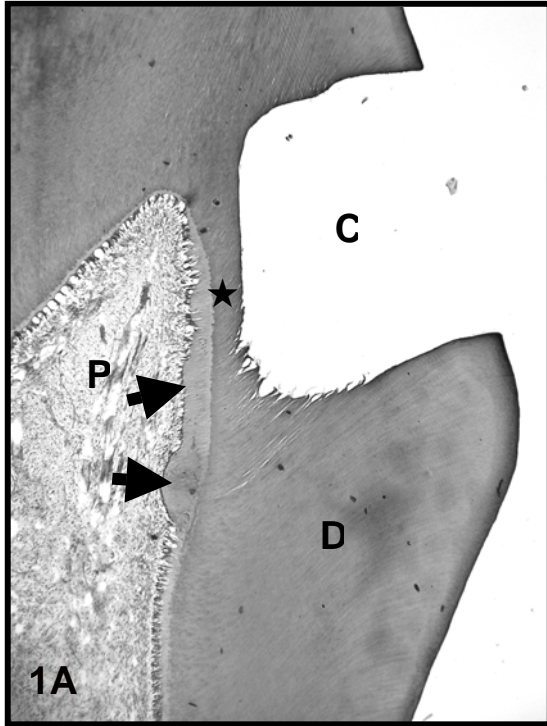


Figura 2. Grupo Cimento de ionômero de vidro modificado por resina. A - Deposição de matriz dentinária (EDRa = 76,43 μm) na região da polpa relacionada com o preparo cavitário. H/E, 64x. B - Maior aumento da figura 2A. Matriz de dentina tubular depositada em continuidade com a dentina circumpulpar. H/E, 125x. C - Note as células odontoblásticas com os processos citoplasmáticos dentro dos túbulos dentinários (*pointers*). Tricrômico de Masson, 230x. (P = tecido pulpar; D = dentina; DRa = dentina reacional; setas = camada odontoblástica).

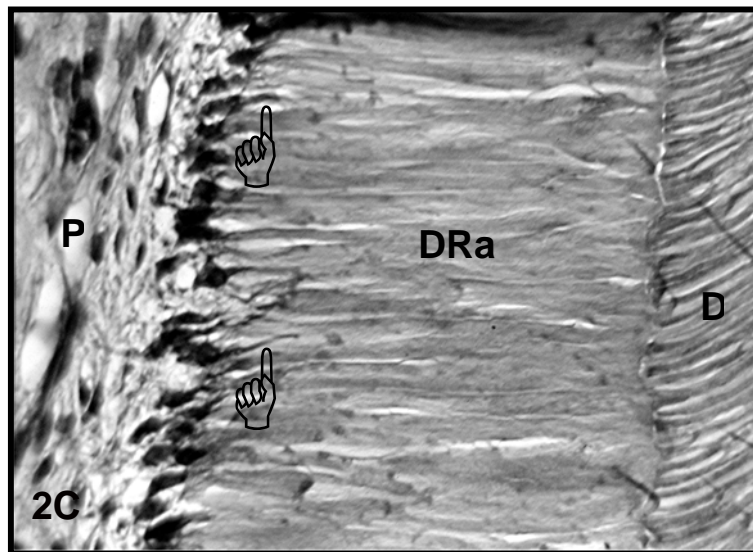
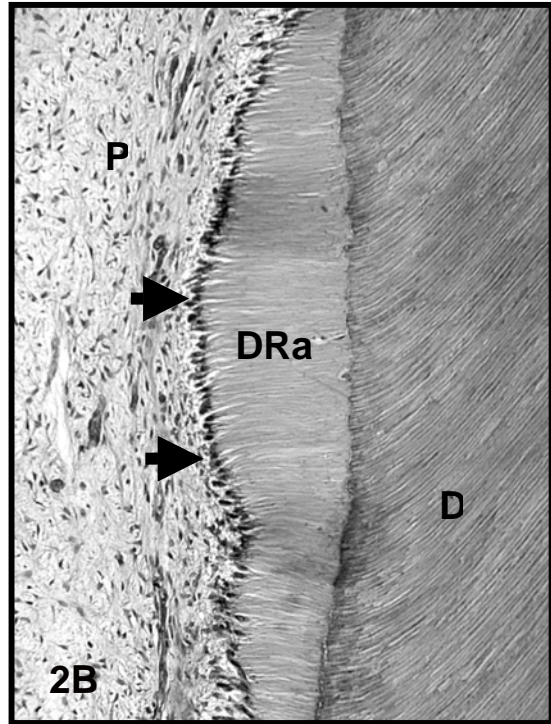
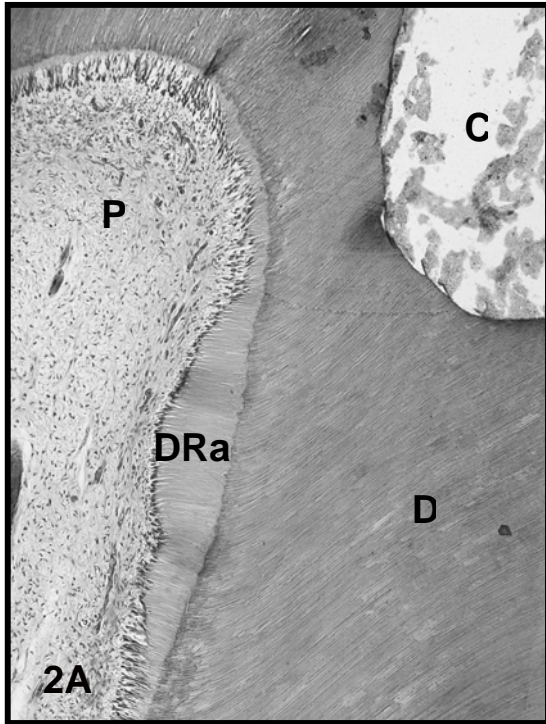
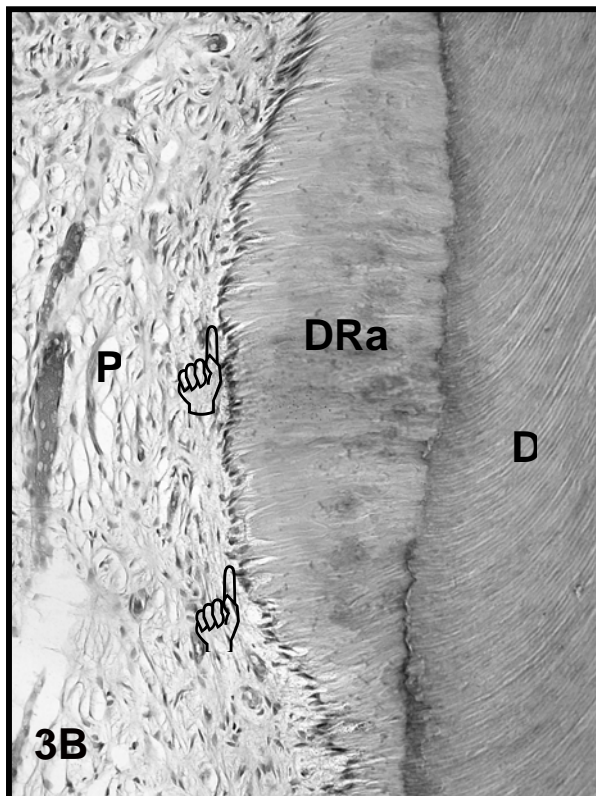
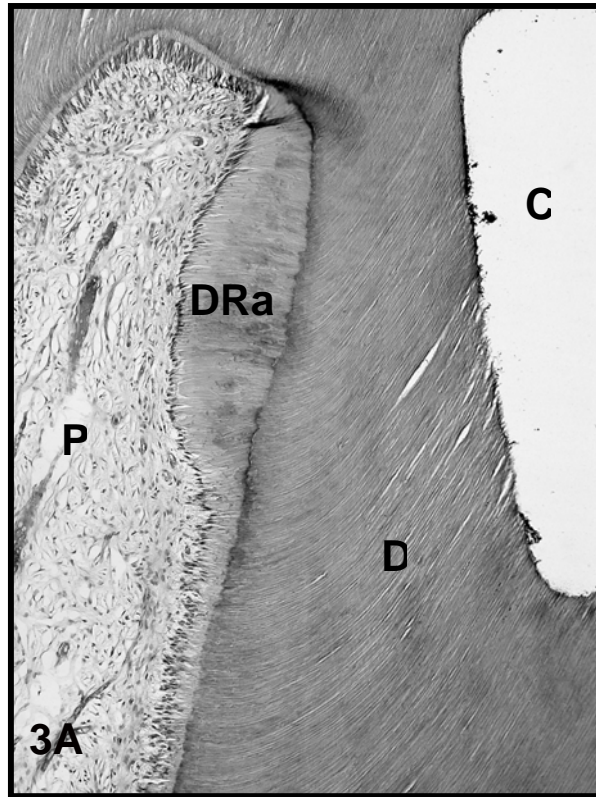


Figura 3. Grupo cimento de hidróxido de cálcio. A - Relação entre o preparo cavitário e o tecido pulpar. Note a moderada deposição de matriz de dentina subjacente a uma reduzida espessura de dentina remanescente (EDR = 306,11 μm ; EDRA = 102,31 μm). H/E, 64x. B - Maior aumento da figura 3A. Uma camada contínua de células odontoblásticas alongadas (*pointers*) pode ser observada adjacente à dentina reacional. H/E 125x (P = polpa; D = dentina; C = cavidade; DRa = dentina reacional).



Artigo 3

**Avaliação clínica e microbiológica de
lesões profundas em dentina antes e após
remoção incompleta da cárie dentária**

**Avaliação clínica e microbiológica de lesões profundas em dentina antes e após
remoção incompleta da cárie dentária**

Clinical and microbiological evaluation of deep dentinal lesions before and after
incomplete caries removal

Autores: C. Duque¹, TC Negrini², NT Sacono¹, DMP Spolidorio², J Hebling¹.

¹Departamento de Clínica Infantil e ²Departamento de Fisiologia e Patologia,
Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP,
Araraquara, SP, Brasil.

Título reduzido: Estudo clínico e microbiológico após remoção incompleta de cárie.

Short Title: Clinical and microbiological study after incomplete caries removal

Autor correspondente:

Profa. Dra. Josimeri Hebling, DDS, PhD

Universidade Estadual Paulista / UNESP

Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAR

Rua Humaitá, 1680 / CEP: 14.801-903, Araraquara, SP, Brasil. Telefone: 16-3301-6334

Fax: 16-3301-6329. E-mail: jhebling@foar.unesp.br

Palavras-chave: cárie dentária, cimentos de ionômero de vidro, cimento de hidróxido de cálcio, capeamento da polpa dentária, reação em cadeia da polimerase.

Resumo

Os objetivos deste estudo foram avaliar a efetividade clínica e microbiológica do tratamento pulpar indireto com dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e um cimento de hidróxido de cálcio, além de identificar as espécies *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* presentes nas amostras de dentina cariada antes e após o tratamento. Foram selecionados 33 molares decíduos e/ou permanentes com lesões de cárie profunda, divididos em G1: Vitrebond (3M ESPE), G2: Fuji Lining LC (GC América) e G3: Dycal (Dentsply). Os critérios avaliados foram: sintomatologia, textura, coloração e umidade da dentina e exame radiográfico. Foi realizada a remoção parcial da cárie dentinária, forramento com um dos materiais propostos, selamento temporário, e após três meses, reabertura e restauração definitiva. A avaliação clínica e as coletas de dentina foram executadas antes e após a remoção parcial da cárie e três meses depois. As amostras foram processadas para contagem de estreptococos grupo *mutans* (SM) e lactobacilos (LB). Colônias de SM foram selecionadas para identificação de *S. mutans* e *S. sobrinus* por PCR. Após três meses do tratamento, foi verificada ausência de sintomatologia clínica e sinais radiográficos de patologias pulpare, para todos os materiais testados. Além disso, a dentina remanescente apresentou-se resistente à curetagem e seca e houve redução estatisticamente significativa da contagem de SM e LB para todos os grupos. Das 429 colônias selecionadas, 377 (87,9%) foram identificadas como *S. mutans* e 7 (1,6%) como *S. sobrinus*. O tratamento pulpar indireto com os cimentos avaliados mostrou resultados clínicos satisfatórios e redução expressiva das bactérias cariogênicas testadas, entretanto não houve a eliminação completa das mesmas.

Introdução

Em dentes com lesões extensas em dentina e ausência de patologias pulparens irreversíveis, a remoção da cárie sem comprometer a vitalidade do tecido pulpar continua sendo a melhor estratégia de tratamento. Por esse motivo, técnicas alternativas de remoção parcial da dentina cariada, que objetivam evitar a exposição da polpa, como o tratamento restaurador atraumático e o tratamento pulpar indireto, estão sendo amplamente divulgadas e aplicadas com sucesso na clínica odontológica [Farooq et al., 2000; Falster et al., 2002; Taifour et al., 2003]. É conhecido que a dentina cariada apresenta basicamente duas camadas, uma mais externa, conhecida como infectada, com aspecto amolecido e coloração clara e outra mais interna, a dentina contaminada, mais dura e escura que a primeira, sendo passível de remineralização [Fusayama, 1979]. Embora esteja indicada somente a remoção da dentina infectada, conhecida por sua elevada concentração de microrganismos, durante as técnicas de remoção parcial da cárie dentária, grande número de bactérias ainda está presente na dentina mais interna [Bjorndal et al., 1997; Bjorndal e Larsen, 2000], tornando necessária a utilização de um material forrador com propriedades antibacterianas.

Estudos têm demonstrado o efeito inibitório *in vitro* dos cimentos ionoméricos sobre o crescimento de bactérias cariogênicas [Loyola-Rodriguez et al., 1994; Herrera et al., 2000; Duque et al., 2005]. Sua aplicação, entretanto, é reconhecida para os procedimentos de tratamento restaurador atraumático e pouco divulgada para o tratamento pulpar indireto. Nesse procedimento, os cimentos de hidróxido de cálcio são os mais utilizados [Bjorndal et al., 1997; Bjorndal e Larsen, 2000; Falster et al., 2002; Maltz et al., 2002]. Além da considerável atividade antibacteriana, os cimentos de ionômero de vidro apresentam propriedades mecânicas, físicas e biológicas desejáveis para um material forrador/base como a adesão à estrutura dentinária, coeficiente de

expansão térmica, módulo de elasticidade e resistência à compressão adequados [Mathis e Ferrance, 1989], além de biocompatibilidade quando aplicados em cavidades profundas [Costa et al., 2003]. Com base nestas constatações, alguns investigadores avaliaram o efeito do cimento de ionômero de vidro sobre a dentina cariada, em situações de tratamento pulpar indireto e constataram sucesso clínico [Farooq et al., 2000], além da redução na microbiota cariogênica [Kreulen et al., 1997; Weerheijam et al., 1999].

Os objetivos deste estudo foram avaliar a efetividade clínica e microbiológica do tratamento pulpar indireto utilizando dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e um cimento de hidróxido de cálcio, após três meses de tratamento, além de identificar as espécies *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* presentes nas amostras de dentina cariada antes e após o tratamento, por meio de PCR.

Materiais e métodos

A amostra consistiu de 33 molares decíduos e/ou permanentes jovens, selecionados de 20 crianças, de ambos os gêneros, faixa etária de 4 a 10 anos de idade. Destes, 14 eram primeiros molares decíduos (3 superiores e 11 inferiores), 13 segundos molares decíduos (4 superiores e 9 inferiores) e 6 primeiros molares permanentes (2 superiores e 4 inferiores). Todos os dentes apresentavam lesão de cárie profunda em dentina comprometendo a superfície oclusal, entretanto, 8 dentes também apresentavam cárie em uma ou mais superfícies proximais. Lesões de cárie ativa foram verificadas em 25 dentes e os demais apresentavam cáries mistas ou crônicas.

Radiografias iniciais foram realizadas para verificar a extensão da lesão de cárie e excluir possíveis patologias periapicais. Não foi verificada dor espontânea ou sensibilidade à percussão em nenhum dos casos. O presente estudo foi aprovado pelo

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (protocolo 05/2004) (Anexo 2). O consentimento livre e esclarecido foi obtido dos responsáveis pelas crianças participantes.

Procedimentos clínicos e coleta das amostras

Os dentes foram divididos aleatoriamente em três grupos, de acordo com o material forrador que seria aplicado sobre a dentina cariada remanescente. No grupo 1 (G1), 12 dentes foram tratados com o cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) - Vitrebond (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA); no grupo 2 (G2), 10 dentes foram tratados com o CIVMR - Fuji Lining LC (GC, Tokyo, Japão) e no grupo 3 (G3 - grupo controle), 11 dentes foram tratados com o cimento de hidróxido de cálcio - Dycal (Dentsply, Mildford, DE, EUA). Durante o tratamento pulpar indireto, os seguintes critérios foram avaliados: sintomatologia, textura, coloração e umidade da dentina e aspectos radiográficos, determinados em escores conforme mostra a Tabela 1.

Inicialmente, foi realizada anestesia local e profilaxia dentária com pasta profilática e taça de borracha. Após isolamento absoluto e anti-sepsia do campo operatório com digluconato de clorexidina a 0,2%, o acesso à lesão de cárie foi obtido utilizando uma broca carbide (#245 - KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil), quando necessário. Após a remoção de uma pequena camada de dentina necrótica superficial, a primeira amostra da dentina cariada (A) foi coletada com cureta esterilizada e transferida para um tubo de ensaio contendo 5 ml do meio de cultura BHI caldo (Brain Heart Infusion - Difco Laboratories, MI, USA). Para padronização da quantidade de dentina coletada, ela foi inserida em uma cavidade confeccionada na extremidade ativa de um condensador de amálgama (SS White, Artigos Dentários, Rio de Janeiro, Brasil) com fresa esférica em alta rotação, até preenchê-la totalmente.

Em seguida, o tecido cariado foi completamente removido das margens cavo-superficiais e de todas as paredes laterais da cavidade. Na parede pulpar, a remoção da dentina cariada foi realizada com brocas esféricas em baixa rotação até que esse tecido apresentasse aspecto mais resistente, verificado pela sensibilidade tátil do operador. Entretanto, uma camada de dentina cariada mais profunda foi mantida para evitar a exposição do tecido pulpar. Após lavagem e secagem da cavidade para remover resíduos resultantes da escariação da dentina, foi realizada a segunda coleta (B) de dentina cariada da porção mesial da parede pulpar, procedendo da mesma maneira descrita anteriormente. Em seguida, um forramento sobre toda a parede pulpar foi realizado com um dos materiais avaliados (Vitrebond, Fuji Lining LC ou Dycal). Os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina foram fotoativados por 30 segundos utilizando um aparelho fotopolimerizador (Optilux 500, Demetron Research Co, Danbury, CT, USA - 450mW/cm²). As cavidades foram restauradas temporariamente com cimento de óxido de zinco e eugenol (IRM - Dentsply, Mildford, DE, USA). Todos os materiais foram manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes.

Após três meses do tratamento, foi realizada reavaliação clínica e radiográfica. Sob anestesia e isolamento absoluto, os dentes foram reabertos e o material forrador completamente removido. Os aspectos clínicos da dentina remanescente foram reavaliados (Tabela 1) e uma terceira coleta (C) de dentina cariada foi realizada na porção distal da parede pulpar, seguindo os mesmos procedimentos descritos. As cavidades foram forradas com cimento de ionômero de vidro e restauradas definitivamente com amálgama de prata.

Procedimentos laboratoriais

Os tubos de ensaio contendo as amostras de dentina cariada foram agitados por

15 segundos e mantidos em estufa a 37° C, por 24 horas. Depois de constatado o crescimento bacteriano, os tubos foram submetidos a 1 minuto de vibração e as amostras diluídas em série de 10⁻¹ a 10⁻⁴ em solução salina esterilizada a 0,9%. Subseqüentemente, alíquotas de 25 µl de cada diluição foram inoculadas, em duplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Sacarose Bacitracina - SB-20 [Davey e Rogers, 1984], para o cultivo de estreptococos do grupo *mutans* e em placas contendo Ágar Rogosa (Difco Laboratories), para o cultivo de lactobacilos. Após incubação a 37° C, por 48 horas, havendo crescimento positivo nas placas inoculadas com as amostras, as colônias foram contadas utilizando um contador eletrônico digital. Então, 6 a 8 colônias com morfologia típica de estreptococos grupo *mutans* foram aleatoriamente coletadas e transferidas individualmente para um tubo contendo 5 ml de caldo BHI. As culturas foram incubadas a 37° C, por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, duas alíquotas de 500 µl do subcultivo foram estocadas em microtubos com 1,0 ml de BHI glicerol a 10% e congeladas a -20° C, para análises microbiológicas posteriores.

PCR (reação em cadeia da polimerase)

Para a identificação dos isolados bacterianos por PCR foram utilizados *primers* específicos, baseados no gene da enzima glicosiltransferase (*gtfB* de *S. mutans* e *gtfI* de *S. sobrinus*) [Oho et al., 2000]. As seqüências desses *primers* para *Streptococcus mutans* foram 5' - ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G - 3' e 5' - CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C - 3', amplificando uma seqüência de 517pb. Para *Streptococcus sobrinus*, as seqüências utilizadas foram 5' - GAT AAC TAC CTG ACA GCT GAC T - 3' e 5' - AAG CTG CCT TAA GGT AAT CAC T - 3', para amplificar um segmento de 712 pb.

Inicialmente, para obtenção do DNA das cepas isoladas, estas foram reativadas em 5ml de BHI caldo e incubadas a 37° C, por 24 horas. Após crescimento bacteriano, 1

ml obtido dos inóculos foi centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado em 1 ml de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) pH 8.0. Após agitação e nova centrifugação, nas mesmas condições, as células bacterianas foram re-suspensas e lavadas por mais duas vezes. Então, 100 µl de tampão TE foram acrescentados ao precipitado final e estes submetidos a banho de fervura por 10 minutos. Após centrifugação, alíquotas de 60 µl do sobrenadante (DNA) foram coletadas para posterior utilização [Nascimento et al., 2004].

Para cada 25 µl da reação de PCR foram utilizados 5 µl de solução tampão (10 X *Reaction Buffer Taq Polymerase* - 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 3,0 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP (*DNA Polymerization Mix*), 1 µM de cada *primer* específico para uma das bactérias do estudo, 2,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Life Technologies do Brasil), água deionizada e uma alíquota de 5 µl de cada amostra de DNA. Além das amostras, foram utilizados os controles positivos: DNA das cepas padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) e de *S. sobrinus* (ATCC 27607) e negativos (água bi-distilada e deionizada).

Essas reações foram submetidas a um aparelho termociclador (GeneAmp PCR System 2400 - Perkin Elmer) para amplificação do DNA, seguindo a seguinte programação: inicialmente 5 minutos a 95° C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95° C (desnaturação), 30 segundos a 59° C (hibridização), 1 minuto a 72° C (extensão), e uma extensão final de 7 minutos a 72° C [Oho et al., 2000]. Os produtos da amplificação foram misturados a 2 µl de corante de azul de bromofenol e inseridos em canaletas confeccionadas em gel de agarose a 1% (Invitrogen, Life Technologies do Brasil). As corridas eletroforéticas foram submetidas a uma corrente contínua de 75 V por cerca de 2 horas. Um padrão de peso molecular de 100 pb foi incluído em cada corrida. Para visualização dos produtos de PCR, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio

(0,5 µg/ml) por 10 minutos e analisado em um transluminador de luz ultravioleta (UltraLum - Labtrade do Brasil). Em seguida, os géis foram fotografados (Câmera Kodak Digital Science) e suas imagens analisadas em *software* específico (Kodak Digital Science 1D).

Análise estatística

Considerando-se os escores atribuídos aos critérios: sintomatologia, cor da dentina, textura da dentina, umidade da dentina e exame radiográfico, o teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar o desempenho de cada material antes e após a realização do tratamento pulpar indireto. As contagens iniciais (A e B) e finais (C) de estreptococos grupo *mutans* e lactobacilos também foram comparadas estatisticamente para cada material. Para tanto, os valores de UFC (unidades formadoras de colônias) foram transformados em logaritmos [$\log(\text{UFC}+1)$] com o objetivo de reduzir a variabilidade do conjunto de dados e facilitar a visualização dos resultados. Testes adicionais de Mann-Whitney foram utilizados para detectar diferenças entre os grupos de materiais. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5%.

Resultados

Observações clínicas

A frequência de escores obtidos para cada grupo é apresentada na Tabela 2. As medianas e amplitudes (*range*) dos escores obtidos podem ser observadas na Tabela 3. Comparando-se os momentos mais significativos para análise clínica - radiográfica, ou seja, a condição da dentina remanescente antes (B) e após 90 dias da aplicação dos materiais (C), pôde ser verificada diferença estatisticamente significante somente para

textura e umidade da dentina, considerando os materiais, Dycal e Vitrebond ($p < 0,05$). Após três meses, a dentina tornou-se mais resistente à curetagem e seca. Apenas para o grupo do cimento de hidróxido de cálcio foi observado escurecimento do substrato dentinário, no momento da reabertura das cavidades. Para o grupo do Fuji Lining LC, não foi constatada diferença estatística para nenhum critério avaliado, quando as coletas B e C foram comparadas ($p > 0,05$). Somente três dentes apresentaram sintomatologia dolorosa provocada (2 tratados com Vitrebond e um com Dycal) e nenhuma alteração patológica foi verificada nos dentes selecionados, após o período de avaliação.

Avaliação microbiológica

A contagem de UFC/ml de estreptococos grupo *mutans* e lactobacilos foi realizada para cada coleta (A, B e C). Os dados numéricos das contagens são apresentados em $[\log (\text{UFC}+1)]$ conforme mostram as Tabelas 4 e 5, que contêm as medianas e amplitudes obtidas para cada material e coleta. Para todos os grupos de materiais avaliados, houve uma redução estatisticamente significativa na contagem de estreptococos grupo *mutans* e lactobacilos, quando consideradas a primeira e segunda coleta (A e/ou B) comparadas à última coleta (C), após três meses de tratamento ($p < 0,05$). Contudo, não houve diferença estatística quando as duas primeiras coletas foram comparadas entre si ($p > 0,05$). Após três meses de tratamento, não foi detectado nenhum crescimento (UFC = 0) para estreptococos grupo *mutans* em 21 dentes (10 Vitrebond, 3 Fuji Lining LC e 8 Dycal) e em 26 dentes para lactobacilos (9 Vitrebond, 8 Fuji Lining LC e 9 Dycal). Em 17 dentes do estudo, nenhum crescimento foi verificado para ambos os grupos bacterianos avaliados.

Identificação das espécies por PCR

Foram coletadas 429 colônias de estreptococos grupo *mutans*, sendo identificadas 377 (87,9%) como *Streptococcus mutans* e somente 7 (1,6%) como *Streptococcus sobrinus*. As 45 colônias restantes não foram identificadas, podendo pertencer a qualquer outra espécie do grupo citado, com exceção das avaliadas. O número de colônias isoladas do meio SB-20 e cepas identificadas como *S. mutans* para cada material e período de coleta é apresentado na Tabela 6. Das cepas identificadas como *Streptococcus sobrinus*, 6 foram isoladas do mesmo dente tratado com Vitrebond (5 na coleta A e 1 na coleta B) e 1 amostra de um dente tratado com Fuji Lining LC (coleta C).

Discussão

O desequilíbrio bioquímico entre o biofilme bacteriano e o substrato dentário pode resultar na perda substancial de minerais, com conseqüente dissolução dos tecidos rígidos do dente (esmalte e dentina), levando a um processo dinâmico, denominado cárie dentária [Fejerskov, 1997]. A intervenção odontológica adequada nas fases iniciais desse processo impede o avanço da doença e a destruição dos tecidos dentários. Entretanto, em situações em que houve o progresso do processo carioso e a instalação de uma lesão extensa em dentina, técnicas alternativas de remoção do tecido cariado infectado, como o tratamento pulpar indireto e o tratamento restaurador atraumático, estão sendo empregadas na tentativa de interromper esse processo destrutivo, evitando a manipulação direta do tecido pulpar.

Este estudo demonstrou a eficiência clínica do tratamento pulpar indireto em dentes com lesões de cárie profunda em dentina, baseada na ausência de sintomatologia e de sinais radiográficos de alterações patológicas apicais e periapicais,

após três meses do procedimento clínico. Considerando o limitado período de avaliação, estes resultados estão de acordo com os obtidos em diversos estudos, independente do material forrador utilizado [Farooq et al., 2000; Falster et al., 2002; Maltz et al., 2002; Massara et al., 2002].

Após o selamento da cavidade, alterações na coloração e textura da dentina remanescente, resultando em uma dentina mais escura e endurecida, têm sido observadas e associadas à interrupção da progressão do processo cariioso [Maltz et al., 2002]. Neste estudo, a dentina remanescente, após três meses de tratamento, apresentou-se mais resistente à curetagem e seca, apenas para os grupos do Dycal e Vitrebond. É possível que a deposição de íons cálcio ou flúor potencialize a remineralização, promovendo o endurecimento da camada de dentina remanescente após remoção incompleta do tecido cariado [Eidelman et al., 1965; Massara et al., 2002]. Estudos *in vitro* e *in situ* têm demonstrado o aumento no conteúdo de minerais em lesões dentinárias adjacentes e/ou subjacentes a restaurações de cimento de ionômero de vidro [ten Cate e van Duinen, 1995; Massara et al., 2002], demonstrando significativa ação remineralizadora desses cimentos. Além disso, a utilização de cimentos forradores (hidróxido de cálcio/CIVMR) poderia contribuir para uma leve solubilização superficial da dentina, imediatamente após sua aplicação sobre o soalho dentinário [Smith et al., 1995; Costa et al., 2003, Duque et al., 2006]. Dessa forma, fatores de crescimento (TGF- β - transforming growth factor- β) presentes na matriz dentinária poderiam ser liberados e estimulariam as células odontoblásticas a sintetizarem dentina reacional, facilitando a obliteração dos túbulos dentinários e reduzindo conseqüentemente a permeabilidade dentinária [Smith et al., 2003].

Em relação ao critério coloração, somente o grupo do cimento de hidróxido de cálcio apresentou significativa escurecimento do substrato dentinário, no momento da

reavaliação, entretanto os dentes tratados com Vitrebond apresentaram uma tendência ao escurecimento, embora não estatisticamente significativa. Resultados similares foram obtidos por Corallo [2003]. A reação de Maillard que ocorre entre carboidratos e proteínas tem sido proposta como a causa do escurecimento das lesões de cárie dentinária, uma vez que nessas lesões foram detectados pigmentos marrons quimicamente semelhantes aos produzidos nesse tipo de reação, originalmente associada com complicações de diabetes e da idade. O escurecimento da dentina remanescente poderia estar associado à oxidação dos produtos iniciais da reação de Maillard ou ainda à reação de pequenos aldeídos derivados de bactérias com proteínas formando polímeros com coloração mais acastanhada [Kleter et al.,1998].

Para os dentes tratados com Fuji Lining LC, alterações nas características clínicas da dentina foram verificadas logo após a remoção parcial da cárie, na sessão inicial do tratamento. É possível que esse fato tenha ocorrido devido ao maior número de dentes com cárie mista ou crônica (7 dos 10 dentes) nesse grupo, os quais inicialmente apresentaram uma coloração mais acastanhada, além de uma maior resistência à curetagem e aspecto mais seco quando comparados aos dentes com cáries ativas (dentina mais amarelada, amolecida e úmida). Alguns estudos, ainda não publicados, utilizaram materiais placebo como guta-percha [Pinto, 2001] e cera utilidade [Corallo, 2003] para forramento das cavidades e verificaram que mesmo na presença de materiais inertes, a dentina sofreu modificações na textura e coloração, após 3 a 7 meses de selamento, não sendo detectada diferença significativa entre o material experimental (cimento de hidróxido de cálcio) e os placebos. É interessante, entretanto, acrescentar que em todos os grupos deste estudo, independente do material utilizado, houve redução expressiva das bactérias avaliadas. Na literatura parece não haver um consenso sobre a correlação entre a coloração ou textura da dentina e

número de microrganismos detectados na lesão. Enquanto alguns investigadores relacionam o aspecto mais escurecido ou a dureza da dentina com a menor proporção de bactérias [Bjordnal et al., 1997; Bjordnal e Larsen, 2000; Maltz et al., 2002], outros não constatarem essa associação [Kidd et al., 1993; Ricketts et al., 1995; Ayna et al., 2003; Bonecker et al., 2003]. Pode ser especulado que essas alterações na coloração, textura e umidade da dentina sejam mais nítidas clinicamente para os dentes com cárie ativa e não devem ser consideradas isoladamente na determinação do sucesso do tratamento pulpar indireto. Além disso, a avaliação dos aspectos clínicos determinados para a dentina pode variar de acordo com os critérios táteis e visuais inerentes a cada investigador.

Durante muitos anos, o cimento de hidróxido de cálcio tem sido o material de escolha para forramento de cavidades, após a remoção parcial da cárie. Diversos estudos *in vivo* têm demonstrado sucesso clínico após aplicação de cimentos de hidróxido de cálcio [Farooq et al., 2000; Falster et al., 2002; Maltz et al., 2002] em situações de remoção parcial de cárie. Entretanto, estudos *in vitro* têm apresentado resultados contraditórios em relação à atividade antibacteriana desses cimentos, desde nenhum ou mínimo efeito [McComb e Ericson, 1989; Estrela et al., 2000] até a inibição marcante de algumas bactérias cariogênicas, considerada por alguns autores como consequência da alcalinidade dos cimentos de hidróxido de cálcio [Forsten e Söderling, 1984; Barkhordar e Kempler, 1989]. Além disso, algumas propriedades desfavoráveis desse cimento, como a alta solubilidade, a baixa resistência à compressão e a ausência de adesão ao substrato [Cox e Suzuki, 1994; Freedman et al., 1999], aliadas ao advento dos materiais adesivos, têm conduzido as pesquisas para a utilização dos cimentos de ionômero de vidro como materiais alternativos, principalmente os CIVMR, que apresentam adequadas propriedades mecânicas [Mathis e Ferrance, 1989] e biológicas

[Costa et al., 2003], além de considerável atividade antibacteriana [Loyola-Rodriguez et al., 1994; Duque et al., 2005].

Neste estudo, para todos os grupos de materiais, não houve redução na quantidade de estreptococos grupo *mutans* e lactobacilos viáveis quando comparadas as coletas A e B (*baseline*). Apesar disso, alterações significantes na textura da dentina foram observadas, ratificando o exposto anteriormente de que pode não existir correlação entre esse aspecto clínico e a redução da microbiota [Bonecker et al., 2003]. Estudos têm verificado que, embora a dentina infectada seja conhecida por sua elevada concentração de microrganismos, grande número de bactérias ainda está presente na dentina mais interna [Bjorndal et al., 1997; Bjorndal e Larsen, 2000].

Após três meses do tratamento (coleta C), acentuada redução das bactérias avaliadas presentes na dentina cariada remanescente foi observada em todos os grupos do estudo. Essa redução foi ainda mais expressiva para os grupos Vitrebond e Dycal, apesar de não estatisticamente significante, quando comparados os grupos de materiais ($p > 0,05$). Embora, na maior parte dos dentes não tenha sido verificado nenhum crescimento detectável (UFC=0), para ambas as bactérias, no período de reavaliação, não foi possível a completa eliminação das mesmas, uma vez que cultura positiva para os grupos de estreptococos e lactobacilos foi verificada em 36,4 e 21,2% dos dentes tratados, respectivamente. Resultados similares foram obtidos em outros estudos [Kidd et al., 1993; Bjordnal et al., 1997; Kreulen et al., 1997; Weirheijm et al., 1999; Bjorndal e Larsen, 2000]. Somente em estudo desenvolvido por Maltz et al. [2002], pôde ser verificada a ausência de crescimento para estreptococos e lactobacilos, a partir de amostras de dentina coletadas de todas as cavidades reabertas, após seis a sete meses da remoção incompleta da cárie dentária.

Essa significante redução na microbiota residual, em particular de

estreptococcus grupo *mutans* e lactobacilos, poderia estar relacionada a dois fatores basicamente: o próprio selamento da cavidade e às propriedades antibacterianas dos materiais forradores. Como consequência do selamento, é provável que a disponibilidade de nutrientes tenha se tornado limitada, tanto na quantidade quanto na complexidade, dificultando o metabolismo e a sobrevivência das bactérias [Paddick et al., 2005]. Em relação aos cimentos forradores, estudos *in vitro* têm demonstrado marcantes propriedades antibacterianas dos CIVMR [Loyola-Rodriguez et al., 1994; Herrera et al., 2000; Duque et al., 2005], indicando que sua aplicação sobre dentina cariada contaminada poderia contribuir para redução ou até eliminação da microbiota residual. Essa atividade inibitória dos cimentos de ionômero de vidro foi associada ao baixo pH inicial e a liberação de componentes químicos como o flúor [DeSchepper et al., 1989; Loyola-Rodriguez et al., 1994]. Vitrebond e Fuji Lining LC apresentam pH iniciais em torno de 4,0, que se elevam com o decorrer do tempo, aproximando-se de 5,5 nas primeiras 24 horas [DeSchepper et al., 1989; Loyola-Rodriguez et al., 1994]. Entretanto, a exposição de cepas de estreptococos e lactobacilos orais a valores de pH entre 6,0 e 3,5 pode ocasionar a indução de uma resposta de tolerância ácida que eleva a sobrevivência dessas bactérias a valores de pH iguais ou abaixo de 3,5 [Svensäter et al., 1997]. É provável que a liberação de flúor seja o principal mecanismo de interferência no crescimento dessas espécies, pois o flúor na sua forma livre (F^-) ou ionizável (HF) pode se ligar a sítios específicos de enzimas ou outras proteínas bacterianas, inibindo sua ação. Além disso, pode formar complexos flúor-metal, principalmente com alumínio e berílio e modular as atividades enzimáticas das bactérias [Marquis et al., 2003]. Entretanto, a inibição bacteriana pelo flúor pode ainda ocorrer por um mecanismo mais complexo, a ação desse íon como um carreador de prótons transmembrana, interferindo na saída de íons H^+ da célula e reduzindo

consecutivamente a tolerância ácida das bactérias ácido-láticas [Marquis et al., 2003]. A menor liberação de flúor pelo Fuji Lining (aproximadamente 114 ppm/mg após 8 dias de aplicação) comparada ao Vitrebond (265 ppm/mg no mesmo período) foi associada ao seu menor efeito inibitório sobre bactérias cariogênicas [Loyola-Rodriguez et al. 1994]. Neste estudo, essa observação poderia explicar o maior número de estreptococos e lactobacilos isolados dos dentes tratados com o Fuji Lining LC, mesmo após três meses de selamento. A alcalinidade dos cimentos de hidróxido de cálcio como Dycal, que elevam o pH do meio para cerca de 9,5 nas primeiras 3 horas, como demonstrado por Forsten e Söderling [1984], poderia danificar organelas celulares, provocando a lise bacteriana. Entretanto, em estudo *in vitro*, sobrevivência de cepas de *S. mutans* foi observada em culturas com pH até 8,5, demonstrando a resistência dessa espécie em ambientes alcalinos [Castillo et al., 2000].

Embora os lactobacilos sejam considerados os microrganismos predominantes em lesões de cárie profunda [Kidd et al., 1993; Bjordal et al., 1997; Maltz et al., 2002], neste estudo, foi possível detectar prevalência de estreptococos grupo *mutans* sobre os lactobacilos. Esses achados estão de acordo com os outros recentes estudos [Toi et al., 2003; Ayna et al., 2003; Lager et al., 2003]. Após três meses de tratamento, um maior número de dentes apresentando bactérias resistentes pertencia ao grupo dos estreptococos *mutans* (12 dentes) que ao dos lactobacilos (7 dentes). O método do PCR confirmou a prevalência de *Streptococcus mutans* (87,9%) dentre as colônias isoladas do meio SB-20. Houve grande frequência de *S. mutans*, em todos os períodos de avaliação, verificada para os três grupos de materiais. A maior proporção de *S. mutans* sobre *S. sobrinus* denota sua relação direta com a etiologia e progressão da doença cárie [de Soett e de Graaff, 1998].

Apesar do tratamento pulpar indireto com os cimentos forradores avaliados ter

apresentado efetividade clínica e a redução expressiva das bactérias cariogênicas, não foi possível a eliminação completa das mesmas. A capacidade das bactérias sobreviverem e persistirem em um determinado ambiente depende, em parte, de sua plasticidade genética inerente, que determina sua habilidade em responder a flutuações nas condições do ambiente e ao estresse [Dobrint e Hacker, 2001]. Uma rápida resposta adaptativa é exibida por *S. mutans*, envolvendo um processo de síntese de proteínas específicas, dentro de 30 minutos do choque ácido [Hamilton e Svensäter, 1998], a qual poderia ser induzida pelos ácidos produzidos nas reações químicas dos materiais ou pelo próprio metabolismo das bactérias que interagem no mesmo ambiente. Quando ocorre a acidificação do ambiente, as bactérias produzem uma variedade de medidas protetoras, incluindo sistemas que alteram a composição da membrana celular, a extrusão de prótons e as vias metabólicas [Cotter e Hill, 2003]. A sobrevivência das bactérias ácido-resistentes, como o *S. mutans*, sob restaurações também pode estar relacionada à sua capacidade de metabolizar carboidratos, provindos de glicoproteínas do soro presentes no fluido dentinário, como ácido siálico, galactose e N-acetilglicosamina [Homer et al., 1993; Abranches et al., 2004; Paddick et al.; 2005]. Embora o selamento favoreça a redução do teor de oxigênio do ambiente, *S. mutans*, por serem considerados microrganismos anaeróbios facultativos (aerotolerantes), não são influenciados por essa mudança, pois podem crescer na presença ou ausência de oxigênio. De modo contrário, o ambiente anaeróbio exclui os microrganismos dependentes do oxigênio e reduz os microrganismos que crescem melhor na sua presença, facilitando a proliferação de espécies como *S. mutans* [Thomas e Pera, 1983].

Neste estudo, o tratamento pulpar indireto com os cimentos de ionômero de vidro e de hidróxido de cálcio mostrou resultados clínicos satisfatórios e redução

expressiva das bactérias cariogênicas avaliadas, entretanto não houve a eliminação completa das mesmas. É importante considerar a possibilidade de que alterações no ambiente poderiam estimular a formação de cepas mais resistentes. Estudos são necessários para avaliar geneticamente esses resistentes bacterianos, isolados de dentes após remoção parcial de cárie, verificando a possibilidade da geração de cepas com maior virulência.

Agradecimentos

Os autores agradecem Andréia Cristina Celi e Carina Bento Luis Macera pelo suporte técnico-laboratorial. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 04/00677-1) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processo 520079/00-0).

Referências

- Abranches J, Chen YY, Burne RA: Galactose metabolism by *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol 2004;70:6047-6052.
- Ayna B, Celenk S, Atakul F, Sezgin B, Ozekinci T: Evaluation of clinical and microbiological features of deep carious lesions in primary molars. J Dent Child 2003;70:15-8.
- Barkhordar RA, Klemper D: Antimicrobial activity of calcium hydroxide liners on *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. J Prosthet Dent 1989;61:314-317.
- Bjorndal L, Larsen T: Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. Caries Res 2000;34:502-508.
- Bjorndal L, Larsen T, Thylstrup A: A clinical and microbiological study of deep carious lesion during stepwise excavation using long treatment intervals. Caries Res

1997;31:411-412.

Bonecker M, Toi C, Cleaton-Jones P: Mutans streptococci and lactobacilli in carious dentine before and after Atraumatic Restorative Treatment. *J Dent* 2003;31:423-428.

Castillo A, Rubiano S, Gutiérrez J, Hermoso A, Liébana J. Post-pH effect in oral streptococci. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:142-146.

Corallo DJ: Effect of different liners on the biological behavior of dentin caries and bacteria. Clinical and ultrastructural analysis [dissertation]. Rio Grande do Sul (BR): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.

Costa CAS, Giro EMA, Nascimento ABL, Teixeira HM, Hebling J: Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities *Dent Mat* 2003;19:739-746.

Cotter PD, Colin Hill: Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:429-453.

Cox CF, Suzuki S: Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. adhesive hybridization. *J Am Dent Assoc* 1994;125:823-831.

Davey AL, Rogers AH: Multiple types of the bacterium streptococci *mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Arch Oral Biol* 1984;29:453-460.

DeSchepper EJ, White RR, von der Lehr W: Antibacterial effects of glass ionomers *Am J Dent* 1989;2:51-56.

Dobrint U, Hacker J: Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4:550-557.

Duque C, Negrini T, Hebling J, Spolidorio DMP: Inhibitory activity of glass-ionomer cements on cariogenic bacteria. *Oper Dent* 2005;30:636-640.

Duque C, Hebling J, Smith AJ, Giro EMA, Oliveira MF, Costa CAS: Reactionary

- dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in non-human primate teeth. *J Oral Rehab, In press* 2006.
- Eidelman E, Finn S, Koulourides I: Remineralization of carious dentin treated with calcium hydroxide. *J Dent Child* 1965;32:218-225.
- Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pecora JD: Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, Calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000;11:3-9.
- Falster CA, Araújo FB, Straffon LH, Nör JE: Indirect pulp treatment: in vivo outcomes of an adhesive resin system vs calcium hydroxide for protection of the dentin-pulp complex. *Pediatr Dent* 2002;24:241-248.
- Farooq NS, Coll J, Kawabara A, Shelton P: Success rate of formocresol pulpotomy and indirect pulp therapy in treatment of deep dentinal caries in primary teeth. *Pediatr Dent* 2000; 22:278-286.
- Fejerskov O: Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1997;25:5-12.
- Freedman G: Bases and liners: to use or not to use, a paradigm shift. *Dent. Today* 1999;18:52-59.
- Forsten L, Söderling E: The alkaline and antibacterial effect of seven Ca(OH)₂ liners in vitro. *Acta Odontol Scand* 1984;42:93-98.
- Fusayama T: Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Oper Dent* 1979;4:63-70.
- Hamilton IR, Svensäter G: Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other oral bacterial during acid shock. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13:292-300.

- Herrera M, Castillo A, Bravo M, Liébana J, Carrión P: Antibacterial activity of resin adhesives, glass ionomer and resin-modified glass ionomer and a compomer in contact with dentin caries samples *Oper Dent* 2000; 25:265-269.
- Homer KA, Patel R, Beighton D: Effects of N-acetylglucosamine on carbohydrate fermentation by *Streptococcus mutans* NT 10449 and *Streptococcus sobrinus* SL-1. *Infect Imm* 1993;61:295-302.
- Kidd EAM, Joyston-Bechal S, Beighton D: Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Res* 1993;27:402-408.
- Kleter GA: Discoloration of dental carious lesions (a review). *Arch Oral Biol* 1998;43:629-632.
- Kreulen CM, de Soet JJ, Weerheijm KL, van Amerongen WE: In vivo cariostatic effect of resin modified glass ionomer and amalgam on dentine. *Caries Res* 1997;31:384-389.
- Lager A, Thornqvist E, Ericson D: Cultivable bacteria in dentine after caries excavation using rose-bur or carisolv. *Caries Res* 2003;37:206-211.
- Loyola-Rodriguez JP, Garcia-Godoy F, Lindquist R: Growth inhibition of glass ionomer cements on mutans streptococci. *Pediatr Dent* 1994;16:346-349.
- McComb D, Ericson D: Antimicrobial action of new, proprietary lining cements. *J Dent Res* 1987;66:1025-1028.
- 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;33:151-159.
- Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M: Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev* 2003;26:493-510.
- Mathis RS, Ferrance JL: Properties of glass ionomer resin composite hybrid materials

- Dent Mater 1989;5:355-358.
- Massara MLA, Alves JB, Brandao PRG: Atraumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. Caries Res 2002;36:43-436.
- Nascimento MM, Höfling JF, Gonçalves RB: *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. Caries Res 2004;38:454-463.
- Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiya M, Koga T: Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by Polymerase Chain Reaction. Oral Microbiol Immunol 2000;15:258-262.
- Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EAM, Beighton D: Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. Appl Environ Microbiol 2005;71:2467-2472.
- Pinto AS: Clinical, radiographic and microbiological evaluation of caries lesions in deciduous molars, after incomplete dentinal caries removal [dissertation]. Rio Grande do Sul (BR): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.
- Ricketts DNJ, Kidd EAM, 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;179:214-220.
- de Soet JJ, de Graaff J: Microbiology of carious lesions. Dent Update 1998;25:319-324.
- Smith AJ, Garde C, Cassidy N, Ruch JV, Lesot H: Solubilisation of dentin extracellular matrix by calcium hydroxide. J Dent Res. 1995; 74:829.
- Smith AJ: Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. J Dent Educ. 2003;67:678-689.
- Svensäter G, Larsson U-B, Greif ECG, Cvitkovitch DG, Hamilton IR: Acid tolerance response and survival by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol 1997; 12:266-273.
- Taifor D, Frencken JE, Beiruti N, van't Hof MA, Truin GJ, van Palenstein Helderma

- WH: Comparison between restorations in the permanent dentition produced by hand and rotary instrumentation – survival after 3 years. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003;31:122-128.
- Ten Cate JM, van Duinen RNB: Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass ionômero cement restorations. *J Dent Res* 1995;74:1266-1271.
- Thomas EL, Pera KA: Oxygen metabolism of *Streptococcus mutans*: uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 1983;154:1236-1244.
- Toi CS, Bonecker M, Cleaton-Jones PE: *Mutans streptococci* strains prevalence before and after cavity preparation during Atraumatic Restorative Treatment. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:160-164.
- Weerheijm KL, Kreulen CM, de Soet JJ, Groen HJ, van Amerongen WE: Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-years in vivo effects. *Caries Res* 1999;33:130-134.

Tabela 1. Critérios clínicos e radiográficos para avaliação do tratamento pulpar indireto.

Crítérios	Escores	Descrição
Sintomatologia	0	Ausente
	1	Provocada por estímulos térmicos ou mecânicos
	2	Espontânea ou sensível ao calor
Exame radiográfico	0	Presença de imagem radiopaca sugestiva de tecido dentinário mineralizado entre a cavidade e câmara coronária
	1	Imagem sugestiva de comunicação da lesão/cavidade com a câmara pulpar coronária.
	2	Presença de rarefação óssea sugestiva de lesão periapical
Textura da Dentina	0	Dura, resistente à curetagem.
	1	Amolecida, ligeiramente resistente à curetagem.
	2	Muito amolecida, facilmente removida com a cureta.
Coloração da dentina	0	Amarelo
	1	Castanho claro
	2	Castanho escuro
Umidade da dentina	0	Seca
	1	Úmida

Tabela 2. Freqüência dos escores obtidos na avaliação clínica e radiográfica antes (*baseline*) e após três meses do tratamento pulpar indireto (Vitrebond - n=12; Fuji Lining LC - n=10 e Dycal - n=11).

Descrição	Materiais	Escore						Escore		
		<i>Baseline</i>			Reavaliação			Coleta C		
		Coleta A			Coleta B			0	1	2
		0	1	2	0	1	2	0	1	2
Sintomatologia	Vitrebond	12	0	0	-	-	-	12	0	0
	Fuji Lining LC	10	0	0	-	-	-	10	0	0
	Dycal	11	0	0	-	-	-	11	0	0
RX	Vitrebond	12	0	0	-	-	-	12	0	0
	Fuji Lining LC	8	2	0	-	-	-	9	1	0
	Dycal	9	2	0	-	-	-	11	0	0
Textura Dentina	Vitrebond	0	5	7	2	8	2	9	3	0
	Fuji Lining LC	1	8	1	6	4	0	6	4	0
	Dycal	0	5	6	2	3	6	7	4	0
Cor Dentina	Vitrebond	3	6	3	3	6	3	0	7	5
	Fuji Lining LC	0	4	6	0	4	6	0	3	7
	Dycal	3	7	1	3	7	1	0	3	8
Umidade Dentina	Vitrebond	3	9	-	3	9	-	11	1	-
	Fuji Lining LC	4	6	-	10	0	-	10	0	-
	Dycal	3	8	-	4	7	-	10	1	-

Tabela 3. Medianas e amplitudes para a avaliação clínica e radiográfica antes (*baseline*) e após três meses do tratamento pulpar indireto.

Descrição	Materiais	Mediana (amplitude) - <i>Baseline</i>		Mediana (amplitude) Reavaliação
		Coleta A	Coleta B	Coleta C
Sintomatologia	Vitrebond	0 (0-0) ^{a*}	-	0 (0-0) ^a
	Fuji Lining LC	0 (0-0) ^a	-	0(0-0) ^a
	Dycal	0 (0-0) ^a	-	0 (0-0) ^a
RX	Vitrebond	0 (0-0) ^a	-	0 (0-0) ^a
	Fuji Lining LC	0 (0-1) ^a	-	0 (0-1) ^a
	Dycal	0 (0-1) ^a	-	0 (0-0) ^a
Textura Dentina	Vitrebond	2 (1-2) ^a	1 (0-2) ^b	0 (0-1) ^c
	Fuji Lining LC	1 (0-2) ^a	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b
	Dycal	2 (1-2) ^a	1 (0-2) ^b	0 (0-1) ^c
Cor Dentina	Vitrebond	1 (0-2) ^a	1 (0-2) ^a	1 (1-2) ^a
	Fuji Lining LC	2 (1-2) ^a	2 (1-2) ^a	2 (1-2) ^a
	Dycal	1 (0-2) ^a	1 (0-2) ^a	2 (1-2) ^b
Umidade Dentina	Vitrebond	1 (0-1) ^a	1 (0-1) ^a	0 (0-0) ^b
	Fuji Lining LC	1 (0-1) ^a	0 (0-0) ^b	0 (0-0) ^b
	Dycal	1 (0-1) ^a	1 (0-1) ^a	0 (0-0) ^b

* Nas linhas, letras iguais denotam ausência de diferença significativa entre as variáveis, dentro de cada grupo (Teste de Wilcoxon, $p > 0,05$).

Tabela 4. Contagem de estreptococos grupo *mutans* [log(UFC+1)] de acordo com o momento da coleta e materiais experimentais.

Material	Mediana (amplitude)		Mediana (amplitude) Coleta C	Diferença* mediana (amplitude)
	Baseline			
	Coleta A	Coleta B		
Vitrebond	8,08 (0-8,85) ^a	6,31 (0-8,99) ^a	0 (0-6,08) ^b	5,72 (-1,48-9,99) ^A
Fuji Lining LC	7,94 (0-8,08) ^a	7,41 (0-8,08) ^a	5,10 (0-8,08) ^b	1,74 (-0,18-8,08) ^A
Dycal	7,93 (0-9,00) ^a	6,93 (0-8,08) ^a	0 (0-6,38) ^b	6,60 (-2,27-8,08) ^A

* Diferença entre as coletas B e C.

^a Letras minúsculas iguais - ausência de diferença estatística entre as coletas, dentro de cada grupo (Teste de Wilcoxon - $p > 0,05$).

^A Letras maiúsculas iguais - ausência de diferença estatística entre os grupos (Teste de Mann-Whitney - $p > 0,05$)

Tabela 5. Contagem de lactobacilos [log(UFC+1)] de acordo com o momento da coleta e materiais experimentais.

Material	Mediana (amplitude)		Mediana (amplitude) Coleta C	Diferença* mediana (amplitude)
	Baseline			
	Coleta A	Coleta B		
Vitrebond	6,60 (0-8,08) ^a	6,29 (0-8,08) ^a	0 (0-8,08) ^b	3,00 (-2,00-8,99) ^A
Fuji Lining LC	6,85 (0-8,08) ^a	6,34 (0-7,49) ^a	0 (0-8,08) ^b	1,00 (-0,66-7,49) ^A
Dycal	7,08 (0-8,08) ^a	7,08 (0-8,08) ^a	0 (0-7,00) ^b	1,08 (-0-8,08) ^A

* Diferença entre as coletas B e C.

^a Letras minúsculas iguais - ausência de diferença estatística entre as coletas, dentro de cada grupo (Teste de Wilcoxon - $p > 0,05$).

^A Letras maiúsculas iguais - ausência de diferença estatística entre os grupos (Teste de Mann-Whitney - $p > 0,05$)

Tabela 6. Número de colônias isoladas do meio SB-20 e de colônias identificadas como *Streptococcus mutans* pelo método de PCR.

Material	Colônias isoladas			Total	<i>S. mutans</i>			Total
	Baseline		Reavaliação		Baseline		Reavaliação	
	A	B	C		A	B	C	
Vitrebond	70	51	14	136	57 (81,5%)	44 (86,3%)	14 (100%)	115 (84,6%)
Fuji Lining LC	57	55	47	154	55 (96,5%)	55 (100%)	37 (78,7%)	142 (92,2%)
Dycal	59	51	25	135	49 (83,1%)	47 (92,3%)	19 (76%)	115 (85,2%)
Total	186	157	86	429	161 (86,6%)	146 (93%)	70 (81,4%)	377 (87,9%)

Artigo 4

**Polimorfismo genético de cepas de
Streptococcus mutans associadas à
remoção incompleta da cárie dentária**

Polimorfismo genético de cepas de *Streptococcus mutans* associadas à remoção incompleta da cárie dentária

Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* strains associated with incomplete caries removal.

Autores: C. Duque¹, TC Negrini², NT Sacono¹, MFG Boriollo³, DMP Spolidorio², J. Hebling¹

¹Departamento de Clínica Infantil e ²Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil. ³Faculdades Integradas Einstein de Limeira, Limeira, São Paulo, Brasil.

Título reduzido: Genótipos de *S. mutans* associados à remoção incompleta de cárie.

Short title: *S. mutans* genotypes associated with incomplete caries removal.

Autor correspondente: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Universidade Estadual Paulista / UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAR. Rua Humaitá, 1680 / CEP: 14.801-903, Araraquara, SP, Brasil. Telefone: 16-3301-6334. E-mail: jhebling@foar.unesp.br

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, reação em cadeia da polimerase com *primers* arbitrários, cárie dentária.

Resumo

Apesar das propriedades antibacterianas dos materiais aplicados sobre a dentina, em procedimentos de remoção parcial da cárie dentária, bactérias residuais têm sobrevivido sob as restaurações. O objetivo deste estudo foi avaliar o polimorfismo genético de cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de lesões de cárie dentinária antes e após três meses de sua remoção parcial. Coletas de dentina cariada foram realizadas em 33 molares decíduos e/ou permanentes jovens submetidos ao tratamento pulpar indireto, para análise microbiológica. Somente 10 desses dentes, nos quais foi observado crescimento positivo para estreptococos *mutans* (SM), mesmo após três meses de tratamento, foram considerados para este estudo. Assim, isolados de SM foram coletados e identificados por PCR como *Streptococcus mutans*. Em seguida, esses isolados foram submetidos à técnica de AP-PCR, para determinação do polimorfismo genético. No máximo sete genótipos diferentes foram encontrados em cada coleta de dentina cariada em um mesmo dente, sendo que alguns foram detectados em mais de uma coleta. Grupos de *S. mutans* idênticos ou altamente relacionados entre si foram verificados em cada dente. Quando todos os isolados detectados após três meses do tratamento foram comparados, alta diversidade genética foi verificada entre os dentes. Os resultados indicaram grande polimorfismo genético das cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de lesões de cárie dentinária, mesmo após três meses da sua remoção parcial. A persistência de alguns genótipos idênticos e a alta similaridade genética entre os isolados de um mesmo dente, em diferentes coletas, denotam a resistência ao tratamento de algumas linhagens de *S. mutans*.

Introdução

A ampla distribuição e variedade de bactérias bucais na população mundial demonstram a grande habilidade de sobrevivência dessas espécies, como resultado de seus mecanismos de transmissão de cepas entre hospedeiros e a persistência no ambiente bucal (5). Existem diversos micro-ambientes dentro da cavidade bucal abrigando comunidades bacterianas patogênicas ou não, os denominados biofilmes, que se formam principalmente nas superfícies rígidas do dente (9). O desequilíbrio bioquímico entre o biofilme e o substrato dentário, ocasionado pela produção intensa de ácidos provenientes do metabolismo bacteriano, pode levar à desmineralização dentária e conseqüentemente ao desenvolvimento de lesões de cárie (12).

Dentre os patógenos bucais, os estreptococos *mutans* (SM) compreendem um grupo composto por sete espécies bacterianas, sendo que, destas, somente *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. rattus* e *S. cricetus* habitam a cavidade bucal humana (8). A alta prevalência de *S. mutans* (de 74 a 94%) entre esses estreptococos orais isolados de lesões de cárie, indica seu papel fundamental no desenvolvimento dessa doença (21). *S. mutans* apresenta a habilidade de resistir às alterações nos níveis de ácidos produzidos no ambiente bucal, por meio de mecanismos de expulsão de prótons do interior da célula, protegendo assim seus constituintes orgânicos, em especial o DNA, dos efeitos agressivos da acidificação (30). Além disso, em ambientes hostis, com restrição de nutrientes, foi sugerido que algumas bactérias bucais, entre elas *S. mutans*, são capazes de obter carboidratos a partir de glicoproteínas derivadas do hospedeiro (saliva ou soro) (1,15).

A diversidade entre cepas de uma mesma espécie pode estar associada à sua capacidade de sobreviver às flutuações no ambiente. Dessa forma, a seleção de cepas bacterianas melhor adaptadas a um determinado ambiente pode promover a geração

de variantes genéticas, representando populações clonais, que conservam o mesmo DNA das células-mães, ou não-clonais, que adquirem DNA proveniente de outras células (5). Diversos estudos têm demonstrado a heterogeneidade genética de *S. mutans* por meio de métodos de tipagem molecular, como a reação em cadeia da polimerase com *primers* arbitrários (AP-PCR - *arbitrary primed polymerase chain reaction*); eletroforese de enzima multilocus (MLEE - *multilocus enzyme eletrophoresis*), polimorfismos do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP - *restriction fragment length polymorphisms*), reação de polimerização em cadeia com seqüências de elementos extragênicos repetitivos palindrômicos (REP-PCR - *repetitive extragenic palindromic PCR*), entre outros (13,24,28,31,33,34,35).

O método da AP-PCR tem sido utilizado principalmente em estudos de epidemiologia e transmissibilidade de estreptococos, demonstrando rapidez, eficiência e reprodutibilidade na geração dos *amplicons* de isolados bacterianos (33, 36). A partir do método da AP-PCR, diversos estudos têm demonstrado a maior diversidade genotípica de *S. mutans* em crianças com cárie dentária quando comparadas àquelas livres de cárie (2,24), além de verificar um padrão de colonização sítio-específica de genótipos de *S. mutans* em lesões de cárie coronária ou radicular (13,25).

A sobrevivência de estreptococos bucais tem sido constatada, mesmo após meses ou anos da remoção parcial da cárie e selamento da cavidade (3,4,17,37), demonstrando a existência de cepas resistentes ao tratamento. Paddick et al. (28) detectaram distintas linhagens de *Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii*, após cinco meses da remoção parcial da cárie dentária, embora com reduzida diversidade genotípica/fenotípica em comparação às linhagens isoladas previamente ao tratamento. Desse modo, o objetivo deste estudo foi determinar o polimorfismo genético de cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de lesões de cárie antes e após três

meses da remoção parcial do tecido dentinário cariado.

Materiais e métodos

Descrição da amostra

Foram utilizados inicialmente 33 molares decíduos/permanentes jovens submetidos ao tratamento pulpar indireto, provenientes de 20 crianças, de ambos os gêneros, entre 4 e 10 anos de idade. Destes, foram considerados somente os dentes nos quais foi verificado crescimento positivo para o grupo de estreptococos *mutans* em amostras de dentina cariada coletadas antes e após três meses da realização do tratamento (ver Procedimentos clínicos). Todos os dentes apresentavam cárie profunda em dentina, entretanto, por meio de avaliação clínica e radiográfica, não foi constatada nenhuma patologia pulpar irreversível e/ou periapical. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (protocolo 05/2004 - Anexo 2). O consentimento livre e esclarecido foi obtido dos responsáveis pelas crianças participantes.

Procedimentos clínicos e coleta das amostras

Para a realização do tratamento pulpar indireto, foi utilizada a anestesia local e os dentes foram submetidos à profilaxia com pasta profilática, seguida do isolamento absoluto e anti-sepsia do campo operatório com digluconato de clorexidina a 0,2%. Quando necessário, o acesso à lesão de cárie foi obtido utilizando uma broca carbide em alta rotação (#245 - KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil). Após remoção da dentina necrótica mais superficial, uma primeira coleta de dentina (A) foi realizada, com o auxílio de uma cureta esterilizada e transferida para um tubo de ensaio contendo 5 ml do meio de cultura BHI caldo (Brain Heart Infusion - Difco

Laboratories, MI, USA). A remoção completa do tecido cariado das margens cavo-superficiais e paredes laterais da cavidade foi realizada com brocas esféricas em baixa rotação. Na parede pulpar, parte da dentina cariada foi removida, deixando apenas uma camada mais profunda para evitar a exposição do tecido pulpar. Em seguida, foi realizada a segunda coleta (B) de dentina cariada da porção mesial da parede pulpar, procedendo da mesma maneira descrita anteriormente. Para o forramento da parede pulpar foram utilizados cimentos de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond - 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA ou Fuji Lining LC - GC, Tokyo, Japan) ou um cimento de hidróxido de cálcio (Dycal - Dentsply, Midford, DE, EUA). As cavidades foram restauradas temporariamente com cimento de óxido de zinco e eugenol (IRM - Dentsply, Mildford, DE, EUA). Após três meses do tratamento, os dentes foram reabertos e o material forrador completamente removido. Uma terceira coleta (C) de dentina cariada foi realizada na porção distal da parede pulpar, seguindo os mesmos procedimentos descritos. As cavidades foram forradas com cimento de ionômero de vidro e restauradas definitivamente com amálgama de prata.

Procedimentos laboratoriais

As amostras de dentina cariada obtidas em cada coleta (A, B e C) foram agitadas por 15 segundos em um misturador Vortex (Phoenix AT 56, Munising, Mich., USA) e incubadas a 37° C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, nova agitação foi realizada por 1 minuto e as amostras diluídas seriadamente. Para o cultivo de estreptococos do grupo *mutans* (SM), alíquotas de 25µl de cada diluição foram inoculadas em Ágar Sacarose Bacitracina - SB-20 (10) e mantidas a 37° C por 48 horas, em jarras de anaerobiose (sistema chama de vela). Após esse período, 6 a 8 colônias

com morfologia típica de estreptococos grupo *mutans* foram coletadas e inoculadas individualmente em 5 ml de BHI caldo. Após 24 horas de incubação a 37° C, a identidade e pureza das culturas foram confirmadas através de coloração de *Gram* e alíquotas do subcultivo foram estocadas a -20° C em BHI glicerol, para posterior identificação molecular dos isolados bacterianos.

Isolamento do DNA bacteriano

O método de preparação do DNA cromossomal foi inicialmente descrito por Nociti et al. (26) e modificado por Nascimento et al. (25). Resumidamente, culturas de isolados SM foram reativadas em BHI caldo por 24 horas. Em seguida, foram centrifugadas e lavadas por duas vezes com tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Após centrifugação, os precipitados foram dissolvidos em 100 µl de tampão TE e submetidos a um banho de fervura por 10 minutos. Após centrifugação, alíquotas de 60 µl do sobrenadante (DNA) foram coletadas para posterior utilização nas reações de PCR e AP-PCR.

PCR (reação em cadeia da polimerase)

Para a identificação de *Streptococcus mutans*, o DNA dos isolados bacterianos (SM) obtidos de cada coleta de dentina foram submetidos ao método do PCR, utilizando *primers* específicos para regiões do gene da glicosiltransferase (*gtfB*) com as seguintes seqüências: 5' - ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G - 3' e 5' - CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C - 3', que amplificam um fragmento de DNA de 517pb (27). Cada reação de PCR continha 5 µl de cada amostra de DNA, 5µl de solução tampão (10 X *Reaction Buffer Taq Polymerase*), 0.2 mM de dNTPs (*DNA Polymerization Mix*), 3,0 mM de MgCl₂, 1 µM de cada *primer* específico e 2.5 U de *Taq DNA Polymerase*

e água deionizada esterilizada para completar um volume final de 25 µl. Todos os reagentes foram obtidos da Invitrogen, Life Technologies do Brasil. Os controles positivo e negativo da reação foram o DNA de uma cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) e água deionizada, respectivamente. A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Applied Biosystems) com uma desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação (95° C por 30 segundos), hibridização ou anelamento (59° C por 30 segundos) e extensão (72° C por 1 minuto), além de uma extensão final a 72° C por 7 minutos (27). Os produtos da amplificação foram inseridos em gel de agarose a 1% submerso em tampão de corrida Tris-borato-EDTA (TBE) a 75 V por 2 horas. Em seguida, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta (UltraLum – Labtrade do Brasil). Um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA ladder) foi incluído em cada corrida eletroforética.

AP-PCR (reação de polimerização em cadeia com primers arbitrários)

Cepas identificadas como *Streptococcus mutans* foram submetidas à tipagem molecular utilizando o método do AP-PCR. Para a amplificação do DNA dos isolados de *S. mutans* foi utilizado o primer OPA-13 (5'- CAGCACCCAC - 3') (24,25,33). A reação do AP-PCR foi realizada com um volume de 25µl, contendo 2,5 µl de solução tampão (10 x *Reaction Buffer Taq Polymerase*), 7 mM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTP (*DNA Polymerization Mix*), 1 µM de primer, 2,5 U de *Taq DNA Polymerase*, 50 ng de DNA e água destilada (25). A amplificação programada no aparelho termociclador foi executada na seguinte seqüência: desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos a 94° C por 30 segundos, 36° C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto, concluindo com extensão final a 72° C por 3 minutos (19). Os *amplicons* gerados pelo

AP-PCR foram separados eletroforéticamente em gel de agarose a 1.4%, corados em 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Um marcador de peso molecular de 1Kb foi utilizado em cada gel. Os géis foram fotografados (Câmera Kodak Digital Science) e suas imagens analisadas em *software* específico (Kodak Digital Science 1D). As bandas eletroforéticas previamente marcadas foram convertidas em dados binários e estes submetidos ao programa NTSYS-pc, versão 1.7 (Applied Biostatistics, Inc.), utilizando o coeficiente S_{SM} (*Simple Matching Coefficient*) e o método de agrupamento UPGMA (*Unweighet Pair-Group method with Mathematic Average*) para construção dos dendrogramas.

Resultados

Um total de 206 isolados de SM foi obtido das amostras de lesões de cárie comprometendo somente a face oclusal de 10 diferentes dentes [7 primeiros molares decíduos (6 inferiores e 1 superior), 1 segundo molar superior decíduo e 2 primeiros molares permanentes (1 superior e 1 inferior)], provenientes de 8 pacientes, considerando os três períodos de coleta (A, B e C). Para este estudo, um dente foi tratado com Vitrebond, seis com Fuji Lining LC e três com Dycal. Como a distribuição dos dentes não foi uniforme entre os grupos de materiais, a análise dos dados foi realizada para todos os dentes, independente do tipo de material utilizado.

Dos isolados de SM, 173 (83,5%) foram identificados por PCR como *Streptococcus mutans*, produzindo fragmento único de DNA de 517 pb. Em seguida, todos os isolados de *S. mutans* foram submetidos ao método de AP-PCR. Para facilitar a manipulação e visualização dos dados, os códigos dos isolados foram determinados de acordo com a seguinte ordem: código do dente (1- 10), período de coleta (A, B e C) e número do isolado (1 a 8), por exemplo, 5A2. Os dentes codificados como 6 e 8 pertencem ao mesmo paciente. O mesmo ocorreu para os dentes 9 e 10 para outro paciente. A Figura

1 ilustra os perfis eletroforéticos de *S. mutans* isolados do dente 3 utilizando AP-PCR. A amplificação do DNA genômico dessa espécie pelo *primer* OPA-13 gerou fragmentos (*amplicons* ou bandas eletroforéticas) entre 2,2 e 0,3 kb. Algumas bandas foram específicas da espécie, enquanto outras foram encontradas em poucos isolados, indicando polimorfismo ou diversidade genética de *S. mutans*.

O número de genótipos (*amplitypes*) de *S. mutans* obtidos em cada dente, considerando separadamente as coletas é apresentado na Tabela 1. Foram verificados de 1 a 7 genótipos de *S. mutans* em cada coleta, devendo-se salientar que um mesmo padrão genotípico pôde ser encontrado em mais de uma coleta. Desse modo, desconsiderando as repetições entre as coletas, o total de genótipos encontrados em cada dente é apresentado na Tabela 2. Os graus de similaridade genética entre os isolados de *S. mutans*, com base nas combinações geradas pelo *primer* OPA-13 utilizado no método AP-PCR são ilustrados em dendrogramas obtidos pela análise UPGMA com coeficiente S_{SM} – *Simple Matching* (Figuras 2a/b, 3a/b e 4).

Com base na análise dos dendrogramas de cada dente representados na Figura 2 a/b, independente do material utilizado, os valores de similaridade genética entre os isolados de *S. mutans* variaram de $0,555 \leq S_{SM} \leq 1$ até $0,837 \leq S_{SM} \leq 1$. Foram observados de 2 a 4 grupos de *S. mutans*, contendo isolados idênticos e/ou altamente relacionados entre si ($S_{SM} \geq 0,869$) para cada dente. Esses grupos podem ser identificados nos dendrogramas de cada dente pelas diferentes tonalidades de cinza. Dentro desses grupos, isolados idênticos (mesmo genótipo) foram encontrados em uma mesma coleta ou entre coletas diferentes (clones). Foram obtidos pelo menos dois isolados com o mesmo genótipo em cada dente, para uma mesma coleta (exemplo: dente 1 – isolados 1B2 e 1B3). Quando as coletas foram comparadas, clones foram identificados entre A e B para os dentes 1,4,5,7 e 10. Entre A e C, o mesmo foi observado para os dentes 1,4 e

10. Nenhum clone foi encontrado para B e C. Entretanto, quando as três coletas (A,B e C) foram comparadas, dois clones foram observados (dentes 3 e 7).

Para verificar a similaridade entre isolados de *S. mutans* obtidos em dentes diferentes, mas pertencendo ao mesmo paciente, foram construídos dendrogramas que são apresentados nas figuras 3a/b. Em nenhum dos pacientes foram verificados genótipos idênticos entre os dentes tratados. Os valores de similaridade genética entre isolados de *S. mutans* obtidos para os dentes 6/8 (Figura 3a) e 9/10 (Figura 3b) variaram entre $0,618 \leq S_{SM} \leq 1$ e $0,710 \leq S_{SM} \leq 1$, respectivamente, sendo que os maiores valores foram observados entre os isolados obtidos de cada dente em um mesmo paciente.

Os isolados resistentes ao tratamento pulpar indireto, pertencendo à coleta C, foram agrupados, e um total de 41 genótipos de *S. mutans* foi identificado a partir das diferentes combinações de *amplicons* OPA-13. Um dendrograma com todos os isolados detectados na coleta C foi construído, e a similaridade genética determinada entre $0,621 \leq S_{SM} \leq 1$ (Figura 4). A análise de agrupamento (UPGMA) revelou 11 grupos com $0,869 \leq S_{SM} \leq 1$, ou seja, constituídos por isolados idênticos e/ou altamente relacionados entre si. Sete desses grupos continham isolados pertencendo ao mesmo dente, ou seja, cada grupo correspondendo a um dente específico (Grupos 1,3,7,8,9,10,11), outros três grupos apresentavam isolados de dois dentes (Grupos 4, 5 e 6) e um grupo apresentava isolados de *S. mutans* de quatro dentes (Grupo 2), demonstrando maior similaridade genética entre isolados do mesmo dente e diversidade entre aqueles detectados em dentes diferentes.

Discussão

Streptococcus mutans é considerado o principal patógeno envolvido no processo da cárie dentária. Estudos têm demonstrado sua habilidade em resistir às bruscas alterações de pH, desde a acentuada alcalinidade (6) aos extremos níveis de acidez (30) similares àquelas produzidas por reações químicas de cimentos forradores como os utilizados neste estudo. Além disso, em ambientes com restrição de nutrientes, como em cavidades adequadamente seladas, foi sugerido que *S. mutans* apresenta capacidade de produzir enzimas glicosídicas e liberar carboidratos de glicoproteínas provenientes do fluido dos túbulos dentinários (28). Dessa forma, é possível sugerir que características fenotípicas específicas estejam sendo expressas por genótipos de *S. mutans* mais adaptados a sobreviverem e/ou crescerem em ambientes adversos (5).

Grande diversidade genética de *S. mutans* foi detectada neste estudo a partir de amostras de dentina coletada de lesões profundas de cárie, mesmo após 3 meses de sua remoção parcial. Considerando cada dente isoladamente, foi possível verificar até 7 genótipos diferentes em cada coleta ou até 17 genótipos, considerando-se conjuntamente todas as três coletas. Diversos estudos têm demonstrado heterogeneidade genética entre isolados de *S. mutans* coletados de amostras de saliva ou biofilme dentário (33,35). Entretanto foi observado que essa diversidade é ainda maior em indivíduos cárie-ativos (2,24). Neste estudo, diversidade genética também foi observada entre dentes de um mesmo paciente (dentes 6 e 8; 9 e 10), demonstrando que genótipos específicos de *S. mutans* podem se abrigar em sítios distintos na cavidade bucal em um mesmo indivíduo. Estudos sugerem que a frequência de distribuição de genótipos de *S. mutans* pode variar entre os sítios bucais, contudo parece haver uma colonização sítio-específica dos genótipos detectados em lesões de cáries dentárias (13, 25).

Neste estudo, alguns genótipos de *S. mutans* foram detectados em mais de uma coleta, em um mesmo dente. Isso foi observado entre as coletas A e B (5 genótipos diferentes), A e C (3 genótipos) e A, B e C (2 genótipos). Embora poucos genótipos tenham se repetido entre essas coletas, a alta similaridade genética entre isolados detectados no mesmo dente, em coletas distintas, sugere a resistência de algumas linhagens de *S. mutans*. É possível que os grupos genéticos com isolados altamente relacionados entre si apresentem um ancestral em comum (5) e que surgiram, a partir dele, novas linhagens com algumas alterações genéticas. Acredita-se que polimorfismos observados entre espécies seja resultado de modificações no pareamento das bases por deleção ou inserção de novas seqüências genéticas (32), além da transmissão de clones de outras fontes externas (14). A freqüência, entretanto, desses eventos ainda não é conhecida *in vivo* (5).

Como parte do processo evolutivo, as bactérias apresentam a habilidade de adquirir material genético de outras células pelo mecanismo da transformação. Para que essa recombinação ocorra, é necessário que o DNA doado apresente entre 70 e 100% de identidade com a seqüência no cromossomo da célula receptora (11). Algumas cepas de *S. mutans* podem adquirir diversas propriedades cariogênicas (29), além de resistência aos fluoretos (7) e a alguns antibióticos (23), também por transformação. É possível que *S. mutans* também seja doador de DNA para outras espécies, como *S. sanguis* e *S. milleri* (18). Cvitokovitch (9) sugeriu que transformações bacterianas podem ocorrer em locais, como a cavidade bucal, que apresentam extremas alterações ambientais, além de flutuações na dinâmica da população. Li et al. (19) verificaram que células de *S. mutans* apresentaram grande habilidade *in vitro* de realizar transformação genética quando cresceram em biofilmes. Os autores sugeriram que em ambientes como o biofilme, essas bactérias são expostas a várias condições de estresse, tais como:

excesso ou carência de nutrientes, baixo pH, alta osmolaridade, além do freqüente consumo de agentes antibacterianos pelo hospedeiro. Dessa forma, a transformação genética natural poderia ser considerada um importante mecanismo de adaptação às mudanças ambientais, promovendo resistência microbiana, variação genética e rápida evolução dos fatores de virulência (9,11,19).

Quando os genótipos de *S. mutans* isolados de amostras de dentina coletadas após três meses de tratamento foram comparados, diversidade genética foi verificada entre os dentes e alta similaridade detectada intra-dente. Dos 11 grupos contendo isolados idênticos ou altamente relacionados entre si, sete estavam associados a um mesmo dente, ou seja, cada um desses grupos correspondendo a um dente específico. Estes resultados sugerem que as diferentes linhagens resistentes de *S. mutans* sejam dente - específicas, pois não foi possível revelar nenhum padrão genético comum à população submetida ao tratamento proposto neste trabalho. Estudos têm demonstrado similaridade genética somente entre genótipos de *S. mutans* provenientes de membros da mesma família (16,20,31,35) ou que convivem muito proximamente em um mesmo ambiente, como em escolas ou creches (22), denotando transmissão vertical. Indivíduos não relacionados raramente compartilham os mesmos genótipos de *S. mutans* (33). Nascimento et al. (25) compararam 40 tipos genéticos determinados pelo AP-PCR, isolados de 9 pacientes diferentes e verificaram grande diversidade genética de *S. mutans* entre os pacientes, ressaltando que o maior grau de similaridade ($S_{SM} = 0.960$) foi observado apenas para isolados do mesmo indivíduo.

Apesar de algumas deficiências do método do AP-PCR, como a dificuldade de visualização de bandas de baixa intensidade ou ainda a necessidade de mais *primers* para aumentar a precisão da técnica (24), estudos tem demonstrado sua eficácia na detecção de polimorfismo genético de várias espécies bacterianas (33,36), apresentando

resultados semelhantes a técnicas mais sofisticadas, como MLEE (24). Neste estudo, foi possível verificar grande polimorfismo genético das cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de lesões de cárie dentinária, mesmo após três meses da sua remoção parcial. A persistência de alguns genótipos idênticos e a alta similaridade genética entre os isolados de um mesmo dente, em diferentes coletas, denotam a resistência ao tratamento de algumas linhagens de *S. mutans*. A grande diversidade genética dos isolados de *S. mutans* detectados entre diferentes dentes pode sugerir que as linhagens resistentes sejam específicas para cada dente, não sendo possível verificar um padrão genético comum entre os indivíduos. Contudo, outros estudos são necessários para avaliar as características fenotípicas dos diferentes genótipos de *S. mutans* resistentes ao tratamento pulpar indireto ou a outras técnicas de remoção parcial de cárie, verificando possíveis similaridades na produção de enzimas que participam dos diversos mecanismos de virulência dessa espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem Andréia Cristina Celi e Carina Bento Luis Macera pelo suporte técnico-laboratorial. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 04/00677-1) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

1. Abranches J, Chen YY, Burne RA. Galactose metabolism by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 2004;**70**:6047-6052.
2. Alaluusua S, Mattö J, Grönroos L, Innila S, Torkko H, Asikainen S, et al. Oral

- colonization by more than one clonal type of mutans streptococci in children with nursing-bottle dental caries. *Arch Oral Biol* 1996;**41**:167-173.
3. Bjorndal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesion during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res* 1997;**31**:411-412.
 4. Bjorndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res* 2000;**34**:502-508.
 5. Bowden GHW, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;**9**:54-85.
 6. Castillo A, Rubiano S, Gutiérrez J, Hermoso A, Liébana J. Post-pH effect in oral streptococci. *Clin Microbiol Infect* 2000;**6**:142-146.
 7. Chasley PE, Kral TA. Transformation of fluoride resistance genes in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1989;**57**:1968-1970.
 8. Coykendall AL. Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin Microbiol Rev* 1989;**2**:315-328.
 9. Cvitkovitch DG. Genetic competence and transformation in oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;**12**:217-243.
 10. Davey AL, Rogers AH: Multiple types of the bacterium streptococci *mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Arch Oral Biol* 1984;**29**:453-460.
 11. Dowson CG, Barcus V, King S, Pickerill P, Whatmore A, Yeo M. Horizontal gene transfer and the evolution of resistance and virulence determinants in *Streptococcus*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1997;**26**:42S-51S.
 12. Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;**25**:5-12.

13. Grönroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res* 2000;**34**:474-480.
14. Hohwy J, Reinholdt J, Kilian M. Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. *Infect Immun* 2001;**69**:6055-6063.
15. Homer KA, Patel R, Beighton D. Effects of N-acetylglucosamine on carbohydrate fermentation by *Streptococcus mutans* NT 10449 and *Streptococcus sobrinus* SL-1. *Infect Immun* 1993;**61**:295-302.
16. Klein MI, Flório FM, Pereira AC, Höfling JF, Gonçalves RB. Longitudinal study of transmission, diversity and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in brazilian nursery children. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:4620-4626.
17. Kreulen CM, de Soet JJ, Weerheijm KL, van Amerongen WE. In vivo cariostatic effect of resin modified glass ionomer and amalgam on dentine. *Caries Res* 1997;**31**:384-389.
18. Kuramitsu HK, Trapa V. Genetic exchange between oral streptococci during mixed growth. *J Gen Microbiol* 1984;**130**:2497-2500.
19. Li Y, Lau PCY, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol* 2001;**183**:897-908
20. Lindquist B, Emilson CG. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Res* 2004;**38**:95-103.
21. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in dental decay. *Microbiol Rev* 1986;**50**:353-380.
22. Mattos-Graner RO, Li Y, Caufield PW, Duncan M, Smith DJ. Genotypic diversity of mutans streptococci in brazilian nursery children suggest horizontal transmission. *J Clin Microbiol* 2001;**39**:2313-2316.

23. Murchison HH, Barret JF, Cardineau GA, Curtiss RD. Transformation of *Streptococcus mutans* with chromosomal and shuttle plasmid (pYA629) DNAs. *Infect Immun* 1986;**54**:273-282.
24. Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EAR, Höfling JF, Mattos-Granner, Gonçalves RB. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-actived individuals. *J Med Microbiol* 2004;**53**:697-703.
25. Nascimento MM, Höfling JF, Gonçalves RB. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res* 2004;**38**:454-463.
26. Nociti FH, Cesco de Toledo R, Machado MA, Stefani CM, Line SR, Gonçalves RB. Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implants in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2001;**12**:295-300.
27. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiyama M, Koga T: Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by Polymerase Chain Reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2000;**15**:258-262.
28. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EAM, Beighton D. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:2467-2472.
29. Perry D, Wondrack LM, Kuramitsu HK. Genetic transformation of putative cariogenic properties in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1983;**41**:722-727.
30. Quivey Jr. RG, Kuhnert W, Hahn K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;**12**:301-314.
31. Redmo-Emanuelsson I, Wang X. Demonstration of identical strains of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. *Eur J Oral Sci* 1998;**106**:788-794.
32. Robinson WG, Old LA, Shah DSH, Russell RRB. Chromosomal insertions and deletions in *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2003;**37**:148-156.

33. Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Arch Oral Biol 1996;**41**:821-826.
34. Shiroza T, Shinozaki N, Watanabe T, Ikemi T, Fukushima K, Abiko Y. Rapid isolation of chromosomal DNA from oral streptococci and polymerase chain reaction - oriented restriction fragment-length polymorphism analysis for genetic heterogeneity. Oral Microbiol Immunol 1998;**13**:11-16.
35. Spolidorio DMP, Höfling JF, Pizzolitto AC, Rosa EA, Negrini TC, Spolidorio LC. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in brazilian family members. Braz J Microbiol 2003;**34**:213-217.
36. Truong TL, Ménard C, Mouton C, Trahan L. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. J Med Microbiol 2000;**49**:63-71.
37. Weerheijm KL, Kreulen CM, de Soet JJ, Groen HJ, van Amerongen WE. Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-years in vivo effects. Caries Res 1999;**33**:130-134.

Tabela 1. Número de genótipos de *S. mutans* provenientes das coletas de dentina cariada realizadas em cada dente do estudo.

<i>Dente</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Coleta A	2	1	4	4	3	4	5	7	5	5
Coleta B	3	-	4	4	4	5	5	5	5	1
Coleta C	3	5	4	4	5	2	4	4	5	6

Tabela 2. Total de isolados e genótipos de *S. mutans* encontrados em cada dente para todas as coletas (A, B, C).

<i>Dente</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Isolados	15	12	15	16	21	15	18	20	21	20
Genótipos *	6	6	10	8	11	12	12	17	15	9

* Os genótipos que se repetem entre as coletas foram considerados apenas uma vez.

Figura 1. Perfis eletroforéticos de *S. mutans* isolados do dente 3 obtidos pelo método do AP-PCR utilizando o *primer* OPA-13. Ld - Padrão de peso molecular de 1Kb (DNA ladder); CP - cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175). A2 a C5 - isolados obtidos de acordo com o período da coleta (A,B,C).

Figura 1.

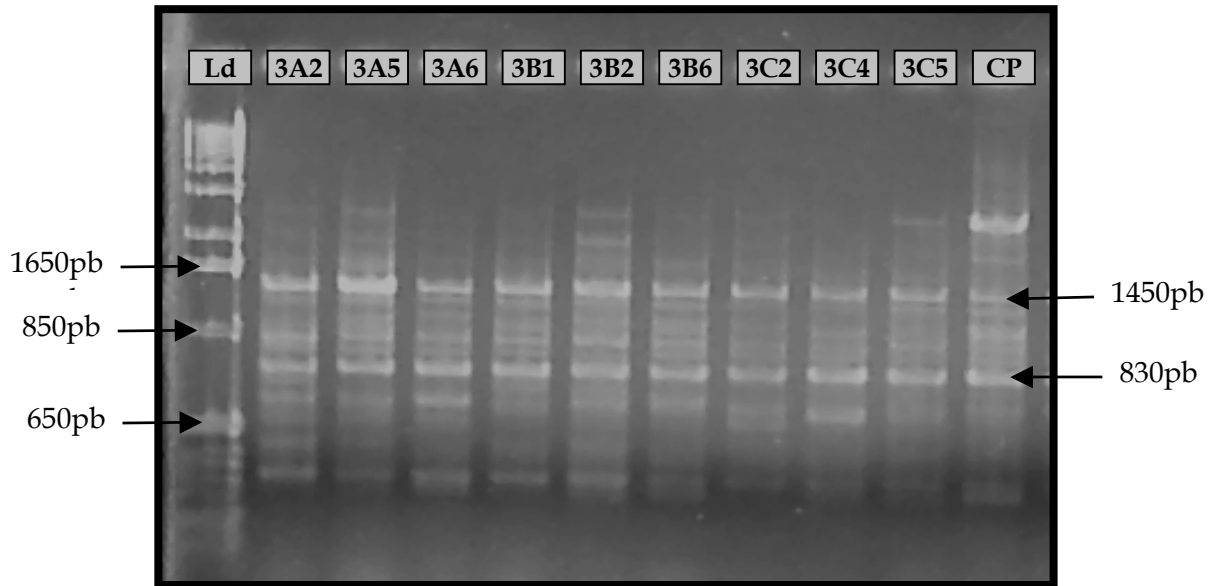
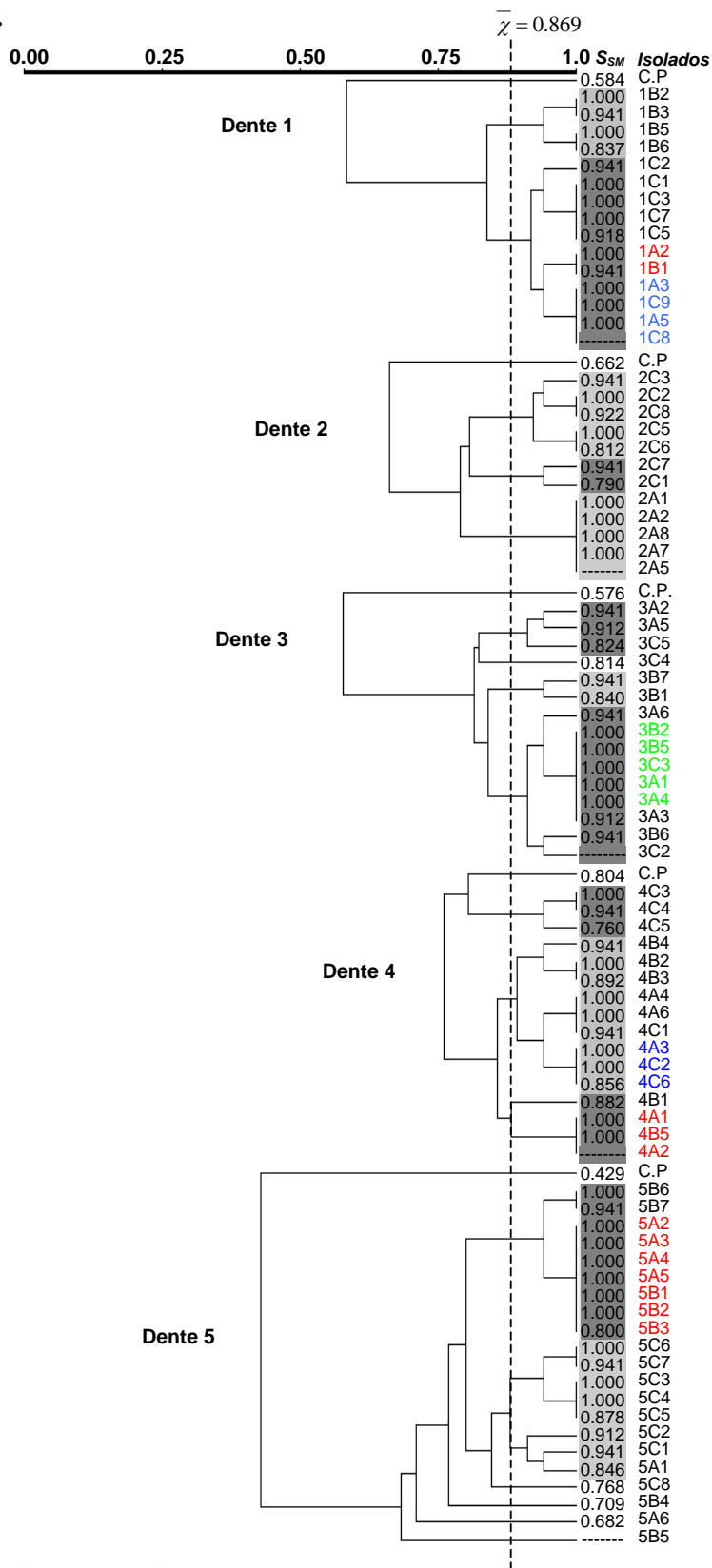


Figura 2. Similaridade genética (método AP-PCR, *primer* OPA-13) entre isolados de *S. mutans* provenientes de amostras de lesões de cárie coletadas de cada dente submetido ao tratamento pulpar indireto. (a) Dendrogramas obtidos para os isolados dos dentes de 1 a 5. (b) Dendrogramas obtidos para os isolados dos dentes 6 a 10. Foi utilizada a análise UPGMA e matriz de similaridade S_{SM} (*Simple Matching*). Diferentes tonalidades de cinza em um mesmo dendrograma ilustram os grupos contendo isolados de *S. mutans* idênticos ou altamente relacionados.

Figura 2a.



Cores: Vermelho – clones entre as coletas A e B

Azul – clones entre as coletas A e C

Verde – clones entre as coletas A, B e C.

Figura 2b.

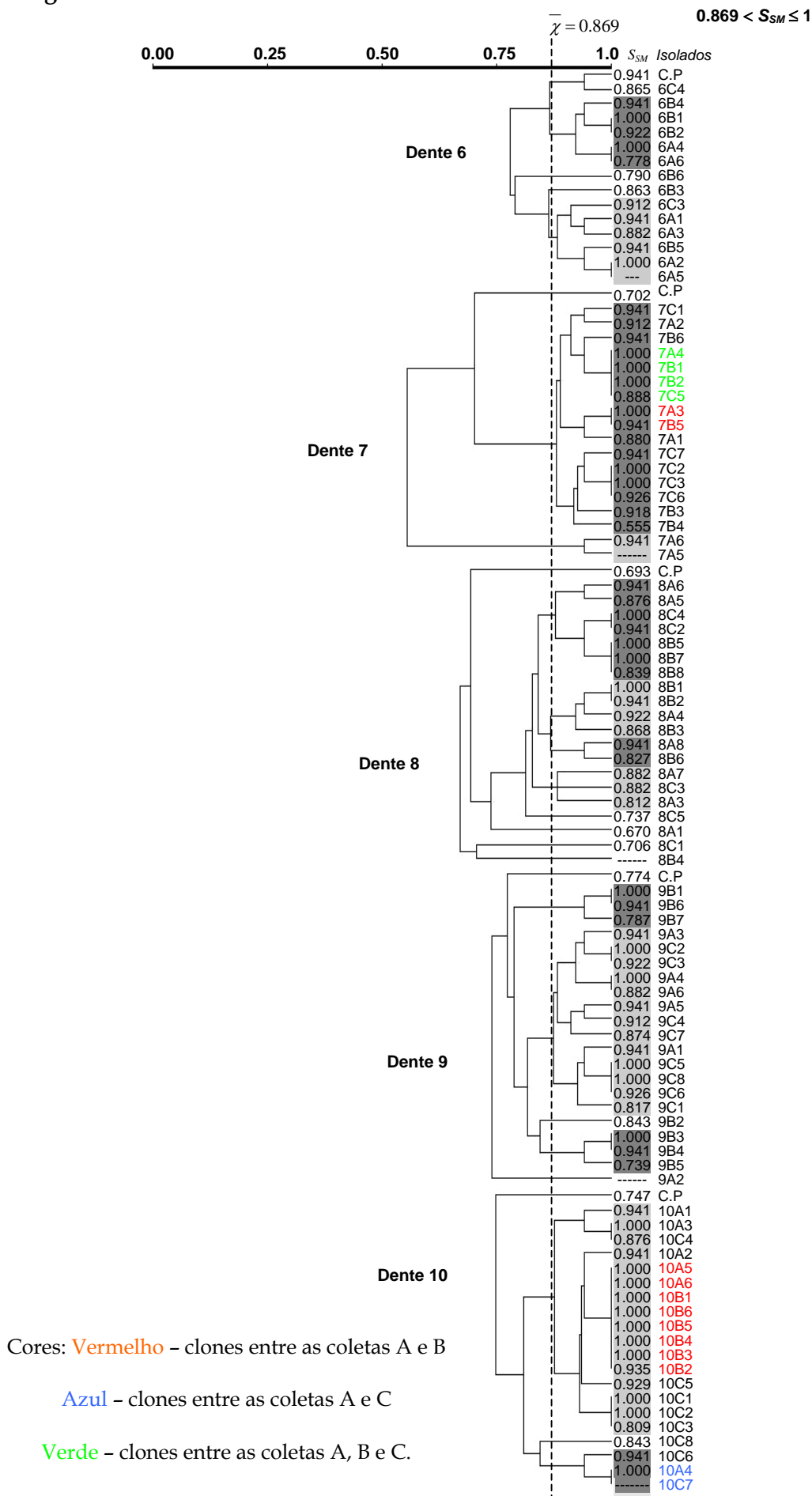


Figura 3. Similaridade genética (método AP-PCR, primer OPA-13) entre isolados de *S. mutans* provenientes de amostras de lesões de cárie coletadas de dois dentes diferentes do mesmo paciente. (a) Dentes 6 e 8; (b) Dentes 9 e 10. Dendrograma UPGMA gerado a partir da matriz de similaridade S_{SM} (*Simple Matching*).

Figura 3a.

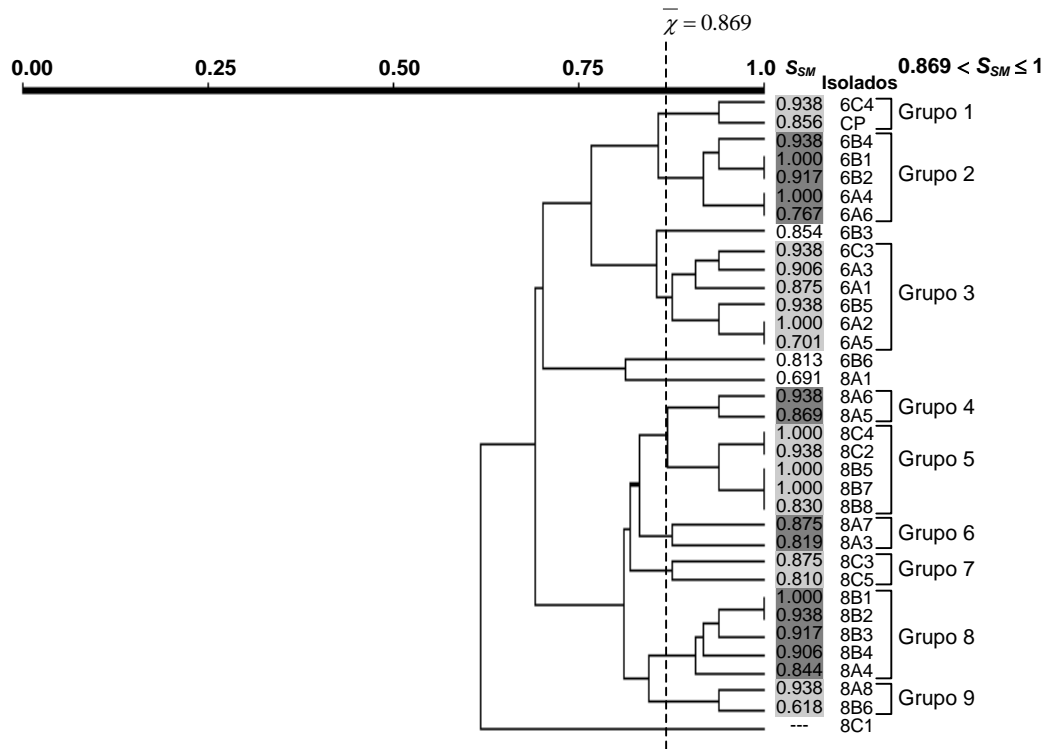


Figura 3b.

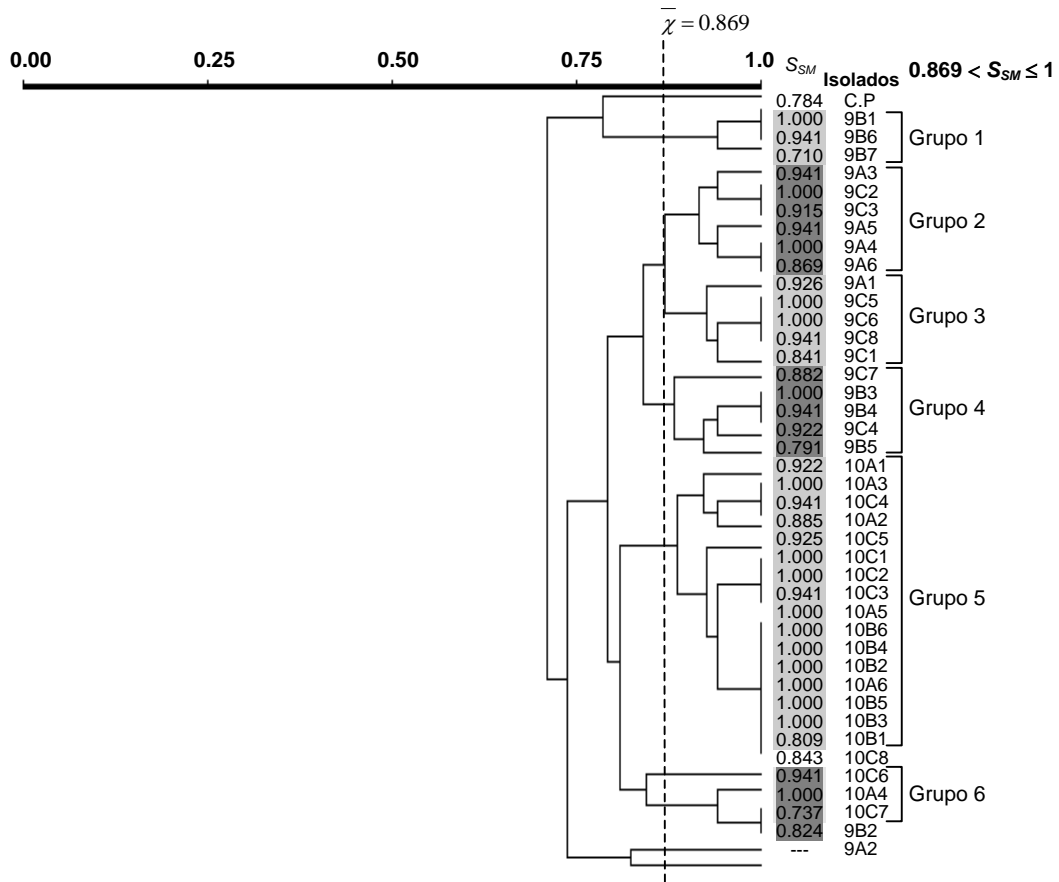
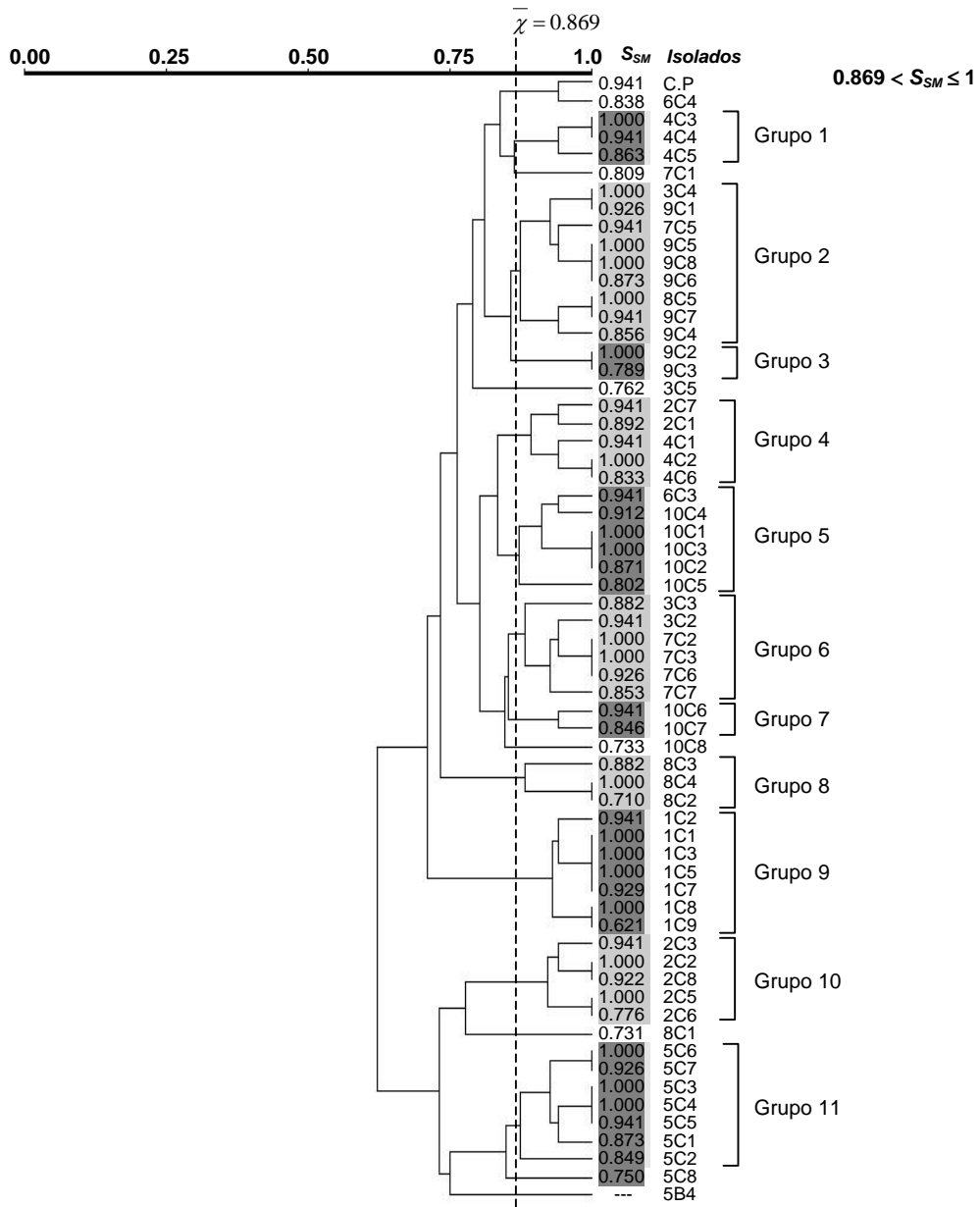


Figura 4. Similaridade genética (método AP-PCR, primer OPA-13) entre isolados de *S. mutans* provenientes de amostras de lesões de cárie coletadas após 3 meses do tratamento pulpar indireto - coleta C (cepas resistentes ao tratamento). Dendrograma UPGMA gerado a partir da matriz de similaridade S_{SM} (*Simple Matching*).

Figura 4.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nestes trabalhos e nos relatos documentados na literatura, é de fundamental importância para a proteção da polpa dentária, considerar a utilização de materiais forradores em cavidades profundas envolvendo a dentina. Diante da presença do risco de exposição pulpar, técnicas de remoção parcial de cárie dentária, como o tratamento pulpar indireto, podem ser utilizadas, com significativo sucesso clínico e microbiológico, em dentes com ausência de sinais clínicos ou radiográficos de patologias pulpares e/ou periapicais.

Nesse contexto, os cimentos de ionômero de vidro estão sendo indicados na proteção direta do complexo dentino-pulpar, por apresentarem adequadas propriedades físicas e biológicas. Quando aplicados em cavidades profundas, esses cimentos podem ser considerados biocompatíveis, por causarem mínima inflamação e desorganização do tecido pulpar, permitindo a reparação tecidual, por meio da formação de dentina reacional pelos odontoblastos primários (COSTA et al.¹⁰). Entretanto, estudos em biologia pulpar têm apresentado novas tendências de tratamento, demonstrando a preocupação com a utilização de materiais que possam estimular a resposta biológica sem causar qualquer irritação às células pulpares, como as moléculas bioativas provenientes da própria matriz dentinária (SMITH et al.^{50,51}). Em cavidades profundas, essas moléculas poderiam se difundir pelos túbulos dentinários e estimularem a dentinogênese reacional e conseqüente proteção do tecido pulpar de agressões bacterianas ou de produtos tóxicos dos próprios materiais restauradores (SMITH et al.⁵⁰). Embora essas perspectivas apresentem considerável embasamento científico, ainda são necessários estudos clínicos em humanos e em situações de forramento cavitário após remoção de cárie dentária, sugerindo ainda a

utilização de soluções com propriedades antibacterianas que pudessem eliminar os microrganismos residuais antes da aplicação desses materiais biológicos.

Considerando que situações clínicas geralmente envolvem a presença de tecido cariado, a escolha de um material forrador/base com atividade antibacteriana tem fundamental importância na determinação do sucesso do tratamento restaurador. Os cimentos de ionômero de vidro têm apresentado marcante capacidade inibitória sobre bactérias cariogênicas (McCOMB e ERICSSON³³; LOYOLA-RODRIGUEZ et al.³¹; MEIERS e MILLER³⁵; HERRERA et al.²²), confirmada neste estudo *in vitro*, principalmente sobre espécies de estreptococos do grupo *mutans*, lactobacilos e actinomyces. Em situações de remoção parcial de cárie, esses cimentos podem ser indicados para aplicação sobre dentina contaminada, reduzindo ou até eliminando bactérias residuais presentes nesse tecido, as quais poderiam se difundir pelos túbulos dentinários e causar irritação pulpar (BJORNDAL e LARSEN⁵; MALTZ et al.³²). O cimento de ionômero de vidro modificado por resina, Vitrebond, apresentou destaque nos presentes estudos, denotando marcante atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo*, pois em poucos dentes humanos tratados com esse cimento, bactérias remanescentes foram verificadas após um curto período de três meses da remoção parcial de cárie.

Embora estudos apresentem críticas em relação ao cimento de hidróxido de cálcio, sua aplicação sobre cavidades profundas com lesões dentinárias parcialmente removidas tem demonstrado resultados clínicos e microbiológicos favoráveis (FISHER et al.¹⁶; LEUNG et al.²⁷). Vale ressaltar, entretanto, a influência do selamento adequado da cavidade dentária sobre a sobrevivência da microbiota sob restaurações. Dentre os microrganismos bucais, *Streptococcus mutans* despertou interesse da comunidade científica, devido à sua capacidade de tolerância a ácidos, provenientes do seu metabolismo ou de outras espécies bacterianas ou ainda da reação química de

materiais dentários. Além disso, apresenta habilidade de metabolizar outros nutrientes, em situações de restrição de carboidratos, como poderia ser verificado em cavidades com adequado selamento (PADDICK et al.⁴¹). Em razão dessas características, cepas resistentes desse microrganismo estão ainda presentes no tecido dentinário remanescente, mesmo após meses da remoção incompleta da cárie. A diversidade genética de *S. mutans* entre indivíduos ou ainda dentro de sítios específicos em um mesmo indivíduo demonstra a complexidade do relacionamento entre isolados dessa espécie, tornando necessário o desenvolvimento de novos estudos que possam elucidar as características de virulência desses organismos, fornecendo subsídios ao cirurgião-dentista na escolha de melhores estratégias de tratamento da cárie dentária.

CONCLUSÃO

Os materiais forradores cavitários investigados (cimentos de ionômero de vidro e cimento de hidróxido de cálcio) apresentaram aceitável compatibilidade biológica, quando comparados ao material biológico ESDP (Artigo 2). Além disso, também mostraram atividade inibitória sobre as bactérias cariogênicas avaliadas (Artigos 1 e 3), entretanto, existe a possibilidade de adaptação genética de cepas de *Streptococcus mutans* resistentes aos referidos materiais (Artigo 4).

Referências*

1. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Reference manual: guidelines for pulp therapy for primary and young permanent teeth. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.23, n.7, suppl., p.29-90, 2001.
2. BAMMANN, L.L.; ESTRELA, C. Aspectos microbiológicos em endodontia. In: ESTRELA, C. **Endodontia** - princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas, 1999. cap.6, p.167-189.
3. BARKHORDAR, R.A.; KLEMPER, D. Antimicrobial activity of calcium hydroxide liners on *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. **J. Prosth. Dent.**, St. Louis, v.61, n.3, p.314-317, Mar. 1989.
4. BERGENHOLTZ, G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. **J. Endod.**, Baltimore, v.7, n.3, p.100-104, Mar. 1981.
5. BJORN DAL, L.; LARSEN, T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. **Caries Res.**, Basel, v.34, n.6, p.502-508, Nov./Dec. 2000.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

6. BJORN DAL, L.; LARSEN, T.; THYLSTRUP, A. A clinical and microbiological study of deep carious lesion during stepwise excavation using long treatment intervals. **Caries Res.**, Basel, v.31, n.6, p.411-417, Nov./Dec. 1997.
7. BRÄNNSTRÖM, M.; ASTRÖM, A. The hydrodynamics of the dentine: its possible relationship to dentinal pain. **Int. Dent. J.**, London, v.22, n.2, p.219-227, June 1972.
8. BRÄNNSTRÖM, M.; VOJINOVIC, O. Response of the dental pulp to invasion of bacteria around three filling materials. **J. Dent. Child.**, Fulton, v.43, n.2, p.15-21, Mar./Apr. 1976.
9. COSTA, C.A.S. et al. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.19, n.8, p.739-746, Dec. 2003.
10. COSTA, C.A.S.; NASCIMENTO, A.B.L.; TEIXEIRA, H.M. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.18, n.7, p.543-551, Nov. 2002.
11. COX, C.F.; SUZUKI, S. Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. adhesive hybridization. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.125, n.7, p.823-831, July 1994.

12. DUQUE, C.; NEGRINI, T.; HEBLING, J.; SPOLIDORIO, D.M.P. Inhibitory activity of glass-ionomer cements on cariogenic bacteria. **Oper. Dent.**, Seattle, v.30, n.5, n.636-640, Sept./Oct. 2005.
13. ESTRELA, C.; BAMMANN, L.L.; ESTRELA, C.R.A.; SILVA, R.S.; PECORA, J.D. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, Calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.11, n.1, p.3-9, Jan. 2000.
14. FALSTER, C.A. et al. Indirect pulp treatment: in vivo outcomes of an adhesive resin system vs calcium hydroxide for protection of the dentin-pulp complex. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.24, n.3, p.241-248, May/June 2002.
15. FAROOQ, N.S. et al. Success rate of formocresol pulpotomy and indirect pulp therapy in treatment of deep dentinal caries in primary teeth. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.22, n.4, p.278-286, July/Aug. 2000.
16. FISHER, F.J. The effect of a calcium hydroxide-water past on microorganisms in carious dentine. **Br. Dent. J.**, London, v.133, n.1, p.19-21, July 1972
17. FITZGERALD, M.; HEYS, R.J. A clinical and histological evaluation of conservative pulpal treatment in human teeth. **Oper. Dent.**, Seattle, v.16, n.3, p.101-112, May/June 1991.
18. FORSTEN, L.; SÖDERLING, E. The alkaline and antibacterial effect of seven Ca(OH)₂ liners in vitro. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.42, n.2, p.93-98, Apr. 1984.

19. FREEDMAN, G. et al. Bases and liners: to use or not to use, a paradigm shift. **Dent. Today**, Montclair, v.18, n.2, p.52-59, Fev. 1999.
20. GIBBONS, R.J.; COHEN, L.; HAY, D.I. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. **Infect. Immun.**, Washington, v.52, n.2, p.555-561, May 1986.
21. HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.44, n.2, p.331-384, June 1980.
22. HERRERA, M. et al. Antibacterial activity of resin adhesives, glass ionomer and resin-modified glass ionomer and a compomer in contact with dentin caries samples. **Oper. Dent.**, Seattle, v.25, n.4, p.265-269, July/Aug. 2000.
23. HILTON, T.J. Cavity sealers, liners, and bases: current philosophies and indications for use. **Oper. Dent.**, Seattle, v.21, n.4, p.134-146, July/Aug. 1996.
24. HU, C.-C. et al. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. **J. Endod.**, Baltimore, v.24, n.11, p.744-751, Nov. 1998.
25. IGARASHI, T.; YAMAMOTO, A.; GOTO, N. Polymerase chain reaction for identification of oral streptococci: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei* and *Streptococcus salivarius*. **J. Microbiol. Meth.**, Amsterdam, v.34, n.1, p.81-88, Sept. 1998.

26. KREULEN, C.M. et al. In vivo cariostatic effect of resin modified glass ionomer and amalgam on dentine. **Caries Res.**, Basel, v.31, n.5, p.384-389, Sept./Oct. 1997.
27. LEUNG, R.L.; LOESCHE, W.J.; CHARBENEAU, G.T. Effect of Dycal on bacteria in deep carious lesions. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.100, n.2, p.193-197, Feb. 1980.
28. LIEBANA, J. et al. Phenotypic characterization of oral streptococci by classical methods. **Microbios**, Cambridge, v.76, n.306, p.7-18, 1993.
29. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.
30. LOESCHE, W.J.; SYED, S.A. The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine. **Caries Res.**, Basel, v.7, n.3, p.201-216, 1973.
31. LOYOLA-RODRIGUEZ, J.P.; GARCIA-GODOY, F.; LINDQUIST, R. Growth inhibition of glass ionomer cements on mutans streptococci. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.16, n.5, p.346-349, Sept./Oct. 1994.
32. MALTZ, M. et al. A clinical, microbiologic and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. **Quintessence Int.**, Berlin, v.33, n.2, p.151-159, Feb. 2002.

33. McCOMB, D.; ERICSON, D. Antimicrobial action of new, proprietary lining cements. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.66, n.5, p.1025-1028, May 1987.
34. MARSHALL, G.W.Jr. et al. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J. Dent.**, Bristol, v.25, n.6, p.441-458, Nov. 1997.
35. MEIERS, J.C.; MILLER, G.A. Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers, and polyacid-modified composite resins. **Oper. Dent.**, Seattle, v.21, n.6, p.257-264, Nov./Dec.1996
36. MITRA, S.B. In vitro fluoride release from a light-cure glass ionomer liner/base. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.70, n.1, p.72-74, Jan. 1991.
37. MOUNT, G.J. Glass ionomer cements: past, present and future. **Oper. Dent.**, Seattle, v.19, n.3, p.82-90, May/June 1994.
38. NAKASHIMA, M. et al. Transforming growth factor-beta superfamily members expressed in rat incisor pulp. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.43, n.9, p.745-775, Sept. 1998.
39. NASCIMENTO, M.M.; HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. **Caries Res.**, Basel, v.38, n.5, p.454-463, Sept./Oct. 2004.

40. NIRSCHL, R.F.; AVERY, D.R. Evaluation of a new pulp-capping agent in indirect pulp therapy. **J. Dent. Child.**, Fulton, v.50, n.1, p.25-30, Jan./Feb.1983.
41. PADDICK, J.S. et al. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.71, n.5, p.2467-2472, May 2005.
42. PASHLEY, D.H. et al. The effects of dentin permeability on restorative dentistry. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.46, n.2, p.211-245, Apr. 2002.
43. REDMO EMANUELSSON, I.M. et al. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.18, n.1, p.24-29, Feb. 2003.
44. RUTHERFORD, R.B. et al. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.38, n.7, p.571-576, July 1993.
45. SAARELA, M. et al. Typing of *mutans* streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Archs. Oral Biol.**, v.41, n.8/9, p.812-826, Aug/Sep. 1996.
46. SCHRÖDER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.64, spec. iss., p.541-548, Apr. 1985.

47. SLOAN, A.J.; SMITH, A.J. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.44, n.2, p.149-156, Feb.1999.
48. SPOLIDORIO, D.M.P. et al. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.34, n.3, p.213-217, July 2003.
49. SMITH, A.J. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. **J. Dent. Educ.**, Washington, v.67, n.6, p.678-689, June 2003.
50. SMITH, A.J.; TOBIAS, R.S.; MURRAY, P.E. Transdental stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. **J. Dent.**, Bristol, v.29, n.5, p.341-346, July 2001.
51. SMITH, A.J. et al. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.39, n.1, p.13-22, Jan. 1994.
52. TOI, C.S.; BÖNECKER, M.; CLEATON-JONES, P.E. *Mutans* streptococci strains prevalent before and after cavity preparation during Atraumatic Restorative Treatment. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.18, n.3, p.160-164, Aug. 2003.

-
53. TRONSTAD, L.; BIRKELAND, J.M. in vitro studies on the influence of cements on the alkaline effect of calcium hydroxide. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.79, n.5, p.350-355, 1971.
54. WEERHEIJM, K.L.; KREULEN, C.M.; DE SOET, J.J.; GROEN, H.J., VAN AMERONGEN, W.E. Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-years in vivo effects. **Caries Res.**, Basel, v.33, n.2, p.130-134, Mar./Apr. 1999

ANEXOS

Anexo 1.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Odontologia
Câmpus de Araraquara
Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 08/2002, referente à pesquisa "*Avaliação da difusão transdentária de proteínas morfogenéticas e capacidade de indução da dentinogênese*" sob a responsabilidade de *Cristiane Duque* e *Josimeri Hebling* está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP em reunião de *23/junho/2004*.

CERTIFICATE



We certify that the protocol # *08/2002* referring to the research "*Evaluation of transdental diffusion of morphogenetic proteins and capacity of dentinogenesis induction*" under responsibility of *Cristiane Duque* e *Josimeri Hebling* is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Araraquara Dental School-UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in *June 23, 2004*.

Araraquara, 23 de junho de 2004


Prof. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira
Coordenadora do CEEA/FOAr/UNESP

Anexo 2.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

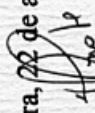
Comitê de Ética em Pesquisa

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO CLÍNICA, RADIOGRÁFICA E MICROBIOLÓGICA DE TRATAMENTO PULPAR INDIRETO COM CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO E DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO**", sob o protocolo nº **05/04**, de responsabilidade do Pesquisador (a) **CRISTIANE DUQUE**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 01 (um) ano, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "**CLINICAL, RADIOGRAPHIC AND MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF INDIRECT PULP TREATMENT WITH GLASS IONOMER AND CALCIUM HYDROXIDE CEMENTS**", protocol number **05/04**, under Dr **CRISTIANE DUQUE** responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 01 (one) year when the final review of this study will occur.

Araraquara, 22 de abril de 2004.


Profª Drª Marian Aparecida Onofre
Coordenadora