



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

LETÍCIA GRILO DE SOUZA

**RELAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA E
QUANTIDADE DE ENDOTOXINAS COM A
SINTOMATOLOGIA DOLOROSA DE PULPITE REVERSÍVEL
EM LESÕES CARIOSAS PROFUNDAS**

2016

LETÍCIA GRILO DE SOUZA

**RELAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA E QUANTIDADE DE
ENDOTOXINAS COM A SINTOMATOLOGIA DOLOROSA DE PULPITE
REVERSÍVEL EM LESÕES CARIOSAS PROFUNDAS**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área dentística.

Orientador: Prof. Dr Eduardo Bresciani

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

São José dos Campos

2016

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr Eduardo Bresciani (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof Dr João Maurício Ferraz da Silva

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. César Rogério Pucci

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 19 de janeiro de 2016.

.

Dedicatória

Aos meus pais Sônia Mara de Souza e Antônio Marcio Grilo de Souza e meu irmão Luiz Otávio Grilo de Souza pelo apoio incondicional em todos os momentos. A vocês devo todas minhas conquistas!!

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por sempre me abençoar e dar coragem e força de vontade para prosseguir mesmo diante dos obstáculos.

À **minha família** por todo amor, apoio e compreensão.

Ao meu orientador **Prof Dr Eduardo Bresciani**, obrigada pela confiança e por toda atenção durante esses dois anos. Obrigada ainda por dividir seus ensinamentos, aperfeiçoando meus estudos com sua grande experiência e competência.

Aos **Professores da disciplina de Dentística** pela contribuição na minha formação acadêmica e pelos ensinamentos transmitidos.

À **UNESP** – Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, antiga Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Prof^a. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa da coordenador Prof. Adj Alexandre Luiz Souto Borges.

À **Universidade de Guarulhos**, Prof^a Luciene Figueiredo e a técnica Izilvânia Barreto por toda ajuda e disposição na realização do teste microbiológico.

A Prof^a **Dra Luciane Dias de Oliveira** e ao Aluno de Doutorado **Felipe** por toda ajuda e paciência nos ensaios clínicos de endotoxinas.

Aos amigos de Pós Graduação que se tornaram amigos para a vida: **Debora, Ingrid, Marina, Cassia, Lucas, Juliana**, por todos esses de anos de convívio e amizade, que tornaram essa dura caminhada muito mais agradável.

As técnicas **Fernanda** e **Josiana**, que se tornaram muito especiais pelas quais terem sempre um carinho enorme.

Aos Professores **Dr. João Maurício** e **Dr. César Pucci** por terem aceitado o convite para ser banca desse trabalho

À **Capes** pelo auxílio financeiro durante o período do mestrado.

Aos pacientes que participaram da pesquisa, muito obrigada!

Muito Obrigada a todos que de alguma forma colaboraram para essa pesquisa e para o meu aprendizado.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Bactérias da cárie	13
2.2 Método molecular para identificação de microorganismos.....	27
2.3 Endotoxinas e sintomatologia dolorosa.....	32
3. PROPOSIÇÃO.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Critérios para seleção	37
4.2 Coletas das amostras.....	38
4.3 Quantificação pelo teste Checkerboard.....	40
4.3.1 Extração do DNA bacteriano.....	41
4.3.2 Colocação das amostras na membrana de <i>nylon</i>	41
4.3.3 Hibridização da membrana com as sondas de DNA.....	41
4.3.4 Detecção das espécies	47
4.4 Quantificações de endotoxinas	48
5 RESULTADOS	50
5.1 Checkerboard.....	53
5.2 Endotoxinas	71
6 DISCUSSÃO.....	73
6.1 Checkerboard.....	73
6.2 Endotoxinas	78
7 CONCLUSÃO.....	81
8 REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE	87
ANEXO	96

Souza LG. Relação da diversidade bacteriana e quantidade de endotoxinas com a sintomatologia dolorosa de pulpite reversível em lesões cariosas profundas[dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

A cárie é uma doença infectocontagiosa multifatorial. Em cavidades profundas, as lesões cariosas geralmente estão associadas a quadros de sintomatologia pulpar dolorosa. O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade bacteriana e a quantidade de endotoxinas e casos de cáries sintomáticas e assintomáticas. Para este estudo foram selecionados 20 pacientes com lesões cariosas profundas com sensibilidade dolorosa compatível com pulpite reversível (n=10) e sem sintomatologia dolorosa (n=10). As amostras de dentina cariada foram obtidas com o auxílio de colheres de dentina estéreis e apirogênicas e foram coletadas em dois momentos: antes e após a remoção convencional do tecido cariado. Estas amostras foram divididas em duas alíquotas, que foram em seguida submetidas ao teste Checkerboard (alíquotas contendo 150 µl de TE e 100 µL de NaOH a 0,5 M) e teste cinético cromogénico LAL (Alíquotas com 1 ml de soro apirogênico) para determinação do perfil microbiano e quantificação de endotoxina, respectivamente. O teste estatístico Mann Whitney não mostrou diferença entre a camada de dentina superficial e profunda para as bactérias estudadas. Em relação ao fator sensibilidade as bactérias *Capnocytophaga sputigena*, *Leptotrichia buccalis* e *Lactobacillus species* foram as que apresentaram diferenças estatísticas significantes, sendo mais presente em pacientes com sintomatologia. Para as endotoxinas, os dentes sintomáticos resultaram em maiores quantidades de endotoxinas ($p = 0,047$). Dentes sintomáticos apresentaram $4,13 \log_{10}$ EU / mg dentina, enquanto o nível de endotoxinas para os dentes assintomáticos foi de $3,45 \log_{10}$ EU / mg dentina. Dentina coletada em diferentes áreas apresentaram quantidades similares de endotoxinas ($p = 0,139$). A quantidade de bactérias não parece estar relacionada com a sintomatologia de lesões cariosas profunda, enquanto a quantidade de endotoxinas é maior em cáries sintomáticas.

Palavras chaves: Cárie dentária. Bactérias. Endotoxinas. Dor. Pulpite

Souza LG. Relation of bacterial diversity and amount of endotoxins with the painful symptoms of reversible pulpitis in deep carious lesions[dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016

ABSTRACT

Caries is a multifactorial infectious disease. In deep cavities, carious lesions are usually associated with scenarios of pulp painful symptoms. The objective is to determine bacterial diversity and endotoxin levels in cases of symptomatic and asymptomatic caries. Twenty patients with deep carious lesions with soreness compatible with reversible pulpitis ($n = 10$) and without pain symptoms ($n = 10$). Carious dentine samples were obtained with the aid of sterile dentine and apyrogenic spoons and harvested in two steps: before and after conventional caries removal. These samples were divided into two aliquots, which were then subjected to the checkerboard (aliquots contained in 150 μ l of TE and 100 μ l of 0.5 M NaOH) and kinetic chromogenic LAL test (aliquots with 1 ml of apyrogenic serum) for determination of microbial profile and quantitation of endotoxin, respectively. By Mann Whitney test showed no difference between the superficial and deep dentin layer for the studied bacteria. In relation to factor sensitivity bacteria Capnocytophaga sputigena, Leptotrichia buccalis e Lactobacillus species were the ones that showed statistically significant differences, being more present in patients with symptoms. For the endotoxins, symptomatic teeth resulted in greater quantity of endotoxins ($p=0.047$). Symptomatic teeth presented 4.13 log₁₀ EU/mg dentin, while endotoxin level for no symptomatic teeth was 3.45 log₁₀ EU/mg dentin. Dentine collected in different areas presented similar amount of endotoxins ($p=0.139$). The amount of bacteria does not seem to be related to symptomatology of deep carious lesions, while endotoxins quantity is greater in symptomatic scenarios.

Keywords: Dental caries. Bacteria. Endotoxins. Pain. Pulpitis.

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infectocontagiosa multifatorial que resulta em perda mineral localizada do tecido dental duro causada por ácidos orgânicos provenientes de uma microbiota (bactérias) específica (Loesche, Syed 1973).

A microflora da cárie é altamente complexa e varia entre cada lesão. A composição dos grupos dominantes pode depender da dieta, da saliva, e da cronicidade da lesão. Estreptococos do grupo mutans, tais como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* são importantes na iniciação e progressão da cárie. A medida que a lesão progride mais profundamente na dentina, ocorre uma transição das bactérias Gram-positivas predominantemente facultativas por *Lactobacillus* e / ou bactérias anaeróbias. Esta transição é provavelmente influenciada por uma mudança no ecossistema, isto é, nutrientes, oxigênio e competição bacteriana (Hoshino 1985; Hahn, Liewebr 2007).

Dois tipos de lesões de cárie profunda foram identificados: lesões com alta contagem de *Lactobacillus* ou com baixa contagem de *Lactobacillus*. Nas lesões com baixa concentração de *Lactobacillus*, uma grande variação dos microorganismos foi notada, sendo que bactérias Gram-positivas de *Lactobacillus*, cocos Gram-positivos, ou *Prevotella intermedia* foram dominantes em determinadas amostras (Hahn, Liewebr 2007; Callaway et al. 2013).

Existe geralmente uma grande incidência de quadros de sintomatologia dolorosa compatível com pulpite reversível associados com lesões cariosas profundas (Thompson et al. 2008; Hayashi et al. 2011; Callaway et al. 2013). Não se sabe se esta sintomatologia está ou

não associada ao perfil bacteriano destas lesões, uma vez que o mesmo pode apresentar grande variação. Quando a desmineralização da dentina aproxima-se da polpa a uma distância entre 0,5 e 1 milímetro, reações inflamatórias podem ser vistas na região subodontoblástica. É importante notar que não há nenhuma infecção do tecido pulpar, e acredita-se que as reações das células inflamatórias deste tecido sejam resultado dos produtos bacterianos da lesão cariosa (Reeves, Stanley 1966; Massler 1967; Fejerskov, Kidd 2008).

Dentre estes produtos bacterianos, destacam-se as endotoxinas, uma vez que são substâncias neurotóxicas e inflamatórias. Estas substâncias estão presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas e podem ser secretadas em vesículas por organismos em crescimento ou liberado para o ambiente após a morte da célula. As endotoxinas são um importante fator de virulência capaz de iniciar várias respostas biológicas, como a ativação do complemento, indução da febre, a ativação dos macrófagos, citotoxicidade e reabsorção óssea. Estudos tem mostrado que os produtos microbianos podem produzir uma reação inflamatória na polpa dentária (Khabbaz et al. 2001; Jacinto et al. 2005, Vianna et al 2007).

Acredita-se que as endotoxinas podem provocar dor através da ativação do factor de Hageman, que leva à produção de bradicinina, um mediador de dor potente (Seltzer, Farber, 1994). Do mesmo modo, estudos relataram que as endotoxinas possuem propriedades neurotóxicas que atuam em terminais nervosos pré-sinápticos (Palmiero et al. 1962). Segundo Khabbaz et al 2000, a concentração de endotoxina nas camadas superficiais da dentina cariada é significativamente maior do que e nas camadas profundas. Sabendo que as endotoxinas têm propriedades inflamatórias e neurotóxicas, o nível mais elevado de endotoxinas em lesões de cárie de dentes sintomáticos constitui, talvez, um fator envolvido no mecanismo de dor pulpar, possivelmente pela proximidade da lesão em questão com a polpa.

Desta forma, a diversidade bacteriana pode estar indiretamente relacionada com a dor pulpar pela presença ou não de endotoxinas em suas paredes celulares. A sintomatologia pulpar é de extrema importância, pois é uma das principais características clínicas da resposta inflamatória, sendo por isso crucial no diagnóstico da lesão pulpar. A lesão pulpar reversível caracteriza-se por uma leve alteração inflamatória da polpa em fase inicial, e muitas vezes a causa é uma lesão cáriosa profunda que não causou exposição, em que a reparação tecidual ocorre com a remoção do agente desencadeador do processo. Se os irritantes persistirem ou aumentarem, a inflamação pulpar torna-se de intensidade moderada a severa, o que caracteriza a lesão pulpar irreversível, com posterior necrose pulpar (Reeves, Stanley 1966; Massler 1967; Fejerskov, Kidd 2008). Sendo assim, a pulpíte reversível representa um parâmetro geralmente utilizado para definir procedimentos e adotar protocolos clínicos restauradores.

Com base no acima apresentado, torna-se necessário correlacionar a diversidade bacteriana e quantidade de endotoxinas com a sintomatologia dolorosa de pulpíte reversível em lesões cárias profundas.

Onde a hipótese deste trabalho é de que se o perfil bacteriano das lesões cárias profundas for composto em sua maior parte por bactérias gram negativas, isso acarretaria em uma maior liberação de endotoxinas o que justificaria a presença de lesões cárias profundas sintomáticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A doença cárie depende parcialmente de bactérias específicas e, apesar de não se ter claramente a composição bacteriana das lesões cariosas, sabe-se que esta composição pode estar associada com a presença de sintomatologia dolorosa, principalmente pelas endotoxinas derivadas destas colônias bacterianas. Desta forma, esta revisão de literatura será subdividida em tópicos para facilitar o entendimento do leitor sobre estas características e ainda trará tópicos sobre os testes utilizados neste estudo.

2.1 Bactérias da cárie

2.2. Método molecular para identificação de microorganismos

2.3. Endotoxinas e sintomatologia dolorosa

2.1 Bactérias da cárie

Com o crescente estudo, nas ultimas décadas, a respeito da doença cárie, hoje se tem maior conhecimento sobre a forma como se inicia e sua evolução. Porém a flora bacteriana presente nas lesões cariosas é de alta complexidade não se conhecendo até hoje toda microflora envolvida nesse processo. Loesche e Syed 1973 relacionaram a presença de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* com a presença da doença cárie, criando a teoria da especificidade, porém sabe-se que essa microflora pode variar de acordo com a o estágio da doença e a profundidade da lesão.

Essa microbiota pode variar de acordo com o estágio, profundidade e atividade da lesão cariosa (Hahn et al.1991, Bjorndal, Larsen 2000; Hahn, Liewebr 2007; Ass et al. 2008; Lima et al.2011).

Hahn et al. 1991 realizaram um estudo microbiológico da dentina cariada de dentes humanos com pulpite irreversível. Para isso, 29 dentes com diagnóstico de pulpite irreversível (dor prolongada aos estímulos térmicos) foram extraídos. Os dentes foram então sulcados longitudinalmente com brocas carbides em alta rotação, em seguida foi feita a quebra do dente, separando-se as duas metades. O tecido pulpar foi removido sob condições assépticas, e uma sequência de amostras de dentina do tecido cariado foram coletadas com uma colher de dentina estéril, progredindo a partir da superfície pulpar em direção à região externa da lesão e a análise foi feita através de meios de cultura. As amostras foram identificadas em vários Agar meios seletivos para espécies *Bacteroides*, *Fusobacterium nucleatum*, Espécies *Veillonella*, espécies de *Lactobacillus*, *Neisseria* espécies, *Actinomyces* espécies, levedura, entéricos, espécies de *Staphylococcus* e *Strep. Mutans*. *Bacilos Gram positivos* foram a flora predominante (64-72%) em todos os locais de amostragem, seguido dos *cocos Gram positivos* e bactérias anaeróbias e sugeriu, a partir do material coletado, a presença de dois tipos de lesões: as com alta contagem de *Lactobacillus* e as com baixa contagem de *Lactobacillus*. Sendo que a região com maior concentração de *Lactobacillus* encontrava-se na dentina cariada na região próxima a polpa, portanto a persistência de *Lactobacillus* na dentina cariada profunda sugere que eles têm um papel importante na morte pulpar. Na região onde havia alta concentração de *Lactobacillus*, encontrava-se pequena quantidade de *Streptococcus* o que sugere que estes não podem sobreviver em ambientes extremamente ácidos de lesões de cárie profunda.

Gomes et al., 1994 fizeram a associação de bactérias específicas associada a alguns sinais e sintomas endodônticos. Foi utilizada uma amostra de 30 pacientes, foi feita coleta do material intra canal com cones de papel. As amostras foram imediatamente semeadas em quatro placas de Agar diferentes (3 para avaliar o crescimento de bactérias anaeróbias e 1 para as bactérias aeróbias). Observaram que bactérias anaeróbias estavam presentes em 93% dos canais com sintomatologia dolorosa e em 53% dos canais sem sintomatologia. E concluiu que existe um relação entre a dor e a presença de *Prevotella* e *Peptostreptococcus spp* nos canais radiculares.

Brailsford et al. 1999 analisaram a predominância de *Actinomyces spp* na dentina infectada em lesões cariosas radiculares ativas. Foi utilizada uma amostra de 9 dentes, o material foi coletado com escavadores de dentina estéreis e colocados em 1ml de meio de transporte e uma série de diluições foram feitas e 100µL foram plaqueadas em meio seletivos e não seletivos. As bactérias foram identificadas através de meios de cultura. *Candida spp.* foram cultivadas em Agar Sabouraud Dextrose, incubados aerobicamente durante 3 dias. Agar Rogosa (Oxoid) foi utilizado para a cultura de *Lactobacilos*, e Agar mitis salivarius (Oxoid) suplementado com bacitracina e sacarose, foi usado para a enumeração de *Streptococcus mutans*. Estes meios foram incubadas em anaerobiose durante 3 dias a 37 ° C. E a presença de *Actinomyces spp.* foi analisado através do PCR, utilizando sondas específicas. Uma maior proporção de *A. gerencseriae* foi isolado a partir das placas aeróbicas, enquanto que uma proporção de *A. israelii* foi significativamente maior em placas anaeróbias.

Bjorndal e Larsen 2000 avaliaram as mudanças na microflora de lesões cariosas profundas, analisando antes e depois da escavação. Foram utilizado 9 dentes permanentes com cáries proximais profundas, uma radiografia foi utilizada para classificar a lesão como profunda e descartar a presença de lesão periapical, o teste térmico foi

realizado para descartar a possibilidade de pulpite irreversível. Foram realizadas duas coletas: uma inicial, antes do tratamento expectante e a final após um intervalo de 4-6 meses. As amostras de dentina foram obtidas com uma broca estéril embebidas em solução salina. Foi realizada uma coleta de dentina da camada mais externa e do centro da lesão, respectivamente, seguido pela aplicação de uma restauração temporária. Após o intervalo de tratamento, a restauração temporária era removida, e uma nova coleta executada da região central da dentina e depois a escavação final. As amostras foram transferidas para o fluido de transporte, agitadas em vortex durante 30 s, e diluídas em série e plaqueadas em agar de soja tríptica. Após a incubação anaeróbia a 37 ° C durante 7 dias, o número total de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro foi contado. Concluiu que o tratamento expectante é um método adequado para gerir lesões de cárie profundas sem sintomas de pulpite irreversível. Houve uma predominância de bacilos Gram positivos, representando 70% do total de unidades formadoras de colônias por mililitro, sendo os *Lactobacillus* os mais isolados. Foi observado na primeira coleta alta concentração de *Lactobacillus*, cocos Gram positivos e negativos respectivamente. Após o tratamento a nova coleta mostrou redução significativa da quantidade de *Lactobacillus* e cocos Gram negativos e a microbiota era composta basicamente por *A. naeslundii* e alguns tipos de *Streptococcus*.

Martin et al. 2002 realizaram um estudo microbiológico da cárie humana e correlacionou a presença de bactérias anaeróbias com mudanças histopatológicas na polpa dental. Utilizou 65 dentes extraídos com cárie avançada e pulpite. A dentina cariada de cada dente foi pesada individualmente, e uma solução padrão de 10 mg (peso úmido) de dentina por ml de fluido de transporte reduzida (RTF) foi preparado a 37 ° C numa câmara anaeróbia. Os fragmentos de dentina cariada foram dispersas em RTF e agitadas num vórtex 20 s. Diluições em série destas suspensões foram preparadas em RTF; e 100 µl amostras foram

semeadas em duplicata e incubadas numa câmara de anaerobiose durante até 2 semanas ou, em condições microaerofílicas, numa jarra de anaerobiose com um pacote de gás CO₂ a 37°C por 48 horas. A carga microbiana total por miligrama (peso úmido) da dentina foi determinada através da medição do número de UFC em meios de cultura específicos para determinadas bactérias. Após a identificação, cada placa com as amostras clínicas foram examinadas e foram registrados os números de colônia do tipo principal presente. As amostras de dentina que não foram utilizadas foram congeladas a -80°C para posterior análise PCR. Foi feito o isolamento do DNA das bactérias presentes nas amostras de dentina cariada: as bactérias foram cultivadas até a fase exponencial máxima, colhidas por centrifugação (14,000 x g a 18 até 20°C por 2 min), lavadas e ressuspensas em 10mM tampão de fosfato (pH 6,7). Depois da incubação a 60°C por 30min, o DNA foi extraído e purificado com o QIAamo DNA mini Kit de acordo com as instruções do fabricante. Para extrair o DNA das bactérias anerobicas presentes nas suspensões homogeneizadas de dentina as amostras foram descongeladas e 80µL foram combinadas com 100µL de tampão de ATL e 400µg de proteinase K. As amostras foram agitadas por 10s e incubadas a 56°C por 40 min, sendo agitadas em vortex a cada 10 minutos para lisar as células. A seguir foi adicionado 200µg de RNase, as amostras foram incubadas durante mais 10 minutos a 37°C, antes do DNA ser finalmente purificado com o QIAamp DNA mini kit. Foi realizado o design das sondas e dos primers para a realização do PCR. A ultima etapa foi o processamento da polpa dentária: imediatamente após a amostragem da dentina cariada, os dentes foram retirados da câmara anaeróbia e o tecido pulpar foi recuperado, processado, e seccionados, fixados durante 24 h a 4 ° C em paraformaldeído a 4% em solução salina tamponada com fosfato. Todas as seções de tecido pulpar foram coradas com 1% de azul de toluidina, codificado para evitar viés de avaliação subsequente, e, inicialmente, examinadas em baixa ampliação (X 50) ,e depois áreas selecionadas

foram escolhidas para uma análise mais aprofundada, em uma ampliação maior(x312). As amostras foram classificadas em quatro categorias, de acordo com a aparência tecido pulpar, tal como descrito anteriormente por Massey et al.,1993. Estas categorias foram: (i) alteração inflamatória mínima, que consistia de um padrão de tecido essencialmente normal com infiltração inflamatória mínima; (li) a degeneração do tecido mole, que consistia em uma arquitetura anormal do tecido conjuntivo com alterações, inclusive com espessamento da membrana basal, através de substituição de tecido por material de hialina, muitas vezes infiltrados com uma calcificação difusa; (lii) ampla degeneração do tecido, que consistia de alterações dos tecidos duros com evidência de calcificação distrófica; e (iv) alteração degenerativa inflamatória, que consistiu de tecidos que apresentavam infiltração inflamatória generalizada de toxicidade aguda e / ou crônica com formação de abscesso e regiões necróticas. O teste molecular usado para essa avaliação revelou uma relação positiva entre *M.micros* e *P.endotalis* na detecção e degeneração inflamatória do tecido pulpar. Portanto, níveis elevados dessas bactérias, em lesões de carie, podem ser um indicativo de pulpíte irreversível. Concluíram também que há uma predominância de bactérias Gram positiva nas lesões cariosas, particularmente os *Lactobacillus*, porem bactérias Gram negativas estavam presentes em numero significativo, *Prevotella spp* foi o grupo mais numeroso.

Ayna et al. 2003 realizaram uma avaliação clínica e também através de recursos microbiológicos de lesões cariosas profundas em primeiros molares. Avaliaram 72 lesões de cárie profunda. Foi constatado que o dente apresentava vitalidade através de teste de vitalidade térmico e exame clínico, um exame radiográfico confirmou que a lesão era profunda e nao havia lesão periapical. Para determinar a cor e consistência da dentina foram utilizados os critérios de Bjorndal e Larsen 2000: a)muito amolecida (penetração da sonda exploradora com extrema facilidade); b)amolecida (Sonda exploradora penetrou no tecido sem

resistência); c)média/dura: leve resistência da sonda exploradora ao penetrar o tecido; d)dura: comparável à dentina afetada. A cor da dentina desmineralizada central, foi classificada como: amarelo claro, amarelo, marrom claro, marrom escuro ou preto. As amostras de dentina foram coletadas por uma broca estéril, estas foram então transferidas em agar Rogosa SL para o crescimento de lactobacilos oral e em ágar mitis salivarius para o crescimento de *Streptococcus mutans*. Concluiu que a proporção de *Streptococcus mutans* *Lactobacillus* e de unidades formadores de colônias eram maiores quando a cor e a consistência da dentina eram compatíveis à dentina infectada quando comparada a dentina afetada.

Munson et al. 2004, fizeram uma análise de cultura e molecular da microflora associada à carie dental *in vivo*. Foram coletadas amostras de 5 dentes com cáries médias ou profundas. Primeiramente foi feita a remoção da cárie até a junção esmalte-dentina utilizando brocas carbides em alta rotação, após isso a dentina cariada foi coletada com escavadores estéreis. Foram realizadas duas coletas: uma na região da dentina média e outra na dentina profunda, quando a cavidade já estava limpa, sem cárie. As amostras de dentina cariada foram colocados em 1 ml de meio de transporte(RTM) e realizado diluições em série. O DNA foi extraído diretamente das amostras e os genes 16 rRNA foram amplificados por PCR com primers universais. Para a análise de cultura as diluições da amostra foram plaqueadas em agar anaeróbio, ágar sangue e placas de ágar Rogosa. As 5 amostras utilizadas continham apenas 3 bactérias em comum: *S. mutans*, *Rothia dentocariosa*, *Propionibacterium sp.* E a flora predominante foi *S. mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces spp*, *Veillonela spp* e *Propionobacterium*.

Beighton 2005 fez uma revisão de literatura avaliando a complexa microbiota bucal de indivíduos com alto risco a cárie e seu papel no processo desenvolvimento desta. Estudos moleculares demonstraram a grande diversidade e complexidade da flora associada

com a cárie. Outras bactérias orais, como *Actinomyces* spp e *Bifidobacterium* spp são acidogênicos e acidúricos. Elas superam, em número, os *Streptococcus mutans* na placa dental, e há dados que suportam o papel dessas bactérias na iniciação e progressão da cárie. Portanto, *Streptococcus mutans* são bons marcadores de doença, mas não necessariamente, os agentes etiológicos da mesma.

Chhour et al. 2005, também avaliaram a diversidade microbiana em cáries avançadas. As amostras foram coletadas de 10 dentes (molares e pré molares) extraídos com cáries avançadas. Após a remoção da placa superficial e detritos que se sobrepõe à lesão, a zona da cárie de dentina descalcificada e parcialmente descalcificados foi escavada, pesada, e colocada em um fluido de transporte a uma concentração de 10 mg (peso húmido) de dentina por ml, antes do processamento e extração do DNA bacteriano usando o reagente tampão ATL (Qiagen, Clifton Hill, Victoria, Austrália). Com os iniciadores universais, cada uma das 10 amostras foram sujeitas a amplificação PCRtermociclador FTS-320 (Corbett Research, Sydney, Austrália). O PCR foi efetuado em triplicata num volume total de 100l usando o kit do reagente AmpliTaq Gold PCR (Applied Biosystems). Foi realizada uma desnaturação inicial de 95 ° C durante 10 min, seguido por 25 ciclos de 95 ° C durante 15 s e 60 ° C durante 1 min, com uma temperatura final de descanso de 4 ° C. As amostras triplicadas de PCR foram combinadas e purificadas usando o sistema de purificação DNA Preps PCR Wizard (Promega, Sydney, New South Wales, Austrália), antes de serem clonadas em plasmídeos linearizados utilizando o GEM-T Easy vector system (Promega). Entre 105 e 110 colônias brancas foram selecionadas aleatoriamente a partir de cada uma das 10 amostras e inoculadas em 5 ml de caldo de Luria-Bertani suplementado com 100 µg de ampicilina ml-1 e incubadas a 37 ° C com agitação durante 18 h. Para o isolamento do plasmídio uma alíquota de 2 mL, de cada uma das culturas overnights, foi utilizada para extrair DNA de plasmídeo usando o sistema de purificação

de DNA Wizard Plus Minipreps (Promega) após isso foi procedido o sequenciamento e análise filogenética. O teste molecular detectou 75 espécies bacterianas sendo as mais prevalentes: *Latobacillus spp* e prevotella. Mas encontraram também, em níveis significativos: *Selenomonas spp*, *Dialester spp*, *F. nucleatum*, *Eubacterium spp*, *Lachnospiraceae family*, *Olsenella spp*, *Bifidobacterium spp*, *Propionibacterium spp*, *Pseudoramibacter alactolyticus*.

Hahn e Liweber 2007 fizeram uma revisão de literatura avaliando *in vivo* a relação entre bactérias da cárie, reposta do hospedeiro, sinais clínicos e sintomas de pulpíte em cáries profundas e concluiu que existem basicamente dois tipos de lesões: as com alta contagem de *Lactobacillus* e as com baixa contagem de *Lactobacillus*. As lesões que possuem taxa de *Lactobacillus* mais baixa geralmente estão associadas a sinais clínicos de dor e sensibilidade, visto que nestes casos há uma maior concentração de bactérias do gênero prevotella e *Streptococcus* que por sua vez estimulam a produção de citocinas pro inflamatórias justificando tais sinais. Muitas vezes, clinicamente encontra-se dentes com cáries profundas porém sem sensibilidade. Este achado clínico pode ser explicado, em parte, pelo efeito supressor direto dos ácidos orgânicos produzidos nas lesões com alta contagem de *Lactobacillus*, e em parte pela indução de citocinas pró-inflamatórias.

Ass et al. 2008, usaram métodos moleculares para detectar todas as espécies bacterianas associadas à cárie e associou esse perfil aos diferentes estágios da doença. Inicialmente foram divididos 2 grupos: a) 15 pacientes com cárie em dentes decíduos e 14 controles e b) 36 indivíduos com cáries secundárias e 25 controles e o material foi coletado de 4 sítios diferentes: -esmalte intacto, -lesão de mancha branca,- lesão em dentina,- lesão em dentina profunda. A partir do esmalte, lesões de mancha branca, e lesões escavadas, a placa foi obtida passando a sonda exploradora na superfície do dente e depois transferida para um cone de papel endodôntico. A dentina cariada foi escavada uma

colher de dentina ou uma broca esférica em baixa velocidade. As amostras foram colocadas em microtubos estéreis. O DNA foi isolado e purificado e congelado a -20°C para análise posterior. As amostras clínicas foram analisadas para 110 espécies bacterianas no ensaio de hibridização (checkerboard). As sondas de DNA foram sintetizados com múltiplos timidinas (T) na extremidade 5' do oligonucleotídeo. Concluíram que o perfil bacteriano no início da cárie é mais complexo do que em cáries estabelecidas. E em indivíduos com *S. mutans* espécies adicionais como: *Atopobium genomopecies C1*, *Lactobacillus sp* estavam presentes em níveis elevados. Já em indivíduos sem *S. mutans*, uma predominância de *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium dentium* foi detectada. Além disso, *Actinomyces spp*, esteve presente em altos níveis na iniciação da cárie.

Em 2010, Nadikarni et al. selecionaram molares com lesões de cárie profundas, associados com respostas dolorosas, mas que apresentavam sinais clínicos de vitalidade. Os dentes foram extraídos e cortes sagitais realizados. Os dentes preparados foram colocados no paraformaldeído a 4% durante a noite a 4°C com as polpas in situ. Foram então descalcificados em 10% de EDTA-PBS durante 4 semanas com troca diária do produto. Após isso, realizou-se a desidratação através de alcoóis graduados e incluídos em cápsulas de resina (dentes) e blocos plásticos(polpas). Foram realizados cortes de dois micrometros usando o Reichert-Jung SuperCut 2050 microtome. Foram submetidas a coloração e hibridização fluorescente (FISH). As lâminas foram analisadas através de um microscópio de fluorescência e as imagens capturadas com a câmera Leica DFC500. As polpas incluídas em resina foram preparadas usando o micrótomo e coradas com azul de toluidina(0,05%) para determinar a morfologia e evidência de invasão microbiana. Os estágios de infecção foram arbitrariamente designados como limitada (menos de um terço da área da superfície pulpar infectada), estabelecida (entre um terço e dois terços da área de superfície pulpar infectada), e avançada

(mais de dois terços da área de superfície pulpar infectada, mas algum tecido remanescente intacto foi indicativo de polpa vital). DNA foi extraído utilizando o QIAamp DNA minikit, de acordo com as instruções do fabricante e sequenciamento feito utilizando o iniciador apropriado. Concluíram em seu trabalho que a invasão bacteriana da polpa dental pode estar associada com as complexas populações bacterianas da dentina cariada e concluiu também que os *Lactobacillus* são a espécie predominante nos estágios iniciais da infecção polimicrobiana da polpa dental.

Takahashi e Nyvad 2011 realizaram uma revisão de literatura analisando o papel das bactérias no processo de cárie. A cárie pode ser dividida em 3 fases reversíveis: a microflora sobre superfícies de esmalte contém principalmente estreptococos não mutans e *Actinomyces*, em que a acidificação é leve e pouco frequente (1ª fase: estabilidade dinâmica). Quando o açúcar é fornecido com frequência, a acidificação torna-se moderada e frequente. Isso pode aumentar a presença de bactérias acidogênicas, o que pode com o tempo, mudar o equilíbrio desmineralização / remineralização para a perda de mineral levando à iniciação / progressão de cáries dentárias (2ª fase: estágio acidogênico). Sob intenso e prolongados desafios ácidos, as bactérias mais acidúricas tornam-se dominantes (3ª fase: acidúrica), nesta fase, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, bem como *Actinomyces*, bifidobactérias, e leveduras podem tornar-se dominante.

Lima et al. 2011, avaliaram *in vivo* a microbiota cariada de 30 dentes nas diferentes camadas da dentina cariada (superficial, média e profunda). A cárie em esmalte foi removida até a junção esmalte-dentina com uma ponta diamantada estéril, em alta rotação. As lesões em dentina foram escavadas a mão, utilizando colheres de dentina estéreis. Após a camada mais superficial de dentina amolecida e necrótica ter sido removida e descartada, a primeira amostra foi colhida a um nível que representa a camada mais superficial da lesão. Uma segunda amostra foi

tomada da porção média da lesão dentinária. Finalmente, uma terceira amostra foi coletada, quando a cavidade foi considerada clinicamente como livre de cárie, com base no critério de dureza à sondagem. As amostras de dentina foram colocadas em tubos estéreis contendo 1 ml de 5 % de dimetilsulfóxido em tripticase-caldo soja (Difco, Detroit, Mich., EUA) e imediatamente congeladas a -20 ° C. O DNA foi extraído das amostras de dentina cariada, utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, Calif., EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para maximizar a extração de DNA de bactérias Gram-positivas, uma etapa de pré-incubação com lisozima durante 30 minutos foi adicionada, de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas sondas para 28 bactérias específicas, além das sondas foram adicionados dois controles na concentração de 10^5 e 10^6 células. O checkerboard foi realizado utilizando o sistema Minislot-30 e Miniblotter-45 (Immunetics, Cambridge, Mass., EUA). Em primeiro lugar, 100 pmol de sonda em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) foram introduzidos nos poços horizontais do aparelho Minislot, e fixadas na membrana de nylon (AmershamPharmacia Biotech, Bucks., Reino Unido) por irradiação ultravioleta usando um Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, Calif., EUA). A membrana foi então pré-hibridizada a 55 ° C durante 1 h e depois foi desnaturada a 95 ° C durante 5 min e colocada no aparelho Miniblotter. A hibridação foi realizada a 54 ° C durante 2 h. Após a hibridação, a membrana foi lavada e bloqueada em um tampão com caseína. A membrana foi incubada sequencialmente em anticorpo conjugado com fosfatase alcalina (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha) e substrato quimioluminescente ultrasensitivo CDP Star (New England Labs, Ipswich, Mass, EUA). Finalmente, a membrana foi colocada em cassete de filme radiográfico e exposta ao raio X a fim de detectar a hibridização. As contagens foram transformados em dados semi-quantitativo e classificados da seguinte forma: um nível abaixo de detecção (ou ausência); um nível $<10^5$ bactérias; um nível de

aproximadamente 10^5 bactérias; um nível $> 10^5 < 10^6$ bactérias; um nível de aproximadamente 10^6 bactérias, e um nível $< 10^6$ bactérias. Uma grande infecção foi considerada para os níveis $< 10^5$. E concluíram que não houve diferença significativa entre as 3 zonas sendo os grupos bacterianos mais encontrados: *Atopobium genomospecies C1*, *F. nucleatum*, *S. mutans*, *S. species*, *Veillonella species*.

Simón-Soro et al. 2014, utilizaram um método molecular conhecido como metatranscriptase para avaliar a composição bacteriana global de lesões cariosas. Este método faz a amplificação do gene a partir do RNA ao contrário dos PCRs e Checkerboard que fazem a partir do DNA, isso parece ser uma vantagem visto que estes podem amplificar DNA de microorganismos mortos ou inativos enquanto que a amplificação do gene a partir do RNA análise microrganismos viáveis, dado que a quantidade de rRNA em células bacterianas é conhecido por estar relacionado com o seu grau de atividade metabólica. Avaliou caries em esmalte (n=15) e caries em dentina (n=6), as amostras foram coletadas com escavadores de dentina estéreis. As amostras foram diluídas em 500 µl de tampão PBS e imediatamente congeladas a -80°C . Concentrações de RNA obtidas variaram entre 12 a 120 µg / µl. Todas as amostras foram diluídas a 12 µg / µl antes da realização do PCR. O RNA foi extraído por uma combinação de lise física e química. As amostras das lesões foram suspensas em 500 µl de solução salina estéril e sujeitas a 50 Hz “beating” por 2 min em um Tissuelyzer II (QIAGEN, Limburg, Países Baixos) seguido por 5 min em gelo três vezes. A lise química, extração do RNA e o tratamento de ADNase, foram realizadas utilizando o ARN / ADN kit Masterpure Extração (Epicentro, Hamburgo, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante com a adição de um tratamento com lisozima a 37°C durante 30 min. As cadeias simples de DNA foram construídas com o igh- Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Grand Island, NY). Concluíram que estas possuem composições bacterianas diferentes, sendo que os *Lactobacillus* foram

encontrados quase que exclusivamente nas lesões de dentina. E da comunidade total de *Streptococcus*, 40% estavam nas lesões de esmalte e 20% nas de dentina e concluíram por fim que os *Streptococcus mutans* representaram apenas 0,02% a 0,73% da comunidade bacteriana total.

Dige et al. 2014 fizeram um estudo molecular de cáries oclusais. Avaliou a comunidade bacteriana em diferentes estágios da cárie oclusal. Foram utilizados 11 dentes extraídos e a análise foi feita através de FISH. Foram classificados de acordo com o estágio das cáries oclusais como: ativo / inativo / cavitadas / não-cavitadas) utilizando os critérios visuais de Nyvad (Nyvad et al., 1999). Foram examinados doze sítios oclusais, dos quais cinco foram classificados como ativos e não cavitados, três como ativos e cavitados, dois como inativos e não cavitados, e dois como clinicamente saudáveis. Imediatamente após a extração, os dentes foram armazenados em frascos individuais a -20°C até poderem ser fixados em paraformaldeído a 3% durante 16 horas a 4°C. Os dentes foram cortados em fatias perpendiculares à superfície oclusal e essas fatias foram descalcificadas por 14 a 25 dias. Após isso foram montadas em lâminas para análise de FISH. Biofilme observado ao longo da entrada de fissuras mostrou uma camada de microrganismos organizados em paliçadas muitas vezes identificados como *Actinomyces*, cobertos por uma camada bacteriana de gêneros diversos, semelhante ao biofilme supragengival. A invasão bacteriana (frequentemente por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium spp.*) no interior dos túbulos dentinários foi observada apenas em estágios avançados da doença cárie onde havia formação de cavidade.

Pode-se perceber que à medida que a lesão cariosa progride, o habitat bacteriano também se modifica, tornando-se cada vez mais complexo e diversificado. E o aparecimento de bactérias anaeróbias, pode estar associado aos casos de lesão de cárie com sintomatologia dolorosa.

2.2 Método molecular para identificação de microorganismos

Nyvad et al. 2013 avaliaram, através de uma revisão de literatura, as perspectivas da microbiologia molecular para análise da cárie dentária e concluiu que cada método possui suas vantagens e desvantagens e mais estudos são necessários para determinar o método ideal e escolha de cada método depende da questão a ser tratada na pesquisa.

A grande maioria dos estudos que avaliou o perfil bacteriano das lesões cariosas o fez através do método molecular PCR, do inglês *polymerase chain reaction*, que possibilita a amplificação de pequenas amostras de DNA até um nível grande o suficiente para permitir a identificação (Massey et al. 1993; Alam et al. 2000; Martin et al. 2002; Call et al. 2003; Martin 2003; Munson et al. 2004; Chhour et al. 2005; Ass et al. 2008; Nadkarni 2010; Lima et al. 2011)

No entanto, com o surgimento de novas técnicas de biologia molecular, avanços ocorreram na área da microbiologia, tornando possível a identificação de espécies bacterianas de maneira mais confiável, através de sondas de DNA. Um desses novos métodos é conhecido como Checkerboard DNA-DNA hybridization, preconizada por Sockransky et al. 1994. É um método mais preciso e rápido quando comparado ao PCR, pois utiliza varias sondas de DNA de uma única vez, podendo as amostras serem estocadas por longos períodos. Porém, como são utilizadas sondas de genomas inteiros, há possibilidade de ocorrer uma hibridação cruzada. Uma desvantagem adicional da técnica reside no fato de que apenas um número limitado de espécies serem estudadas simultaneamente.

Poucos estudos, até hoje, foram realizados utilizando esta técnica. Filoche et al 2007 avaliaram os microorganismos presentes na placa dental que estão relacionados ao desenvolvimento da cárie dental,

e para isso utilizou o método Checkerboard. As placas com os microorganismos foram iniciadas a partir da saliva estimulada (40 ml) de dois doadores diferentes, que não realizaram higiene oral por 24 horas antes da coleta. Foram feitos dois experimentos: no primeiro foram utilizados 3 meios de crescimento, todos com e sem 0.15 % de sacarose, esses meios eram análogos de saliva(DMM-meio enriquecido com mucina, BMM-meio basal de mucina e BM- meio sem mucina); no segundo foi utilizado apenas o DMM com e sem suplementação de sacarose 0,15 %, as trocas dos meios eram diárias. Após 10 dias, foi feita a remoção do sobrenadante (lamelas e biofilme aderente) usando pinças estéreis, colocados em um tecido estéril para absorver qualquer excesso de líquido e a biomassa do biofilme foi pesada e preparada para Checkerboard (colocados em água estéril, agitados em vortéx e congelados a -80 °C até a análise). Foi monitorada a presença de 40 espécies bacterianas associadas à saúde oral e a carie dental usando Checkerboard DNA-DNA. Cada amostra e mais dois controles (mistura de todas as espécies estudadas numa concentração de 10^5 e 10^6 células) foram fixadas na membrana de *nylon* e depois hibridizadas com as sondas específicas. A avaliação do número de células foi realizada comparando os sinais com sinais de padrões pré-definidos, correspondendo a 10^5 e 10^6 células de cada uma das espécies. Os sinais foram codificados numa escala de 0 a 5. Concluíram que as bactérias presentes na placa que estavam associadas ao desenvolvimento da cárie eram: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Actinomyces gerensceriae*.

Socransky et al. 2004 utilizaram o Checkerboard para avaliar um complexo ecossistema microbiano de espécies subgengivais. Foram analisados a composição da microbiota subgengival de indivíduos em diferentes estágios de doença periodontal (79 periodontalmente saudáveis e 272 periodontite crônica). As amostras foram coletadas com curetas *gracey* do mesmo sitio pré-determinado em cada visita de

monitoramento. As amostras coletadas eram depositadas em microtubos contendo 0,15 ml de TE, logo após a coleta foi adicionado ao tubo 0,15 ml de NaOH e cada amostra era fervida em banho de água durante 5 minutos. As amostras eram, em seguida, fixadas na membrana de *nylon* e depois hibridizadas com as sondas específicas. A avaliação do número de células foi realizada comparando os sinais com sinais de padrões pré-definidos, correspondendo a 10^5 e 10^6 células de cada uma das espécies. Os sinais foram codificados numa escala de 0 a 5. Concluíram que as sondas de DNA utilizadas foram uma ferramenta útil para a enumeração das espécies bacterianas em sistemas microbiológicos complexos.

Ginazi et al. 2009, analisaram a distribuição de bactérias cariogênicas em cinco diferentes habitats intra-orais selecionados, em crianças pequenas. As amostras foram coletadas da saliva, placa supragengival, placa subgengival, dorso da língua e tecidos moles e foram analisadas através do Checkerboard DNA-DNA hybridization. As amostras de saliva foram coletadas através da saliva estimulada dos pacientes, 0,2 ml da amostra foram colocadas em alíquotas e agitadas com 0,15 ml de tampão de TE (Tris-Edta), foi colateada 0,2 ml dessa mistura e 0,1 ml de NaOH adicionados. A amostra da placa subgengival foi coletada usando curetas estéreis, de sítios pré-determinados, cada amostra foi colocada em microtubos contendo 0,15 ml de TE e depois adicionado 0,1 ml de NaOH. As amostras do dorso da língua foram coletadas com escovas próprias, cada amostra foi colocada em eppendorfs contendo 0,15 ml de TE e depois adicionado 0,1 ml de NaOH. A amostra da placa supragengival foi coletada com swabs e colocadas em eppendorfs contendo 0,15 ml de tampão de TE e depois adicionado 0,1 ml de NaOH. Cada amostra foi fixada na membrana de nylon e depois hibridizada com as sondas específicas. A avaliação do número de células foi realizada comparando os sinais com sinais de padrões pré-definidos, correspondendo a 10^5 e 10^6 células de cada uma das espécies. Os sinais foram codificados numa escala de 0 a 5. Concluíram que saliva e a língua

foram mais colonizadas por espécies cariogênicas do que o dente. As bactérias que mais prevaleceram foram *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Lactobacillus acidophilus*.

Haffage et al. 2008, avaliaram o complexo microbiológico da placa supragengival através do checkerboard utilizando 40 sondas específicas. A amostra contou com 55 indivíduos que forneceram placa supragengival após 7 dias de limpeza profissional e 93 indivíduos que forneceram placa supragengival após 3 a 24 meses de limpeza profissional. A amostra da placa supragengival foi coletada usando curetas Gracey esterilizadas de sítios pré-determinados. As amostras foram colocadas em tubos tipo eppendorf contendo 0,15 ml de tampão de TE e 0,1 ml de NaOH foi adicionado imediatamente em cada tubo após a coleta. Cada amostra foi fixada na membrana de nylon e depois hibridizada com as sondas específicas. A avaliação do número de células foi realizada comparando os sinais com sinais de padrões pré-definidos, correspondendo a 10^5 e 10^6 células de cada uma das espécies. Os sinais foram codificados numa escala de 0 a 5. Concluíram que em curto prazo (7 dias) a estrutura da comunidade bacteriana foi imperfeitamente desenvolvida, o que sugere que um maior tempo é necessário para produzir um “típico” biofilme maduro, a longo prazo (3-24 meses) a estrutura da comunidade bacteriana foi reconstruída, embora houvessem um menor número de espécies quando comparados a comunidade bacteriana pré-terapia.

Dahlen et al. 2010 fizeram um estudo microbiológico em relação à presença de cálculos e cáries, utilizando o Checkerboard. A amostra contou com 100 crianças que foram orientadas a não realizar a higiene no dia da coleta. Foi coletado 1 ml de saliva estimulada. As amostras da placa bacteriana foram coletadas com curetas gracey de sítios pré-determinados e transferidas para tubos tipo eppendorfs contendo 150 µl de tampão de TE e logo após foi adicionado 0,1M de NaOH. As amostras de saliva foram diluídas em VMG I em uma diluição

de 10 vezes e, a partir de cada diluição, 0,1 ml foi espalhado uniformemente sobre Agar mitis-salivarius seletivo para *Streptococcus mutans*, Agar rogosa para a cultura seletiva de *Lactobacillus*. As placas foram incubadas durante 5 dias a 37°C em 10% CO₂. Foi estudado a presença e o nível de 12 bactérias específicas geralmente associadas com periodontites através da técnica DNA-DNA hybridization. As amostras foram fixadas na membrana de nylon através do aparelho Minislot 30 e depois hibridizadas com as sondas específicas no aparelho Minibloter 45. A avaliação do número de células foi realizada comparando os sinais com sinais de padrões pré-definidos, correspondendo a 10⁵ e 10⁶ células de cada uma das espécies. Os sinais foram codificados numa escala de 0 a 5. Especial atenção foi dada ao score 3 que correspondeu ao padrão >10⁵ e <10⁶, indicando altos níveis de células bacterianas. Foram selecionadas as 23 crianças com os maiores scores de cálculo(e livres de cárie) e foram comparados ao grupo formado por 22 crianças com os mais altos níveis de cárie, e esses dois grupos foram comparados. E concluíram que os pacientes do grupo cárie possuíam altos níveis de *Prevotella nigrescens* e *Filifactor alocis* em comparação com o grupo cálculo e concluiu por fim que a cárie esta associada à presença de bactérias glicolíticas, enquanto que não existe um grupo de bactérias específicas que esta relacionada à formação de cálculos.

No trabalho de Lima et al. 2011, citado anteriormente, também foi utilizado esse método para avaliar a comunidade bacteriana das lesões cariosas, para isso usou sondas específicas para 28 bactérias.

O teste Checkerboard é um método relativamente novo, mas que esta sendo difundido para estudos que visam avaliar o perfil bacteriano das amostras e já mostrou que apresenta vantagens quando comparados aos testes anteriormente realizados, como o PCR por exemplo.

2.3 Endotoxinas e sintomatologia dolorosa

Pode se perceber através dessa revisão que a lesão cariosa esta composta em sua maior parte por bactérias *Gram* positivas, porém existem alguns gêneros de bactérias *Gram* negativas, que quando presentes podem estar associados aos casos com sintomatologia dolorosa. Estas bactérias, além de possuírem diferentes fatores de virulência e gerarem produtos e subprodutos tóxicos aos tecidos apicais e periapicais, contêm endotoxina em sua parede celular. Esse conhecimento é particularmente importante, uma vez que a endotoxina é liberada durante a multiplicação ou morte bacteriana, exercendo uma série de efeitos biológicos relevantes, que conduzem a uma reação inflamatória e à reabsorção dos tecidos mineralizados e a sintomatologia dolorosa (Seltzer, Farber, 1994; Martinho et al. 2014)

Nissan et al. 1995, avaliaram a habilidade das endotoxinas bacterianas se difundirem através da dentina humana. Para isso realizou um estudo *in vitro* em 5 terceiros molares extraídos, onde cavidades foram preparadas de maneira com que restasse 0.5 mm de dentina, e a endotoxina foi introduzida na caixa oclusal. A fonte de endotoxina utilizada neste estudo foi *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, conhecido por ter uma endotoxina extremamente potente. A endotoxina foi extraída usando fenol em água quente. A fim de maximizar a permeabilidade dentinária, a superfície de dentina foi condicionada com ácido fosfórico a 37% por 30 s a fim de remover o esfregaço e a smear layer, depois foi lavada com água isenta de pirógenos. Ambas as câmaras, oclusal e pulpar, foram preenchidas com água livre de pirógenos. Depois de 30 segundos foram coletados 0,1 ml para avaliar a presença de endotoxinas através do teste LAL. Os dentes que deram positivo a presença da endotoxina foram excluídos do estudo. A câmara oclusal foi preenchida com 0,1 mL de uma endotoxina solução de concentração conhecida (100 µg/ml) e a câmara pulpar foi

preenchida com 0,1 ml de água isenta de pirogéno. Depois da adição de endotoxina na câmara oclusal, foram retirados 0,1 ml da câmara pulpar após 15 e 30 minutos e de novo em intervalos de 30 minutos até 5 horas. A amostra final foi coletada 24 h após o início do experimento, resultando num total de 13 amostras por espécime. Como foram retiradas amostras de 0,1 ml foram retiradas da câmara pulpar, um volume igual de água isenta de pirogénos foi adicionado à câmara, mantendo-se assim um volume constante. Os dentes que deram positivo a presença da endotoxina foram excluídos do estudo. As amostras foram submetidas ao teste LAL. Concluiu que a endotoxina é capaz de se difundir através de uma camada de 0,5 mm de dentina num período de tempo relativamente curto. Porém mais pesquisas são necessárias para determinar se estas podem passar por camadas mais espessas de dentina.

Khabbaz et al. 2000, fizeram a determinação de endotoxinas nas camadas superficiais e profundas das lesões cariosas e fez associação com a dor pulpar. Para isso utilizou dois grupo: dentes com pulpite reversível (n=11) e dentes com pulpite irreversível (n=9), foram realizadas duas coletas, uma da dentina mais superficial e outra da região mais profunda. Os critérios utilizados para classificar como pulpite irreversível foram: dor espontânea ou dor severa para estímulos térmicos que duaram minutos ou horas; os critérios para classificar como pulpite reversível foram: nenhuma história de dor pulpar moderada ou grave e sem dor no momento da amostragem e submetidas a estímulos térmicos cessava logo. Foi utilizado um grupo controle (n=4) que contavam com pré-molares intactos com indicação de exodontia por motivos ortodônticos. O dente foi anestesiado e isolado e as duas coletas procedidas com curetas estéreis e apirogênicas e colocadas em tubos estéreis Foi feito um esforço para coletar uma quantidade igual de tecido cariado em todos os casos (cerca de 6 mg) para isso os tubos foram pesados antes e após cada coleta. A extração de endotoxinas foi realizada utilizando o método Fenol + água, as amostras eram agitadas à

temperatura ambiente durante 1 minuto em um vortex. Após a centrifugação a 3500 r.p.m por 50 min o sobrenadante foi removido com uma pipeta e colocado em um tubo estéril em água por 10 min a 60°C para desintegrar as proteínas que podem induzir um resultado falso positivo. A quantificação da endotoxina foi feita através do teste cromogênico LAL. Eles concluíram que a quantidade de endotoxina é maior na camada superficial da dentina cariada e que a quantidade era maior também nos casos de cárie sintomática. Foi a mesma conclusão chegada por Hoshino 1985, que justificou a maior presença das endotoxinas da camada superficial devido ao fato desta dentina estar totalmente desnaturada, e, portanto as condições são apropriadas para a multiplicação de bactérias.

Khabbaz et al. 2001, correlacionaram endotoxinas presentes em dentes humanos cariados e associou com dor pulpar. Contou com uma amostra de 28 dentes e os dividiu em 2 grupos: o grupo com sintomatologia(n=15) e o grupo sem sintomatologia(n=13), além do grupo controle composto por 5 dentes saudáveis. Os critérios utilizados para classificar como pulpite irreversível foram: dor espontânea ou dor severa para estímulos térmicos que duraram minutos ou horas e para classificar como pulpite reversível foram: nenhuma história de dor pulpar moderada ou grave e sem dor no momento da amostragem e submetidas a estímulos térmicos cessava logo. O dente foi anestesiado e isolado. Toda dentina cariada foi removida com uma broca esterelizada em baixa rotação, seguida da penetração a camara pulpar com uma nova broca estéril. A amostra coletada com essa broca foi transferido para um tubo estéril pré-pesado e uma nova pesagem foi realizado após a coleta (cerca de 8mg). Todas as amostras foram armazenadas a -30°C. A extração da endotoxina foi realizado pelo método fenol e água, as amostras foram agitadas à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugadas a 3500 rpm durante 50 minutos. Formaram-se então duas fases dessa solução: a fase superior (sobrenadante) que foi removida com uma pipeta

apirrogênica e colocada em tubo com água por 10 min a 60°C para desintegrar as proteínas que podem induzir um resultado falso positivo. A quantificação da endotoxina foi feita através do teste cromogênico LAL. A quantidade de endotoxinas encontrada foi maior nos dentes que apresentavam sintomatologia compatível a pulpite irreversível.

Jacinto et al. 2005, realizaram a quantificação de endotoxinas de canais com necrose pulpar de dentes sintomáticos e assintomáticos e estudou a possível relação entre a concentração de endotoxina e sinais e sintomas endodônticos. . As amostras foram coletadas dos canais de 50 pacientes e a quantificação foi feita através do teste cromogenico LAL. Nos dentes que possuíam mais de um canal o material foi coletado apenas do maior canal. Os cones de papel foram introduzidos no canal e guardados em posição por 60 segundos para a amostragem. Os cones foram armazenados em ependorfs contendo 1ml solução salina apirrogênica, e alíquotas de 100µl foram utilizadas para a cultura microbiana e o resto da amostragem foi congelada a -30°C. Para a cultura microbiana os 100 µl sofreram diluições em série e 50µl da ultima diluição foi plaqueada em Agar Fastidious Anaerobe. As placas foram incubadas a 37°C numa camara de anaerobiose por 14 dias. Após esse período foi feita a contagem de c.f.u. Para o teste LAL, antes foi realizado a curva padrão e as amostras foram lidas através do leitor de ELISA. Concluiu que a concentração de endotoxinas foi maior nos casos em que havia sinais e sintomas de dor pulpar.

3. PROPOSIÇÃO

Considerando a literatura revisada sobre bactérias, teste molecular Checkerboard e quantificação de endotoxinas a proposta deste estudo é:

- a) investigar e quantificar endotoxinas de lesões cariosas profundas, na camada superficial e profunda;
- b) analisar o perfil bacteriano de lesões cariosas profundas, na camada superficial e profunda;
- c) analisar a diferença entre perfil bacteriano e quantidade de endotoxinas das lesões cariosas profundas sintomáticas e assintomáticas, bem como as diferenças da camada superficial e profunda.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa (CEP) do Instituto de Ciência e Tecnologia- UNESP.(ANEXO A)

4.1 Critérios para seleção

Foram selecionados 20 pacientes com idade entre 18 a 35 anos, que apresentassem pelo menos uma lesão cáriosa profunda em dentina em dentes posteriores permanentes, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão a seguir:

- a) critérios de inclusão: presença de lesão cáriosa profunda em dentina em dentes posteriores permanentes, determinada por meio de radiografias interproximais (lesões que atingiam 2/3 do tecido dentinário), com ou sem sensibilidade dolorosa compatível com pulpite reversível (Dor provocada-aguda, rápida, fugaz em resposta a estímulos, localizada / cede logo após a remoção do estímulo, não há relato de dor à percussão);
- b) critérios de exclusão: presença de fístula; dente com diagnóstico de necrose pulpar ou pulpite irreversível, antibioticoterapia recente, quinzena anterior ao estudo.

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

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

4.2 Coletas das amostras

Os pacientes receberam inicialmente uma profilaxia profissional, com exceção do dente a ser incluído no estudo. Em seguida, o paciente recebeu anestesia do dente em questão e este foi isolado com auxílio de isolamento absoluto (Figura 1A). A seguir, foi realizado o vedamento da interface coroa/lençol com barreira gengival para evitar infiltração de saliva. O dente foi novamente limpo com auxílio de escovas de Robinson e água, para se remover biofilme dentário – película adquirida, ou qualquer tipo de contaminação que não tenha sido removida durante a profilaxia inicial, tomando cuidado para não englobar a lesão que foi estudada. O dique de borracha e o grampo ao redor do dente envolvido foram limpos com bolinha de algodão embebida em clorexidina a 0,12%, para se ter uma antissepsia do campo, tomando o cuidado de não englobar a superfície oclusal do dente e a lesão nesta assepsia, uma vez que a determinação da microbiota bacteriana foi estudada.

A abertura cavitária, se necessária, compreendendo remoção do esmalte sem suporte e/ou restaurações remanescentes foi realizada com o auxílio de pontas diamantadas estéreis e apirogênicas (radiação gama com cobalto 60, dose 20 KGy por 6 horas, esterilização realizada pela EMBRARAD-Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, São

Paulo) em alta velocidade e com refrigeração (solução salina apirogênica) Após acesso à lesão, a dentina foi qualificada (Figura 1B) de acordo com suas características clínicas (cor e dureza), seguindo os critérios descritos por Kidd et al., em 1993, e os dados foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE C). A dentina foi classificada de acordo com a dureza em: mole (fácil penetração da sonda), de consistência média (penetração da sonda após pressão firme) e dura (semelhante ao tecido sadio adjacente); e em relação à cor, esta poderia ser amarela, marrom clara e marrom escura, de acordo com escala de cor desenvolvida para este fim. Caso o dente apresentasse lesão cariada inativa ou paralisada, este foi desconsiderado da pesquisa. Em seguida, a dentina mais superficial foi coletada para análise de bactérias e endotoxinas.

A seguir, a remoção de dentina cariada foi realizada com colheres de dentina estéreis e apirogênicas (Figura 1B). Nova determinação das características clínicas da dentina foi realizada e nova coleta para verificação de bactérias e endotoxinas após remoção do tecido cariado também foi feita (Figura 1D).

A amostragem para realização do teste de Checkerboard e teste cromogênico LAL foi obtida com a utilização de colheres de dentina estéreis e apirogênicas, os microtubos foram pesados antes e após a coleta, sabendo-se assim o peso de dentina coletada. Após realização da coleta, a amostra utilizada para a quantificação de endotoxinas foi colocada em microtubos contendo solução salina estéril e apirogênica e as amostras do teste Checkerboard em tubos contendo 150µL de TE e após a coleta foram inseridos 100µL de NaOH para preservação do DNA bacteriano (Figura 1C, D).

O dente em questão recebeu tratamento odontológico restaurador convencional, seja tratamento definitivo realizado com resina composta ou expectante com cimento de ionômero de vidro, dependendo da situação clínica de cada caso. (Figura 1 F).

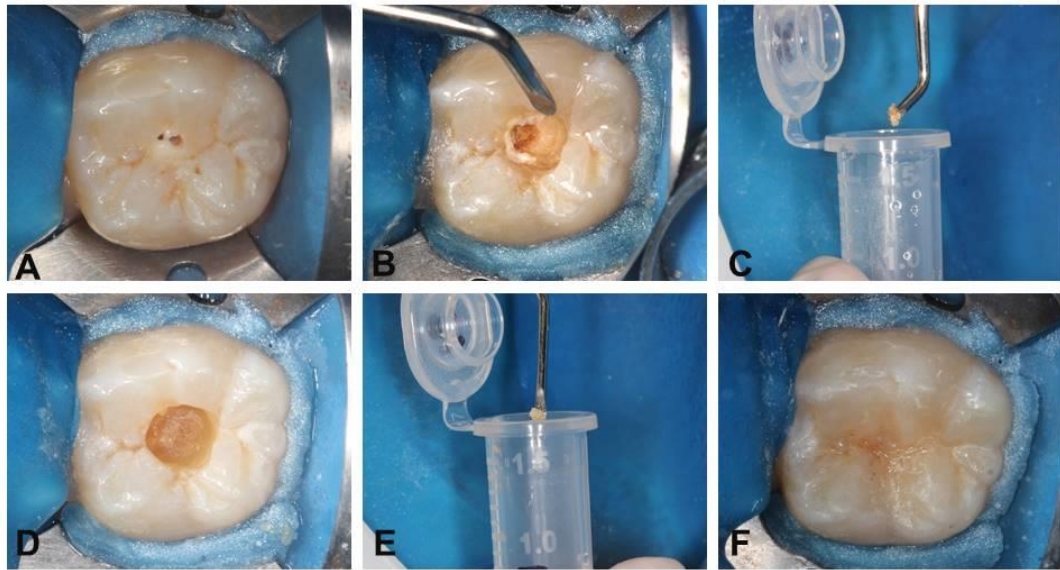


Figura 1- A a F. Sequência para realização da coleta dentina cariada.

Os microtubos, contendo a amostra coletada, a água apirogênica e a dentina coletada, foram agitados por vortex por 60 segundos.

Foram obtidos 4 microtubos ao final de cada coleta. Duas alíquotas foram utilizadas para determinação do conteúdo endotóxico, por meio do teste cinético cromogênico LAL, e as duas outras alíquotas foram submetidas ao teste Checkerboard, para determinação do perfil bacteriano.

O processamento das amostras para o teste Checkerboard seguiu o seguinte protocolo:

4.3 Quantificação pelo teste Checkerboard

O teste foi realizado na Universidade de Guarulhos(UnG)

4.3.1 Extração do DNA bacteriano

O *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi utilizado para estudar a diversidade microbiológica da dentina cariada investigando 40 espécies bacterianas encontradas nas lesões cariosas profundas.

A extração de DNA foi realizada com o QIamp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.2 Colocação das amostras na membrana de *nylon*

Uma membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL- USA) foi montada em Minislot 30® (Immunetics, Cambridge, MA – USA). Cada suspensão de amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do Minislot 30® e o DNA permaneceu depositado na membrana de *nylon*. A membrana foi removida do aparato e o DNA, previamente depositado na mesma, foi fixado por intermédio de aquecimento em forno a 120 °C, por 20 minutos. As duas últimas canaletas do *Minislot* 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos microrganismos que foram investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas.

4.3.3 Hibridização da membrana com as sondas de DNA

Após a fixação do DNA na membrana, esta foi pré-hibridizada a 42°C, por uma hora, numa solução de 50 % formamida, 1 % caseína, 5 X SSC (Solução Salina Citrada), 25 nM de fosfato de sódio (pH

6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura. A membrana foi então colocada sob a placa acrílica do *Miniblotter* 45® (Immunetics, Cambridge, MA – USA), rotacionada 90° de sua posição original, com as linhas contendo o DNA fixado, perpendiculares às canaletas do *Miniblotter* 45®. O *Miniblotter* 45® contém 45 canaletas que servem cada uma, para a colocação de uma sonda de DNA.

As sondas de DNA específicas para as 40 espécies que foram usadas neste estudo (Quadro 1) foram confeccionadas usando *random primer digoxigenin labeling kit* (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN – USA), Essas espécies foram selecionadas devido à sua associação com as lesões cariosas e endodônticas (Gomes et al., 1994; Siqueira Jr. et al., 2001; Siqueira Jr & Rôças, 2004; Gomes et al., 2004; Lima et al., 2011).

Quadro 1- Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano

(continua)

ESPÉCIE	CEPA (ATCC)	GRAM	METABOLISMO
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596	Gram-	Anaeróbio estrito

Quadro 1- Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano

(continua)

ESPÉCIE	CEPA (ATCC)	GRAM	METABOLISMO
<i>Campylobacter showae</i>	51146	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Actinomyces oris</i>	43146	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	Gram-	Anaeróbio facultativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	Gram+	Anaeróbio estrito
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	Gram+	Anaeróbio estrito

Quadro 1- Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano

(continua)

ESPÉCIE	CEPA (ATCC)	GRAM	METABOLISMO
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp. <i>nucleatum</i>	25586	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp. <i>polymorphum</i>	10953	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp. <i>vincentii</i>	49256	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	Gram+	Anaeróbio estrito
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Lactobacillus fermentum</i>	14931	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Parvimonas micra</i>	33270	Gram	Anaeróbio estrito

Quadro 1- Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano

(continua)

ESPÉCIE	CEPA (ATCC)	GRAM	METABOLISMO
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Parvimonas micra</i>	33270	Gram	Anaeróbio estrito
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella intermedia</i>	25611	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Propionibacterium acnes I e II</i>	11827 e 11828	Gram+	Anaeróbio terotolerante
<i>Selenomonas noxia</i>	43541	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	Gram	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	Gram+	Anaeróbio facultativo

Quadro 1- Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano

(conclusão)

ESPÉCIE	CEPA (ATCC)	GRAM	METABOLISMO
<i>Streptococcus mitis</i>	49456	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus mutans</i>	25175	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus oralis</i>	35037	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	Gram+	Anaeróbio facultativo
<i>Tanarella forsythia</i>	43037	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Treponema denticola</i>	B1	Gram-	Anaeróbio estrito
<i>Veillonella parvula</i>	10790	Gram-	Anaeróbio estrito

Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de 10^4 células bacterianas. Suas concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas seja semelhante.

Cada sonda de DNA contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20 mg/mL de sonda de DNA). Cada canaleta do *Miniblotter* 45® foi preenchida com 135 µL de uma determinada sonda. As sondas foram hibridizadas perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixadas, propiciando um formato xadrez com as linhas de DNA horizontais, e as sondas verticais. O aparato *Miniblotter* 45® e a membrana com as sondas e o DNA das amostras bacteriana fixado, foi colocado dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas e incubado a 42 °C para que a hibridização ocorra. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu durante um período mínimo de 12 horas (*overnight*).

4.3.4 Detecção das espécies

Após a hibridização com as sonda, as membranas foram removidas do *Miniblotter* 45® e lavadas por 40 minutos a 65 °C, numa solução adstringente de PO₄ Buffer (Tampão de fosfato), a fim de remover sondas que não hibridizarem completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora, sob agitação, numa solução bloqueadora contendo 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3 % Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0 e por 30 minutos na mesma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina (*Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim – Germany) conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer, Mannheim – Germany), numa diluição 1/25.000. As membranas foram, então, lavadas com uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, duas vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0,1 M Tris HCl, 0,1 NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5. Em seguidas as membranas foram incubadas em solução

detectora, *CDP-Star Detection Reagent* ®(Amershan Biosciences UK Limited, Buckinghamshire – UK), por 60 minutos a 37 °C. Finalmente, as membranas foram colocadas em cassete sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) por aproximadamente 40 minutos, e os filmes foram revelados logo em seguida.

Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra da dentina cariada foi comparado ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 . Sendo classificada em 5 escores: 0-nível inferior de detecção, 1- nível $< 10^5$ bactérias, 2- nível de cerca de 10^5 bactérias, 3- nível $> 10^5$ e $< 10^6$. bactérias, 4-um nível de aproximadamente 10^6 . bactérias, 5- um nível $< 10^6$. bactérias.

4.4 Quantificações de endotoxinas

As quantificações das endotoxinas presentes nas lesões cariosas foram feitas através do teste cinético cromogênico LAL.

Os microtubos contendo as amostras foram armazenados em 1 mL de água apirogênica e agitados durante 1 minuto. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas transferindo 50 µL da amostra matriz para a diluição 10^{-1} e após transferido 50 µL da diluição 10^{-1} para diluição 10^{-2} em microtubos (1,5 mL) contendo 450 µL de água apirogênica.

Vale ressaltar que anteriormente a realização do experimento, foi realizado um estudo piloto para determinar quais seriam as amostras utilizadas durante o teste de endotoxinas.

Para verificar a neutralização da endotoxina, as amostras coletadas foram submetidas à análise quantitativa pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL) (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

Inicialmente foi realizada uma curva-padrão. O controle padrão de endotoxina de *Escherichia coli* foi reconstituído com um volume especificado, no certificado de qualidade, da água apirogênica. Esta suspensão contém 50 EU/mL. Foram realizadas diluições a partir deste padrão de endotoxina em diferentes concentrações (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 EU/mL). Para cada amostra, foi realizado um controle positivo .(APÊNDICE D).

Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 µL de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas e os controles positivos. A placa foi incubada no leitor cinético QCL a 37 ± 1 °C por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com *software* WinkQCL™ específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiras apirogênicas . Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorava, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorvância a 405 nm em cada poço da microplaca. O *software* WinkQCL™ automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório de impressão.

5 RESULTADOS

A média de idade dos 20 pacientes atendidos neste estudo foi de $29,2 \pm 1,5$. Dos 20 pacientes, 15 receberam tratamento definitivo após remoção de tecido cariado e 5 receberam tratamento com cimento de ionômero de vidro, de acordo com a indicação de cada caso.

As lesões cariosas foram caracterizadas radiograficamente e foram selecionadas apenas lesões profundas ($>2/3$ da extensão da dentina) e ainda clinicamente de acordo com a atividade (ativa/paralisada), consistência (mole/média/dura) e coloração (amarela, marrom clara, marrom escura).

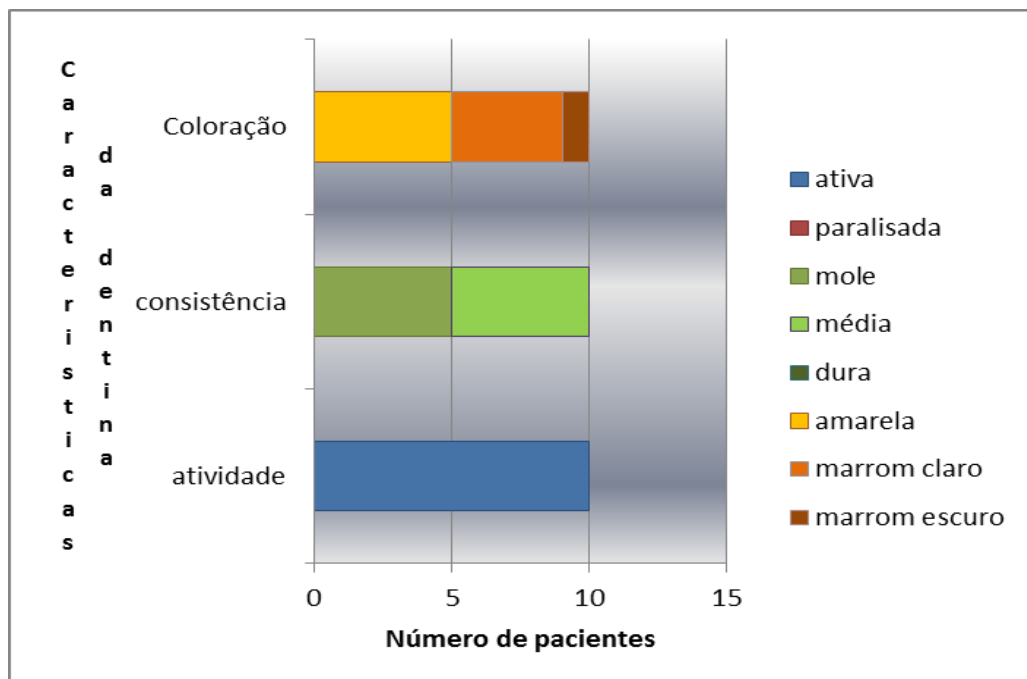


Figura 2- Atividade, consistência e coloração das lesões cariosas da camada superficial dos pacientes com sintomatologia.

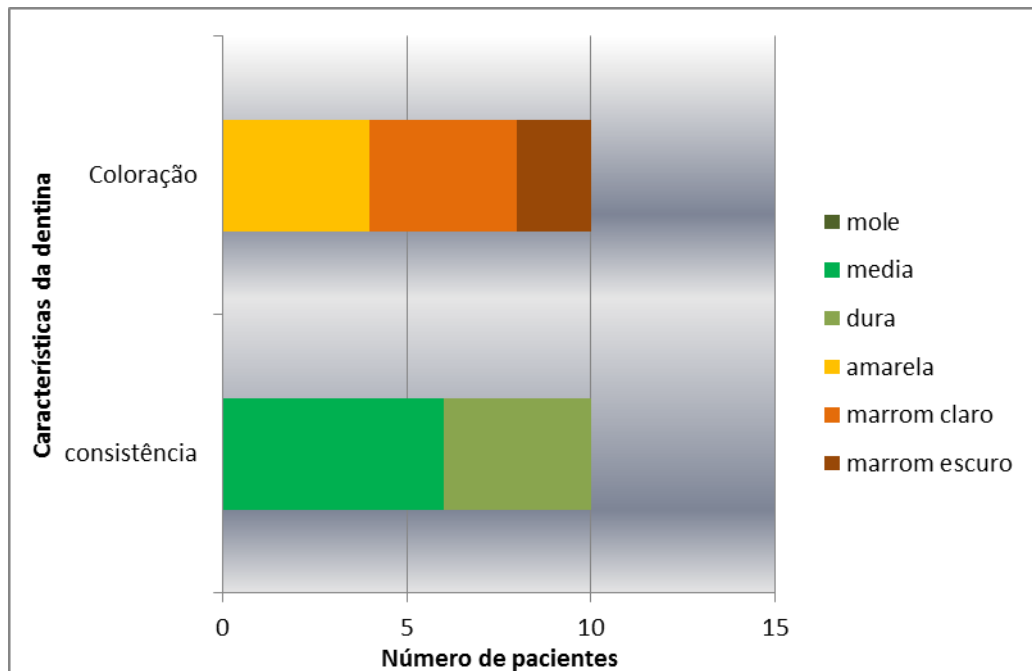


Figura 3- Consistência e coloração das lesões cariosas da camada profunda dos pacientes com sintomatologia

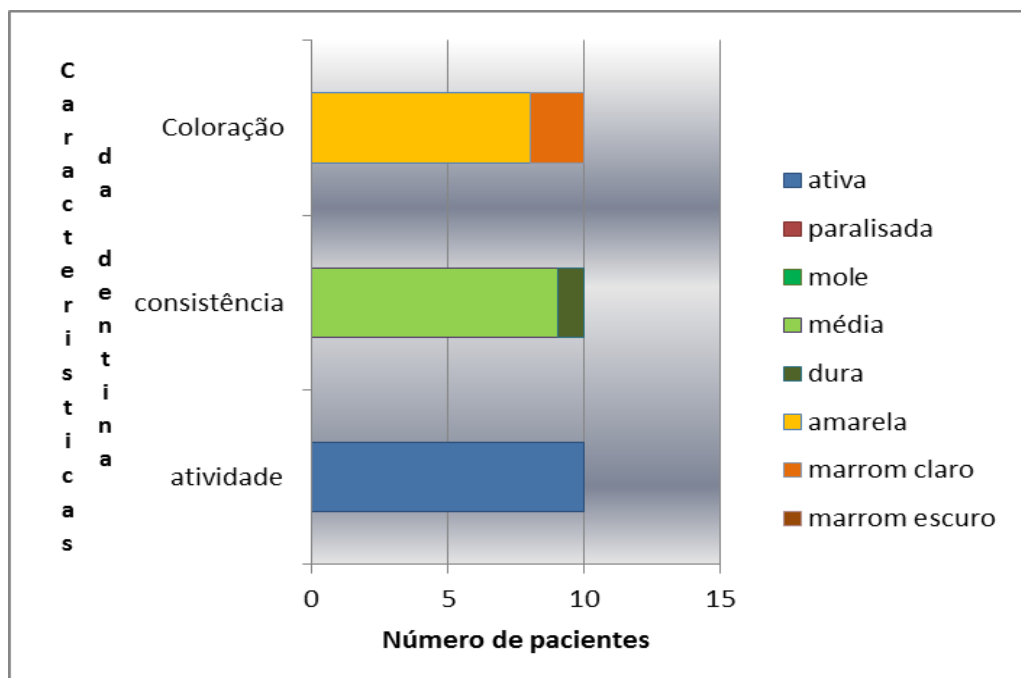


Figura 4- Atividade, consistência e coloração das lesões cariosas da camada superficial dos pacientes sem sintomatologia.

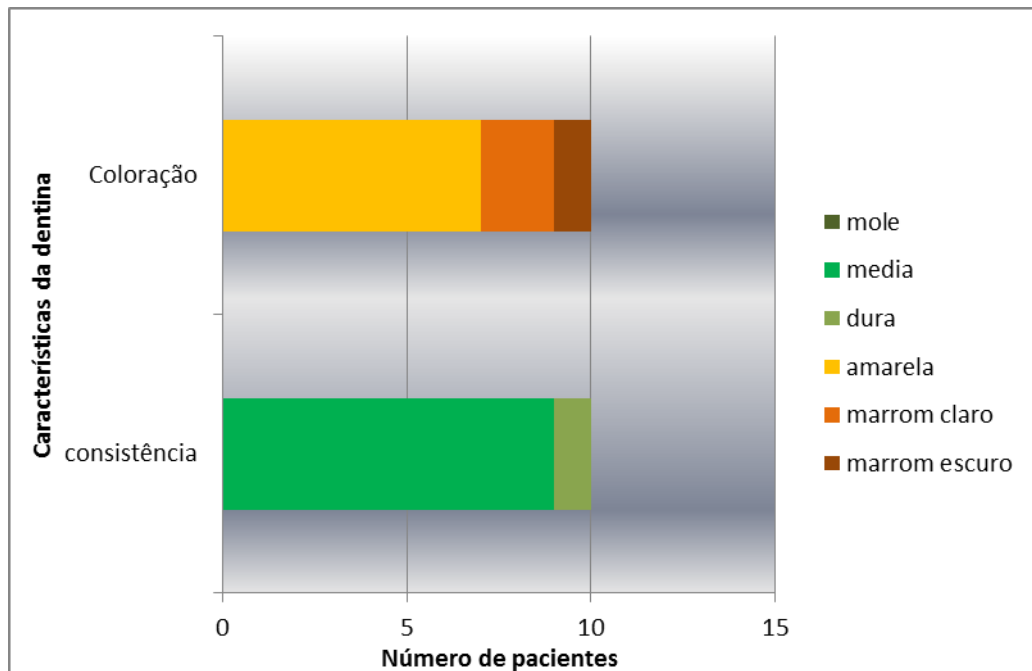


Figura 5- Consistência e coloração das lesões cariosas da camada profunda dos pacientes sem sintomatologia.

No caso dos pacientes com sintomatologia, na camada superficial todas as lesões foram caracterizadas clinicamente como ativas, de acordo com a consistência 50 % encontrava-se amolecida e os outros 50 % média. A coloração de 50 % era amarela, 40 % marrom claro e 10 % marrom escuro. Na camada profunda a consistência de 60 % das lesões foram médias e 40 % duras e a coloração de 40 % era amarela, 40 % marrom claro e 20 % marrom escuro.

No caso dos pacientes sem sintomatologia, na camada superficial todas as lesões foram caracterizadas clinicamente como ativas, de acordo com a consistência 90 % encontrava-se amolecida e os outros 10 % dura. A coloração de 80 % era amarela, 20 % marrom claro. Na camada profunda a consistência de 90% das lesões foram médias e 10 % duras e a coloração de 60 % era amarela, 30 % marrom claro e 10 % marrom escuro.

5.1 Checkerboard

A predominância das seguintes espécies foram observadas em todas as amostras: *Lactobacillus fermentum*, *Actinomyces gerencsarie*, *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum* (sp. *Nucleatum*), *Lactobacillus acidophilus*, *Fusobacterium nucleatum*(sp. *Polymorphum*), *Capnocytophaga ochracea* e *Veillonella parvula* (Figura 6).

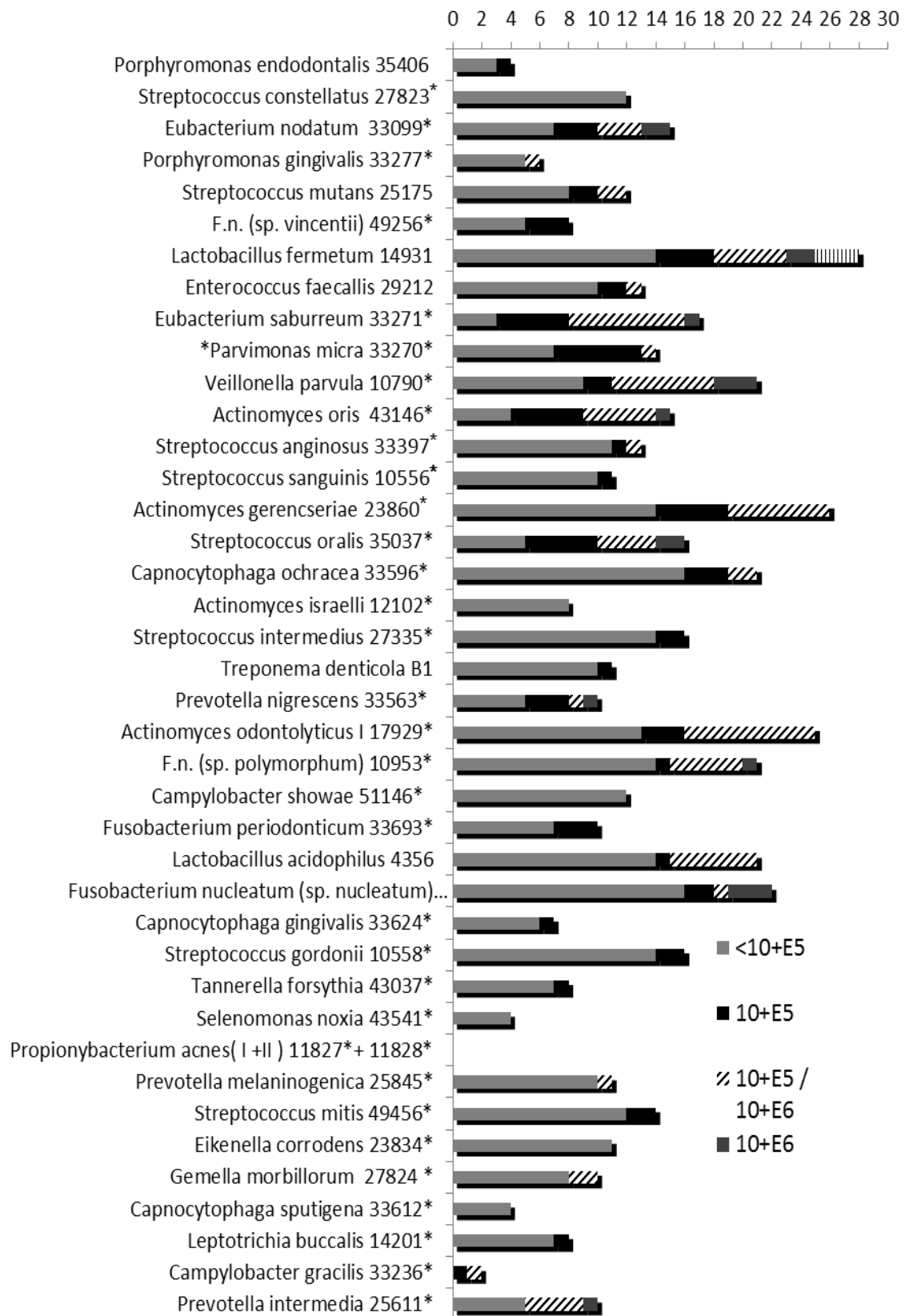


Figura 6 -Relação das bactérias estudadas e suas concentrações.

Houve uma predominância, na camada superficial da lesão cariosa, das seguintes espécies: *Lactobacillus fermentum*, *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*(sp. *Polymorphum*), *Capnocytophaga ochracea* *Lactobacillus acidophilus*, *Veilonella parvula*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*(sp *nucleatum*) (Figura 7).

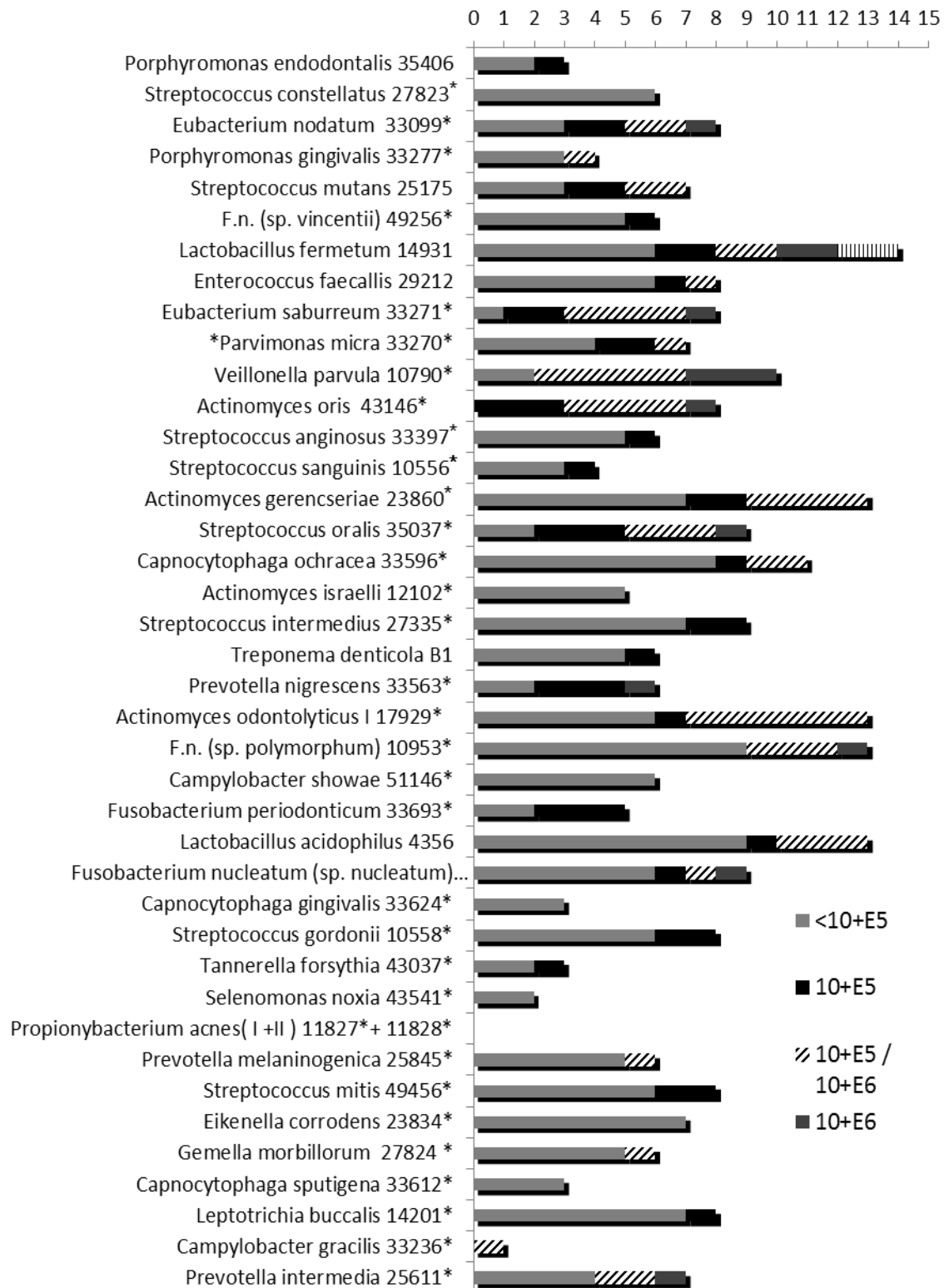


Figura 7- Relação das bactérias estudadas presentes na camada superficial e suas concentrações.

Na camada profunda da lesão cariosa as seguintes espécies foram predominantes: *Lactobacillus fermentum*, *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eubacterium sabureum*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*(sp. *nucleatum*), *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium nucleatum*(sp *polymorphum*) (Figura 8)

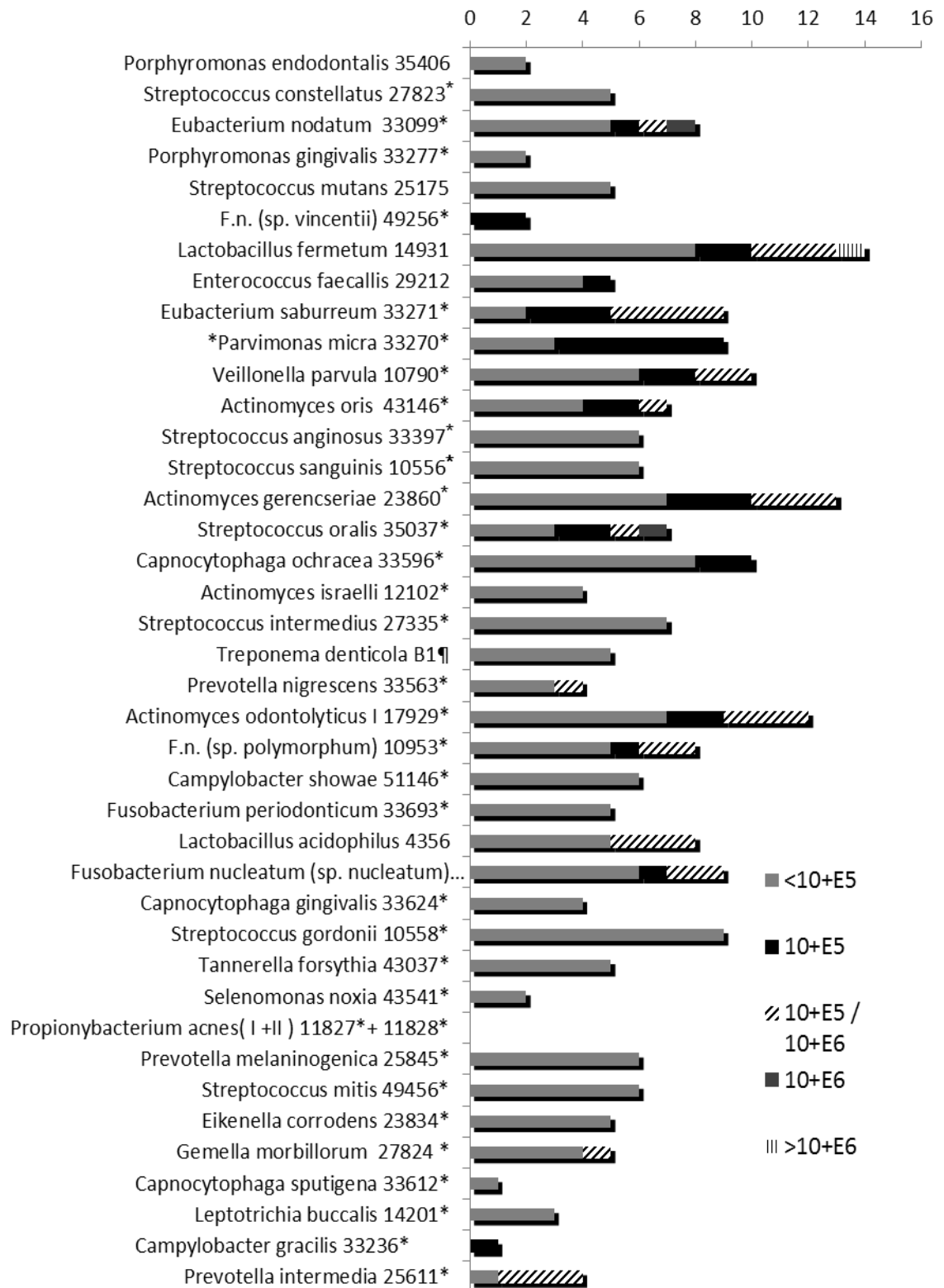


Figura 8- Relação das bactérias presentes na camada profunda e suas concentrações.

Pode- se perceber uma predominância, na camada superficial da lesão cariosa, dos pacientes sem sintomatologia, das seguintes espécies: *Actinomyces odontolyticus I*, *Leptotrichia buccalis*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces gerencseriae*, *Eubacterium notadum*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces oris*, *Capnocytophaga ochracea*, *Streptococcus gordonii*. (Figura 9)

Na camada profunda da lesão cariosa, dos pacientes sem sintomatologia, as seguintes foram as mais prevalentes: *Lactobacillus fermentum*, *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces odontolyticus I* (Figura 10).

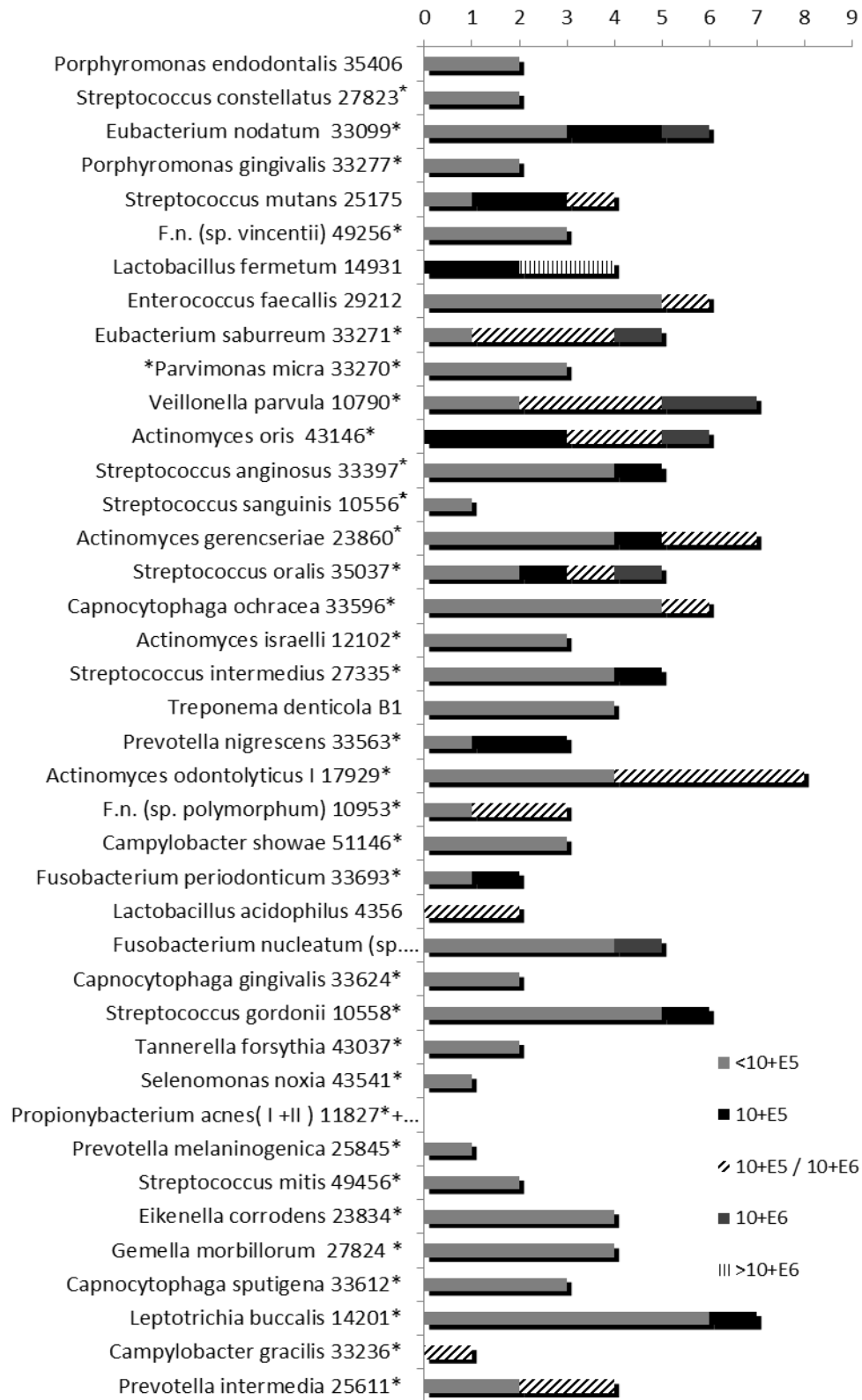


Figura 9- Relação das bactérias presentes na camada superficial e suas concentrações nos pacientes sem sintomatologia.

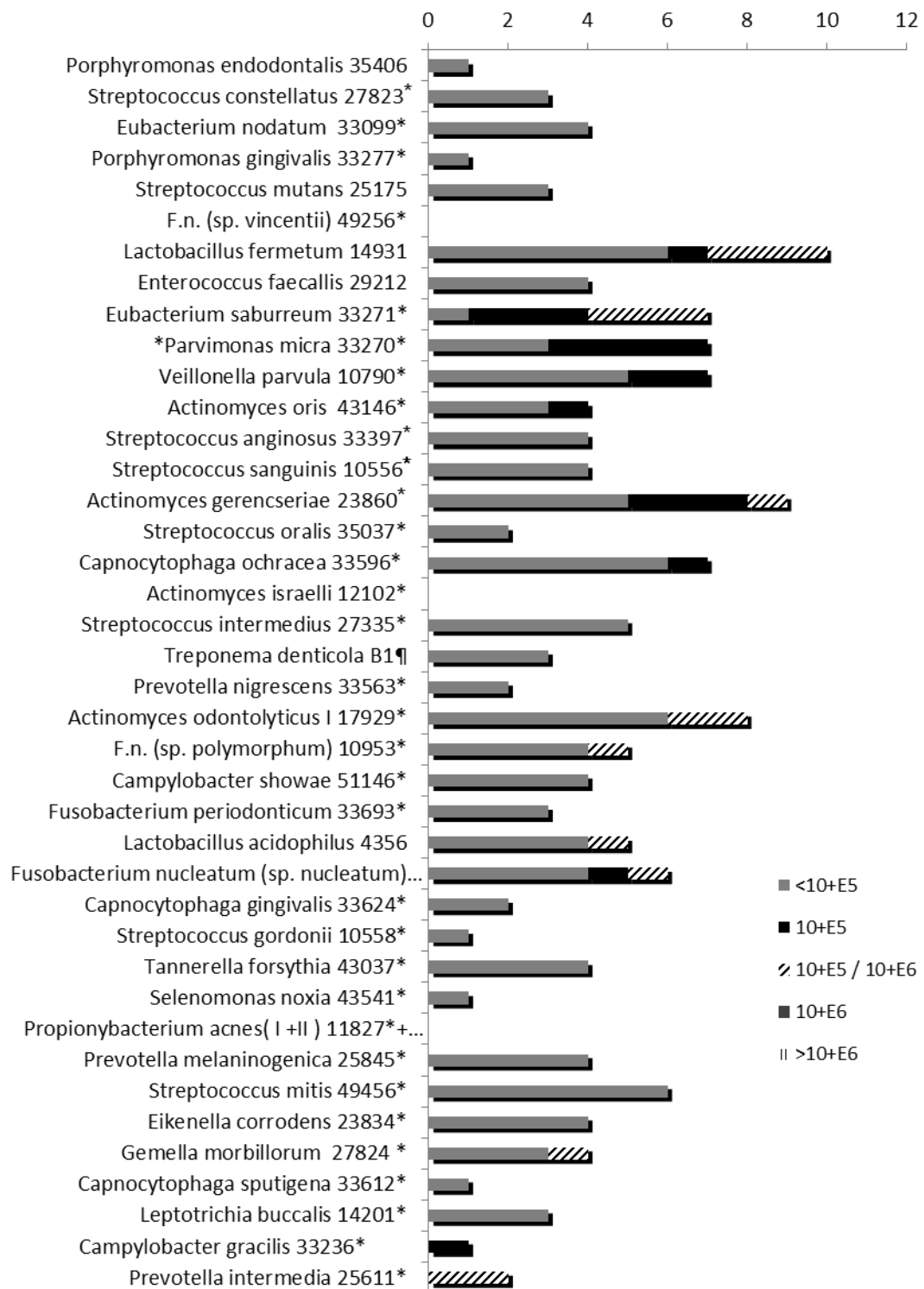


Figura 10- Relação das bactérias presentes na camada profundas e suas concentrações nos pacientes sem sintomatologia.

Na camada superficial da lesão cariada, dos pacientes com sintomatologia, as seguintes espécies foram as mais encontradas: *Lactobacillus fermentum*, *Actinomyces gerencseriae*, *Capnocytophaga ochracea*, *Actinomyces odontolyticus I*, *Lactobacillus acidophilus*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum*(*sp. nucleatum*)(Figura 11).

Pode-se perceber uma predominância, na camada profunda da lesão cariada, dos pacientes com sintomatologia, das seguintes espécies: *Veillonella parvula*, *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces odontolyticus I* (Figura 12).

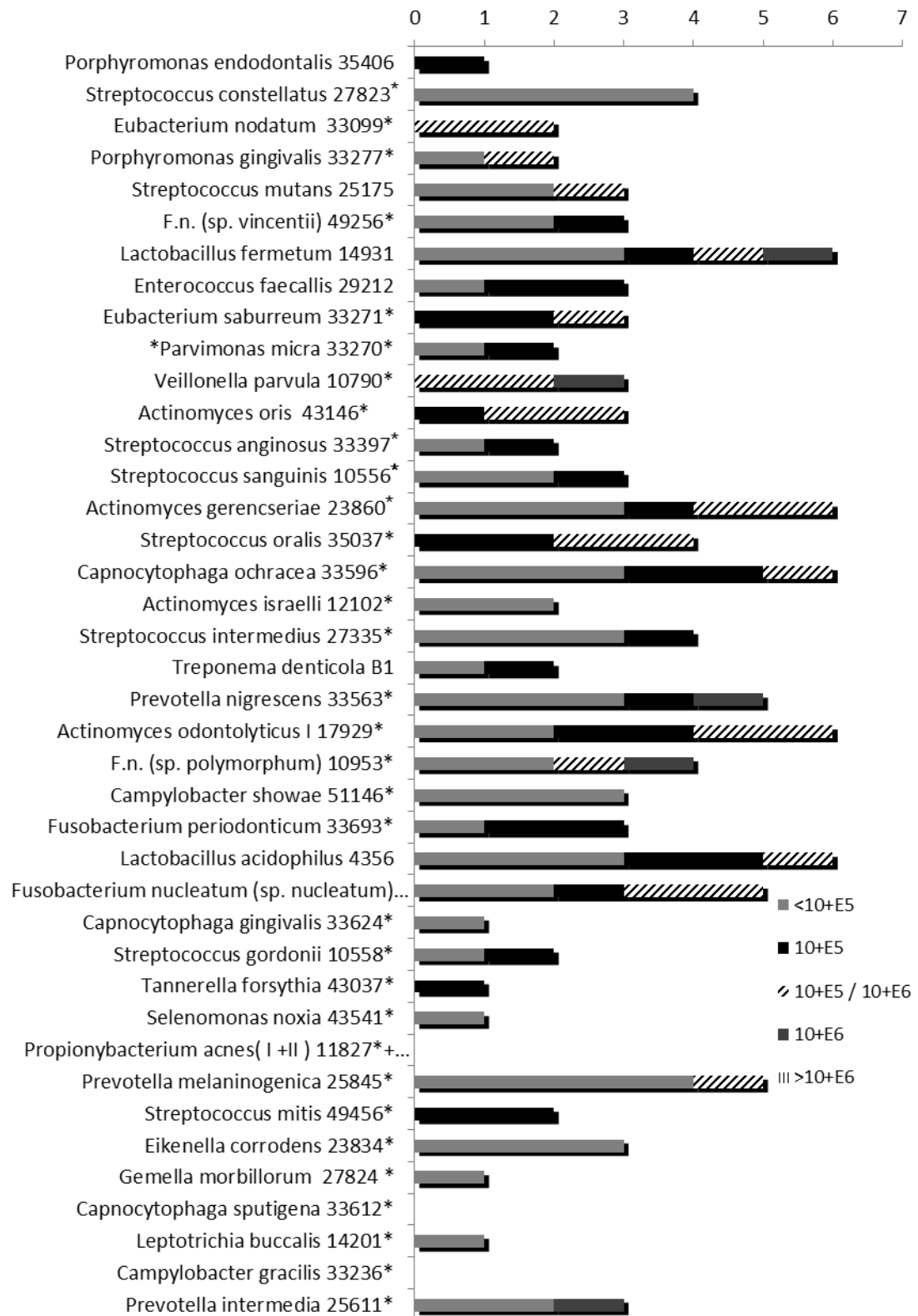


Figura 11- Relação das bactérias presentes na camada superficial e suas concentrações nos pacientes com sintomatologia.

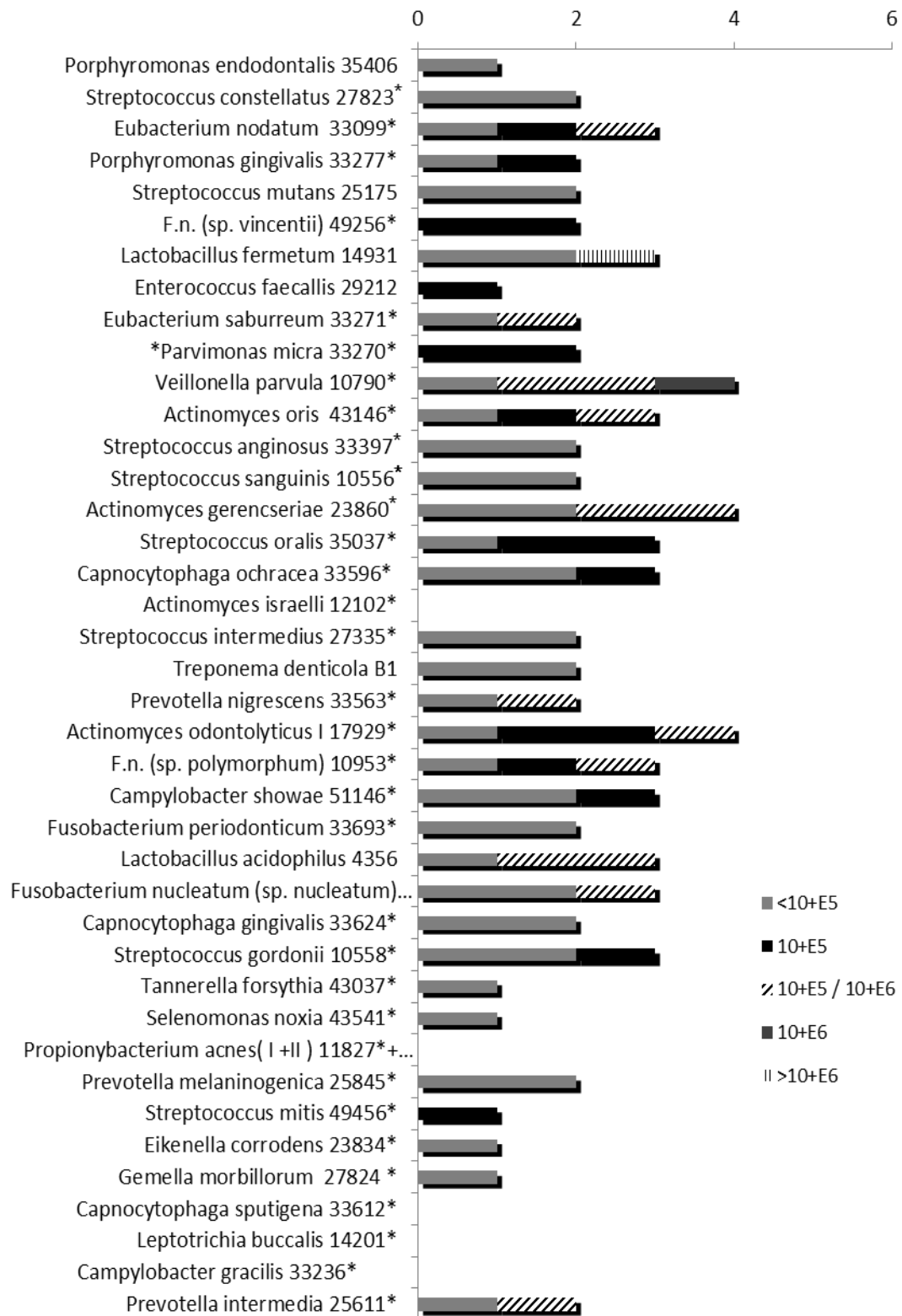


Figura 12- Relação das bactérias presentes na camada profunda e suas concentrações nos pacientes com sintomatologia.

Por meio do teste Mann Withney não observamos diferenças entre a camada de dentina superficial e profunda para as bactérias estudadas. Já com relação ao fator sensibilidade as bactérias *Capnocytophaga sputigena* e *Leptotrichia buccalis* e *Lactobacillus* foram as únicas que apresentaram diferença estatística, sendo mais presentes nos pacientes com sintomatologia.

A carga bacteriana dos microrganismos estudados esta apresentada nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Média das cargas bacterianas nos casos de pacientes com sintomatologia

(continua)

ESPÉCIE	Média carga bacteriana	
	Superficial	Profunda
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	1,2	1,4
<i>Actinomyces israelii</i>	0,3	0
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,6	1,2
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0,8	0,8
<i>Campylobacter showae</i>	0,3	0,4
<i>Campylobacter gracilis</i>	0,3	0,2
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0,2	0,2
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0,3	0,1
<i>Actinomyces oris</i>	1,6	0,5

Tabela 1- Média das cargas bacterianas nos casos de pacientes com sintomatologia

(continua)

ESPÉCIE	Média carga bacteriana	
	Superficial	Profunda
<i>Eikenella corrodens</i>	0,4	0,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,8	0,4
<i>Eubacterium nodatum</i>	1,1	0,4
<i>Eubacterium saburreum</i>	1,4	1,6
<i>Fusobacterium nucleatum spp. nucleatum</i>	0,8	0,9
<i>Fusobacterium nucleatum spp. polymorphum</i>	0,7	0,7
<i>Fusobacterium nucleatum spp. vincentii</i>	0,3	0
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	0,3	0,3
<i>Gemella morbillorum</i>	0,4	0,6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,6	0,7
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,4	1,3
<i>Leptotrichia buccalis</i>	0,8	0,3
<i>Parvimonas micra</i>	0,3	1,1
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0,2	0,1
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,2	0,1
<i>Prevotella intermedia</i>	0,8	0,6

Tabela 1- Média das cargas bacterianas nos casos de pacientes com sintomatologia

(continua)

ESPÉCIE	Média carga bacteriana	
	Superficial	Profunda
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0,1	0,4
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,5	0,2
<i>Propionibacterium acnes I e II</i>	0	0
<i>Selenomonas noxia</i>	0,1	0,1
<i>Streptococcus constellatus</i>	0,2	0,3
<i>Streptococcus gordonii</i>	0,7	0,1
<i>Streptococcus intermedius</i>	0,6	0,5
<i>Streptococcus mitis</i>	0,2	0,6
<i>Streptococcus mutans</i>	0,8	0,3
<i>Streptococcus oralis</i>	1,1	0,2
<i>Streptococcus anginosus</i>	0,6	0,4
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,1	0,4
<i>Tanerella forsythia</i>	0,2	0,4
<i>Treponema denticola</i>	0,4	0,3
<i>Veillonella parvula</i>	1,9	0,9
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	1,1	0,8

Tabela 1- Média das cargas bacterianas nos casos de pacientes com
sintomatologia

(conclusão)

ESPÉCIE	Média carga bacteriana	
	Superficial	Profunda
<i>Actinomyces israelii</i>	0,2	0
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,2	0,8
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	1	0,4
<i>Campylobacter showae</i>	0,3	0,4

Tabela 2- Média das cargas bacterianas nos casos de pacientes sem sintomatologia

(continua)

ESPÉCIE	Média carga bacteriana	
	Superficial	Profunda
<i>Campylobacter gracilis</i>	0	0
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0,1	0,2
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0	0
<i>Actinomyces oris</i>	0,8	0,6
<i>Eikenella corrodens</i>	0,3	0,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,5	0,2
<i>Eubacterium nodatum</i>	0,6	0,6
<i>Eubacterium saburreum</i>	0,7	0,4
<i>Fusobacterium nucleatum spp. nucleatum</i>	1	0,5
<i>Fusobacterium nucleatum spp. polymorphum</i>	0,9	0,6
<i>Fusobacterium nucleatum spp. vincentii</i>	0,4	0,4
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	0,5	0,2
<i>Gemella morbillorum</i>	0,1	0,1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	0,7
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,2	0,7
<i>Leptotrichia buccalis</i>	0,1	0

Tabela 2- Média das cargas bacterianas nos casos de pacientes sem sintomatologia

(continua)

ESPÉCIE	Média carga bacteriana	
	Superficial	Profunda
<i>Parvimonas micra</i>	0,3	0,4
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0,2	0,1
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,4	0,3
<i>Prevotella intermedia</i>	0,6	0,4
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0,7	0,2
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,9	0,4
<i>Propionibacterium acnes I e II</i>	0	0
<i>Selenomonas noxia</i>	0,1	0,1
<i>Streptococcus constellatus</i>	0,4	0,2
<i>Streptococcus gordonii</i>	0,3	0,4
<i>Streptococcus intermedius</i>	0,5	0,2
<i>Streptococcus mitis</i>	0,4	0,2
<i>Streptococcus mutans</i>	0,5	0,2
<i>Streptococcus oralis</i>	1	0,5
<i>Streptococcus anginosus</i>	0,3	0,2
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,4	0,2

Tabela 2- Média das cargas bacterianas nos casos de pacientes sem sintomatologia

(conclusão)

ESPÉCIE	Média carga bacteriana	
	Superficial	Profunda
<i>Tanerella forsythia</i>	0,2	0,1
<i>Treponema denticola</i>	0,3	0,2
<i>Veillonella parvula</i>	1	1,1

5.2 Endotoxinas

As médias das endotoxinas da dentina superficial e profunda e seus respectivos desvios padrão estão apresentados na tabela 3

Tabela 3- Quantificação de endotoxinas(EU/ml)

	Superficial	dp	Profunda	dp2
Com dor	78,05	86,17	36,12	73,08
Sem dor	10,56	11,29	37,22	10,07

Pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os dados obtidos não apresentaram distribuição normal ($p < 0,001$) e foram transformados em $\log_{10}$ (Tabela 4).

O teste ANOVA dois fatores foi utilizado e somente o fator sensibilidade apresentou influência (Tabela 5). Foi realizado o teste de Tukey para o fator sensibilidade, os níveis de endotoxinas foram maiores nos pacientes com sintomatologia (Tabela 6)

Tabela 4- Quantificação de endotoxinas em log 10

	Superficial	dp	Profunda	dp2
Com dor	4,40	0,873	3,86	0,929
Sem dor	3,70	0,590	3,38	1,118

Tabela 5- ANOVA dois fatores

Efeito	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	589,8947	1	122157,4	88,8479	0,000000
Sensibilidade	3,4112	1	3,42112	4,2280	0,047067
Tipo de dentina	1,8509	1	1,8509	0,2042	0,138598
Erro	29,0449	36	0,8068		

Tabela 6- Teste de Tukey para o fator sensibilidade

	Média log10	1	2
Com dor	4,13		****
Sem dor	3,45	****	

6 DISCUSSÃO

Na literatura revisada não ocorreram relatos da correlação entre sintomatologia dolorosa com o perfil bacteriano e níveis de endotoxinas de lesões cariosas profundas como foi feito por este trabalho. Este estudo foi realizado com o objetivo de entender as características citadas acima e se pensar em futuras possibilidades para a abordagem clínica dos pacientes com lesões cariosas profundas e com sintomas de pulpite reversível, visto que existem medicações que podem neutralizar as endotoxinas, que são as principais causadoras da dor. Um dos materiais que podem exercer tal função é o Hidróxido de Cálcio, que está altamente presente na rotina clínica do profissional. Talvez a simples limpeza da cavidade com uma solução de hidróxido de cálcio possa auxiliar na redução da sensibilidade, porém ainda não existe nenhum trabalho que mostre o efeito dessa terapia em lesões cariosas, o que é uma sugestão para estudos futuros.

6.1 Checkerboard

Poucos estudos foram realizados utilizando a metodologia do Checkerboard para avaliar lesões cariosas (Lima et al. 2011; Ass et al. 2008; Ginazi et al. 2009)

Historicamente a quantidade de bactérias na dentina afetada é menor que na dentina infectada (Massler 1967; Fusayama 1979), porém o conceito de dentina afetada considerava a remoção total do tecido cariado, inclusive da região cariada passível de remineralização. Os resultados do presente estudo trazem dados conflitantes com estes trabalhos de referência, uma vez que não

encontramos diferenças entre a quantidade de bactérias entre a dentina infectada e afetada. Esta observação pode estar relacionada com a metodologia utilizada, a qual resulta em dados de biologia molecular semi-quantitativos, os quais também podem detectar bactérias mortas e inativas. Por outro lado, estes dados estão de acordo com Lima et al. 2011 e Munson et. al. 2004. Possivelmente essa semelhança se dá pela semelhança na área de dentina coletada e analisada nos 3 estudos: na zona superficial da dentina cariada (dentina infectada) e na região mais profunda correspondendo a dentina afetada.

O padrão clínico para se definir dentina afetada e infectada não é tão claro e pode variar de acordo com o profissional e o conceito que este tem de cada uma das áreas da dentina. Pois como já foi dito, trabalhos mais antigos preconizavam a remoção de toda dentina após a utilização da fúrcula e a dentina remanescente era considerada afetada. Hoje sabe-se que com a utilização da fúrcula toda dentina afetada era removida, permanecendo a dentina sadia.

Em relação às bactérias das lesões cariosas, Simon-Soro et al. 2014 concluíram que os *Lactobacillus* são encontrados quase que exclusivamente nas lesões de dentina e também que os *Streptococcus mutans* representam apenas 0,02% a 0,73% da comunidade bacteriana total. A metodologia usada no referido estudo foi a metatranscriptase, a qual faz a amplificação do gene a partir do RNA e não detecta bactérias mortas, ao contrário do PCR e Checkerboard que fazem amplificação a partir do DNA e detectam bactérias vivas e mortas. Além disso, as coletas foram realizadas em locais diferentes do presente estudo: foram coletadas cárie de esmalte e cárie de dentina sem distinguir a profundidade, se dentina superficial ou profunda. Apesar das diferenças metodológicas, entre os estudos, *Lactobacillus* também foram as bactérias predominantemente encontradas em todas as lesões independente da profundidade e da sintomatologia, em diferentes níveis de concentração.

Aas et al. 2008 em seu trabalho concluíram que existem dois tipos de lesões: as com altas taxas de *Streptococcus mutans* e as com baixas taxas de *Streptococcus mutans*. Apesar de ter usado a mesma metodologia, o fato de ter coletado de locais diferentes (Esmalte, lesão de mancha branca, lesão em dentina, lesão em dentina profunda) dos coletados por este trabalho, onde os *Streptococcus mutans* apareceram em 12 de 20 amostras, fazem com que os resultados sejam distintos, além disso, as lesões analisadas nesse estudo eram predominantemente em esmalte.

Chhour et al 2005, concluíram em seu trabalho que as espécies *Lactobacillus spp* e Prevotella foram as predominantes em lesões cariosas profundas, o que foi confirmado por nosso trabalho, os *Lactobacillus spp* apareceram em 14 de 20 amostras e a Prevotella em 9 de 20 amostras. Não foram localizados na literatura relato sobre o nível de outras bactérias específicas das lesões cariosas.

Nadikarni 2010 et al concluíram que *Lactobacillus* são a espécie predominante nos casos de pacientes com sintomatologia em lesões cariosas profundas e estas são a espécie predominante também nos estágios iniciais da infecção polimicrobiana da polpa dental. Existe uma limitação de estudos que mostram o potencial patogênico dos lactobacilos, embora se sabe que eles são capazes de fazer agregação plaquetária e ativação de plasminogênio. No presente estudo também foi verificada uma maior prevalência de altas concentrações da espécie *Lactobacillus* nos pacientes que apresentavam sintomatologia.

Martin et al 2002 verificaram em seu trabalho uma associação positiva entre *M. micros* e *P. endotalis*, presentes nas lesões cariosas profundas com pulpite irreversível. Concluíram também que existe uma predominância de bactérias Gram positivas nas lesões cariosas, particularmente *Lactobacillus*, bem como bactérias Gram negativas estavam presentes em número significativo. Essas constatações também foram observadas no presente estudo, onde a

espécie *Lactobacillus* foi a de maior incidência quando todas as amostras foram analisadas, e as Gram negativas com maiores taxas foram: *Capnocytophaga ochracea* e *Prevotella nigrescens*. Porém em nosso estudo nos casos de pacientes com sintomatologia houve uma maior prevalência das espécies *Lactobacillus fermentum*, *Actinomyces gerencseriae*, *Capnocytophaga ochracea*, *Actinomyces odontolyticus* I, *Lactobacillus acidophilus*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum*(sp. *nucleatum*), visto que analisamos apenas pacientes com pulpite reversível, possivelmente justificando as diferentes bactérias encontradas.

Hahn et al. 1991, correlacionaram a presença de *Lactobacillus* nas lesões cariosas profundas com morte pulpar e pulpite irreversível. Segundo eles o grupo de *Lactobacillus* foi a espécie predominante das lesões cariosas avançadas o que também foi confirmado por este estudo. Isso pode ser explicado pelo fato de o ambiente ser extremamente ácido em lesões cariosas profundas, selecionando bactérias que consigam sobreviver neste meio, o que faz com que a contagem dos *Lactobacillus* nesta região seja alta. A persistência desta espécie em regiões profundas da dentina cariada e dentro de canais infectados sugere que esta têm um papel importante na dor pulpar. Além disso, a baixa prevalência de *Streptococcus* em lesões avançadas evidencia que estes não conseguem sobreviver em locais com acidez elevada.

Neste estudo esperava-se encontrar uma maior prevalência de bactérias Gram negativas nos casos de pacientes com sintomatologia. Apesar de espécies Gram negativas, como *Capnocytophaga ochracea*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella melaninogenica* e *Veillonella parvula*, terem sido encontradas nos pacientes com sintomatologia, as espécies predominantes (*Lactobacillus* e *Actinomyces*) foram Gram positivas assim como foi confirmado por

Hoshino 1985, Hahn et al. 1991, Bjorndal e Larsen 2000, Munson et al. 2004.

Deve-se levar em conta que a sintomatologia do paciente é subjetiva e que pode ser influenciada por inúmeros fatores (ansiedade, medo). Neste estudo a sensibilidade dolorosa não foi estimulada e o relato de sensibilidade durante a anamnese foi considerada para distinguir os casos de pacientes sintomáticos ou não. Além disso, sabe-se que as bactérias Gram positivas produzem LTA (ácido lipoteicóico), que é um correspondente do LPS das bactérias Gram negativas. A presença do LTA pode estar relacionado à sintomatologia dolorosa, o qual apesar de possuir um fator de virulência menor que o LPS, também é capaz de causar dor devido sua potente ação citotóxica (Jin et al., 2007; Baik et al 2008).

Pode-se observar que existe uma grande variabilidade de opiniões em relação à microbiota das lesões cariosas profundas e não existe na literatura ainda um consenso. Isso pode ser explicado, pois já foi relatado que podem inclusive existir diferentes microbiotas em lesões cariosas distintas (Chour et al. 2005; Aas et al. 2008), existem diferentes metodologias para se fazer a avaliação e também diferentes parâmetros do que é considerado uma dentina infectada e uma dentina afetada. Por tudo isso, torna-se difícil chegar a uma concordância em relação a microbiota das lesões cariosas profundas.

Esperava-se encontrar com este trabalho, uma maior taxa de bactérias Gram negativas nos pacientes sintomáticos e também diferença na microbiota da cárie infectada e afetada. Porém, isso não foi constatado, talvez pelo fato da limitação do teste Checkerboard, no qual apenas 40 sondas de DNA bacteriano podem ser utilizadas e nesse presente estudo selecionamos as bactérias Gram negativas mais encontradas em lesões cariosas e pode ser que bactérias Gram negativas que não estavam entre as bactérias selecionadas pra este

estudo estivessem presentes nas lesões cariosas dos pacientes sintomáticos. Outra limitação é de que o teste Checkerboard analisa bactérias vivas e mortas e as endotoxinas são liberadas em sua maior parte por bactérias Gram negativas mortas. A não diferença entre as microbiotas da dentina dos pacientes sintomáticos e assintomáticos pode ser justificada pelo fato de que nos trabalhos que acharam diferença a coleta ter sido realizada em locais diferentes dos coletados pelo presente estudo.

6.2 Endotoxinas

Quanto às endotoxinas, pode-se perceber que existe uma relação entre quantidade de endotoxinas e sintomatologia dolorosa, visto que os pacientes sintomáticos apresentaram maiores níveis de endotoxinas. Esse resultado corrobora com estudos anteriores de Khabbaz, et al. 2000 e 2001

Sabe-se que a microbiota das lesões de cárie em seu início são predominadas por bactérias Gram Positivas, principalmente pelos *Streptococcus*. Conforme a lesão vai progredindo, o ambiente ácido seleciona bactérias que consigam sobreviver a esse meio, como os *Lactobacillus* e *Actinomyces*. Em cavidades muito profundas, o suprimento de oxigênio começa a ficar escasso o que acaba selecionando as bactérias Gram negativas anaeróbias, que possuem um maior potencial de virulência devido a liberação de endotoxinas, a partir da parede celular após sua morte.

Jacinto et al. 2005 quando realizaram a quantificação de endotoxinas de canais com necrose pulpar de dentes sintomáticos e assintomáticos também concluiu que a concentração de endotoxinas foi maior nos casos em que havia sinais e sintomas de dor pulpar.

Nissan et al. 1995 mostraram em seu trabalho que endotoxinas são capazes de se difundir através de uma camada de 0,5 mm de dentina num período de tempo relativamente curto, e neste trabalho foram utilizadas lesões cariosas profundas onde a espessura de dentina remanescente era ligeiramente maior que 0,5 mm, portanto, possivelmente, as endotoxinas podem ultrapassar camadas até mais espessas de dentina.

Ao contrário do encontrado por Khabbaz et al. 2000, não houve influencia da profundidade da dentina cariada com a quantidade de endotoxinas. Os autores do mesmo trabalho relataram que a quantidade de endotoxinas são maiores na camada superficial da lesão cariosa. Esses resultados diferentes encontrados podem estar relacionados ao fato de, nesses trabalhos as coletas terem sido feitas seguindo os parâmetros de Massler 1967 e Fusayama 1979, que como já falado anteriormente, preconizavam a remoção total da dentina afetada. Já no presente estudo foi feita a remoção apenas da dentina infectada que não era passível de remineralização, assim os níveis de endotoxinas da camada superficial e profunda da dentina cariada são relativamente semelhantes. Não existem outros trabalhos que estudam esta condição para que pudéssemos tirar conclusões mais relevantes frente ao tema.

Sabe-se que a dor pulpar é multifatorial, mas este estudo assim como o de Khabbaz et al. 2000 e 2001 e Jacinto et al 2005, mostrou que existe relação da dor com a concentração de endotoxinas. Um certo nível de endotoxinas deve ser alcançado para ter um efeito sobre a inflamação da polpa dental de tal forma que a dor clínica possa ser observada. Apesar desta informação não existe um valor numérico para que se possa estabelecer esse nível. No presente estudo, o nível de endotoxina de 114,62 EU/ml foi observado nos pacientes com sintomatologia e suficiente para estar relacionado com esta condição.

Sabe-se que a liberação das endotoxinas ocorre

após a lise bacteriana, portanto isso sugere que há maiores quantidade de bactérias Gram negativas mortas nos casos de pacientes sintomáticos. O teste utilizado para analisar as bactérias avaliou bactérias vivas e mortas não se conseguindo fazer distinção entre elas, justificando a diferença de níveis de endotoxinas e a semelhança de bactérias nos pacientes sintomáticos e assintomáticos deste estudo.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e de acordo com as metodologias propostas neste estudo concluímos que:

- a) não houve diferença entre perfil bacteriano entre a camada superficial e profunda das lesões cariosas;
- b) não houve diferença na quantidade de endotoxinas entre a camada superficial e profunda das lesões cariosas;
- c) os dentes sintomáticos apresentaram maiores níveis de endotoxinas quando comparados aos assintomáticos;
- d) o perfil bacteriano de lesões sintomáticas e assintomáticas foi semelhante, com exceção da espécie *Capnocytophaga sputigena*, *Leptotrichia buccalis* e *Lactobacillus* que foi mais prevalente nos casos sintomáticos.

8 REFERÊNCIAS*

Ayna B, Çelenk S, Atakul F, Sezgin B, Ozekinci T. Evaluation of clinical and microbiological features of deep carious lesions in primary molars. *J Dent Child*. 2003 Jan-Apr;70(1):15-8.

Alam S, Brailsford SR, Adams S, Allison C, Sheehy E, Zoitopoulos L, et al. Genotypic heterogeneity of *Streptococcus oralis* and distinct aciduric subpopulations in human dental plaque. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Aug;66(8):3330-6.

Ass 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. *Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1407-17.

Baik JE, Kum KY, Yun CH, Lee JK, Lee K, Kim KK, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1355-9.

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.

Bjorndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res*. 2000 Nov-Dec;34(6):502-8

Brailsford SR, Tregaskis RB, Leftwich HS, Beighton D. The predominant *Actinomyces* spp. Isolated from infected dentin of active root caries lesions. *J Dent Res*. 1999 Sep; 78(9):1525-34.

Call DR, Borucki MK, Loge FJ. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J Microbiol Methods*. 2003 May;53(2):235-243

* * Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Callaway A, Kostrzewa M, Willershausen B, Schimdt F, Thiede B, Küpper H, et al. Identification of *Lactobacillus* from deep carious lesions by means of species-specific PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. Clin Lab. 2013;59(11-12):1373-9.

Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. J Clin Microbiol. 2005 Feb;43(2):843-9.

Dahlén G, Konradsson K, Eriksson S, Teanpaisan R, Piwat S, Carlén A. A microbiological study in relation to the presence of caries and calculus. Acta Odontol Scandi. 2010 Jul;68(4):199-206. Doi: 10.3109/00016351003745514.

Dige I, Grønkjær L, Nyvad B. Molecular studies of the structural ecology of natural occlusal caries. Caries Res. 2014;48(5):451-60.

Fejerskov O, Kidd E. Dental caries: the disease and its clinical management. 2nd Ed. Copenhagen: Blackwell Munksgaard;2008.

Filoché SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. Oral Microbiol Immunol. 2007 Apr;22(2):73-9.

Fusayama T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. Oper Dent. 1979 Spring;4(2):63-70.

Gizani S, Papaianou W, Haffajee AD, Kavvadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five intra-oral habitats in young children. Int J Paediatr Dent. 2009 May;19(3):193-200.

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Int Endod J. 1994 Nov;27(6):291-8.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004 Apr;19(2):71-6.

Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. Oral Microbiol Immunol. 2008 Jun;23(3):196-205.

Hahn CL, Falkler WA Jr, Minah GE. Microbiological studies of caries dentine from human teeth with irreversible pulpitis. Arch Oral Biol. 1991;36(2):147-53.

Hahn CL, Liewebr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod*. 2007 Mar;33(3):213-9.

Hayashi M, Fujitani M, Yamaki C, Momoi Y. Ways of enhancing pulp preservation by stepwise excavation: a systematic review. *J Dent*. 2011 Feb;39(2):95-107.

Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res*. 1985 Oct;64(10):1195-8.

Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005 Aug;54(Pt8):777-83.

Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al .Crystal structure of the TLR1- TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007 Sep21;130(6):1071– 82.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. *Int J Endod*. 2000 Mar;33(2):132-7.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: Association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 May;91(5):587- 93.

Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessment of caries activity during cavity preparation. *Caries Res*. 1993;27(5):402-8.

Lima KC, Coelho LT, Pinheiro IVA, Roças IN, Siqueira JF Jr. Microbiota of dentinal caries assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res*. 2011;45(1):21-30. doi: 10.1159/000322299.

Loesche WJ, Syed SA. The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine. *Caries Res*. 1973;7(3):201-16.

Martin FE. Carious pulpitis: microbiological and histopathological considerations. *Aust Endod J*. 2003 Dec;29(3):134-7.

Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol*. 2002 May;40(5):1698-704.

Martinho FC, Leite FRM, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BPFA. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against acrophages

by cytokine production. Clin Oral Invest 2014 Dec;18(9):2095-102. Doi:10.1007/s00784-014-1198-1.

Massey WLK, Romberg DM, Hunter N, Hume WR. The association of carious dentin microflora with tissue changes in human pulpits. Oral Microbiol Immunol.1993 Feb;8(1):30-5.

Massler M. Pulpal reaction to dentinal caries. Int Dent J 1967 Jun;17(2):441–60.

Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. Clin Microbiol. 2004 Jul;42(7):3023-9.

Nadkarni MA, Simonian MR, Harty DW, Zoellner H, Jacques NA, Hunter N. Lactobacilli are prominent in the initial stages of polymicrobial infection of dental pulp. Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1732-40.

Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge H. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. J Endod. 1995 Feb;21(2):62-4.

Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective[review]. Caries Res. 2013;47(2):89-102. doi: 10.1159/000345367.

Palmiero C, Ming S, Frank E, Fine J. The role of the sympathetic nervous system in the generalized Schwartzman reaction. J Exp Med.1962 Mar1;115;906-12.

Reeves R, Stanley HR. The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1966 Jul;22(1):59–65.

Seltzer S, Farber P. Microbiologic factors in endodontology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994 Nov;78(5): 634-45.

Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. J Oral Microbiol.2014 Oct;6:25443.doi: 10.3402/jom.v6.25443.

Siqueira JrJF, Roças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 Jan;97(1):85-94.

Siqueira JrJF, Roças IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 2001 Sep;27(9):563-66.

Socransky SS, Haffage AD, Smith C, Martin L, Haffage JA, Uzel NG, et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Dec;19(6):352-362.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994 Oct;17(4):788–92.

Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dental Res*. 2011 Mar;90(3):294-303. doi: 10.1159/000159604.

Thompson V, Craig RG, Curro FA, Green WS, Ship JA. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: a critical review. *J Am Dent Assoc*. 2008 Jun;139(6):705-12.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Aug;22(4):411-8.

APÊNDICE A - Carta de informação e termo de consentimento livre e esclarecido

Carta de Informação ao Paciente

Título do Projeto de Pesquisa: Correlação entre pulpite reversível e quantidade de endotoxinas e perfil bacteriano em lesões cariosas profundas

Pesquisadores Responsáveis: Letícia Grilo de Souza e Eduardo Bresciani

Objetivo: O objetivo deste estudo será verificar a relação existente entre a sintomatologia dolorosa de pulpite reversível (dor apresentada pelo paciente em dente com lesão de cárie frente principalmente a estímulos de frio), quantidade de endotoxinas (proteínas tóxicas produzidas por certas bactérias) e quantidade de bactérias de lesões cariosas profundas, para posterior estabelecimento do tratamento restaurador odontológico adequado.

Métodos e duração do projeto: Serão selecionados trinta pacientes, entre 18 e 35 anos, que apresentem pelo menos uma lesão cariosa profunda em dentes posteriores permanentes de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Critérios de inclusão: presença de lesão cariosa profunda em dentes posteriores permanentes, determinada por meio de radiografias, sem ou com sensibilidade dolorosa compatível com pulpite reversível (Dor provocada-aguda, rápida, fugaz em resposta a estímulos, localizada / cede logo após a remoção do estímulo) Critérios de exclusão: presença de fístula (coleção de pus localizada na gengiva acima do dente); dente com diagnóstico de necrose pulpar ou pulpite irreversível (casos que requerem tratamento de canal); uso de antibiótico recente (quinzena anterior ao estudo). Os pacientes assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido para que estes possam ser incluídos no estudo. Anteriormente aos procedimentos clínicos propriamente ditos, serão preenchidas fichas de anamnese dos pacientes. A coleta do material utilizado no estudo será realizada em dois momentos: antes da remoção do tecido cariado e após a remoção deste. Após isso, todos os pacientes receberão o tratamento restaurador mais adequado do dente em questão.

Riscos: Os mesmos riscos que um tratamento odontológico convencional oferece.

Benefícios: Os benefícios deste estudo são a obtenção de dados reais sobre perfil bacteriano encontrado nas lesões cariosas, bem como a quantidade de endotoxinas para que seja selecionado o tratamento mais adequado para estes casos.

Compensação por doença ou dano: Não se aplica.

Documentação: Uma cópia deste formulário será guardada com a documentação do estudo e você receberá outra cópia. Se tiver alguma pergunta sobre o estudo, sobre seus direitos ou sobre qualquer dano possivelmente causado pelo estudo, você poderá entrar em contato com o Prof. Dr. Eduardo Bresciani ou C.D. Letícia Grilo de Souza (telefone: 12 3947-9048).

Confidencialidade: Seu nome não será publicado em nenhum momento do estudo. Seus registros serão confidenciais.

Participação: A participação neste estudo é completamente de sua escolha. Você poderá desistir a qualquer momento e por qualquer motivo. Isto não afetará possíveis atendimentos que possam vir a ser realizados na Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

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

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais contidas nos itens IV 3 e IV 4 da RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012, o(a) senhor(a) _____, portador do RG nº _____ SSP/____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo(s) profissionais em seus mínimos detalhes, e ciente das etapas do estudo, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, dá o seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância para que o menor acima citado participe da pesquisa “Correlação entre pulpite reversível, quantidade de endotoxinas e perfil bacteriano em lesões cariosas profundas”.

O paciente e/ou representante legal estão cientes que podem a qualquer momento retirar o seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar do estudo e ainda que todos os dados coletados são informações confidenciais que serão guardadas por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética em Odontologia).

Por estar de acordo, assino o presente termo.

São José dos Campos, ____ de _____ de 2014.

Nome por extenso/ assinatura do responsável pelo paciente

Nome por extenso/ assinatura do paciente

Prof Dr Eduardo Bresciani / Mestranda Letícia Grilo de Souza

APÊNDICE B –Ficha de anamnese

FICHA DE ANAMNESE

Nome: _____

Endereço: _____ Fone: _____

Data de nascimento: _____

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

Declaração do paciente

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

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

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

Assinatura do paciente ou responsável

São José dos Campos, _____ de _____ de 201__.

APÊNDICE C- Ficha de caracterização da dentina cariada

FICHA DE CARACTERIZAÇÃO DA DENTINA CARIADA

Paciente – N^o Dente: _____ Iniciais do Paciente: _____ DATA: _____

Características Clínicas do dente

Relato do Paciente

Dor espontânea ☐ Dor Provocada ☐ Sem dor ☐

Teste de sensibilidade com endofrost

Sensível ☐ Sem sensibilidade ☐ Sensível após a remoção do estímulo ☐

Radiografia

Data do Raio-X _____
DD / MM / AAAA

Cárie: Grupo Caries: ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

1 = rasa (terço superficial da dentina coronária envolvida)

2 = moderada (terço médio da dentina coronária envolvida)

3 = profunda (terço profundo da dentina coronária envolvida)

Características da Lesão

Após remoção (se presente) de conteúdo amolecido (sem instrumentos cortantes)

Atividade –lesão: ☐ Ativa ☐ Paralisada

consistência: ☐ Mole ☐ Média ☐ Dura

coloração: ☐ Amarela ☐ Marrom claro ☐ Marrom escuro

(realizar biópsia com broca em baixa e com água apirogênica)

Remoção de cárie e biópsia => Características da lesão

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

consistência: ☐ Mole ☐ Média ☐ Dura

coloração: ☐ Amarela ☐ Marrom claro ☐ Marrom escuro

(realizar biópsia com broca em baixa e com água apirogênica)

APENDICE D – Detalhamento dos procedimentos para realização da curva padrão

- a) ver certificado para conferência do número do lote e quantidade de volume para endotoxina.
- b) colocar a quantidade de água apirogênica (Lonza, Walkersville, MD, EUA) de acordo com as instruções do fabricante na endotoxina de *E. coli*, encontrado no kit fornecido pela empresa (Figura 9);

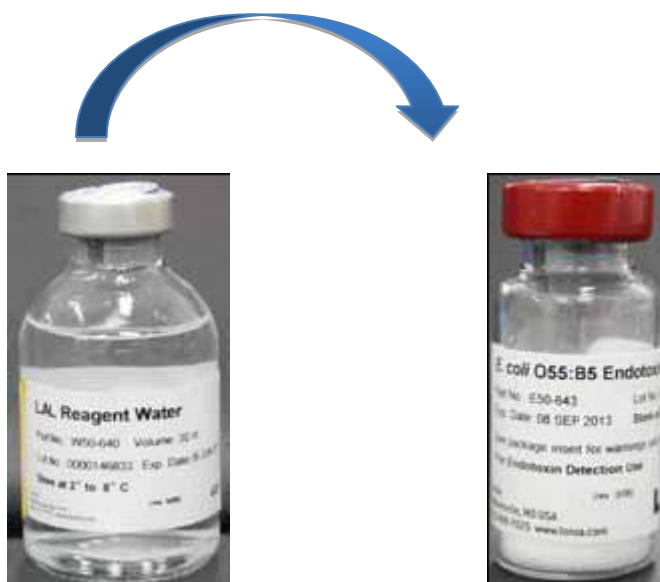


Figura 9 – Esquema para suspender endotoxina de *E. coli* utilizando água apirogênica.

- c) agitar a suspensão durante 15 minutos.
- d) separar 4 tubos de vidro apirogênicos, tamanho 13 mm x 100 mm (Lonza, Walkersville, MD, EUA), identificá-los de acordo com as diluições (10-1, 10-2, 10-3, 10-4) e pipetar 900 µL de água apirogênica em cada tubo de vidro (Figura 10);



Figura 10 – Tubos de vidro apirogênicos necessários para diluição da endotoxina.

e) decorridos os 15 minutos, transferir 100 μ L da suspensão de endotoxina para o tubo “5” (referente à diluição 10-1). Agitar 1 minuto, transferir 100 μ L para o próximo tubo “0,5” (referente à diluição 10-2) e assim sucessivamente (Figura 11).

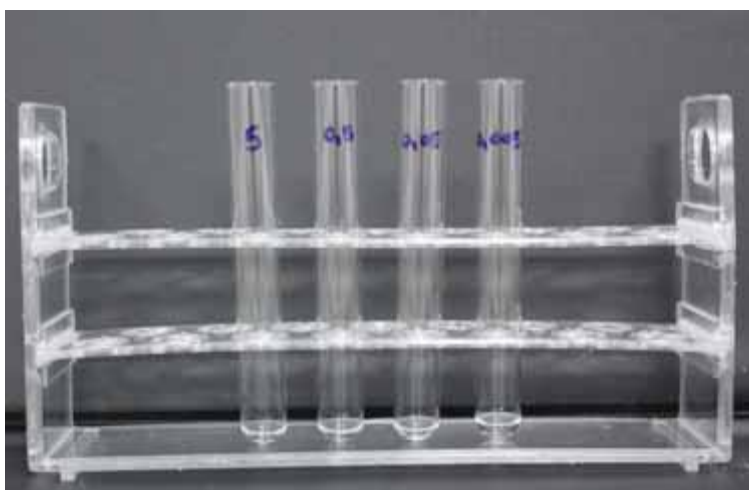


Figura 11 – Esquema de diluições da endotoxina para realização da curva padrão.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA CAMPUS SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: CORRELAÇÃO ENTRE PULPITE REVERSÍVEL E QUANTIDADE DE ENDOTOXINAS E PERFIL BACTERIANO EM LESÕES CARIOSAS PROFUNDAS Pesquisador: Leticia Grilo de Souza Área Temática: Versão: 3 CAAE: 30710714.7.0000.0077 Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 831.159 Data da Relatoria: 14/10/2014 Apresentação do Projeto: Trata-se de um estudo observacional para se detectar o grau de correlação de endotoxinas e bactérias com a sensibilidade pulpar do paciente com lesões cariosas. Serão selecionados 30 pacientes com idade entre 18 a 35 an apresentando dente permanente com lesão cariada profunda determinada por radiografia interproximal, sendo quinze com sintomatologia dolorosa compatível com o quadro de pupite reversível e o restante sem sintomatologia. Os pacientes assinarão TCLE. A coleta das amostras será realizada sob isolamento absoluto, com brocas carbide apirrogênica em baixa rotação, em dois estágios, antes e após a remoção da dentina cariada. Nestes tempos operatórios, também será verificada a característica clínica da dentina em questão segundo a cor e consistência. As amostras de dentina coletada serão analisadas para a quantidade de endotoxinas, pelo método cromogênico LAL, e para determinação do perfil bacteriano, por meio do teste checkerboard. Serão estudadas 40 espécies bacterianas, relacionadas com a cárie profunda, com problemas endodônticos, periodontais e da cavidade oral. Os dados serão obtidos e analisados estatisticamente por testes apropriados, dependendo do resultados.								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Jardim São Dimas</td> <td>CEP: 12.245-000</td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SAO JOSE DOS CAMPOS</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (12)3947-9078</td> <td>Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@focjc.unesp.br</td> </tr> </table>	Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777		Bairro: Jardim São Dimas	CEP: 12.245-000	UF: SP	Município: SAO JOSE DOS CAMPOS	Telefone: (12)3947-9078	Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@focjc.unesp.br
Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777								
Bairro: Jardim São Dimas	CEP: 12.245-000							
UF: SP	Município: SAO JOSE DOS CAMPOS							
Telefone: (12)3947-9078	Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@focjc.unesp.br							

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 831.159

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a correlação entre os níveis de endotoxinas e o perfil bacteriano em lesões cariosas profundas com e sem sintomatologia dolorosa compatível com quadros de pulpíte reversível.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há nenhum risco com o tratamento realizado neste estudo além daqueles envolvidos em um tratamento dentário de rotina.

Benefícios: O paciente se beneficiará pelo tratamento restaurador recebido. Se comprovada a correlação entre a sintomatologia dolorosa e os níveis de endotoxinas, tratamentos específicos para a sintomatologia do paciente podem ser protocolados, exercendo um benefício para a odontologia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados corretamente.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer da relatora.

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@fosjc.unesp.br