



Universidade Estadual Paulista
Dr. Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Odontologia de Araraquara



PATRICIO AGUSTIN VILDÓSOLA GREZ

**QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE
STREPTOCOCCUS MUTANS EM RESTAURAÇÕES OCLUSAIS E
SELANTES EM DENTES MEDIANTE A TÉCNICA DA MOLDEIRA.
ESTUDO CLINICO CEGO**

Araraquara

2015



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Dr. Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Odontologia de Araraquara



PATRICIO AGUSTIN VILDÓSOLA GREZ

**QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE
STREPTOCOCCUS MUTANS EM RESTAURAÇÕES OCLUSAIS E
SELANTES EM DENTES MEDIANTE A TÉCNICA DA MOLDEIRA.
ESTUDO CLINICO CEGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Área de Dentística, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Cury Saad

Araraquara

2015



PATRICIO AGUSTIN VILDÓSOLA GREZ

QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE
STREPTOCOCCUS MUTANS EM RESTAURAÇÕES OCLUSAIS DE
DENTES E SELANTE MEDIANTE A TÉCNICA DA MOLDEIRA.
ESTUDO CLINICO CEGO

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de doutor em ciências odontológicas

Presidente e orientador: Prof. Dr. José Roberto Cury Saad

2º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade

3º Examinador: Prof. Dr. Edson Alves de Campos

4º Examinador: Prof. Dr. Hugo Henriques Alvim

5º Examinador: Prof. Dra. Patricia Aleixo dos Santos Domingos



DADOS CURRICULARES

PATRICIO AGUSTIN VILDÓSOLA GREZ

NASCIMENTO: 12/02/1977 ã Santiago ã Chile

FILIAÇÃO:

Eduardo Patricio Vildósola Aguayo

Carmen Lucía Grez Ibañez

1996-2002: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidad de Chile

2006-2008: Mestrado com especialização em Reabilitação Oral pela Faculdade de Odontologia da Universidad Andres Bello

2013-2015: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Área de Dentística ã Nível Doutorado - Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista ã UNESP/SP



DEDICATÓRIA

Agradeço primeiro a Deus por sua presença em minha vida, por sua salvação e sofrimento por nos.

Á minha esposa Sara, por seu amor e apoio incondicional, compreensão e paciência. Juntos fazemos um equipe invencível e podemos lograr os desafios que Deus nos envia.

Minha Família por seu amor sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao governo do Brasil e Chile. À Universidade Estadual Paulista e do Chile por este convênio que nos honrou. À Faculdade de Odontologia de Araraquara representada pela Digníssima Diretora **Andréia Affonso Barreto Montandon**, pela oportunidade única.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas representado pelo conselho.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Cury Saad** meu orientador, pelo apoio, confiança e dedicação em todo este tempo. Agradeço muito sua confiança e o carinho neste tempo compartilhado.

Ao **Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior** pela grande oportunidade que me deu, seu carinho, dedicação e amizade gerada.

Aos professores **Edson Alves de Campos, Andrea Abi Rached Dantas, Marcelo Ferrarezi de Andrade e Alessandra Nara de Souza Rastelli**, pelo acolhimento, dicas e seu recebimento sempre com ótima disposição.

À **Creuza**, pelo carinho, obrigado pela paciência e estar sempre a plena disposição para ajudar.

Aos meus amigos **Eduardo Fernández, Javier Martin y Gustavo Moncada**, pela amizade, companhia, momentos de alegria e apoio neste caminho.

A **Janaina Bortolatto** quem foi uma excelente companheira em cada uma das nossas viagens.

À **Hélida e Hernane**, muito obrigado por todo os momentos compartilhados.

Aos todos **os colegas no Chile do Departamento de Odontologia Restauradora** por seu esforço e trabalho para que nos podamos fazer nosso estudo.

Aos colegas **Cristian, Juan e Camila** pelo seu compreensão, ajuda, alegria e companhia.



PDF

Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

a

todos

Vildósola PG. Quantificação de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus mutans* em restaurações oclusais e selantes em dentes mediante a técnica da moldeira. Estudo clínico cego [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

RESUMO

As restaurações e selantes podem sofrer cárie como qualquer material, devido à possibilidade das bactérias de aderir-se a suas superfícies. **Objetivo principal** foi colher e quantificar (contagem) das unidades formadoras de colônias de *S. mutans* de forma direta pela técnica da moldeira (TR) em restaurações de resina composta (RC), amálgama (AM) e em selantes de fósulas e fissura. **Material e método:** Recrutaram-se 40 pacientes para o estudo de avaliação da TR, 65 para a comparação das restaurações de AM e RC e 38 para o selante. Critérios inclusão: pacientes 18-50 anos, mínimo 28 dentes na boca, pelo menos uma restauração oclusal de RC e de AM avaliadas alfa pelo critério Ryge (Kappa 0,8), e um dente com indicação de selante. Numa primeira parte, no mesmo paciente foram realizadas amostragem de saliva, impressões de RC ou AM com a TR e a técnica *toothpick* (TT). Na segunda e terceira etapa num mesmo paciente foram realizadas impressões de RC ou AM com a TR e no caso de selante num mesmo dente foi realizado antes e após da aplicação. TR foi feita numa moldeira de fluoreto com ágar tripticase, extrato levedura, L-cisteína, sacarose e bacitracina (TYCSB) preparada previamente. As amostras foram incubadas a 37°C durante 48 horas, após uma contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizado por um operador calibrado. Os resultados foram analisados com um nível de confiança do 95%. **Resultados:** TR foi capaz de colher e isolar *S. mutans*, e ter uma correlação positiva significativa ($r = 0,95$) com TT. Não houve correlação significativa entre TR e grupo saliva ($r = 0,47$). RC teve diferença estatística significativa com maior número de UFC de *S. mutans* do que AM ($p < 0,05$). A mediana de UFC/cm² foi de 111,00 para antes aplicação de selante e 22,00 após aplicação ($p < 0,05$). **Conclusões :** TR pode colher UFC de *S. mutans* desde as superfícies oclusais de restaurações dentárias, com uma correlação positiva e significativa com TT. As RC oclusais amostram maior contagem de UFC de *S. mutans* do que AM mediante TR. A aplicação de selantes de fósulas e fissuras em superfícies oclusais de dentes permanente reduz significativamente as UFC de *S. mutans*.

Palavras-chave: Cárie dentária. Amálgama dentário. Resina composta, Selante de fósulas e fissura. *Streptococcus mutans*

Vildósola PG. Counting colony forming unit of *Streptococcus mutans* on occlusal restorations and sealants of teeth by tray technique. Blind clinical study [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015

ABSTRACT

The restorations suffer secondary decay as anything material, because of the possibility of bacteria from adhering to their surfaces. Therefore the aim of the study is quantified (count) the colonies forming units (CFU) of *S. mutans* by tray technique in resin composite (RC), amalgam (AM) restorations and sealants of pits and fissures. **Material and Method:** 40 patients were selected to assess the tray technique, 65 patients to compare AM restorations and RC and 38 patients for sealant. Inclusion criteria: Patients 18 to 50 years old, with 28 teeth, at least one occlusal restorations with RC and AM, evaluated alpha Ryge criteria (Kappa 0.8), and at least with one teeth with indication of occlusal sealant. First study, in the same patient was taken saliva samples, for RC or AM took the impression by TR and toothpick technique (TT). The second and third parts in the same patient were taken RC and AM impression by TR and the sealant of study in the same tooth was performed before and after the sealant application. This method was performed with a fluoride tray previously loaded with a solid tripticase yeast extract cysteine sucrose and bacitracin agar. The samples were incubated at 37°C for 48 hours, after the colonies forming units (CFU) were quantified by a calibrated operator (Kappa 0.8). The results were analyzed with a confidence level of 95%. **Results:** TR was able to recover and isolated *S. mutans*, and had a positive correlation ($r = 0.95$) with TT. There was no significant correlation between TR and saliva ($r = 0.47$). RC restorations, there was statistical significant difference, with higher number of CFU of *S. mutans* than AM ($p < 0.05$). The median CFU/cm² was 111,00 before the sealant application and 22,00 after sealant application ($p < 0.05$). **Conclusion:** The TR was able to recover CFU of *S. mutans* from occlusal restorations with positive correlation and significant with TT. RC restorations showed higher quantified of CFU of *S. mutans* than AM with the TR. The applications of pits and fissures sealant on tooth significantly decrease the CFU of *S. mutans*.

Key words: Dental caries. Dental amalgam. Composite resins. Pit fissure sealant. *Streptococcus mutans*



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

**[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 HIPÓTESE E OBJETIVO.....	14
3 PUBLICAÇÕES	
3.1 Artigo 1: Contagem de <i>Streptococcus mutans</i> sob restaurações pela técnica da moldeira ã Estudo clínico aleatorizado.....	15
3.2 Artigo 2: Há diferença na contagem de <i>Streptococcus mutans</i> em restaurações oclusais de amálgama e resina composta. Estudo clinico cego	28
3.3 Artigo 3: Há diminuição de <i>Streptococcus mutans</i> apos aplicação de selante nas superfícies oclusais em dentes permanentes de adultos. Estudo clinico cego	40
4 DISCUSSÃO FINAL.....	52
5 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS	64

A cárie dental representa uma das doenças mais comuns do mundo que afetam a cavidade bucal e apesar que os países mais desenvolvidos tem decrescido seus os níveis, nos países com menos recursos ainda é um problema importante de saúde. Portanto os esforços tem sido focados em desenvolver estratégias de tratamento que previnam o começo e desenvolvimento da doença cárie^{31,40}. A cárie e descrito como um processo complexo, crônico que afeta os dentes da cavidade bucal e que avança lentamente na maioria dos pacientes, podendo destruir completamente os dentes¹⁹. Por outro lado, há outros fatores que podem influenciar na processo da doença cárie e dentro destes fatores um dos mais importantes esta o microbiológico como as bactérias. As bactérias estão imersas dentro de um biofilme num ambiente de equilíbrio⁵⁸. Apesar disso este equilíbrio microbiológico pode ser modificado pela dieta alta em conteúdo de carboidratos, provocando o aumento de populações de bactérias cariogênicas que fermentam estes carboidratos, provocando dessa forma uma diminuição do pH no ambiente oral e estimulando a desmineralização dos tecidos duros do dente num processo dinâmico da cárie^{8,45}. Neste biofilme há muitas espécies de bactérias, as quais estão embutidas num meio liquido e têm a possibilidade de estar aderidas às superfícies dos dente pela matriz extracelular produzidas pelas mesmas. Dessa forma encontra-se o grupo *Streptococcus* onde pode-se mencionar o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), bactéria mais frequentemente isolada e que é associada fortemente á doença cárie. A presença deste microrganismo é capaz de produzir uma quantidade importante de ácido, sobreviver e continuar processos metabólicos nestas condições (pH baixo) causando a desmineralização da estrutura dentária⁸.

Para prevenir e restaurar o dano provocado pela cárie estão as restaurações, que podem ser de resina composta, amálgama e no caso de prevenção estão os selantes de fósulas e fissura. Assim, as restaurações sofrem como qualquer material de cárie secundaria, isto é devido como mencionou-se anteriormente à possibilidade das bactérias aderir-se e colonizar a suas superfícies⁴¹. A explicação desta adesão poderia ser a influência das características próprias de cada material como a rugosidade, carga elétrica e composição química destas superfícies, assumindo que a composição dos materiais das restaurações podem ter diferentes influência na adesão ao biofilme^{5,12,14,25}.

os tem sido uns dos principais materiais restauradores da região posterior, porem as resina compostas (RC) hoje são mais populares sendo o materiais de eleição principalmente a suas propriedades estéticas e de adesão^{26,39}, apesar disso há evidencia que as RC têm maior incidência de cárie secundaria quando é comparado com outras restaurações como a amálgama^{10,42,46}. Estudos prévios reportam que as RC promovem o crescimento bacteriano em suas superfícies sugerindo-se que pode ser um fator relevante no processo de formação da cárie. Estudos in vitro e in vivo amostram que as RC tendem acumular mais bactérias e biofilme que o esmalte⁷ e também tem reportado que atividade de *S. mutans* poderia acrescentar o processo de degradação das restaurações e selantes de RC^{11,13,55}. Ao contrario tem vários estudos dizendo que o amálgama inibe adesão bacteriana, devido principalmente a sua habilidade de liberação de prata⁴⁷, mas não há suficiente evidencia científica certa que possa comprovar isso principalmente porque não é claro se esta prata liberada tem o suficiente poder para permitir a inibição das bactérias cariogênicas¹⁷. No caso de superfícies oclusais em zonas potencialmente de desenvolvimento da cárie os selantes de fóssulas e fissuras são o principal materiais indicado para proteger- los, sendo a RC, o material mais indicado segundo a evidencia atual^{22,35}. Porem como mencionamos anteriormente pode ter o mesmo problema que as RC em quanto à adesão de biofilme em sua superfície¹¹, somado que só um estudo clínico que foi feito em saliva, tem reportado que o *S. mutans* diminui apos colocação do selante⁶.

Vários métodos de contagem de bactérias tem sido proposto para avaliar fatores de risco que afetam as restaurações dentais em especial de *S. mutans*. Um dos métodos mais utilizados para a contagem de *S. mutans* é da saliva, o qual tem a vantagem de fácil aplicação e baixo custo, mas com o problema de ser um método incapaz de avaliar a superfície do dente ou restaurações. Contagem da saliva pode ter uma sob estimação dos níveis de *S. mutans*, porque as amostras podem ter altos níveis de contagem de *S. mutans*, mas num dente ou restauração não tem contagem da mesma bactéria, portanto para poder avaliar de maneira mais precisa a presença do *S. mutans* alguns autores sugerem fazer a contagem direto no dente ou restauração^{49,60}. Por isso tem outros métodos para a contagem de *S. mutans* em biofilme dental, sendo atualmente o mais utilizado o Método de "Palito de dente" ou "toothpick" proposto por Wallman e Krasse em

1993⁶³. Este é um método económico e relativamente simples, que é utilizado como padrão ouro para colher amostras de biofilme. Os autores propuseram colher biofilme das restaurações utilizando um instrumento de madeira afilado chamado "Toothpick" o qual passa-se pela superfície da restauração. Porém os autores mesmos relataram que têm as desvantagens de requerer um processo complexo e de longo tempo no laboratório, além disso outro inconveniente é que pode haver um grau de imprecisão e subjetividade no processo da amostra, já que depende do passo do instrumento por parte do operador podendo ter maior nível de distorção sob estimando os níveis bacterianos⁶³.

Por isso é necessário ter um método que possa colher diretamente os *S. mutans* desde as restaurações de maneira direta, fácil, simples e não invasiva na clínica, com um processamento das amostras acessível no laboratório. Dessa forma identificar e quantificar os níveis de *S. mutans* poderia ser um fator relevante na predição da vida média dos materiais e além poderia acrescentar o conhecimento dos possíveis riscos locais^{21,53}. Por conseguinte propomos colher diretamente amostras de biofilme de *S. mutans* em restaurações, selantes e dentes, mediante a técnica da moldeira preparada anteriormente com um meio de cultura TYSCB e comparar a quantidade de *S. mutans* nas diferentes restaurações de RC e AM, e comparar a contagem antes e após colocação do selante.

2 HIPÓTESE E OBJETIVO

Hipótese:

- a) A técnica da moldeira é capaz de colher e de obter unidade formadora de colônias de *S. mutans* desde as superfícies de restaurações oclusais tendo uma correlação com o método *toothpick*
- b) As restaurações de resina compostas oclusais têm maior contagem de unidade formadora de colônia de *S. mutans* comparada com as restaurações oclusais de amálgama.
- c) A contagem de unidade formadoras de colônias de *S. mutans* em superfícies oclusais em dentes permanentes de adulto descende após aplicação de selante de resina em fóssulas e fissura.

Objetivos:

Objetivo Geral:

Colher e comparar a contagem de unidades formadoras de colônias de *S. mutans* mediante a técnica da moldeira, das superfícies oclusais em restaurações de resinas composta, amálgama e selante de fóssulas e fissuras.

Objetivos Específicos:

- Colher e quantificar as unidades formadoras de colônias de *S. mutans* de restaurações oclusais em dentes permanentes mediante a técnica da moldeira e correlacionar-la com a técnica *toothpick* e amostra de saliva.
- Quantificar e comparar as unidades formadoras de colônias de *S. mutans* de restaurações de resina composta e amálgama oclusais em dentes permanentes mediante a técnica da moldeira.
- Quantificar e comparar as unidades formadoras de colônias de *S. mutans* antes e após aplicação de selantes oclusais de resina composta em dentes permanentes mediante a técnica da moldeira.

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Artigo 1

Contagem de *Streptococcus mutans* sobre restaurações pela técnica da moldeira ii Estudo clinico aleatorizado*

RESUMO: Objetivo: O Objetivo deste estudo foi correlacionar a técnica da moldeira com a técnica de toothpick para isolar e realizar uma contagem de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) sob restaurações.

Método: 40 pacientes foram selecionados com alto risco cariogênico de ambos gêneros entre 18 e 50 anos. Critérios de inclusão: Restauração oclusal de 2 anos de antigüidade avaliada alfa de acordo com os critérios Ryge (examinador calibrado Cohen-Kappa 0,8). Em cada paciente foi feito uma amostra da saliva (grupe controle S), uma amostra do biofilme de restauração em amálgama e em resina composta. Numa restauração foi colhida uma amostra com a técnica toothpick (grupo TT) e em outra restauração homóloga com a técnica da moldeira (grupo TR). TR implicou uma impressão direta das superfícies oclusais com uma moldeira de fluoreto com ágar tripticase, extrato levedura, L-cisteína, sacarose e bacitracina (TYCSB) preparada previamente. As amostras foram incubadas a 37°C durante 48 horas, após foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados foram analisados pelo software SPSS usando o método de regressão lineal com um nível de confiança de 95%. **Resultados:** TR foi capaz de colher e isolar *S. mutans*, tendo uma correlação positiva significativa ($r = 0,95$) com TT. Não houve correlação significativa entre TR e grupo controle S ($r = 0,47$). **Conclusão:** TR foi capaz de isolar e permitir a contagem das amostras de *S. mutans* em biofilme de restaurações, tendo uma correlação significativa com a TT.

* Vildósola Grez P, Zuñiga Paula, Palma Fluxa P, Fernandez E, de Oliveira Jr. OB, Moncada Cortés G, Martin Casielles J. Recovering *Streptococcus mutans* over restorations by tray technique: a randomized clinical study? Brazilian Journal of Oral Science 2013; 12(4): 292-297

Introdução

A cárie é uma das doenças mais comuns em todo o mundo onde os países industrializados tenham reduzido seus níveis, no entanto ainda não puderam erradicá-la completamente, gastando em seu tratamento muitos recursos humanos e econômicos ^{1,2}.

Entre os fatores deste complexo processo da cárie estão as bactérias que convivem no biofilme potencialmente cariogênico em equilíbrio no ambiente bucal ^{3,4,5}. Esse equilíbrio microbiano pode ser alterado pelo consumo de carboidratos, aumentando a população de bactérias acidogênicas, por tanto produto desta perturbação ecológica na comunidade microbiana, as bactérias induzem a produção de ácido que é o responsável da seleção e adaptação microbiana provocando a desmineralização e posterior destruição do tecido duro do dente ^{5 6}.

Neste biofilme cariogênico encontra-se os mutans streptococci, que são os principais agentes etiológicos da cárie em seres humanos ^{7,8}. Dentro das sete espécies existentes, o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é o patógeno mais frequentemente e isolado no biofilme ⁹. Os níveis de *S. mutans* nas amostras de biofilme tem sido associados com o desenvolvimento da cárie, assim sua detecção pode ser utilizada para prever o risco de cárie e monitorar sua atividade no dente ¹⁰ e do mesmo modo nas restaurações por sua preponderância na cárie secundária ^{11,12}.

Para facilitar a cultura de *S. mutans* por muito tempo tem sido utilizado o meio de cultura *Goldò* ¹³, porém outros diferentes meios têm sido propostos para tentar simplificar a cultura e sua posterior detecção e quantificação de *S. mutans* em laboratório ¹⁴. Dessa forma as amostras de *S. mutans* podem ser processadas e inoculadas em meios de cultura seletivos, tais como *Mitis salivarius* ágar com bacitracina (MSB) e *trypticase* extrato levedura, L-cisteína, sacarose e bacitracina (TYCSB) ¹⁵.

Vários métodos de amostragem para *S. mutans* têm sido propostos, tais como a contagem de *S. mutans* na saliva ou tomando diretas amostras do biofilme dos dentes ou restaurações. No caso da contagem *S. mutans* em saliva pode ser feito estimulando ou não a saliva ¹⁶. Este método é fácil e econômico, mas apresenta algumas limitações, como por exemplo uma pessoa com baixas contagens de *S. mutans* na saliva poderia

sideo *mutans* sob uma restauração específica¹⁷. Portanto, tem

sugerido que a identificação direta das colônias de *S. mutans* sob as restauração permitem uma melhor avaliação da presença das bactérias e pode ser uma avaliação mais precisa do risco de fracasso nas restaurações dentárias ¹⁶. Por esta razão, faz alguns anos, Wallman e Krasse ¹⁸, propuseram um método mais preciso para a contagem de *S. mutans* sob restaurações. Eles sugeriram que as amostras de biofilme devem ser colhidas nas restaurações utilizando a ponta de um instrumento de madeira estéril (toothpick). Este é um método de coleção para realizar no consultório odontológico, enquanto os autores descreveram uma grande desvantagem, que a técnica pode dar uma subestimação da presença do microorganismo devido que não poderia ser acedida pelo toothpick por sua forma e seu tamanho.

Apesar que até agora a técnica de toothpick tem sido uns dos métodos mais utilizados, no presente artigo descreve-se um novo método que permite a identificação e quantificação de *S. mutans* diretamente do dente restaurado, mediante a técnica de moldeira num meio de cultura seletivo solidificado previamente.

Por tanto o objetivo deste estudo foi avaliar a técnica da moldeira (TR) na recuperação, isolamento e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. mutans* sobre superfícies oclusais dentes restaurados e correlacionar-la com o método toothpick. A hipótese deste estudo e demonstrar que a TR e capaz do colher *S. mutans* sobre superfícies oclusais de restaurações e que tem correlação com a técnica toothpick.

Materiais e métodos.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia da Universidad de Chile (PRI-ODO 11-07). Este foi um estudo experimental, aleatório e cego respeitando todos os princípios éticos da convenção de Helsinque 2002. Cada paciente foi informado detalhadamente deste estudo e assinou um consentimento informado. A petição de comitê de ética cada paciente apos de amostras ou tratamento com selante foi ensina a técnica de higiene e aplicaram todas as medidas para baixar o risco de cárie.

O tamanho da amostra foi determinado utilizando o software G*Power 3.1.3 (Enrich-Heine, Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany)¹⁹, considerando um erro α de $p=0,05$,

tanto o análises recomendou mínimo 40 pacientes (40 restaurações por grupo).

De um total de 584 pacientes que foram examinados na Faculdade de Odontologia da Universidad de Chile, selecionaram-se 40 pacientes aleatoriamente segundo os critérios de inclusão. A aleatorização dos pacientes foi feita com o programa NCSS PASS 2008 v08.015 (NCSS Statistical Software Co. Kaysville, USA) e seus dados foram salvos numa planilha Excel (Microsoft Office Excel versão 2007). Isto foi feito por dois operadores (Operador 1 e 2).

Critérios de inclusão: Pacientes entre 18-50 anos, saudável ASA I-II, alto risco cariogênico de acordo programa Cariogram 2.01 (Mälmo University, Mälmo, Suécia) (parâmetros medidos: acesso ao flúor, fluxo salival, capacidade buffer salival, índice CPOD, dieta, índice de placa), mínimo de 28 dentes na boca, ter ao menos duas restaurações de molares ou pre molares oclusais do mesmo material homônimo (resina composta ou amálgama) avaliado pelo examinador calibrado Cohen Kappa=0,8 como alfa em todos os parâmetros de acordo os critérios Ryge modificados (Ryge)²⁰ (Tabela 1), restaurações menor 1/3 da distância entre cúspides, e antigüidade de 2 anos realizadas em Dentística na faculdade de Odontologia Universidade de Chile.

Critérios de exclusão: pacientes acometido por xerostomia, pacientes com tratamento de corticoides ou fármacos imunossupressores ou que reduzem o fluxo salival (antidepressivos, narcóticos, anti-histamínicos, anti-hipertensivos, antieméticos, diuréticos) impossibilidade do paciente para higienizar seus dentes, grávidas ou em período de lactação, bruxismo severo, pacientes com próteses removíveis, fixa ou uso de aparelho dental acrílico, dentes tratados endodonticamente, com tratamento de antibiótico, enxaguatório, e creme dental com maior a 2.500 ppm de fluoreto, consumo de chiclete pelo menos 4 vezes à semana²¹

Moldeiras descartáveis para aplicação de fluoreto (Deepak Products Inc, Miami, Florida, USA) foram esterilizadas numa câmara de biossegurança tipo II (Esco, Technologies Inc, Harboro. PA, USA) com raios ultravioleta (UV) por 20 minutos e foram carregadas com 7,5 mL de meio de cultura seletivo para *S. mutans* TYCSB²² (Difco Laboratories Inc)²². Ágar, Trypticase, extrato de Levedura, Cisteína, Sacarose, Bacitracina) casitone 15,0 g, extrato de levedura 5,0 g, L-cisteína 200 mL, sulfito de sódio 0,1 g, cloreto de sódio 1,0 g, fosfato de sódio 12 hidrato 2,0g, bicarbonato de sódio 2,0 g, tri hidrato de sódio

ágar 15.0 g, água destilada (qsp) e bacitracina 0,2 U/mL.

Tabela 1. Critérios Ryge

Característica Clínica	Alpha	Bravo	Charlie
Integridade Marginal	A Sonda exploradora não é retida quando passado nos dois sentidos dente-restauração.	Sonda exploradora é retida nas margens dente-restauração.	Dentina e/ou base estão expostas ao longo da margem.
Forma Anatômica	Continuidade da restauração com a estrutura adjacente.	A restauração não continua com o contorno do dente.	A restauração tem sub ou sobre contorno.
Rugosidade Superficial	A superfície da restauração não tem nenhum defeito na.	A superfície da restauração tem mínimo defeitos.	A superfície da restauração tem severos defeitos.
Cárie Secundária	Não evidencia clínica de cárie.	N/A	Evidencia clínica de cárie.
Brilho superficial	A superfície da restauração é semelhante á translucidez e lisura do esmalte dental.	A superfície da restauração é opaca.	A superfície da restauração é notoriamente opaca e esteticamente inaceitável.

Dessa forma foram seccionadas após gelificação, para posteriormente colocar numa placa de Petri e selar numa sacola de plástico guardada em geladeira. Aleatoriamente algumas placas foram incubadas numa estufa (ZDP-A2080, Lab Tech. Co., Namyangiu, Coreia) por 24 horas a 37°C como controle de qualidade.

entre as 10:00 e 13:00 horas do dia. A cada paciente pediu-se que enxaguassem com água e isolou o dente com restaurações com rolos de algodão e secou por 5 segundos, para evitar contaminação com saliva.

A amostragem de TR (Grupo TR) foi realizada em biofilme de restaurações num lado fazendo uma impressão pressionando suavemente por 20 segundos e deixadas numa placa de Petri, logo no outro lado da boca foi realizado a amostragem com a técnica TT (Grupo TT) com um instrumento de madeira afiado estéril passando pela superfície de cada restaurações, depois foi transferido a 500 μ L fluido de transporte reduzido (RTF) e salvados a 4°C até processamento do laboratório. Também realizou-se uma amostra de saliva (Grupo S) não estimulada de cada paciente por 5 minuto²³.

Todo o processo de laboratório microbiológico foi realizado no Laboratório de Microbiologia do departamento de Patologia e Medicina Oral da Faculdade de Odontologia, Universidade de Chile, Santiago, Chile

Processamento laboratorial:

As amostras de TT e saliva foram homogeneizadas num vortex (Maxi Mix II tipo 37600, Mixer Barnstead Thermolyne, Dubuque, IA, USA) por 45 segundos. Logo foram removidas 100 μ L do homogeneizado das amostras e colocou-se numa primeira pipeta com 900 μ L de tampão fosfato pH 7,2. Depois agitou por 15 segundos num vortex e novamente removeu 100 μ L da primeira pipeta e adicionou numa segunda pipeta com 900 μ L de tampão fosfato. Assim obtiveram diluições de 1:10 e 1:100. Para amostras de saliva obtiveram-se diluições de 1:1000 y 1:10000.

Semeou-se 100 μ L de cada uma das diluições realizadas as amostras de TT e saliva utilizando uma micropipeta, em placas de Petri com ágar TYCSB. Todo o processo de semeadura foi realizado em condições estéril baixo câmara de fluxo laminar de biossegurança tipo II.

Apos todas as amostras foram incubadas a 37°C por 48 horas numa estufa bacteriológica (ZDP-A2080, LabTech Co. Namyangju, Coreia), em microaerofilia, pela técnica da chama da vela.

Identificação e quantificação (contagem) de unidades formadoras de colônias de *S. mutans*

As placas foram identificados as colônias de *S. mutans* de acordo a sua morfologia macroscópica e aderência ao ágar, isto foi efetuado com lupa estereoscópica (Stemi 2000, Carls Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) sob luz

refletida com aumento de 20X (Schott KL 1500, Carls Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) colocando-se as placas sobre um fundo preto, a fim de ressaltar as características das colônias. As características morfológicas das colônias são: superfície granular semelhante a vidro moído, brancas rugosas e cristalina. Posteriormente realizou-se um teste de coloração Gram positivo.

As colônias de cada amostra compatíveis com *S. mutans* foram escolhidas aleatoriamente e transferidas a caldo Todd Hewitt (Difco Lab. Inc., MI, Detroit, USA) e incubados a 37°C por 48 horas. Cada caldo centrifugou (BD Serofuge 2001, Clay-Adams Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) por 5 minutos a 1500 rpm obtendo um pellet. Apos pellet foi re-transferido em 450 µL de tampão fosfato (pH 7,2) para obtiver um Mc Farland 5. As amostras de colônias foram sometidas a provas de bioquímica para diferenciar ao *S. Mutans* de outras espécies como *Streptococcus sobrinus* como as provas de fermentação de rafinose, melibiose e hidrólise de esculina. De 100 µL de essa suspensão foi colocada em soluções de cada teste bioquímico rafinose e melibiose (Tioglicolato sem dextrosa e sem indicador, 1 % de rafinose e 1% melibiose respetivamente) (Difco, Lab.) Para esculina colocou em solução BHI (Brain Heart Infusion, 1% esculina, Difco Lab, Inc.). As suspensões foram incubadas por 24 horas a 37°C. Depois as suspensões de rafinose e melibiose colocou 2 gotas de citrato de amônio férrico (Sigma-Aldrich Co, St. Louis. Mi, USA) ²⁴.

A contagem das unidades formadoras de colônias foram expressadas em UFC e foram efetuada por um único examinador calibrado (Kappa=0,8) cego, que não sabia a que grupo correspondiam (Operador 3).

Análise Estatística

A etapa foi realizada por um operador cego (Operador 4). Para os analises dos dados, utilizou-se teste de correlação lineal simples com um nível de significância de 95% feito pelo software SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows, Versão 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA)

Identificação e isolamento de *S. mutans*:

Todas as amostras com presença de *S. mutans* mostraram características macroscópicas e de aderência de *S. mutans*, no caso de teste de coloração Gram positivo e todas as provas bioquímicas foram positivas para *S. mutans*, no teste de rafinose- melibiose (cor amarelo) e esculina (cor preto).

Contagem de *S. mutans*:

De todas amostras TT. TR e saliva apresentaram 87,5% presença de *S. mutans* (35 de 40) a media expressadas em UFC/cm² foi para TR 7,98 ($\pm$ 8,70), TT 3,13 ($\pm$ 4,77) $\times 10^3$ UFC/mL e saliva 5,05 ($\pm$ 6,40) $\times 10^5$ UFC/mL.

Correlação TR e TT

O teste de correlação linear simples apresentou um valor $r=+0,95$ (gráfico 1) Um valor positivo $\hat{O}$ 0.65 e considerado como uma correlação positiva e significativa. Para as amostras de TR e S apresentam um valor $r=0,47$ (gráfico 2), que e considerado como positivo mas não significativo.

Gráfico1. Correlação de contagem de UFC/Cm² de *S. mutans* por TR e TT de amostras do biofilme em restaurações.

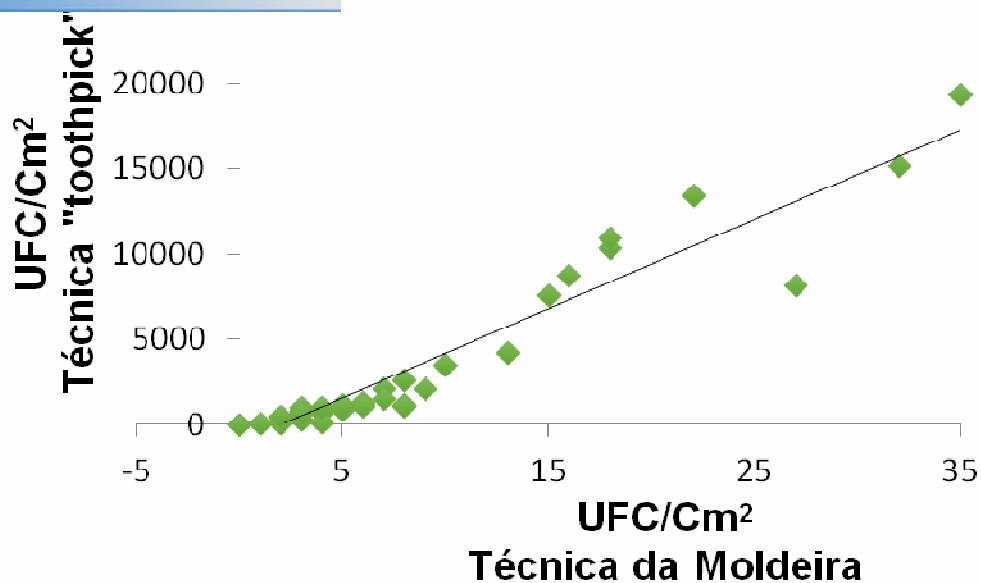
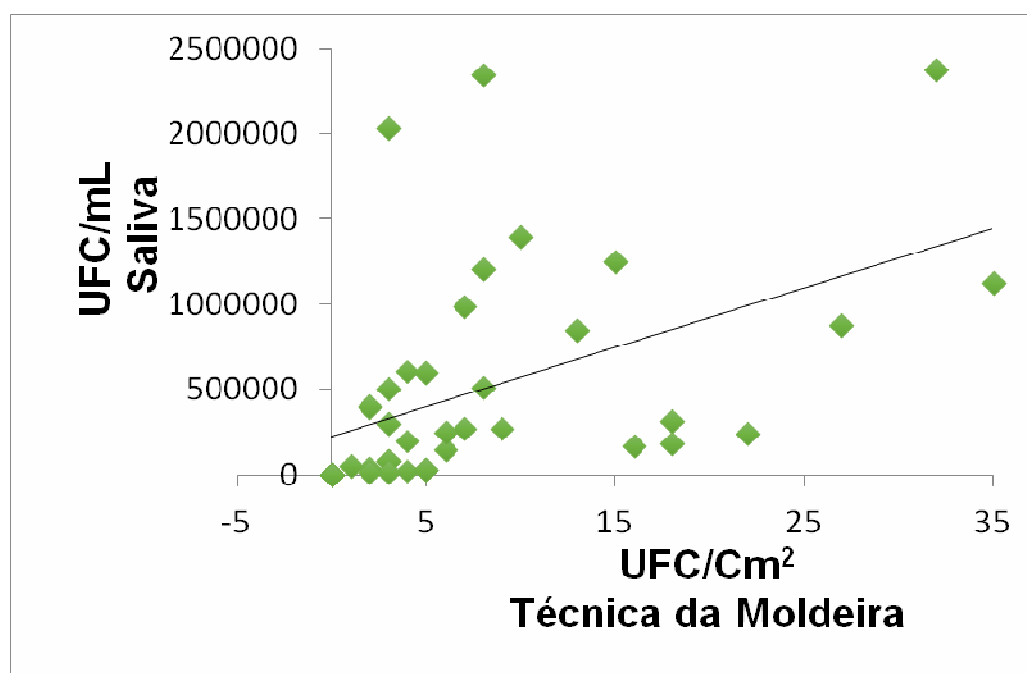


Gráfico 2. Correlação de contagem de UFC/Cm² de *S. mutans* por TR e Saliva de amostras do biofilme em restaurações.



Discussão

já uma correlação significativa entre as técnicas TR e TT para a recollecção de *S. mutans* sob restaurações oclusais num meio seletivo para o *S. mutans* como TYBSC. No quanto a correlação de TR e S foi positiva mas não significativa o qual poderia ser explicado em parte pela dificuldade da técnica de saliva para remover o biofilme das diferentes áreas do dente durante a mastigação sob a cera da parafina¹⁷

Nesta pesquisa as amostras das restaurações nos pacientes foram homogeneizada devido que todas as restaurações foram avaliadas alfa pelo critério de Ryge e com uma mesma longevidade no mesmo paciente, Apesar disso seria interessante avaliar que ocorre com as restaurações bravo, devido que têm maior probabilidade de acumular biofilme em especial em pacientes de alto risco cariogênico.

É conhecido que os níveis de *S. mutans* podem variar entre diferentes restaurações incluso entre o mesmo paciente¹¹. Por tanto, Wallman e Krasse propuseram a TT para colher *S. mutans*. Assim esta técnica tem sido utilizada por muito tempo, porque considerar-se que é um método disponíveis e que pode ser simples na coleção do

microorganismo e que não dana as superfícies das restaurações¹⁸. Porem, tem descrito que a TT não é capaz de colher completamente as bactérias que adere-se às superfícies das restaurações²⁵, por isso propusemos a TR a qual pode colher de maneira mais exata o biofilme aderido às superfícies oclusais das restaurações. TR tem outras vantagens como ser uma técnica mais rápida e simples no quanto ao procedimento laboratoriais tanto para requerimentos logísticos e recursos, posto que no seu processo elimina-se os passos de diluição e sementeado prévio que têm as técnicas TT e saliva. A TR envolve uma impressão direta da restauração e que foi tolerada por todos os pacientes sometidos neste estudo, já que nenhum paciente reportou algum tipo de reflexo nauseoso e incomodidade de mal gosto no processo. Uma explicação desta vantagem pode ser que a TR foi feita numa moldeira seccionada. Além disso outra vantagem é ser uma técnica não invasiva para possível detecção de microorganismos em superfícies, o que poderiam ser usados no futuro no monitoramento de lesões de cárie precoces, avaliando os fatores de maneira local no desenvolvimento da cárie^{9,26}.

Neste estudo foi utilizado ágar TYCSB por ter uma alta especificidade para *S. mutans*, mas poderia ser recomendável realizar com outros tipos de meios de cultura como SB

cepas bacterianas como *S. sobrinus* ou outras que participam no processo do desenvolvimento da cárie^{5,28,29}.

Esta técnica poderia ser usada para pesquisas clinicas de novos materiais antibacterianos de uma forma mais simples. Atualmente, a maioria dos estudos que desenvolvem estos tipos de materiais são frequentemente concentrados em propriedades contra *S. mutans*, talvez seria necessário ampliar-lo a outras novas cepas bacterianas encontradas no processo da cárie .

Por outro lado, a técnica tem uma limitação como que só pode ser utilizada no superfícies dentárias libres como as oclusais e não esta indicada para ser utilizada no superfícies proximais, devido à baixa resistência do meio de cultura que poderia rasgar e sofrer deformação nas áreas de difícil acesso.

Conclusão

A TR pode colher e recuperar unidades formadoras de colônias de *S. mutans* desde

superfícies oclusais de restaurações dentárias, tendo uma correlação positiva com a técnica toothpick

A TR pode ser considerada como um método não invasivo mais direto, simples e rápido do que TT, na colheita de *S. mutans* sob restaurações oclusais

Agradecimentos: Os autores agradecem à Dra. Marta Estela Saravia do departamento de prevenção da faculdade Nacional de odontologia de Tucumán, Argentina por sua ajuda nos processamento microbiológicos.

Referências

1. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. J Dent Res. 2013 Jul;92(7):592-7.
2. Richards D. Oral diseases affect some 3.9 billion people. Evid Based Dent. 2013;14(2):35.

- a A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res.* 2013;47(2):89-102.
4. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008;42(6):409-18.
5. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011 Mar;90(3):294-303.
6. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005 Aug;33(4):248-55.
7. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr;46(4):1407-17.
8. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol.* 2008 Jun;46(6):2015-21.
9. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ.* 2001 Oct;65(10):1028-37.
10. Fontana M, Zero DT. Assessing patients' caries risk. *J Am Dent Assoc.* 2006 Sep;137(9):1231-9.
11. Bentley CD, Broderius CA, Drake CW, Crawford JJ. Relationship between salivary levels of mutans streptococci and restoration longevity. *Caries Res.* 1990;24(4):298-300.
12. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM: (2008) Pathology of dental caries: in Fejerskov O, Kidd EAM (eds). *Dental Caries The disease and Its Clinical Management*, ed 2. Oxford, Blackwell Munksgaard 2008, pp 19-48.
13. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973 Nov;18(11):1357-64.
14. Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol.* 1978 Jan;7(1):82-3.
15. Wan AK, Seow WK, Walsh LJ, Bird PS. Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J.* 2002 Mar;47(1):21-6.
16. Park JH, Tanabe Y, Tinanoff N, Turng BF, Lilli H, Minah GE. Evaluation of microbiological screening systems using dental plaque specimens from young children aged 6-36 months. *Caries Res.* 2006;40(3):277-80.

- ans streptococci in margins of fillings and crowns. J Dent. 1992 Jun;20(3):163-6.
18. Wallman C, Krasse B. A simple method for monitoring mutans streptococci in margins of restorations. J Dent. 1993 Aug;21(4):216-9.
 19. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. Behav Res Methods. 2009 Nov;41(4):1149-60.
 20. Ryge G. Clinical criteria. Int Dent J. 1980 Dec;30(4):347-58.
 21. Zibell S, Madansky E. Impact of gum chewing on stress levels: online self-perception research study. Curr Med Res Opin. 2009 Jun;25(6):1491-500.
 22. Silva TC, Valarelli TM, Sakal VT, Tessarolli V, Machado MA. Oral antibacterial effect of chlorhexidine treatments and professional prophylaxis in children. Braz J Oral Sci. 2013; 12: 132-7
 23. Van Palenstein Helderman WH, Ijsseldijk M, Huis in 't Veld JH. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. Arch Oral Biol. 1983;28(7):599-603.
 24. Coykendall AL. Classification and identification of the viridans streptococci. Clin Microbiol Rev. 1989 Jul;2(3):315-28.
 25. Wennerholm K, Lindquist B, Emilson CG. The toothpick method in relation to other plaque sampling techniques for evaluating mutans streptococci. Eur J Oral Sci. 1995 Feb;103(1):36-41.
 26. Coogan MM, Mackeown JM, Galpin JS, Fatti LP. Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity. J Dent. 2008 Nov;36(11):892-9.
 27. Saravia ME, Nelson-Filho P, Silva RA, De Rossi A, Faria G, Silva LA, et al. Recovery of mutans streptococci on MSB, SB-20 and SB-20M agar media. Arch Oral Biol. 2013 Mar;58(3):311-6.
 28. Saravia ME, Nelson-Filho P, Ito IY, da Silva LA, da Silva RA, Emilson CG. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified SB-20 culture medium. Microbiol Res. 2011 Jan;166(1):63-7.
 29. Peterson SN, Snesrud E, Schork NJ, Bretz WA. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. Int Dent J. 2011 Aug;61 Suppl 1:11-22.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

3.2 Artigo 2

¿Há diferencia na contagem de *Streptococcus mutans* em restaurações oclusais de amálgama e resina composta? ï Estudo Clínico Cego*

Resumo. O objetivo deste estudo foi comparar o numero de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) em restaurações oclusais de amálgama (AM) e resina composta (RC). **Materiais e métodos:** Foram selecionados 65 pacientes, maiores de 18 anos, os quais tinham ao menos uma restauração oclusal de AM e de RC (n=130). Estas foram avaliadas de acordo o critério Ryge (Cohen Kappa 0.8). Em cada paciente realizou-se uma amostra de biofilme em restaurações de amálgama e resina composta do mesmo paciente mediante uma impressão com a técnica da moldeira previamente carregada com ágar sólido tripticase, extrato de Levedura, cisteína, sacarose, bacitracina. As moldeiras foram colocadas numa estufa a 37°C por 48 horas e apos realizou-se a contagem de *S. mutans*. Os resultados foram analisados com o teste de Wilcoxon com 95% de nível de confiança. As restaurações de RC tiveram diferenças estatísticas significativas com mais alto número de UFC de *S. mutans* do que restaurações de amálgama ($p < 0,05$). **Conclusão:** As restaurações de RC tem significativamente mais alta contagem de *S. mutans* em superfícies oclusais do que restaurações de amálgama.

* Vildósola Grez P, Fernandez E, Palma Fluxa P, Cury Saad JR, Moncada Cortés G, Martin Casielles J. Is there difference of *Streptococcus mutans* count and adherence on amalgam and resin occlusal restoration? Brazilian Journal of Oral Science 2015; 14(1): 5-

Introdução

Cárie dentária é uma das doenças mais comuns no mundo. No entanto a maioria dos países desenvolvidos tem diminuídos seus índices da cárie, ainda sem poder erradicá-la completamente¹.

Entre os fatores que desenvolvem o processo complexo da doença cárie estão as bactérias, as quais estão dentro do biofilme potencialmente cariogênico num ambiente de equilíbrio bucal². Este balance microbiológico pode ser modificado pela alta ingestão de carboidratos, desta forma estimulando as bactérias cariogênicas que são responsáveis da desmineralização do dente que pode levar à destruição completa do dente. Dessa forma encontra-se o grupo *Streptococcus* onde pode-se mencionar o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), bactéria mais frequentemente isolada e que é associada fortemente à doença cárie, particularmente no caso de etapas prévias da doença³.

O biofilme é desenvolvido imediatamente em todas as superfícies na cavidade bucal⁴ onde existe uma interação entre os materiais restauradores e microorganismos. Dessa forma as superfícies das restaurações podem influir diretamente no nível de aderência e agregação bacteriana⁵. Isto sugere que os materiais restauradores poderiam ser selecionados de acordo ao risco cariogênico do paciente, o qual poderia ter uma relação com a longevidade das restaurações^{6,7}.

Por muitos anos amálgama (AM) tem sido um dos principais materiais restauradores da região posterior, porém as resinas compostas (RC) hoje são mais populares sendo o material de eleição devido a suas propriedades estéticas e de adesão⁸, apesar disso devido a suas propriedades tem evidência que as RC tem maior incidência de cárie secundária^{9,10} e quando é comparado com outras restaurações como a amálgama¹¹.

Estudos prévios reportam que as RC promovem o crescimento bacteriano em suas superfícies¹¹⁻¹² sugerindo-se que pode ser um fator relevante no processo de formação da cárie¹³. Ao contrário têm vários estudos dizendo que o amálgama inibe adesão bacteriana, devido principalmente a sua habilidade de liberação de prata¹⁴ mas não tem suficiente evidência científica certa que possa comprovar isso porque não é claro se esta

prata liberada tem o suficiente poder para permitir a inibição das bactérias cariogênicas¹⁵.

Por as razões anteriores seria interessante identificar e quantificar os níveis de *S. mutans* aderidos às superfícies das restaurações de AM e RC no ambiente bucal.

O objetivo deste estudo foi comparar as UFC em superfícies oclusais de restaurações de RC e AM. A hipótese alternativa foi que tem diferença estatística significativa de UFC de *S. Mutans* entre restaurações oclusais de AM e RC.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia da Universidad de Chile (PRI-ODO 11-07). Cada paciente foi informado detalhadamente deste estudo e assinou um consentimento informado. A petição de comitê de ética cada paciente após de amostragem foi ensinada a técnica de higiene e aplicaram todas as medidas para baixar o risco de cárie.

O tamanho da amostra foi determinado utilizando o software G*Power 3.1.3 (Enrich-Heine, Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany), considerando um erro α de $p=0,05$, um valor de potência de 0,8 e efeito tamanho médio de 0,5. Portanto a análise recomendou 65 pacientes (65 restaurações por grupo). De um total de 584 pacientes que foram examinados na Faculdade de Odontologia da Universidad de Chile selecionaram-se 65 pacientes aleatoriamente segundo os critérios de inclusão (amostras total de 130 unidades, 2 amostras por paciente) A aleatorização dos pacientes foi feita como o programa NCSS PASS 2008 v08.015 (NCSS Statistical Software Co. Kaysville, USA) e seus dados foram salvos numa planilha Excel (Microsoft Office Excel versão 2007). Isto foi feito por dois operadores (Operador 1 e 2) As variáveis foram quantitativas contínuas. O operador que realizou as impressões conheceu a alocação das restaurações (Operador 3) Critérios de inclusão: Pacientes entre 18-45 anos, saudável ASA I-II, alto risco cariogênico de acordo programa Cariogram 2.01 (Malmö University, Malmö, Suécia) (parâmetros medidos: acesso ao flúor, fluxo salival, capacidade buffer salival, índice CPOD, dieta, índice de placa), mínimo de 28 dentes na boca, ter ao menos duas restaurações oclusais; uma de resina composta (Filtek Supreme 3M-ESPE,

utro homônimo de amálgama (Original D, Wyckle Research, Carson City, Nevada, USA) avaliado pelo examinador calibrado Cohen Kappa=0,8 como alfa em

todos os parâmetros de acordo os critérios Ryge modificados¹⁶ (Tabela 1), restaurações menor 1/3 da distância entre cúspides, e antigüidade de 3 anos realizadas em dentística na faculdade de Odontologia Universidade de Chile.

Critérios de exclusão: pacientes acometido por xerostomia, pacientes com tratamento de corticoides ou fármacos imunossupressores, impossibilidade do paciente para higienizar seus dentes, grávidas ou em período de lactação, bruxismo severo, pacientes com próteses removíveis ou fixa, com aparelho dental acrílico, dentes tratados endodonticamente, com tratamento de enxaquetório, antibiótico e creme dental com maior a 2.500 ppm de fluoreto, consumo de chiclete pelo menos 4 vezes à semana.

Tabela 1. Critérios Ryge.

Característica	Alpha	Bravo	Charlie
Clinica			
Integridade Marginal	A Sonda exploradora não é retida quando passado nos dois sentidos dente-restauração.	Sonda exploradora é retida nas margens dente-restauração.	Dentina e/ou base estão expostas ao longo da margem.
Forma Anatômica	Continuidade da restauração com a estrutura adjacente.	A restauração não continua com o contorno do dente.	A restauração tem sub ou sobre contorno.
Rugosidade Superficial	A superfície da restauração não tem nenhum defeito na.	A superfície da restauração tem mínimo defeitos.	A superfície da restauração tem severos defeitos.
Cárie Secundária	Não evidencia clínica de cárie.	N/A	Evidencia clínica de cárie.
Brilho superficial	A superfície da restauração é semelhante á translucidez e lisura do esmalte dental.	A superfície da restauração é opaca.	A superfície da restauração é notoriamente opaca e esteticamente inaceitável.

Confecção das moldeiras e processo das amostras

Numas moldeiras descartáveis para aplicação de fluoreto (Deepak Products Inc, Miami, Florida, USA) foram esterilizadas numa câmara de biossegurança tipo II (Esco, Technologies Inc, Harboro. PA, USA) com raios ultravioleta (UV) por 20 minutos e foram carregadas com 7,5 mL de meio de cultura seletivo¹⁷ para *S. mutans* TYCSB (Difco Laboratories Inc)¹⁸. Ágar, Trypticase, extrato de Levedura, Cisteína, Sacarose, Bacitracina) casitone 15,0 g, extrato de levedura 5,0 g, L-cisteína 200 mL, sulfito de sódio 0,1 g, cloreto de sódio 1,0 g, fosfato de sódio 12 hidrato 2,0g, bicarbonato de sódio 2,0 g, tri hidrato de sódio acetato 20,0 g, sacarose 50,0 g, ágar 15.0 g, água destilada (qsp) e bacitracina 0,2 U/mL.

após gelificação, para posteriormente colocar numa placa de Petri e selar numa sacola de plástico guardada numa geladeira. Aleatoriamente algumas placas foram incubadas numa estufa (ZDP-A2080, Lab Tech. Co., Namyangju, Coreia) por 24 horas a 37°C como controle de qualidade.

Todas as amostras foram realizadas por um operador diferente do operador que realizou a contagem posterior das colônias formadoras de *S. mutans* (cego). As amostras foram feitas entre as 10:00 e 13:00 horas do dia para permitir a reorganização do biofilme. A cada paciente pediu-se que enxaguassem com água e isolou o dente com restaurações com rolos de algodão e secou por 5 segundos, para evitar contaminação com saliva. As amostras foram realizadas em biofilme de uma restauração oclusal num lado da boca com a técnica da moldeira para RC (Grupo RC) e outro lado homônimo para restauração de AM (Grupo AM) no mesmo paciente. As impressões foram feitas pressionando suavemente por 20 segundos e deixadas numa placa de Petri, dessa forma as impressões foram transportadas a 4°C e após foram incubadas a 37°C por 48 horas numa estufa bacteriológica (ZDP-A2080, LabTech Co. Namyangju, Coreia), em microaerofilia, pela técnica da chama da vela.

Identificação e quantificação de unidades formadoras de colônias de *S. mutans*

Nos diferentes grupos das amostras foram identificados as colônias de *S. mutans* de acordo a sua morfologia macroscópica e aderência ao ágar, isto foi efetuado com lupa estereoscópica (Stemi 2000, Carls Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) sob luz refletida com aumento de 20X (Schott KL 1500, Carls Zeiss Microscopy, Thornwood, NY,

USA) colocando-se as placas sobre um fundo preto, a fim de ressaltar as características das colônias. As características morfológicas das colônias são: superfície granular semelhante a vidro moído, brancas rugosas e cristalina. Posteriormente realizou-se um teste de coloração Gram positivo.

As colônias de cada amostra compatíveis com *S. mutans* foram escolhidas aleatoriamente e transferidas a caldo Todd Hewitt (Difco Lab. Inc., MI, Detroit, USA) e incubados a 37°C por 48 horas. Cada caldo centrifugou (BD Serofuge 2001, Clay-Adams Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) por 5 minutos a 1500 rpm obtivendo um pellet. Após pellet foi re-transferido em 450 µL de tampão fosfato (pH 7,2) para obter um Mc Farland 5. As amostras de colônias foram submetidas a provas de bioquímica

outras espécies como *Streptococcus sobrinus* como as provas de fermentação de rafinose, melibiose e hidrólise de esculina. De 100 µL de essa suspensão foi colocada em soluções de cada teste bioquímico rafinose e melibiose (Tioglicolato sem dextrosa e sem indicador, 1 % de rafinose e 1% melibiose respectivamente) (Difco, Lab.) Para esculina colocou em solução BHI (Brain Heart Infusion, 1% esculina, Difco Lab, Inc.). As suspensões foram incubadas por 24 horas a 37°C. Depois as suspensões de rafinose e melibiose colocou 2 gotas de citrato de amônio férrico (Sigma-Aldrich Co, St. Louis. Mi, USA)¹⁹.

A contagem das unidades formadoras de colônias foram expressadas em UFC/cm² e foram efetuada por um único examinador calibrado (Kappa=0,8) cego, que não sabia a que grupo correspondiam (Operador 4).

Todo o processo de laboratório microbiológico foi realizado no Laboratório de Microbiologia do departamento de Patologia e Medicina Oral da Faculdade de Odontologia, Universidade de Chile, Santiago, Chile

Análise Estatística

A etapa foi realizada por um operador cego (Operador 5). As análises estatísticas de homogeneidade e normalidade dos dados foi realizado para determinar se as provas foram paramétricos ou não, para isso foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov ($n > 40$). Para os análises dos dados, utilizou-se teste de Wilcoxon utilizando um nível de

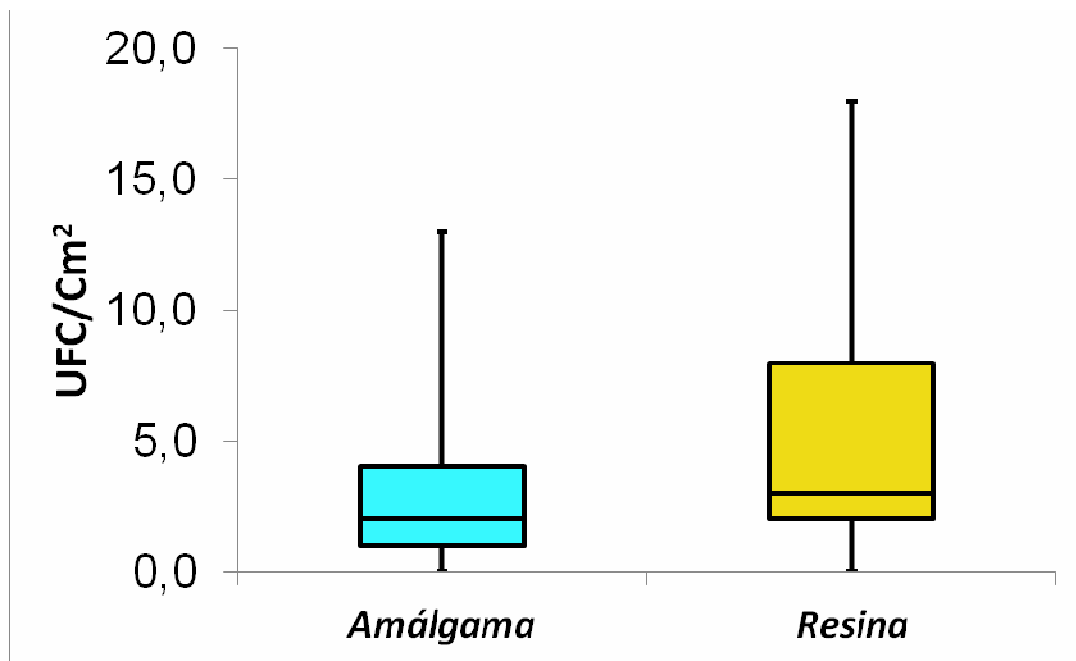
significância de 95% com o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows, Versão 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA)

Resultados

Todas as amostras com presença de *S. mutans* mostraram características macroscópicas e de aderência de *S. mutans*, no caso de teste de coloração Gram positivo e todas as provas bioquímicas foram positivas para *S. mutans*, no teste de rafinose-melibiose (cor amarelo) e esculina (cor preto).

) restaurações com uma media de idade de 30,5 anos. AM apresentaram uma mediana 2.0 UFC/cm² e RC 3.0 UFC/cm². De acordo com teste de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) a distribuição não foi normal. O teste de Wilcoxon por ser no mesmo paciente apresentou um $p < 0,05$ que indicou diferença estatística significativa. (Gráfico 1)

Gráfico 1: Distribuição de UFC/cm² de restaurações de AM e RC.



Discussão

Na comparação das amostras colhidas de UFC de *S. mutans* com a técnica da moldeira em restaurações de AM e RC, o grupo de RC apresentou maior contagem de UFC como diferença significativa ($p < 0,05$). Os resultados de um maior contagem de *S. mutans* em RC indicariam que confirme-se a hipóteses original, do mesmo modo que outro estudos similares in vitro e clinico de *S. mutans* em restaurações^{11,20}.

A comparação das amostras de AM e RC foram realizadas de um mesmo paciente, assegurando que as amostras de biofilme colhidas tiveram o mesmo ecossistema bucal. Além disso todas as amostras das restaurações foram realizadas em restaurações

ryge com uma mesma longevidade (3 anos). Estas condições forma feita para homogeneizar as amostras, podendo inferir-se que as diferenças encontradas de UFC de *S. mutans* nas restaurações oclusais foram principalmente devido às características de cada material, podendo-se afirmar assim que reduzir-se os possível fatores locais de retenção de biofilme e possíveis variações do ecossistema bucal no processo das amostras. Reportou-se que as características do material pode ser relevante na influencia dos níveis de desenvolvimento bacteriano¹⁵ o qual tem sido associado aos características próprias físicas e químicas dos materiais²⁰. Dentro das propriedades físicas pode-se considerar as porosidades do material principalmente num nível de nanoescala²¹ e que além disso outro estudo preliminar apresentou que tem diferença na adesão do biofilme em RC com diferentes níveis de rugosidade²². Por esta razão, poderia explicar-se o maior nível de *S. mutans* nas restaurações de RC do que AM, devido que pode apresentar-se uma maior rugosidade numa escala nanométrica ao contrario às características macroscópicas do material que foram avaliadas segundo o critério Ryge. Porem os resultados do presente estudo são contraditórios aos apresentados por van de Sande et al.²³, possivelmente uma explicação poderia ser que os estudos de eles foram feitos num período de tempo menor à de nos, por o qual sugere-se que provavelmente as bactérias como o *S. mutans* precisam um maior tempo de interação com o material e provocar essas modificações nesse nível de escala.

Por outro lado, as propriedades químicas das superfícies também podem ser um fator relevante na colonização e adesão bacteriana, devido a que o material pode conter

elementos na sua composição que estimulam aquele²⁰. Enquanto no caso de amálgama um estudo disse que pode ter um efeito inibitório na adesão microbiana por a presença de liberação de elementos como a prata, mas que ainda não tem suficiente evidencia que mostra esta liberação de elementos antibacterianos^{14,15}.

No caso da influência das propriedades químicas das RC, crie-se que elas não são capazes de ter alguma atividade antibacteriana e que ao contrario a RC atualmente pode ser considerada como promotora da colonização e desenvolvimento bacteriano, devido a que seus co-monômeros podem estimular diferentes espécies bacterianas^{12,24}. Vários estudos tem descritos e explicado a estimulação do desenvolvimento bacteriano do *S. mutans* em RC, assim relata-se que tem uma degradação dos monômeros por parte do *S. mutans*. Esse efeito e explicado em parte pela ação das enzimas esterases presente

o de TEG-DMA (trietileno glicol dimetacrilato) em TEG (trietileno glicol) o qual libera-se a ambiente bucal afetando a expressão de glicosiltransferase do *S. mutans* que sua vez aumenta a sínteses de glucano²⁵. Apesar disso, ainda não tem evidencia clara deste mecanismo, devido a que produto da degradação depende do tipo de monômeros e some-se a isto uma falta de conhecimento que ocorre em condições in vivo. Assim na cavidade bucal este processo poderia ser afetado diretamente pelo biofilme, o qual é altamente complexo e heterogêneo e que poderia ter mecanismos diferentes com respostas que ainda a maioria não são conhecidas²⁶. A degradação da RC é especialmente importante neste contexto porque provoca um aumento na rugosidade das restaurações, promovendo a adesão e desenvolvimento bacteriano do *S. mutans*²⁴. Em adição as restaurações de RC podem ter um maior nível de microfiltração do que AM o que poderia explicar de melhor forma ate hoje porque elas tem menor longevidade²⁶. Vários estudos tem descrito que as RC têm maior taxas de fracasso devido principalmente à cárie secundaria em especial paciente de alto risco^{6,13}. Opdam et al.⁷ reportaram que risco de cárie pode ter muita relevância na longevidade das restaurações, onde o ambiente bucal pode afetar negativamente às restaurações. Apesar que tem evidencia de restaurações de AM e RC têm similares taxas de longevidade mantendo-se em boas condições aos 12 anos em paciente de baixo risco cariogênico, os resultados de nosso estudo poderiam indicar que é necessário realizar uma avaliação da seleção do material restaurador de acordo com pacientes de alto risco cariogênico e diminuir a possibilidade de cárie secundaria.

Dentro das limitações deste estudo temos que atualmente a doença cáries é conhecida pela sua alta complexidade e que não depende somente do *S. mutans* mas também à existência de um complexo ecossistema onde múltiplas bactérias interacionam entre si, num ambiente onde outros fatores afetam indireta ou diretamente, sugerindo-se investigar com outros tipos de microrganismos.

Finalmente também seria interessante fazer um seguimento da possibilidade de desenvolvimento de cáries nos pacientes e as restaurações estudadas para poder determinar alguma associação de risco de cáries e *S. mutans*.

Conclusão

Estudo nos podemos concluir que em pacientes adultos de alto risco cariogênico as restaurações de RC oclusais amostram maior contagem de UFC de *S. mutans* do que AM mediante a técnica da moldeira. Estes resultados poderiam sugerir que aqueles pacientes seria mais recomendável indicar uma restauração de AM em dente posterior, ajudando a diminuir o potencial risco de cárie secundária.

Referências

1. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*. 2013; 92: 592-7.
2. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011; 90: 294-303.
3. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005; 33: 248-55.
4. Moons P, Michiels CW, Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2009; 35: 157-68.
5. Quirynen M. The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments. *J Dent*. 1994; 22 Suppl 1: S13-6.
6. Opdam NJ, Bronkhorst EM, Loomans BA, Huysmans MC. 12-year survival of composite vs. amalgam restorations. *J Dent Res*. 2010; 89: 1063-7.
7. Simecek JW, Diefenderfer KE, Cohen ME. An evaluation of replacement rates for posterior resin-based composite and amalgam restorations in U.S. Navy and marine corps recruits. *J Am Dent Assoc*. 2009; 140: 200-9; quiz 49.
8. Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dent Mater*. 2011; 27: 29-38.
9. Opdam NJ, van de Sande FH, Bronkhorst E, et al. Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2014; 93: 943-9.
10. Kopperud SE, Tveit AB, Gaarden T, et al. Longevity of posterior dental restorations and reasons for failure. *Eur J Oral Sci*. 2012; 120: 539-48.
11. Beyth N, Bahir R, Matalon S, et al. *Streptococcus mutans* biofilm changes surface-topography of resin composites. *Dent Mater*. 2008; 24: 732-6.

ons made of amalgam outlast those made of resin-based composite? J Am Dent Assoc. 2000; 131: 1186-7.

13. Bernardo M, Luis H, Martin MD, et al. Survival and reasons for failure of amalgam versus composite posterior restorations placed in a randomized clinical trial. J Am Dent Assoc. 2007; 138: 775-83.
14. Orstavik D. Antibacterial properties of and element release from some dental amalgams. Acta Odontol Scand. 1985; 43: 231-9.
15. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. J Dent Res. 2010; 89: 657-65.
16. Ryge G. Clinical criteria. Int Dent J. 1980; 30: 347-58.
17. Vildósola P, Zuñiga P, Fernandez E, Oliveira Jr OB, Moncada G. Recovering Streptococcus mutans overrestorations by the tray technique - arandomized clinical study. Brazilian Journal Oral Science. 2013; 12: 292-7.
18. Van Palenstein Helderma WH, Ijsseldijk M, Huis in 't Veld JH. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium Streptococcus mutans isolated from human dental plaque and saliva. Arch Oral Biol. 1983; 28: 599-603.
19. Coykendall AL. Classification and identification of the viridans streptococci. Clin Microbiol Rev. 1989; 2: 315-28.
20. Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, et al. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. Eur J Oral Sci. 2002; 110: 48-53.
21. Mei L, Busscher HJ, van der Mei HC, Ren Y. Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. Dent Mater. 2011; 27: 770-8.
22. Padovani G, Fúcio S, Ambrosano G, et al. In situ surface biodegradation of restorative materials. Oper Dent. 2014; 39: 349-60.
23. van de Sande FH, Opdam NJ, Truin GJ, et al. The influence of different restorative materials on secondary caries development in situ. J Dent. 2014; 42: 1171-7.
24. Gregson KS, Shih H, Gregory RL. The impact of three strains of oral bacteria on the surface and mechanical properties of a dental resin material. Clin Oral Investig. 2012; 16: 1095-103.
25. Khalichi P, Singh J, Cvitkovitch DG, Santerre JP. The influence of triethylene glycol derived from dental composite resins on the regulation of Streptococcus mutans gene expression. Biomaterials. 2009; 30: 452-9.
26. Alptekin T, Ozer F, Unlu N, et al. In vivo and in vitro evaluations of microleakage around Class I amalgam and composite restorations. Oper Dent. 2010; 35: 641-8.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

3.3 Artigo 3

¿Há diminuição de *Streptococcus mutans* apos aplicação de selante nas superfícies oclusais em dentes permanentes de adultos? Estudo clinico cego

Patricio Vildósola Grez, Eduardo Fernández Godoy, José Roberto Cury Saad, Patricia Palma Fluxá, Natalia Acuña Zepeda, Gustavo Moncada Cortés.*

Resumo: O objetivo deste estudo foi comparar as unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) por cm^2 nas superfícies oclusais de dentes permanentes de adulto antes e apos aplicação de selante de resina. **Materiais e métodos:** Foram selecionados 38 pacientes, entre 18-30 anos, com indicação de selante oclusal num dente posterior. Em cada paciente realizou-se duas amostras no mesmo dente, antes (T0) e apos (T1) aplicação de selante de resina mediante a técnica da moldeira com meio de cultura TYCSB ágar solidificado previamente. Cada amostra foi incubada a 37°C por 48 horas e apos realizou-se a contagem de *S. mutans*. Os resultados foram analisados com o teste de Wilcoxon com 95% de nível de confiança. **Resultados:** A mediana e desvio padrão expressadas em UFC/ cm^2 foi para T0 de 111,00 ($\pm 131,73$) e T1 22,0 ($\pm 78,54$). Houve diferencia significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos com menor contagem de UFC/ cm^2 em T1. **Conclusão:** A aplicação de selante em dentes permanentes de adultos diminui significativamente a contagem de UFC/ cm^2 de *S. mutans*.

* Norma para periódico Brazilian Journal of Oral Science

INTRODUÇÃO

A cárie dentária representa uma das doenças mais comuns que afetam a cavidade bucal, a qual tem sido descrita como uma doença crônica e complexa que pode avançar lentamente na maioria dos pacientes, porém não é auto limitante e poderia ter a possibilidade de destruir completamente no dente se não é intervindo¹. Por outro lado, tem vários fatores que podem influenciar no processo da doença cárie, dentro deste fator um dos mais importantes esta o fator microbiológico como as bactérias, que estão imersas dentro do biofilme num ambiente de equilíbrio². Apesar disso este equilíbrio microbiológico pode ser modificado pela dieta alta em conteúdo de carboidratos, provocando o aumento de populações de bactérias cariogênicas que fermentam estes carboidratos diminuindo o pH no ambiente oral e dessa forma estimulando a desmineralização do tecidos duros do dente no processo dinâmico de cárie^{3,4}. Dentro destas bactérias encontre-se o grupo estreptococos grupo mutans onde pode-se mencionar o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), bactéria mais frequentemente isolada e considerada como umas das principais agentes etiológicos da cárie⁵.

Atualmente a principal estratégia na prevenção da doença cárie é a utilização de selantes de fóssulas e fissura, as quais estão indicadas em superfícies oclusais de pré molares e molares devido que são regiões onde o fluoreto e a higiene poderia ser menos efetivas no pacientes de alto risco cariogênico⁶. Para o selante tem dois materiais indicados como ionômero de vidro ou de resina composta (RC), onde a evidencia atual diz que o material mais efetivo na prevenção de cárie em crianças e adolescentes é de RC, portanto poderia ser considerado o principal material de eleição para selamento fóssulas e fissuras^{6,7}.

O selante de RC é um material que poderia ter o mesmo problema que qualquer outro material restaurador em quanto à adesão de biofilme em sua superfície⁸, Estudos in vitro e in vivo amostram que as RC tendem acumular mais bactérias e biofilme que o esmalte⁹ e também tem sido reportado que atividade de *S. mutans* poderia acrescentar o processo de degradação das restaurações e incluso dos selantes de RC^{8,10,11}. Em adição há escassa informação com relação ao acúmulo de bactérias nos selantes a nível

clínico, já que só um estudo clínico de Baca et al. tem reportado que o estreptococos grupo mutans diminui após colocação do selante num estudo feito em crianças sem presença de cárie e que foi estudado em saliva também não especificando o tipo de selante investigado e se foi selado todos o só um dente¹².

Por estas razões descritas que seria interessante poder determinar clinicamente se o selante de RC verdadeiramente diminui os níveis de *S. mutans* após sua aplicação em dentes posteriores de pacientes adultos de alto risco cariogênico.

Este estudo experimental tem o objetivo principal de calcular as unidades formadoras de colônias (UFC) por cm² em superfícies oclusais de dentes posteriores permanentes antes e após aplicação de selantes de resina composta de fósulas e fissuras. Assim a hipótese proposta é que as UFC de *S. mutans* por cm² nas superfícies oclusais de dentes permanentes posteriores diminuem após aplicação de selante de resina composta de fósulas e fissura.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi feito respeitando os princípios da convenção de Helsinky. Participaram desta pesquisa, pacientes recrutados que compareceram rotineiramente à clínica de dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de Chile, Santiago. Cada paciente assinou um consentimento informado (Anexos). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia, Universidade de Chile, projeto PRI-ODO 11-07 (Anexos). A petição de comitê de ética cada paciente após de amostragem final foi ensinada a técnica de higiene e aplicaram todas as medidas para baixar o risco de cárie.

Este foi um estudo clínico experimental e com cegamento simples. Em cada paciente foram realizadas as impressões no mesmo dente antes e após selamento. O mascaramento foi realizado para examinador na contagem de UFC e estatístico.

O tamanho da amostra foi determinado utilizando o software G*Power 3.1.3 (Enrich-Heine, Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany), considerando um erro α de $p=0,05$, um valor de potência de 0,8 e efeito tamanho médio de 0,5. Portanto a análise recomendou 35 pacientes para 35 dentes. Um acréscimo de perdas foi estabelecido totalizando 38 amostras por grupo.

foram examinados na Faculdade de Odontologia da Universidad de Chile selecionaram-se 38 pacientes aleatoriamente segundo os critérios de inclusão (amostras total de 76) A aleatorização dos pacientes foi feita como o programa NCSS PASS 2008 v08.015 (NCSS Statistical Software Co. Kaysville, USA) e seus dados foram salvos numa planilha Excel (Microsoft Office Excel versão 2007). Isto foi feito por dois operadores (Operador 1 e 2) As variáveis foram quantitativa continuas. Um só operador realizou todas as impressões (Operador 3)

Critérios de inclusão: Pacientes entre 18-30 anos, saudável ASA I-II, alto risco cariogênico de acordo programa Cariogram 2.01 (Malmö University, Malmö, Suécia)¹³ (parâmetros medidos: acesso ao flúor, fluxo salival, capacidade buffer salival, índice CPOD, dieta, índice de placa), mínimo de 28 dentes na boca e pelo menos um dente pré molar ou molar com indicação de selante.

Critérios de exclusão: pacientes acometido por xerostomia, pacientes com tratamento de corticoides ou fármacos imunossupressores, impossibilidade do paciente para higienizar seus dentes, grávidas ou em período de lactação, bruxismo severo, pacientes com próteses removíveis, fixa ou aparelho dental acrílico, com tratamento antibiótico, enxaguatório, e creme dental com maior a 2.500 ppm de fluoreto, consumo de chiclete pelo menos 4 vezes à semana.

Numa primeira sessão nas superfícies oclusais dos dentes foram realizadas profilaxia dental com pedra pomes e água para eliminar partículas de alimentos e biofilme. Após exames examinaram-se os dentes posteriores de maneira visual com um espelho numero 5 (Hu Friedy, Mfg, LLC USA). A indicação do selante foi a presença de área do sulco profundo e com alterações cromáticas. Para isso realizou-se um exame clinico rigoroso além de radiografias interproximais recentes onde mostraram que os dentes estavam hígidos. Numa segunda sessão 2-3 horas depois de escovação de dentes realizou-se a impressão com a técnica da moldeira (TR)¹⁴ do dente em estudo (Grupo TO). Depois um mesmo operador aplicou todos os selantes no mesmo dente (Concise, 3M Espe, St Paul, MN, USA) mediante o seguinte protocolo¹⁵. Isolamento absoluto do campo operatório, lavagem com pedra pomes e água, condicionamento de esmalte dental na superfície com ácido fosfórico a 37% na forma de gel por 15 segundos. Após copiosa lavagem com água e secagem com jatos de ar, o material selador foi aplicado em sulcos e fósulas. A fotopolimerização foi feita pelo tempo de 40 segundos,

gena com potencia acima de 400 mW/cm² (Elipar, 3M ESPE, St Paul, MN, USA). Depois de 45 dias de colocação outro operador calibrado em critério Ryge modificado¹⁶ (Tabela 1) (Kappa= 0.75) avaliou os selantes e realizou a segunda impressões com a TR (Grupo T1).

Todo o processo de laboratório microbiológico foi realizado no Laboratório de Microbiologia do departamento de Patologia e Medicina Oral da Faculdade de Odontologia, Universidade de Chile, Santiago, Chile

Tabela 1. Critérios Ryge

Característica	Alpha	Bravo	Charlie
Clinica			
Integridade Marginal	A Sonda exploradora não e retida quando passado nos dois sentidos dente-restauração.	Sonda exploradora é retida nas margens dente-restauração.	Dentina e/ou base estão expostas ao longo da margem.
Forma Anatômica	Continuidade da restauração com a estrutura adjacente.	A restauração não continua com o contorno do dente.	A restauração tem sub ou sobre contorno.
Rugosidade Superficial	A superfície da restauração não tem nenhum defeito na.	A superfície da restauração tem mínimo defeitos.	A superfície da restauração tem severos defeitos.
Brilho superficial	A superfície da restauração é semelhante á translucidez e lisura do esmalte dental.	A superfície da restauração é opaca.	A superfície da restauração é notoriamente opaca e esteticamente inaceitável.

Para a confecção das moldeiras estas foram feitas com moldeiras descartáveis para aplicação de fluoreto (Deepak Products Inc, Miami, Florida, USA) foram esterilizadas numa câmara de biossegurança tipo II (Esco, Technologies Inc, Harboro. PA, USA) com raios ultravioleta (UV) por 20 minutos e foram carregadas com 7,5 mL de meio de cultura seletivo para *S. mutans* TYCSB¹⁷ (Difco Laboratories Inc) (van palestain). Ágar, Trypticase, extrato de Levedura, Cisteína, Sacarose, Bacitracina) casitone 15,0 g, extrato de levedura 5,0 g, L-cisteína 200 mL, sulfito de sódio 0,1 g, cloreto de sódio 1,0 g, fosfato de sódio 12 hidrato 2,0g, bicarbonato de sódio 2,0 g, tri hidrato de sódio acetato 20,0 g, sacarose 50,0 g, ágar 15.0 g, água destilada (qsp) e bacitracina 0,2 U/mL. Dessa forma foram seccionadas apos gelificação, para posteriormente colocar numa placa de Petri e selar numa sacola de plástico guardada numa geladeira. Aleatoriamente algumas placas foram incubadas numa estufa (ZDP-A2080, Lab Tech. Co., Namyangiu, Coreia) por 24 horas a 37°C como controle de qualidade.

As amostras foram feita entre as 10:00 e 13:00 horas do dia para permitir a reorganização do biofilme. A cada paciente pediu-se que enxaguassem com água e isolou o dente com restaurações com rolos de algodão e secou por 5 segundos, para evitar contaminação com saliva. As impressões foram feitas pressionando suavemente por 20 segundos e deixadas numa placa de Petri, dessa forma as impressões foram transportadas a 4°C e apos foram incubadas a 37°C por 48 horas numa estufa bacteriológica (ZDP-A2080, LabTech Co. Namyangju, Coreia), em microaerofilia, pela técnica da chama da vela. Cada amostra foi assignada um numero por um quarto operador o qual ingresso numa planilha de dados para assegurar cegamento.

Identificação e quantificação de unidades formadoras de colônias de *S. mutans*

Nos diferentes grupos das amostras foram identificados as colônias de *S. mutans* de acordo a sua morfologia macroscópica e aderência ao ágar, isto foi efetuado com lupa estereoscópica (Stemi 2000, Carls Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) sob luz refletida com aumento de 20X (Schott KL 1500, Carls Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) colocando-se as placas sobre um fundo preto, a fim de ressaltar as características das colônias. As características morfológicas das colônias são:

de vidro moído, brancas rugosas e cristalina. Posteriormente realizou-se um teste de coloração Gram positivo.

As colônias de cada amostra compatíveis com *S. mutans* foram escolhidas aleatoriamente e transferidas a caldo Todd Hewitt (Difco Lab. Inc., MI, Detroit, USA) e incubados a 37°C por 48 horas. Cada caldo centrifugou (BD Serofuge 2001, Clay-Adams Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) por 5 minutos a 1500 rpm obtivendo um pellet. Após pellet foi re-transferido em 450 µL de tampão fosfato (pH 7,2) para obter um Mc Farland 5. As amostras de colônias foram submetidas a provas de bioquímica para diferenciar ao *S. mutans* de outras espécies como *Streptococcus sobrinus* como as provas de fermentação de rafinose, melibiose e hidrólise de esculina. De 100 µL de essa suspensão foi colocada em soluções de cada teste bioquímico rafinose e melibiose (Tioglicolato sem dextrosa e sem indicador, 1 % de rafinose e 1% melibiose respectivamente) (Difco, Lab.) Para esculina colocou em solução BHI (Brain Heart Infusion, 1% esculina, Difco Lab, Inc.). As suspensões foram incubadas por 24 horas a 37°C. Depois as suspensões de rafinose e melibiose colocou 2 gotas de citrato de amônio férrico¹⁸ (Sigma-Aldrich Co, St. Louis. Mi, USA).

A contagem das unidades formadoras de colônias foram expressadas em UFC/cm² e foram efetuada por um único examinador calibrado (Kappa=0,8) cego, que não sabia a que grupo correspondiam (Operador 5).

Todos os dentes selados foram fotografados e processados pelo software Image J (imagej.nih.gov/ij/), ajudados com uma sonda periodontal milimétrica. Com o programa calculou-se a porcentagem das faces oclusais ocupadas pelo selante.

Análise Estatística

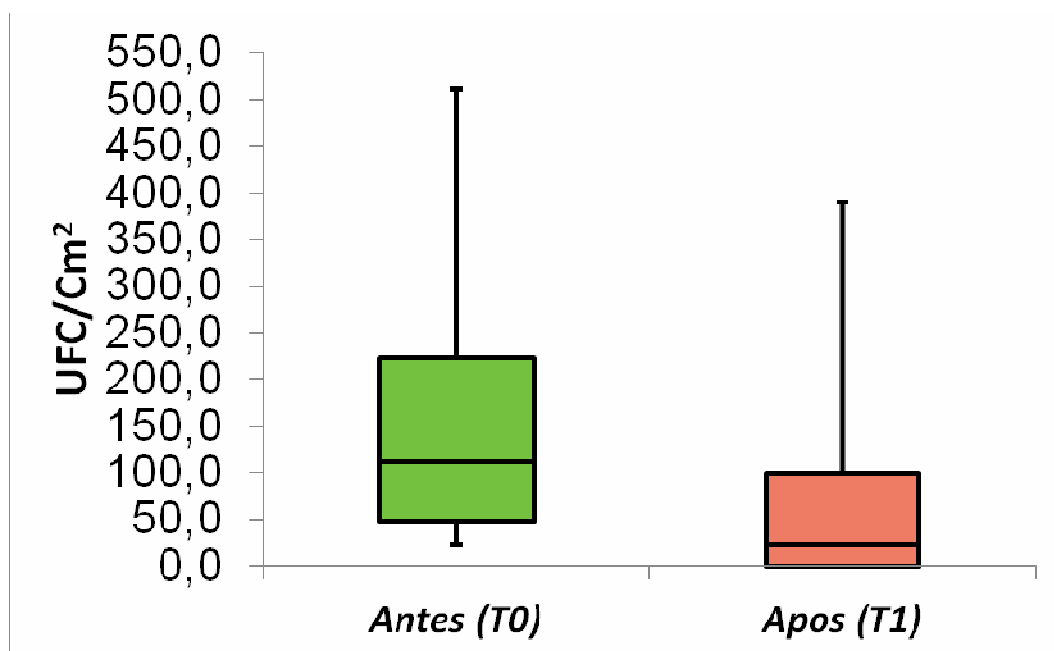
A etapa foi realizada por um operador cego (Operador 6). As análises estatísticas de homogeneidade e normalidade dos dados foi realizado para determinar se as provas foram paramétricos ou não, para isso foi utilizado o teste de Shapiro Wilk ($n < 40$). Para os análises dos dados, utilizou-se teste de Wilcoxon utilizando um nível de significância de 95% com o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows, Versão 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA)

Resultados

sença de *S. mutans* mostraram características macroscópicas e de aderência de *S. mutans*, no caso de teste de coloração Gram positivo e todas as provas bioquímicas foram positivas para *S. mutans*, no teste de rafinose- melibiose (cor amarelo) e esculina (cor preto).

As amostras foram de 38 pacientes sem perdas de pacientes e selantes aos 45 dias depois, com uma media de 23.8 anos. 57,9% (22) molares e 42,1% (16) pré molares. A mediana UFC/cm² para T0 foi 111,00 (±131,73) e T1 foi 22,00 (±78,54) O teste de Shapiro Wilk apresentou uma distribuição não normal (p<0,05). O teste de Wilcoxon para T1 e T0 apresentou diferença estatística significativa (p<0,05) (Gráfico 1)

Gráfico 1: Distribuição de UFC/cm² antes e apos aplicação do selante



Discussão

Neste estudo realizou-se uma comparação em áreas oclusais de fóssulas e fissuras de dentes permanentes na contagem de UFC/cm² de *S. mutans* antes e apos selamento com selante de resina composta, encontrando-se uma diminuição significativa na contagem apos selamento, de maneira que foi aceita nossa hipóteses.

te no quanto à efetividade dos selantes na redução do índices da cárie em crianças e adolescentes¹⁹, porem não tem suficiente informação com relação à magnitude dos benefícios em outras condições²⁰. Portanto, é necessário aportar com informação em outras situações desde um ponto de vista clinico como poderia ser em pacientes adultos de alto risco cariogênico e no caso do presente estudo com relação se tem uma real diminuição de bactérias de *S. mutans* apos colocação de selante. Neste momento só tem um estudo clinico feito por Baca et al. que teve resultados similares nosso estudo. O estudo de Baca¹² foi feito em amostras de saliva no grupos de crianças com e sem cárie, demonstrando que só houve uma diminuição de estreptococos mutans no grupo sem cárie apos aplicação do selante, não obstante o este estudo foi feito com amostras dessas bactérias em saliva e não em dente. No presente estudo foi feito em pacientes de alto risco cariogênico onde antes de fazer a amostragem de selante avaliou-se os parâmetros segundo critérios Ryge eliminando-se o possível potencial de retenção que afetem a contagem de *S. mutans*. Dessa forma as diferencias encontradas antes e apos aplicação de selante podem tem sido principalmente pela influencia do material no dente e em pacientes com condições similares, demonstrando clinicamente que o selante elimina as zonas do dente como fóssulas e fissuras que potencialmente poderiam favorecer a acumulação de *S. mutans*, sendo só uma barreira física no caso de selante sem flúor²¹. Lindquist e Emilson²² têm relatado que as superfícies oclusais com restaurações são capazes de eliminar estas zonas de retenção de biofilme e reduzindo o *S. mutans*, isto foi demonstrado por seu estudo clinico o qual as amostras de biofilme foram coletadas mediante a técnica *toothpick* porem eles descrevem que poderia ter uma sob estimacão na amostragem de *S. mutans*. Por conseguinte nosso estudo pode confirmar as pesquisas previas de forma mais direta na amostragem e confirmar desde um ponto de vista mecânico e talvez químico (selantes com flúor)^{23,24} o selante pode diminuir o risco local o processo da cárie a nível de fóssulas e fissura especialmente se estas são profundas e no paciente de alto risco cariogênico ou de difícil aceso de higiene.

Por outro lado, tem mencionou-se que uma restauração de resina composta poderia ter uma maior retenção de biofilme, já que estudos relatam que a RC poderia estimular a adesão e colonização de bactérias na sua superfície, possivelmente por sua composição química²⁵. Este fenômeno poderia ser explicado pela interação de enzimas da saliva

que provocam uma degradação da matriz dos polímeros da RC, dessa forma aumentando zonas de maior rugosidade num nível microscópico e favorecendo a agregação bacteriana^{26,27}. Em adição estudos têm descrito e explicado a estimulação do desenvolvimento de *S. mutans* em RC, assim relata-se que a degradação dos monômeros por parte do *S. mutans* pode afetar a expressão da glicosiltransferase aumentando a sínteses de glucano²⁵. Apesar de aquele em nosso estudo não pôde ser confirmado e a explicação disto poderia ser principalmente que é muito mais importante na influencia dos níveis de *S. mutans* a presença das fóssulas e fissuras do que o a retenção de biofilme do material mesmo, além posto que os câmbios que poderiam precisar de maior tempo na boca sugerir-se ao futuro fazer um estudo mais a longo prazo, já que este foi feito só numa avaliação e aproximadamente num mês. Por outro lado, seria muito interessante investigar com outro tipos de componentes antibacterianos agregados às resinas compostas em especial no selantes tradicional como o flúor ou novos como ãrganoseleniumò e ãchitosanò que tem mostrado atividade antibacteriana contra *S. mutans*, mas só a nível in vitro^{28,29}.

Finalmente tem sido reconhecido que a cárie é uma doença multifatorial e que há numerosas bactérias envolvidas no processo *S. mutans* pode ser que não seja um fator somente para formação da cárie, incluso questionando-se o verdadeira influencia na cárie³, não obstante o conceito de que o selante e uma barreira mecânica poderia ser extrapolado a outros tipos de bactérias ou microorganismos e no caso de paciente adultos de alto risco cariogênico poderia recomendar-se selar os dentes.

CONCLUSÃO

Com as limitações do estudo, a aplicação de selantes de fóssulas e fissuras em superfícies oclusais de dentes permanente em adultos de alto risco cariogênico reduz significativamente as UFC de *S. mutans* apos 45 dias.

REFERÊNCIAS*

* Referências normas Vancouver do periódico Brazilian Journal of Oral Science.

- nyanan R. Dental caries: A complete changeover (Part II)-Changeover in the diagnosis and prognosis. *J Conserv Dent*. 2009; 12: 87-100.
2. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011; 90: 294-303.
 3. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, et al. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res*. 2013; 47: 89-102.
 4. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005; 33: 248-55.
 5. Khan AU, Islam B, Khan SN, Akram M. A proteomic approach for exploring biofilm in *Streptococcus mutans*. *Bioinformation*. 2011; 5: 440-5.
 6. Kitchens DH. The economics of pit and fissure sealants in preventive dentistry: a review. *J Contemp Dent Pract*. 2005; 6: 95-103.
 7. Crall JJ, Donly KJ. Dental sealants guidelines development: 2002-2014. *Pediatr Dent*. 2015; 37: 111-5.
 8. Biazuz J ZP, Rodrigues-Junior SA. Water sorption, solubility and surface roughness of resin surface sealants. *Braz J Oral Sci*. 2015; 14: 36-40.
 9. Banas JA, Russell RR, Ferretti JJ. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect Immun*. 1990; 58: 667-73.
 10. Spencer P, Ye Q, Misra A, et al. Proteins, pathogens, and failure at the composite-tooth interface. *J Dent Res*. 2014; 93: 1243-9.
 11. Bourbia M, Ma D, Cvitkovitch DG, et al. Cariogenic bacteria degrade dental resin composites and adhesives. *J Dent Res*. 2013; 92: 989-94.
 12. Baca P, Castillo AM, Bravo M, et al. *Mutans streptococci* and *lactobacilli* in saliva after the application of fissure sealants. *Oper Dent*. 2002; 27: 107-11.
 13. Bratthall D, Hänsel Petersson G. Cariogram--a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005; 33: 256-64.
 14. Vildósola P, Zuñiga PS, Fernandez E, de Oliveira Jr OB, Moncada G. Recovering *Streptococcus mutans* overrestorations by the tray technique - a randomized clinical study. *Brazilian Journal Oral Science*. 2013; 12: 292-7.
 15. Simonsen RJ, Neal RC. A review of the clinical application and performance of pit and fissure sealants. *Aust Dent J*. 2011; 56 Suppl 1: 45-58.
 16. Ryge G. Clinical criteria. *Int Dent J*. 1980; 30: 347-58.
 17. Van Palenstein Helderman WH, Ijsseldijk M, Huis in 't Veld JH. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. *Arch Oral Biol*. 1983; 28: 599-603.

on and identification of the viridans streptococci. Clin Microbiol Rev. 1989; 2: 315-28.

19. Splieth CH, Ekstrand KR, Alkilzy M, et al. Sealants in dentistry: outcomes of the ORCA Saturday Afternoon Symposium 2007. Caries Res. 2010; 44: 3-13.
20. Ahovuo-Saloranta A, Forss H, Walsh T, et al. Sealants for preventing dental decay in the permanent teeth. Cochrane Database Syst Rev. 2013; 3: CD001830.
21. Lam A. Increase in utilization of dental sealants. J Contemp Dent Pract. 2008; 9: 81-7.
22. Lindquist B, Emilson CG. Distribution and prevalence of mutans streptococci in the human dentition. J Dent Res. 1990; 69: 1160-6.
23. Kantovitz KR, Pascon FM, Nociti FH, et al. Inhibition of enamel mineral loss by fissure sealant: an in situ study. J Dent. 2013; 41: 42-50.
24. Chestnutt IG, Chadwick BL, Hutchings S, et al. Protocol for "Seal or Varnish?" (SoV) trial: a randomised controlled trial to measure the relative cost and effectiveness of pit and fissure sealants and fluoride varnish in preventing dental decay. BMC Oral Health. 2012; 12: 51.
25. Khalichi P, Singh J, Cvitkovitch DG, Santerre JP. The influence of triethylene glycol derived from dental composite resins on the regulation of Streptococcus mutans gene expression. Biomaterials. 2009; 30: 452-9.
26. Kermanshahi S, Santerre JP, Cvitkovitch DG, Finer Y. Biodegradation of resin-dentin interfaces increases bacterial microleakage. J Dent Res. 2010; 89: 996-1001.
27. Bürgers R, Cariaga T, Müller R, et al. Effects of aging on surface properties and adhesion of Streptococcus mutans on various fissure sealants. Clin Oral Investig. 2009; 13: 419-26.
28. Mahapoka E, Arirachakaran P, Watthanaphanit A, et al. Chitosan whiskers from shrimp shells incorporated into dimethacrylate-based dental resin sealant. Dent Mater J. 2012; 31: 273-9.
29. Tran P, Hamood A, Mosley T, et al. Organo-selenium-containing dental sealant inhibits bacterial biofilm. J Dent Res. 2013; 92: 461-6.

4 DISCUSSÃO FINAL

Na literatura tem diversos estudos de amostragem de microorganismos em superfícies das restaurações e dentes *in vitro*, *in situ* e em menor medida *in vivo*, por conseguinte a principal intenção de nosso estudo foi realizar uma amostragem de *S. mutans* diretamente *in vivo* desde os dentes, restaurações ou selantes, mediante a criação da técnica da moldeira, já que é um desenho mais real do comportamento deste microorganismo na cavidade bucal.

Este foi um estudo baseado principalmente em três partes. A primeira parte permitiu avaliar a técnica da moldeira (TR), sendo capaz de recolher *S. mutans* desde as restaurações e foi correlacionada com as principais técnicas de colheita de *S. mutans* *in vivo* como as amostras de saliva e a colheita de biofilme mediante a técnica de *toothpick*. No caso da saliva a correlação não foi significativa, devido que é conhecido que os níveis de *S. mutans* podem variar entre diferentes restaurações incluso entre o mesmo paciente⁹. Ao contrario, se houve correlação com a técnica de *toothpick* criada por Wallman e Krasse que tem sido utilizada por vários anos, que é considerado um método simples e direto na colheita de biofilme e que não dana as superfícies das restaurações⁶¹. Desta forma a TR pode ser uma técnica não invasiva, de uma impressão direta das superfícies das restaurações da cavidade bucal, sem ser incomoda para ao paciente, mais rápida e simples no quanto ao procedimento laboratoriais com relação aos recursos e logística elimina-se os passos de diluição e semeador prévio.

Nosso estudo tentou procurar a quantidade de adesão de *S. mutans* nas restaurações, devido que o biofilme pode acumular-se em todas as superfícies da boca incluindo os materiais dentários como as resinas compostas e amálgamas⁶². Os principais fatores que tem sido discutido na influência no acúmulo do biofilme nos materiais restauradores são; o aumento da rugosidade superficial, o efeito da interação química e a biodegradação dos materiais^{44,50}. Dessa forma, Moura et al.⁴³ têm sugerido que a quantidade do biofilme e seu potencial cariogênico depende do substrato e que apesar que os materiais restauradores têm acabado e polimento, eles igualmente podem ser afetados pela degradação química da cavidade bucal incrementando dessa forma as

possibilidades de adesão bacteriana e possivelmente o efeito de *S. mutans* nas superfícies e microestruturas poderiam ser material-dependentes²⁸. Este dano nas superfícies das restaurações provocado pelo ambiente da cavidade bucal alguns estudos tem demonstrado que deve-se fundamentalmente ao descenso do pH das bactérias cariogênicas, à ingesta de alimentos ácidos e à ação das enzimas^{65,27}. Esta degradação permite em general um aumento da rugosidade nas superfícies das restaurações promovendo a adesão das bactérias, devido um incremento da área de contato entre a superfície e as bactérias³. Também pode-se mencionar que os materiais podem possuir diferentes propriedades de rugosidade na superfície por seus diferentes composição, dessa forma tendo possivelmente diferentes efeitos na adesão bacteriana⁵⁴.

A degradação das restaurações de qualquer material, somado à infiltração bacteriana que pode suceder entre dente e margem da restauração, possivelmente provoca uma fenda, lugar específico do início da cárie secundária^{13,23,32,57}, onde *S. mutans* tem relatado como uns dos principais agentes etiológicos da cárie, sendo umas das primeiras bactérias que podem habitar no margem interfacial¹⁵. Assim a segunda parte de nosso estudo foi comparar as unidades formadora de colônias de *S. mutans* de restaurações de RC e AM em paciente com similares condições gerais (saudável, risco alto cariogênico) e locais (restaurações alfa segundo critério Ryge), encontrou-se uma diferença significativa no contagem de *S. mutans* em restaurações oclusais de amálgama e resina composta, sendo maior a contagem em RC. Os possível fundamentos de nosso resultado podem ser explicado extensamente na literatura. No caso das RC, desde a década dos 90 têm descrito extensamente e validado até hoje que elas sofrem uma degradação pela ação das enzimas na cavidade bucal e que é inevitável independentemente das formulações, habilidades e técnicas restauradoras das resinas atuais²⁴. Por tanto, tem descrito que o *S. mutans* tem uma alta afinidade pelas resinas compostas incluso tendo um desenvolvimento acelerado em presença delas¹⁰. Em adição é descrito que *S. mutans* pode promover o aumento da rugosidade das superfícies das resinas contribuindo à degradação das resinas e adesivos, principalmente por sua possível atividade esterases^{13,34}. Ao contrario, no caso de AM os fundamentos de uma menor quantidade de *S. mutans* pode ser atribuído à liberação de íons ou elementos tóxicos como o cobre, zinco, mercúrio e prata. A presença de

cobre na amálgama não gama 2 que foi utilizada neste estudo, pode reduzir as bactérias acidogênicas em especial o desenvolvimento de *S. mutans*⁵⁹, assim também o zinco é descrito como um composto que pode provocar câmbios na estrutura proteica e levar uma inibição de enzimas específicas no metabolismo das bactérias ocasionando efeito bacteriostático⁵¹. De acordo com estudos feitos por Bundy et al.¹⁶ o mercúrio da amálgama também pode afetar as bactérias principalmente por sua toxicidade, sendo talvez mais importante que os outros elementos, já que tem descrito - se em alguns artigos que tem uma liberação constante de mercúrio na cavidade bucal expressada em $\mu\text{g}/\text{dia}$ ³⁶. Ao contrário, a prata ainda não tem suficiente evidencia que possa ser liberada e oxidada desde a amálgama em forma constante⁵².

Apesar que vários estudos tem demonstrado um aumento de biofilme nas restaurações de RC versus AM e em adição ainda as RC apresentam maior taxas de cárie secundária comparada com AM⁴², existem diversas dúvidas. Por exemplo se pode relatar no caso da amálgama, se aqueles elementos inibitórios bacterianos são liberados no ambiente bucal de maneira que possa provocar sempre o mesmo efeito, e por outro lado se existe uma clara certeza de que eles podem alcançar uma concentração mínima inibitória sem interferências. Por exemplo, um estudo de Padovani et al.⁴⁸ in situ no prazo de 7 dias não encontraram diferenças no quanto a quantidade de biofilme em amálgama e resina composta explicando que pode haver uma possível interferência na liberação dos produtos pela diluição dos íons na película adquirida e saliva, além como foi relatado por outros autores da possibilidade de interação das enzima liberadas por outras bactérias do biofilme^{2,29,63}. Outra causa de interferência poderia ser a formação e composição da película adquirida, que pode modificar as superfícies dos diferentes materiais restauradores⁴.

Portanto, o biofilme quanto a seu comportamento tem a possibilidade de sofrer variados câmbios na cavidade bucal, possivelmente sendo afetados por outros fatores tais como a dieta e a complexa relação com a microbiota bucal, além de fatores anexos do meio ambiente bucal que pudessem ser modificados por uma alta variabilidade inter e intraindividual²⁹. Por consequência, um ponto importante para futuras pesquisas é o desenvolvimento de novos materiais, talvez com atividade antimicrobiana⁵⁴ que possam entregar uma maior proteção frente à cárie dentária incrementando a longevidade das

restaurações, é um entendimento mais profundo dos mecanismos por os quais as propriedades locais das superfícies dos materiais e o câmbio do ambiente bucal podem modular as respostas fisiológicas e de adesão das bactérias.

No caso da terceira parte de nosso estudo foi comparar as UFC de *S. mutans* antes e após aplicação de selante em fóssulas e fissura em dentes permanentes. Apesar que atualmente tem evidência suficiente no quanto à efetividade dos selantes na redução do índices da cárie em crianças e adolescentes⁵⁶, ainda não tem suficiente informação com relação à magnitude dos benefícios em outras condições¹. Portanto, foi necessário aportar com informação em outras situações desde um ponto de vista clínico como poderia ser em pacientes adultos de alto risco cariogênico e no caso do presente estudo com relação se há uma real diminuição de bactérias de *S. mutans* após colocação de selante. Dessa forma, até momento o único estudo clínico similar foi feito por Baca et al.⁶ com resultados similares. Nesse estudo também houve diminuição de *S. mutans* no grupo sem cárie após aplicação do selante, não obstante o este estudo foi feito com amostras dessas bactérias em saliva e não em dente. No presente estudo foi feito em pacientes de características gerais similares (adultos, saudável com alto risco cariogênico) no mesmo dente com selantes avaliado alfa segundo critérios Ryge eliminando-se o possível potencial de retenção de *S. mutans*. Dessa forma, demonstrou-se clinicamente que o selante elimina as zonas do dente como fóssulas e fissuras que potencialmente poderiam favorecer a acumulação de *S. mutans*, sendo só uma barreira física no caso de selante sem flúor³⁷. Lindquist e Emilson³⁸ têm relatado que as restaurações são capazes de eliminar estas zonas de retenção de biofilme e assim reduzir o *S. mutans*, como foi demonstrado em seu estudo, o qual as amostras de biofilme foram coletadas mediante a técnica "toothpick" porém eles descrevem que poderia ter uma subestimação na amostragem de *S. mutans*. Por conseguinte nosso estudo poderia confirmar as pesquisas prévias de forma mais direta na amostragem desde um ponto de vista mecânico^{20,30} podendo ser o selante um fator relevante na diminuição do risco local no processo da cárie a nível de fóssulas e fissura em especial se estas são profundas e no paciente de alto risco cariogênico ou de difícil acesso de higiene.

e que uma restauração ou selante de resina composta poderia ter uma maior retenção de biofilme, já que estudos relatam que a RC poderia estimular a adesão e colonização de bactérias na sua superfície, como foi explicado

previamente³³. Este fenômeno é devido à ação das esterases, que provocam uma degradação da matriz das RC aumentando sua rugosidade num nível microscópico^{18,32}. Apesar de aquele, em nosso estudo de comparação do selante no mesmo dente não pôde ser confirmado, devido a principalmente dois razões; as fóssulas e fissuras são superfícies anatômicas de alta retenção de biofilme e a aplicação de um material aplicado sob elas reduz significativamente seus níveis³⁸, e a segunda razão é que este estudo foi feito numa avaliação de aproximadamente no mês e possivelmente o selante para poder ter um cambio na sua superfície precisa de tempo mais longo para acrescentar o biofilme de *S. mutans*. Por esta mesma razão, podemos sugerir a futuro fazer uma comparação no tempo de adesão de *S. mutans* no mesmo paciente entre restaurações de RC e selantes.

Como as limitações do estudo temos que a TR só pode ser feita em superfícies oclusais e tem outras zonas do dente como as proximais que seria muito interessante ter conhecimento de adesão e acúmulo de biofilme. Outra limitação de nosso estudo é que foi feito só com uma cepa bacteriana, por tanto seria necessário realizar outros tipos de estudos com diferentes cepas de bactérias, em virtude de que na atualidade o processo de cárie, variados microorganismos podem estar envolvidos e que o biofilme é complexo, onde as interação das bactérias podem mudar o comportamento e expressão genética de cada cepa, podendo modificar sua ação nos tecidos dentários⁴⁵.

À luz de nosso resultado poderia sugerir-se que naqueles pacientes com alto risco cariogênico seria mais recomendável indicar uma restaurações de AM em dentes posteriores, assim ajudando a diminuir o potencial risco de cárie secundária. Não obstante, nesta época a AM esta sendo retirada progressivamente pelas políticas recomendadas na convenção de Minamata e sendo cada vez mais limitada como alternativa como tratamento em restaurações⁶⁴. Porém, nosso tipo de estudo e em especial a técnica da moldeira, seria ainda mais interessante de fazer com relação a desenvolvimento de novos materiais de resina composta ou selante que tenham elementos antimicrobianos e que até momento têm um alto progresso em etapas in vitro, mas não têm evidência desde ponto de vista in vivo ou clínico.

o processo de saúde ao estado de doença da cárie depende de vários parâmetros relacionado com o hospedeiro, dieta e biofilme e que ainda não tem completa certeza que fatores são mais relevantes, por tanto é necessário avançar ao futuro em criar novos níveis de conhecimento e integrar los para desenvolver as melhores estratégias de prevenção e no caso de ter dano do tecido dentário, restaurações que possam incrementar sua longevidade.

5 CONCLUSÃO

A técnica da moldeira pode colher e recuperar unidades formadoras de colônias de *S. mutans* desde as superfícies oclusais de restaurações dentárias, tendo uma correlação positiva com a técnica *toothpick* dessa forma TR pode ser considerada como um método não invasivo direto, simples e rápido do que TT e saliva.

Em pacientes adultos de alto risco cariogênico as restaurações de RC oclusais amostram maior contagem de UFC de *S. mutans* do que AM mediante a técnica da moldeira. Estes resultados poderiam sugerir que aqueles pacientes seria mais recomendável indicar uma restaurações de AM em dentes posteriores, ajudando a diminuir o potencial risco de cárie secundária.

A aplicação de selantes de fósulas e fissuras em superfícies oclusais de dentes permanente em adultos de alto risco cariogênico reduz significativamente as UFC de *S. mutans* apos 45 dias.

REFERÊNCIAS*

1. Ahovuo-Saloranta A, Forss H, Walsh T, Hiiri A, Nordblad A, Mäkelä M et al. Sealants for preventing dental decay in the permanent teeth. *Cochrane Database Syst.* 2013; 28(3): CD001830. doi: 10.1002/14651858.CD001830.pub4
2. Al-Naimi OT, Itota T, Hobson RS, McCabe JF. Fluoride release for restorative materials and its effect on biofilm formation in natural saliva. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19(3):1243-8.
3. Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazson M, Liley M, Ploux L. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater.* 2010; 6(10):3824-46.
4. Aroonsang W, Sotres J, El-Schich Z, Arnebrant T, Lindh L. Influence of substratum hydrophobicity on salivary pellicles: organization or composition? *Biofouling.* 2014; 30(9):1123-32.
5. Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110(1):48-53.
6. Baca P, Castillo AM, Bravo M, Junco P, Baca AP, Llodra JC. Mutans streptococci and lactobacilli in saliva after the application of fissure sealants. *Oper Dent.* 2002; 27(2):107-11.
7. Banas JA, Russell RR, Ferretti JJ. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect Immun.* 1990; 58(3):667-73.
8. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005; 33(4):248-55.
9. Bentley CD, Broderius CA, Drake CW, Crawford JJ. Relationship between salivary levels of mutans streptococci and restoration longevity. *Caries Res.* 1990; 24(4):298-300.
10. Beyth N, Bahir R, Matalon S, Domb AJ, Weiss EI. *Streptococcus mutans* biofilm changes surface-topography of resin composites. *Dent Mater.* 2008; 24(6):732-6.
11. Biazuz JZ, Rodrigues-Junior SA. Water sorption, solubility and surface roughness of resin surface sealants. *Braz J Oral Sci.* 2015; 14(1):36-40.
12. Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B. Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro. *Caries Res.* 2002; 36(2):101-7.
13. Bourbia M, Ma D, Cvitkovitch DG, Santerre JP, Finer Y. Cariogenic bacteria degrade dental resin composites and adhesives. *J Dent Res.* 2013; 92(11):989-94.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

Iljani M, Cochis A, Arciola CR, Rimondini L. Biofilm formation on composite resins for dental restorations: an in situ study on the effect of chlorhexidine mouthrinses. *Int J Artif Organs*. 2012; 35(10):792-9.

15. Buchmann G, Klimm W, Gabert A, Edelmann J. Detection of microecological phenomena in filled teeth.I. Phenomena in gap between restoration and cavity wall. *Microb Ecol Health Dis*.1990; 3(2):51-7.

16. Bundy KJ, Butler MF, Hochman RF. An investigation of the bacteriostatic properties of pure metals. *J Biomed Mater Res*. 1980; 14(5):653-63.

17. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res*. 2010; 89(7):657-65.

18. Bürgers R, Cariaga T, Müller R, Rosentritt M, Reischl U, Handel G, et al. Effects of aging on surface properties and adhesion of *Streptococcus mutans* on various fissure sealants. *Clin Oral Investig*. 2009; 13(4):419-26.

19. Carounanidy U, Sathyanarayanan R. Dental caries: a complete changeover (Part II)-Changeover in the diagnosis and prognosis. *J Conserv Dent*. 2009; 12(3):87-100.

20. Chestnutt IG, Chadwick BL, Hutchings S, Playle R, Pickles T, Liles C, et al. Protocol for "Seal or Varnish?" (SoV) trial: a randomised controlled trial to measure the relative cost and effectiveness of pit and fissure sealants and fluoride varnish in preventing dental decay. *BMC Oral Health*. 2012; 20(12):51-63.

21. Coogan MM, Mackeown JM, Galpin JS, Fatti LP. Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity. *J Dent*. 2008; 36(11):892-9.

22. Crall JJ, Donly KJ. Dental sealants guidelines development: 2002-2014. *Pediatr Dent*. 2015; 37(2):111-5.

23. de Gee AJ, Wendt SL, Werner A, Davidson CL. Influence of enzymes and plaque acids on in vitro wear of dental composites. *Biomaterials*. 1996; 17(13):1327-32.

24. Delaviz Y, Finer Y, Santerre JP. Biodegradation of resin composites and adhesives by oral bacteria and saliva: a rationale for new material designs that consider the clinical environment and treatment challenges. *Dent Mater*. 2014; 30(1):16-32.

25. Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *J Oral Rehabil*. 2004; 31(3):278-85.

26. Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dent Mater*. 2011; 27(1):29-38.

27. Finer Y, Santerre JP. The influence of resin chemistry on a dental composite's biodegradation. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 69(2):233-46.

- brinho LC, Sinhoreti MA, Puppini-Rontani RM. The influence of 30-day-old *Streptococcus mutans* biofilm on the surface of esthetic restorative materials--an in vitro study. *J Dent*. 2008; 36(10):833-9.
29. Hannig C, Basche S, Burghardt T, Al-Ahmad A, Hannig M. Influence of a mouthwash containing hydroxyapatite microclusters on bacterial adherence in situ. *Clin Oral Investig*. 2013; 17(3):805-14.
30. Kantovitz KR, Pascon FM, Nociti FH, Tabchoury CP, Puppini-Rontani RM. Inhibition of enamel mineral loss by fissure sealant: an in situ study. *J Dent*. 2013; 41(1):42-50.
31. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015; 94(5):650-8.
32. Kermanshahi S, Santerre JP, Cvitkovitch DG, Finer Y. Biodegradation of resin-dentin interfaces increases bacterial microleakage. *J Dent Res*. 2010; 89(9):996-1001.
33. Khalichi P, Cvitkovitch DG, Santerre JP. Effect of composite resin biodegradation products on oral streptococcal growth. *Biomaterials*. 2004; 25(24):5467-72.
34. Khalichi P, Singh J, Cvitkovitch DG, Santerre JP. The influence of triethylene glycol derived from dental composite resins on the regulation of *Streptococcus mutans* gene expression. *Biomaterials*. 2009; 30(4):452-9.
35. Kitchens DH. The economics of pit and fissure sealants in preventive dentistry: a review. *J Contemp Dent Pract*. 2005; 6(3):95-103.
36. Koral SM. Mercury from dental amalgam: exposure and risk assessment. *Compend Contin Educ Dent*. 2013; 34(2):138-40.
37. Lam A . Increase in utilization of dental sealants. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 9(3):81-7.
38. Lindquist B, Emilson CG. Distribution and prevalence of mutans streptococci in the human dentition. *J Dent Res*. 1990 69(5):1160-6.
39. Lynch CD, Opdam NJ, Hickel R, Brunton PA, Gurgan S, Kakaboura A et al. Guidance on posterior resin composites: Academy of Operative Dentistry - European Section. *J Dent*. 2014; 42(4):377-83.
40. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*. 2013; 92(7):592-7.
41. Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Surface antibacterial properties of packable resin composites: part I. *Quintessence Int*. 2004; 35(3):189-93.

, Santos GO. Amalgam and resin composite longevity or posterior restorations: a systematic review and meta-analysis. J Dent. 2015 Jun 24. [Epub ahead of print].

43. Moura JS, Lima EM, Paes Leme AF, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Effect of luting cement on dental biofilm composition and secondary caries around metallic restorations in situ. Oper Dent. 2004; 29(5):509-14.

44. Nascimento C, Pita MS, Fernandes FH, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. Clin Oral Implants Res. 2014; 25(3):337-43.

45. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. Caries Res. 2013; 47(2):89-102.

46. Opdam NJ, van de Sande FH, Bronkhorst E, Cenci MS, Bottenberg P, Pallesen U, et al. Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. J Dent Res. 2014; 93(10):943-9.

47. Orstavik D. Antibacterial properties of and element release from some dental amalgams. Acta Odontol Scand. 1985; 43(4):231-9.

48. Padovani GC, Fúcio SB, Ambrosano GM, Correr-Sobrinho L, Puppim-Rontani RM. In situ bacterial accumulation on dental restorative materials. CLSM/COMSTAT analysis. Am J Dent. 2015; 28(1):3-8.

49. Park JH, Tanabe Y, Tinanoff N, Turng BF, Lilli H, Minah GE. Evaluation of microbiological screening systems using dental plaque specimens from young children aged 6-36 months. Caries Res. 2006; 40(3):277-80.

50. Rüttermann S, Trellenkamp T, Bergmann N, Raab WH, Ritter H, Janda R. A new approach to influence contact angle and surface free energy of resin-based dental restorative materials. Acta Biomater. 2011; 7(3):1160-5.

51. Shashibhushan KK, Basappa N, Subba Reddy VV. Comparison of antibacterial activity of three fluorides- and zinc-releasing commercial glass ionomer cements on strains of mutans streptococci: an in vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2008; 26 Suppl 2: S56-61.

52. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. FEMS Microbiol Rev. 2003; 27(2-3):341-53.

53. Simecek JW, Diefenderfer KE, Cohen ME. An evaluation of replacement rates for posterior resin-based composite and amalgam restorations in U.S. Navy and marine corps recruits. J Am Dent Assoc. 2009; 140(2):200-9.

54. Song F, Koo H, Ren D. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. J Dent Res. 2015; 94(8):1027-34.

65. Gonçalves SE, Laurence JS. Proteins, pathogens, and failure at the composite-tooth interface. *J Dent Res*. 2014; 93(12):1243-9.
56. Splieth CH, Ekstrand KR, Alkilzy M, Clarkson J, Meyer-Lueckel H, Martignon S et al. Sealants in dentistry: outcomes of the ORCA Saturday Afternoon Symposium 2007. *Caries Res*. 2010; 44(1):3-13.
57. Svanberg M, Mjör IA, Orstavik D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *J Dent Res*. 1990; 69(3):861-4.
58. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011; 90(3):294-303.
59. Tegginmani VS, Goel B, Uppin V, Horatti P, Kumar LS, Nainani A. Comparison of antibacterial activity of glass-ionomer cement and amalgam in class two restorations by *Streptococcus mutans* count analysis at fixed intervals: an in vivo study. *J Contemp Dent Pract*. 2013; 14(3):381-6.
60. Wallman C, Krasse B. Mutans streptococci in margins of fillings and crowns. *J Dent*. 1992; 20(3):163-6.
61. Wallman C, Krasse B. A simple method for monitoring mutans streptococci in margins of restorations. *J Dent*. 1993; 21(4):216-9.
62. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dental materials with antibiofilm properties. *Dent Mater*. 2014; 30(2):e1-16.
63. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater*. 2007; 23(3):343-62.
64. Wong TC, Eiselé JL. FDI World Dental Federation: responding to new realities of oral health. *J Dent Res*. 2015; 94(4):519-21.
65. Yap AU, Lim LY, Yang TY, Ali A, Chung SM. Influence of dietary solvents on strength of nanofill and ormocer composites. *Oper Dent*. 2005; 30(1):129-33.



CARTA CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO PRI-ODO

Santiago, 23 de diciembre de 2011

DIFO N° 0264 – 2011
Mat. Asignación Código PRI-ODO

Señor
Prof. Dr. Patricio Vildósola Grez
Departamento de Odontología Restauradora
PRESENTE

Estimado doctor Vildósola:

Me permito informar a usted que con fecha de registro de inscripción:

Santiago, 23 de diciembre de 2011

se ha recepcionado el documento; Proyecto de Investigación titulado:

"Recuento de UFC de Streptococcus Mutans sobre Restauraciones Dentarias Mediante Técnica de Cubeta".

del (la) Investigador(a) Responsable:

Prof. Dr.(a): Patricio Vildósola Grez
Departamento: Ciencias Básicas y Comunitarias

y de los co- investigadores:

- 1) Prof. Dra.: Claudia Letelier Pardo, Investigador Alterno
Departamento: Odontología Restauradora
- 2) Prof. Dr.: Gustavo Moncada Cortés, Co Investigador
Departamento: Odontología Restauradora
- 3) Prof. Dr.: Javier Martín Casielles, Co Investigador
Departamento: Odontología Restauradora
- 4) Prof. Dra.: Patricia Palma Fluxa
Departamento: Patología, Área Microbiología

Dicho proyecto ha recibido el siguiente código de inscripción en la Dirección de Investigación:

1	PRI-ODO	Año 2011	N° 11 - 02
---	---------	----------	------------



Este proyecto cuenta con:

1. Carta del Director de Departamento (Inv. Responsable)	SI	No
2. Certificado de aprobación del Comité de Ética de la Facultad	SI	No
3. Certificado de aprobación del Comité de Bioseguridad	SI	No

A partir de la fecha de registro de este proyecto, se deberá considerar el periodo de duración del mismo, por lo tanto el día:

Fecha entrega Informe Final:	23 de diciembre de 2013
------------------------------	-------------------------

Usted deberá hacer llegar a la Dirección de Investigación el Informe final del proyecto en el formulario ad-hoc.

Para obtener el formulario de informe final de proyecto, visite la página Web de la Facultad y el enlace de investigación: <http://odontologia.uchile.cl/investigación/formularios>.

Saluda atentamente a Ud.,


Prof. Dra. BLANCA URZÚA ORELLANA
Directora de Investigación
Facultad de Odontología
UNIVERSIDAD DE CHILE



Distribución:

Copia: Prof. Dra. Claudia Letelier Pardo Investigador Alterno
Prof. Dr. Gustavo Moncada Cortés Co Investigador
Prof. Dr. Javier Martín Casielles Co Investigador
Prof. Dra. Patricia Palma Fluxa Co Investigador
Prof. Dr. Gustavo Moncada Cortés Director Dpto. Odontología Restauradora
Archivo
BUO / cmg



21/12/2011

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2011/17

1. **Acta De Aprobación De Protocolo De Estudio N° 2011/07.**
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

Srta. Valentina Fajreldin Miembro permanente del CE	Dr. Juan Cortés Presidente del CE
Dr. Alejandro Escobar Miembro permanente del CE	Dra. Ximena Lee Miembro permanente del CE
Dra. María Angélica Torres Secretaría del CE	Dr. Eduardo Rodríguez Y. Miembro permanente del CE
3. **Fecha d Aprobación:** 30/11/2011
4. **Título completo del proyecto:** "Recuento de UFC de Streptococcus Mutans sobre restauraciones dentarias mediante técnica de cubeta" Proy. PriOdo 2010
5. **Investigador responsable:** Dr. Patricio Vildósola
6. **Institución:** Departamento de Odontología Restauradora. Facultad de Odontología, Universidad de Chile
7. **Documentación Revisada:**
 - **CV del Investigador principal** y de los Coinvestigadores
 - **Formulario de Consentimiento Informado (CI) en español para el proyecto:** "Recuento de UFC de Streptococcus Mutans sobre restauraciones dentarias mediante técnica de cubeta" Proyecto Pri-Odo 2010.
8. **Carácter de la población:** 40 Pacientes mayores de 18 años que consultan y son atendidos para restauraciones de amalgamas o resinas y cumplen los criterios de inclusión, en la clínica de Operatoria durante los años 2010-2011.

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

9. Fundamentación de la aprobación:

La cantidad de microorganismos, particularmente de *Streptococcus mutans* (S. mutans), es uno de los factores más importantes en el riesgo de desarrollar caries dental, particularmente las caries secundarias bajo restauraciones, siendo el principal factor de fracaso de tratamientos odontológicos. La identificación y cuantificación de S. mutans en la placa bacteriana dental principalmente sobre obturaciones resulta un importante medio de determinación del riesgo cariogénico y su correspondiente enfoque preventivo sobre piezas restauradas. Pero los métodos de análisis microbiológicos disponibles no permiten evaluar la susceptibilidad individual de caries en cada pieza dentaria, muchas veces sobreestimando los niveles de S. mutans, e impidiendo tomar medidas preventivas de manera local. Este proyecto propone evaluar un método para la aislación y recuento de UFC de S. mutans por cm² sobre dientes sanos y/o restaurados denominado "Técnica de Cubeta", el cual es mas simple, rápido, económico y directo, que los métodos tradicionales y tiene la gran ventaja de dejar de lado posibles sesgos por parte del operador en el momento de la toma de muestras ya que el operador en ningún momento manipula algún instrumento.

Este comité ha considerado que el balance entre riesgos y beneficios en este proyecto es pertinente y se ha guardado la voluntad y autonomía de los pacientes para participar en el estudio mediante un consentimiento informado, el cual ha sido evaluado y aprobado por este comité. Este proyecto ha mostrado una línea con las pautas éticas de investigación en seres humanos (Helsinki y CIOM).

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, APRUEBA el estudio: "Recuento de UFC de *Streptococcus Mutans* sobre restauraciones dentarias mediante técnica de cubeta" Proy. PriOdo 2010, bajo la supervisión del Dr. Patricio Vildósola, como Investigador Principal.

Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si fuera necesario.


Dr. Juan Cortés
Presidente del CE



C/c.: Investigador Principal. Y Secretaria C.E.C.

Fecha de Edición: 15 Septiembre de 2011

Nombre del Paciente: é

La obtención de la muestra se llevara a cabo presionando suavemente por un minuto esta cubetilla sobre sus piezas

Lugar donde se realizará la intervención.

El Procedimiento se llevará a cabo durante Operatoria Clínica de 4to año, ubicada en la Clínica Odontológica de la Facultad de Chile, cuya dirección es Av. La Paz 750, comuna de Independencia. Durante los lunes de 8 horas a 13 horas y los miércoles de 14 horas a 17 horas.

Riesgo de la Investigación.

Usted no correrá ningún riesgo mediante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que el material gelatinoso de la cubetilla sólo entrará en contacto con su pieza dentaria, la cual tampoco sufría daño alguno debido a que la presión ejercida es mínima y el material no es perjudicial para la misma.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- Las muestras obtenidas serán de exclusiva utilización para este estudio.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores, para esto, no se utilizará sus nombres sino un sistema de código que enumerará las muestras.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado /a y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
6. Además de esta información que he recibido, seré informado/a en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
7. Autorizo a usar mi caso para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO BENEFICIO

- Nombre del Paciente: _____
- RUT: _____
- Firma: _____
- Fecha: _____

- Nombre Testigo : _____
- RUT: _____
- Firma: _____
- Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

En caso de cualquier duda puede acudir a Av. La Paz 571, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Área de Operatoria Dental los días Lunes de 8 a 13 horas o Miércoles de 14 a 19 horas o comunicarse con Patricio Vildósola a los números 3152281 o 07-8873845

En caso que Usted tenga cualquier otro tipo de duda con respecto al proyecto en el cual participara puede dirigirse al Señor Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile Dr. Juan Cortés con dirección en Sergio Livingstone 943 comuna Independencia.



Universidad de Chile
Facultad de Odontología
Departamento de Odontología Restauradora, Operatoria Clínica 4º año.
Departamento Patología Área de Microbiología Bucal

Fecha de Edición: 20 de Agosto de 2012

Consentimiento Informado

Título del Protocolo: Estudio comparativo in vivo de recuento de *Streptococcus mutans* antes y después de la aplicación de sellante, utilizando el Método de la Cubetaò

Investigador Principal: Prof. Dr. Patricio Vildósola

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile ï Olivos 943 ï Santiago.

Nombre del Paciente: é

Yo Patricio Vildósola Grez docente de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación acerca la bacteria que produce la *caries*, la cual es una de las enfermedades de mayor frecuencia en la población humana. Le proporcionaré información y lo invitaré a ser parte de ella. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de hacerlo puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido la Investigación y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la Investigación, Objetivo de la Investigación, Tipo de Intervención y procedimiento, Beneficios y Riesgos Asociados a la Investigación y Aclaraciones.

Justificación de la Investigación

La caries dental es uno de los principales problemas de salud bucal a nivel mundial, afectando entre el 60% a 90% de la población escolar y a la gran mayoría de los adultos. Su origen es infeccioso y se asocia con la presencia de altas poblaciones de bacterias adheridas sobre los dientes. La bacteria más relacionada con esta enfermedad es el *Streptococcus mutans*, la cual tiene la capacidad de transformar los azúcares que comemos en ácidos que debilitan nuestros dientes, facilitando a que la caries se instale sobre ellos. Es importante considerar que esta bacteria no solo produce caries en dientes sanos sino también en dientes con obturaciones (tapaduras) y sellantes, siendo la principal causa de los fracasos de estos tratamientos.

Para el estudio de esta bacteria se recogerán muestras tanto de la superficie de los dientes antes de ser sellados, como después de la aplicación del sellante. Esta información, en conjunto con el conocimiento de hábitos de higiene y de alimentación, sirve para predecir el riesgo de contraer futuras caries como de asegurar el éxito de futuros tratamientos odontológicos.

Objetivo de la Investigación

La presente investigación tiene por objetivo Determinar las diferencias en el recuento de unidades formadoras de colonias por cm² de *Streptococcus mutans* en las superficies oclusales de dientes posteriores permanentes, antes y después de la aplicación de un sellante de resina.

Beneficio de la Investigación.

Usted tendrá el beneficio de poder someterse a un examen de salud bucal donde podrá conocer el estado actual de boca, y evaluar así la necesidad de posibles tratamientos.

Aprenderá una correcta técnica de higiene en relación a su edad y condición psicomotora.

Conocerá la cantidad *Streptococcus mutans* que usted posee, lo que nos permitirá dirigir terapias preventivas y futuros tratamientos según su riesgo individual, permitiendo así un menor porcentaje de fracasos.

Tipo de Intervención y Procedimiento.

En una primera sesión un examen bucal y se le enseñara una técnica

Para la toma de muestras de placa dental, se utilizará una cubetilla, que es una especie de receptáculo pequeño, del ancho y largo de una pieza dentaria, que en su interior contiene una gelatina que permite la adherencia y crecimiento de la bacteria en estudio.

La obtención de la muestra se llevara a cabo presionando suavemente por un minuto esta cubetilla sobre sus piezas dentarias. Se tomarán dos muestras con esta cubetilla, una en la pieza sana, antes de la aplicación del sellante, y otra 4 semanas después de la aplicación del sellante. Para la aplicación del sellante se realizará una limpieza en el diente a estudiar con una escobilla y pasta profiláctica, luego se grabará la superficie oclusal del diente con ácido ortofosfórico al 37% para luego proceder a la aplicación del sellante de resina.

Luego de la toma de muestra final, serán selladas todas las otras piezas en boca que tengan indicación de sellante.

Lugar donde se realizará la intervención.

El Procedimiento se llevará a cabo durante Operatoria Clínica de 4to año, ubicada en la Clínica Odontológica de la Facultad de Chile, cuya dirección es Av. La Paz 750, comuna de Independencia. Durante los lunes de 8 horas a 13 horas y los miércoles de 14 horas a 17 horas.

Riesgo de la Investigación.

Usted no correrá ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación, debido a que el material gelatinoso de la cubetilla sólo entrará en contacto con su pieza dentaria, la cual tampoco sufrirá daño alguno debido a que la presión ejercida es mínima y el material no es perjudicial para la misma.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención
- Si usted lo decide, puede retirarse cuando lo desee.
- Las muestras obtenidas serán de exclusiva utilización para este estudio.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores, para esto, no se utilizará sus nombres sino un sistema de código que enumerará las muestras.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

a de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

8. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
9. He sido informado /a y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
10. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
11. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
12. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
13. Además de esta información que he recibido, seré informado/a en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
14. Autorizo a usar mi caso para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO BENEFICIO

- Nombre del Paciente, Tutor o Representante Legal: _____
- RUT: _____
- Firma: _____
- Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

- Nombre del Investigador Principal: _____
- Firma: _____
- Fecha: _____

En caso de cualquier duda puede acudir a Av. La Paz 571, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Área de Operatoria Dental los días Lunes de 8 a 13 horas o Miércoles de 14 a 19 horas o comunicarse con Natalia Acuña al números 7-9473022

dução ao português para teses doutorado dos artigos publicados.


Patricio Vildosola Grez <patovildo@gmail.co...>
 3 ago. (Hace 3 días.)
 



para Secretaria

Dear Brazilian Journal Oral Science:
I want to request permission of the articles published in your journal to be translated to Portuguese and it can be published as my doctoral thesis.

1. "Is there difference of Streptococcus mutans count and adherence on amalgam and resin occlusal restorations? A blind clinical study" Patricio Vildosola, Eduardo Fernandez, Patricia Palma, Gustavo Moncada, Jose Roberto Cury Saad, Javier Martin
Brazilian Journal of Oral Sciences 03/2015; 14(1):5

2. "Recovering Streptococcus mutans over restorations by the tray technique: a randomized clinical study" Patricio Vildósola Grez, Patricia Palma Fluxa, Paula Zuñiga Saavedra, Eduardo Fernandez Godoy, Osmir Batista de Oliveira Junior, Gustavo Moncada Cortés Brazilian Journal of Oral Sciences 12/2013; 12(4):292-297.

Sincerely

Dr.Patricio Vildósola G.

Personas (2)
 Secretaria - Braz J ...
 Agregar a círculos

 Mostrar detalles


Secretaria - Braz J Oral Sci
5 ago. (Hace 1 día.)
 



para mí

Dear Dr.Patricio Vildósola G.,

The article can be translated to Portuguese long as it is quoted that was originally published in Brazilian Journal Oral Science and English.

Please inform the institution in which it will present the thesis and it will be in Portuguese?

Thank you for your attention.

Sincerely,
Secretary
Brazilian Journal of Oral Sciences
E-mail: brjorals@fop.unicamp.br
Site: <http://www.fop.unicamp.br/brjorals>

 Personas (2)
 Secretaria - Braz J ...
 Agregar a círculos

 Mostrar detalles


Secretaria - Braz J Oral Sci
5 ago. (Hace 1 día.)
 



para mí

Dear Dr.Patricio Vildósola G.,

The article can be translated to Portuguese long as it is quoted that was originally published in Brazilian Journal Oral Science and English.

Please inform the institution in which it will present the thesis and it will be in Portuguese?

Thank you for your attention.

Sincerely,
Secretary
Brazilian Journal of Oral Sciences
E-mail: brjorals@fop.unicamp.br
Site: <http://www.fop.unicamp.br/brjorals>

 Personas (2)
 Secretaria - Braz J ...
 Agregar a círculos

 Mostrar detalles



Autorizo a reprodução deste trabalho

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 15 de Setembro de 2015

PATRICIO AGUSTIN VILDÓSOLA GREZ