

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**MODIFICAÇÃO DO FLÚIDO DENTINÁRIO AFETA A
COMPOSIÇÃO DO BIOFILME FORMADO SOBRE A SUPERFÍCIE
DE LESÃO CARIOSA NATURAL DE ESMALTE**

MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA



MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA

**MODIFICAÇÃO DO FLÚIDO DENTINÁRIO AFETA A
COMPOSIÇÃO DO BIOFILME FORMADO SOBRE A SUPERFÍCIE
DE LESÃO CARIOSA NATURAL DE ESMALTE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade Federal da
Paraíba como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia – Área de Concentração em
Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa

João Pessoa

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L768m Lira, Maria Luiza Lima Alves.

Modificação do fluido dentinário afeta a composição do biofilme formado sobre a superfície de lesão cáriosa natural de esmalte / Maria Luiza Lima Alves Lira. - João Pessoa, 2021.

60 f. : il.

Orientação: Frederico Barbosa de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Esmalte Dentário. 2. Cárie Dentária. 3. Biofilme Dentário. I. Sousa, Frederico Barbosa de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314.13

Elaborado por Gracilene Barbosa Figueiredo - CRB-15/794

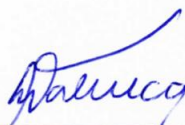
MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA

MODIFICAÇÃO DO FLUIDO DENTINÁRIO AFETA A COMPOSIÇÃO DO
BIOFILME FORMADO SOBRE A SUPERFÍCIE DE ESMALTE DE DENTE
ÍNTEGRO

Banca Examinadora



Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa
Orientador



Prof.ª Dra. Ana Maria Gondim Valença
Examinador - UFPB



Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha mãe
Madalena que de forma muito
guerreira soube me criar e me formar,
por seu amor e dedicação. Ao meu pai
Luiz pelo incentivo e carinho.*

*Dedico também ao meu esposo
Arthur que soube ser meu suporte nas
horas difíceis e soube compreender
minhas ausências e renúncias durante
a construção desse trabalho.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Pelo dom da vida, pelas oportunidades e por ter colocado pessoas maravilhosas para compartilhar comigo minha passagem nesta vida.

A minha família,

*A todos os meus familiares que me apoiaram, incentivaram e acreditaram em mim. Especialmente a minha irmã **Ana Gabriela** que compartilhou comigo noites mal dormidas e se empenhou em me ajudar e me apoiar na construção desse trabalho, muitas vezes abdicando de seus afazeres e de seu descanso em meu favor.*

Aos meus amigos,

Que acompanham minha vida tornando ela mais cheia de amor e felicidade, e estão sempre me incentivando a ir além!

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa**,*

Obrigada pelos ensinamentos transmitidos, foram enriquecedores e com certeza jamais serão esquecidos.

*Aos meus **amigos do mestrado**,*

Por compartilharem os momentos bons e os estresses, pelas boas conversas e risadas.

*Aos **Profs. do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB**,*

Pela dedicação e incentivo, contribuindo assim, com essa conquista.

Aos meus colegas do LAMIB,

Por compartilhem comigo alegrias, tristezas, frustrações, expectativas e êxitos. A convivência com vocês tornou essa jornada muito mais leve.

À Eugênia Lívía,

Por toda a ajuda durante a construção desse trabalho, você sempre esteve disponível para ajudar a qualquer momento, fosse com seu conhecimento, com sua companhia ou com um simples sorriso. Jamais terei como retribuir. Toda sorte do mundo para você!

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a conclusão de mais essa etapa em minha vida.

Muito Obrigada.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

De acordo com a visão mais influente, existe uma barreira de esclerose dentinária entre a dentina sadia/polpa e a lesão cariada natural de esmalte, de modo que o fluido dentinário afetaria de maneira desprezível os poros do esmalte cariado e de sua superfície. Entretanto, tal visão é baseada no aspecto da dentina ao estereomicroscópio, que é ambíguo com relação à condição dentinária (sadia ou cariada), estando aberta a possibilidade do fluido dentinário afetar a superfície do esmalte e o que estiver em contato com ela. Neste contexto, o objetivo deste estudo in vitro foi testar a hipótese de que o tipo de superfície do esmalte (sadio ou cariado naturalmente, com clorexidina ou NaCl no fluido dentinário subjacente) afeta a composição do biofilme de uma espécie. Para tanto foram selecionadas 10 coroas de pré-molares humanos que apresentassem nas suas faces proximais dois tipos de superfície do esmalte: lesão cariada natural inativa de esmalte, tipo mancha branca e escore ICDAS 2, e esmalte normal, escore ICDAS 0. Através de análise de microtomografia computadorizada tridimensional (microCT), foram excluídos dentes com trincas e/ou lesões cariosas cavitárias incipientes. Após remoção do tecido pulpar, foi formado um biofilme monoespécie (*Streptococcus mutans*) sobre cada tipo de superfície de esmalte, cuja dentina subjacente sofreu alteração do seu fluido dentinário. Os grupos pareados foram: (I) superfície com lesão cariada de esmalte não cavitária inativa (ICDAS 2) com solução de clorexidina na câmara pulpar (LECLX); (II) superfície com lesão cariada de esmalte não cavitária inativa (ICDAS 2) com solução de cloreto de sódio 0,9% na câmara pulpar (LECNACL); (III) superfície com esmalte normal (ICDAS 0) com solução de clorexidina na câmara pulpar (ENCLX); e (IV) superfície com esmalte normal (ICDAS 0) com solução de cloreto de sódio na câmara pulpar (ENNACL). Após esterilização dos dentes com óxido de etileno, um dos líquidos foi inserido na câmara pulpar e as amostras foram submetidas a um período de 5 dias de formação de biofilme com meio de cultura TYE e sacarose. Para se certificar de que o desfecho fosse relacionado apenas ao fator, nos grupos LECLX e LECNACL, a coroa foi isolada com verniz de unha, de modo que somente a lesão ficou exposta. Da mesma forma, nos grupos ENCLX e ENNACL somente uma região do esmalte sadio de igual tamanho ao da lesão ficou exposta e o restante da coroa foi isolada. Após cada período de formação de biofilme, os polissacarídeos extracelulares (PEC) foram

quantificados. Finalizados os ensaios de todos os grupos, as amostras foram infiltradas na câmara pulpar com solução aquosa de contraste (solução de *Thoulet* com índice de refração de 1,47) por 24 h e submetidas a análise em microCT. Os resultados mostraram que o fator teve efeito na quantidade de PEC solúveis (ANOVA de medidas repetidas: $p < 0,001$; eta ao quadrado de 36,7%, poder de 97,8%) e de PEC insolúveis (ANOVA de medidas repetidas: $p < 0,01$; eta ao quadrado de 29,3%, poder de 90,8%). Quanto às análises dos pares de grupos (teste T pareado): para PEC solúveis, o grupo LECLX apresentou, dentre todos, a menor quantidade (com grande magnitude de efeito (G de Hedge de 1,5 a 1,92; $p < 0,001$; poder $> 90\%$), enquanto que o grupo LENACL obteve quantidades menores que os grupos ENCLX e ENNACL, também com grande magnitude de efeito (G de Hedge de 1,2 a 1,3; $p < 0,05$; poder $> 90\%$), e o os grupos de esmalte normal não tiveram diferença conclusiva (poder de 51%). Para os PEC insolúveis, os resultam foram semelhantes, com exceção dos grupos LENACL e ENNACL que não apresentaram diferença conclusiva. Através de microCT, foi verificado o trajeto da solução de contraste desde a câmara pulpar até o corpo da lesão cariosa de esmalte, não afetando o esmalte normal. Concluiu-se que a modificação do fluido dentinário alterou a composição do biofilme formado sobre superfície do esmalte, indicando existência de um caminho de transporte facilitado da câmara pulpar até a superfície da lesão cariosa natural de esmalte, com importantes implicações na patogênese e no tratamento de lesões cariosas de esmalte.

Palavras-chave: Esmalte Dentário, Cárie Dentária, Biofilme Dentário.

ABSTRACT

According to the most influential view, there is a barrier of dentin sclerosis between the healthy dentin / pulp and the natural carious lesion of enamel, so that the dentinal fluid would negligibly affect the pores of the carious enamel and its surface. However, such a view is based on the aspect of the dentin under stereomicroscopy, which is ambiguous with respect to the dentin condition (healthy or carious), being open the possibility of the dentin fluid to affect the surface of the enamel and what is in contact with it. In this context, the objective of this in vitro study was to test the hypothesis that the type of enamel surface (healthy or naturally carious, with either chlorhexidine or NaCl in the underlying dentinal fluid) affects the single species biofilm composition. For this purpose, 10 crowns of human premolars were selected that presented two types of enamel surface (inactive natural enamel lesion, white spot lesion and ICDAS score 2, and normal enamel, ICDAS 0 score) on their proximal surfaces. Through three-dimensional computerized microtomography (microCT) analysis, teeth with cracks and / or incipient cavitated carious lesions were excluded. After removal of the pulp tissue, a single species biofilm (*Streptococcus mutans*) was formed on each type of enamel surface, the underlying dentin of which changed its dentin fluid. The paired groups were: (I) noncavitated inactive enamel carious lesion (ICDAS 2) with chlorhexidine solution in the pulp chamber (LECLX); (II) noncavitated inactive enamel carious lesion (ICDAS 2) with 0.9% sodium chloride solution in the pulp chamber (LECNACL); (III) normal enamel surface (ICDAS 0) with chlorhexidine solution in the pulp chamber (ENCLX); and (IV) normal enamel surface (ICDAS 0) with sodium chloride solution in the pulp chamber (ENNACL). After sterilization (with ethylene oxide) of the teeth, one of the liquids was inserted into the pulp chamber and a 5 day biofilm formation period was performed using TYE culture medium and sucrose. To ensure that the outcome was related only to the factor, in the LECLX and LECNACL groups the crown was isolated with nail varnish, so that only the lesion was exposed. Similarly, in the ENCLX and ENNACL groups only one region of the healthy enamel of equal size to that of the lesion was exposed and the remainder of the crown was isolated. After each biofilm formation period, the extracellular polysaccharides (PEC) were quantified. After the assays of all groups were completed, the samples were infiltrated in the pulp chamber with aqueous contrast solution (*Thoulet* solution with

refractive index of 1.47) for 24 h and submitted to microCT analysis. The results showed that the factor had an effect on the amount of both soluble PEC (repeated measures ANOVA: $p < 0.001$, eta squared of 36.7%, power 97.8%) and insoluble PEC (repeated measures ANOVA: $p < 0.01$; eta squared of 29.3%, power of 90.8%). As for the group paired analysis (paired T test): for soluble PECs, the LECLX group had the least amount (with a large effect size: Hedge G of 1.5 to 1.92; $p < 0.001$; power > 90%), whereas the LENACL group had smaller amounts than the ENCLX and ENNACL groups, also with a large effect size (Hedge G of 1.2 to 1.3; $p < 0.05$; power > 90%) and the normal enamel groups did not have a conclusive difference (51% power). For insoluble PEC, the results were similar, except that the LENACL and ENNACL groups had no conclusive difference. Through microCT the path of the contrast solution from the pulp chamber to the body of the enamel carious lesion was verified, not affecting the normal enamel. It was concluded that the modification of the dentin fluid altered the composition of the biofilm formed on the surface of the enamel, indicating the existence of a facilitated pathway between the pulp chamber and the natural enamel carious lesion, not affecting the normal enamel, with important implications on the pathogenesis and treatment of enamel caries.

Keywords: Dental Enamel; Dental Caries; Dental Plaque.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RxTh	Radiomicrografia digital com solução contraste
Rx	Radiomicrografia
EM	Estereomicroscopia
MicroCT	Microtomografia computadorizada tridimensional de raios X
ICDAS	Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie
CLX	Clorexidina
NaCl	Cloreto de sódio
PEC	Polissacarídeos extracelulares
PECs	Polissacarídeos extracelulares solúveis
PECi	Polissacarídeos extracelulares insolúveis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Lesão cariosa proximal de esmalte.....	5
2.1.1 Histopatologia das lesões cariosas proximais	7
2.2 Biofilme e meio bucal.....	8
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Considerações Éticas	13
4.2 Caracterização do estudo	13
4.3 Cálculo amostral	13
4.4 Seleção da amostra.....	13
4.4.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	14
4.4.2 Microtomografia computadorizada tridimensional de raios X	14
4.5 Limpeza e desinfecção	14
4.6 Exame visual e teste de confiabilidade do sistema ICDAS-II	15
4.7 Armazenamento	16
4.8 Preparo dos dentes (separação da coroa, exérese do tecido pulpar e desinfecção)	16
4.9 Definição dos grupos	17
4.10 Preparo dos espécimes para o ensaio.....	17
4.10.1 Preparo das amostras dos grupos I (LECLX) e II (LECNACL)	18
4.10.2 Preparo das amostras dos grupos III (ENCLX) e IV (ENNACL)	20
4.11 Esterilização do espécimens	20
4.12 Preparo do meio de cultura.....	21
4.13 Crescimento do <i>S. mutans</i>	21
4.14 Padronização do Inóculo	22
4.15 Ensaio de formação de biofilme	22
4.16 Dosagem de Polissacarídeos Extracelulares	22
4.17 Infiltração de solução de <i>Thoulet</i>	26
4.18 Análise dos dados	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	39
8. REFERÊNCIAS*	40
ANEXO A.....	46
APÊNDICE.....	48

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença caracterizada pela perda mineral dos tecidos dentais duros, decorrente de ácidos produzidos pelo biofilme oral a partir de carboidratos fermentáveis advindos do meio bucal¹. Os ácidos orgânicos produzidos pelo biofilme oral penetram nos tecidos dentais duros resultando, na coroa dental, em reações de esmalte e dentina.

A flora residente na cavidade oral irá inevitavelmente formar biofilmes nos dentes. Um biofilme é definido como uma população ou comunidade de bactérias que vivem em estruturas organizadas (matriz extracelular ligante) em uma interface entre um sólido e um líquido². No entanto, o biofilme pode acumular-se além de níveis compatíveis com a saúde, então a doença pode ocorrer, sendo mais comum um acúmulo maior em áreas de maior retenção, como entre os dentes (faces proximais) e nas regiões de fossas e fissuras das faces oclusais³.

A virulência do biofilme dental (capacidade de agressão ao dente) é dependente da formação de polissacarídeos extracelulares produzidos pelos microrganismos presentes nesse biofilme e da queda do pH do seu fluido provocada pelo ácidos resultantes da metabolização dos açúcares da dieta pelos microrganismos. Os polissacarídeos extracelulares melhoram a aderência bacteriana às superfícies dos dentes e modificam a matriz do biofilme, aumentando sua porosidade e facilitando a instalação da doença da cárie. A queda do pH induz a uma mudança na microbiota do biofilme, favorecendo aqueles que conseguem viver em ambiente ácido, resultando em distúrbios de equilíbrio entre o fluido do biofilme e o dente⁴.

A clorexidina (CLX) é o agente antimicrobiano mais estudado e eficaz no controle químico do biofilme, sendo considerado o controle positivo (padrão-ouro), ao qual todos os outros agentes antiplaca devem ser comparados. É uma bisbiguanida catiônica, com uma ampla atividade antibacteriana, baixa toxicidade às células de mamíferos e uma alta afinidade para se conectar à pele e às mucosas. Seu mecanismo de ação inclui dano direto à membrana citoplasmática interna, sendo bacteriostático a baixas doses e bactericida em altas concentrações. Suas vantagens não são apenas baseadas em suas propriedades antimicrobianas, mas também em sua afinidade para se conectar a uma grande variedade de substratos. Essa propriedade, conhecida como substantividade, permite que esse composto

atinja níveis antibacterianos efetivos, usando uma dosagem razoável (duas vezes por dia), facilitando assim que os pacientes cumpram seu uso ^{4,5,6}.

No esmalte dental, a formação da lesão cariosa ocorre em decorrência de dois processos: penetração do ácido e perda mineral efetiva ⁷. Na penetração, os ácidos se difundem no tecido seguindo as bainhas dos prismas (regiões de maior porosidade que circundam $\frac{3}{4}$ da periferia dos prismas), causando pequena perda mineral e alargamento das bainhas. Em seguida, a perda mineral progride em direção aos poros intraprismáticos, que são menores que os da bainha.

Os íons minerais dissolvidos se difundem ao acaso no interior do esmalte, podendo resultar em processos de desmineralização e remineralização simultâneos em locais diferentes do esmalte ⁸. O fluxo de íons para fora do esmalte em combinação com o fluxo de ácido para dentro do esmalte pode resultar na formação de uma camada superficial relativamente mais mineralizada do que o esmalte subsuperficial ⁸, gerando uma lesão mais subsuperficialmente localizada (corpo da lesão).

Em um dente com esmalte e dentina normais, existe um transporte de íons (dentro de um fluido) da superfície dental até a polpa e vice-versa ⁹. Materiais vindos do fluido pulpar se incorporam na dentina e passam a formar o fluido dentinário¹⁰. Nos estágios iniciais da lesão cariosa em esmalte, quando existem variadas proporções de esmalte normal e cariado entre a superfície da lesão de esmalte e o limite amelo-dentinário, esse transporte de materiais no esmalte é aumentado na parte cariada, de forma que mesmo resinas fluidas podem penetrar, a partir da superfície dental, no esmalte cariado sendo transportadas por capilaridade. Cabe aqui a abordagem da possibilidade da desmineralização do esmalte aumentar a taxa de materiais vindo do fluido dentinário para o interior do esmalte cariado. Havendo um aumento da difusão do fluido dentinário para o esmalte, então a patogênese das lesões cariosas de esmalte seria afetada. Neste aspecto, o estudo das reações de esmalte e dentina nas lesões cariosas tem importante implicação.

As evidências mais atualmente aceitas indicam que as lesões cariosas naturais de esmalte, já desde quando penetraram cerca de $\frac{1}{4}$ da espessura de esmalte até o momento em que a lesão atinge a dentina, apresentam esclerose dentinária na dentina mais próxima ao limite amelo-dentinário ¹¹. Assim, o transporte de materiais de dentro para fora da coroa dental seria diminuído em

relação ao dente normal. Essa visão é consistente com o fato de que os tratamentos não invasivos indicados para as lesões cariosas não cavitárias de esmalte envolvem a aplicação de materiais na superfície do esmalte: remineralização ¹², infiltração de resinas fluidas ¹³ e selamento superficial com adesivos ¹⁴.

É importante ressaltar que a maior parte das evidências sobre a formação de dentina esclerosada subjacente a uma lesão cariosa de esmalte é baseada em alterações histológicas com estereomicroscopia (análise microscópica estereoscópica com luz refletida) ^{11,15}. Há limitações da estereomicroscopia no tocante à detecção de reações dentinárias ao processo carioso que são importantes para esse assunto. A esclerose dentinária é associada com a translucidez da dentina detectada ao estereomicroscópio, mas uma dentina translúcida pode ser tanto esclerótica como cariada¹⁶. Existe baixíssima correlação entre a translucidez da dentina e sua radiopacidade ¹⁶.

Desde o advento da radiomicrografia, têm sido publicadas imagens evidenciando o aspecto dúbio da dentina translúcida, que pode ser tanto desmineralização como esclerose ¹⁷. Nos anos 40 do século passado, várias imagens de dentina translúcida que apareciam escleróticas ou desmineralizadas foram publicadas ^{18,19}. Recentemente, foram publicadas evidências de que também o aspecto de dentina normal ao estereomicroscópio é dúbio, podendo representar dentina normal ou desmineralizada quando analisada pela radiomicrografia, tendo sido relatado um caso de lesão cariosa oclusal com escore ICDAS 3 (mancha marrom no esmalte sem cavitação) apresentando desmineralização envolvendo o terço interno da dentina e sem zona de esclerose subjacente ²⁰. Essa condição indica presença de túbulos dentinários alargados indo do teto da câmara pulpar até o esmalte.

Uma questão importante levantada por esses dados recentes é se líquidos presentes na câmara pulpar (fluido pulpar ou um líquido estranho inserido na câmara pulpar) poderiam alterar a composição do biofilme formado na superfície da lesão cariosa de esmalte. Isso é particularmente importante se considerarmos a evidência de que 1 a 72 h após uso oral de antibiótico, os níveis pulpares do antibiótico são maiores que sua concentração inibitória mínima ²¹. Tal questão não foi levantada anteriormente na literatura devido as evidências disponíveis apontarem para a ocorrência de esclerose na maior parte da dentina subjacente às lesões cariosas de esmalte. Investigar tal questão pode contribuir para aprofundar

o conhecimento sobre a natureza das lesões cariosas não cavitárias, podendo contribuir para o conhecimento da patogênese da lesão cariosa natural de esmalte e abrir novas possibilidades de aprimorar o diagnóstico e o tratamento desse tipo de lesão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lesão cariosa proximal de esmalte

O volume mineral no esmalte normal (sadio) varia, diminuindo da borda oclusal até a borda cervical ²² e da superfície até o limite amelo-dentinário ²³. Em valores absolutos, a média do volume mineral na metade externa da camada de esmalte na região médio-coronal é de 92% ^{24, 25}, porém valores de até aproximadamente 70% podem ser encontrados no esmalte mais interno ²³. Esses valores baixos se assemelham àqueles encontrados no corpo da lesão cariosa de esmalte ^{22, 26, 27}, de modo que a distinção entre esmalte normal e cariado nem sempre pode ser feita sem conhecer o volume mineral presente antes do início do processo carioso.

Nesse ponto, é importante distinguir diagnóstico de detecção. Diagnóstico é a arte de identificar uma doença a partir dos seus sinais e sintomas. Detecção é o ato de identificar separadamente os sinais e sintomas de uma doença ²⁸. Neste texto usaremos o termo detecção para se referir à identificação da lesão cariosa por métodos visuais e microscópicos.

Um aspecto importante para a severidade da lesão cariosa, e também relevante para detecção e diagnóstico, é a relação entre as alterações de esmalte e dentina numa lesão cariosa. Estas alterações são chamadas de reações de esmalte e dentina ao processo carioso. Os aspectos clínico e visual (a olho nu) e radiográfico de uma superfície dental são influenciados pelas reações de esmalte e dentina, que têm grande implicação nas decisões de tratamento.

O corpo da lesão é a principal zona da lesão do esmalte responsável pelo aspecto visual e radiográfico. A progressão da lesão cariosa de esmalte segue a trajetória dos prismas ¹¹, sendo o primeiro aspecto visual detectável uma mancha branca resultante do maior espalhamento da luz nos poros alargados pela desmineralização.

Antes de a lesão atingir o limite amelo-dentinário, a descrição mais influente é que a primeira reação dentinária é a esclerose (obliteração dos túbulos dentinários principais por minerais), que segue a trajetória dos túbulos dentinários principais e tem profundidade proporcional à da lesão de esmalte. A partir do momento em que a desmineralização de esmalte atinge o limite amelo-dentinário,

começa a se desenvolver uma desmineralização na dentina, cuja extensão ao longo do limite amelo-dentinário é similar à extensão da desmineralização de esmalte na mesma região, sendo as porções dentinárias mais profundas esclerosadas ¹¹.

Quando a cavitação atinge a dentina, o acúmulo de biofilme sobre a superfície dentinária pode permitir a produção de ácido cariogênico nessa região, possibilitando a expansão lateral da desmineralização dentinária ²⁹. O consenso atual é de que uma lesão cariosa cavitária dentinária apresenta as seguintes camadas histológicas (de fora para dentro) ³⁰: zona necrótica, zona de contaminação, zona de desmineralização, zona de dentina translúcida (esclerótica), zona de dentina sadia e zona de dentina terciária. As duas primeiras zonas são conhecidas como dentina desmineralizada e compõem a dentina amolecida (aspecto clínico) ³⁰.

As reações dentinárias são fortemente baseadas em análises da dentina ao microscópio óptico (composto e estereoscópico). Em 1901 Black³¹ descreveu e identificou o processo de desmineralização no esmalte e na dentina através da utilização do estereomicroscopia com a amostra dentária iluminada com luz refletida, o que influenciou a geração seguinte de pesquisadores da histopatologia da cárie³¹. No entanto, ele não explicou claramente o significado do aspecto translúcido observado na dentina, não o considerando como sinal de desmineralização e sua interpretação não teve confirmação através de exame radiográfico.

A EM, comumente referida como histologia, é aceita atualmente, como técnica padrão-ouro para detectar a extensão da desmineralização cariosa³² em dentina. Nesse contexto, a crença na ideia de que dentina translúcida é esclerótica deu forte base para o uso da EM na detecção de reações dentinárias ao processo carioso, porém, essa técnica tem baixa precisão para detectar dentina cariada e esclerótica. Estudos anteriores mostraram que a dentina translúcida pode ser tanto tecido cariado como esclerose^{15, 16, 17, 33}. Isso altera a interpretação da profundidade da lesão cariosa, assim como a compreensão do seu modo de propagação nos tecidos dentários duros¹⁴.

Stanley et al³⁴ confirmaram que havia uma alta correlação entre a translucidez da dentina e seu aspecto na Rx. Suas imagens mostraram área de

dentina translúcida com aspecto radiolúcido, evidenciando que a translucidez dentinária pode corresponder a uma área de desmineralização.

Mais precisamente sobre as faces proximais, Campos et al. (2017) ³⁵ relataram que a correlação entre profundidade da lesão de esmalte (detectada pela estereomicroscopia), com escores ICDAS 0-3 (de esmalte normal à mancha branca com cavitação no esmalte), e o sistema de escores de reações dentinárias de Bjorndal e Thylstrup (1995) ¹² pode ser alta ou baixa dependendo da técnica que se usa para detectar as reações dentinárias. Com a estereomicroscopia, foi encontrada uma correlação de Spearman de 0,654, enquanto que com o uso de radiomicrografia a correlação caiu para 0,24 ³⁵. Das lesões com escore ICDAS 0-3, profundidade máxima de desmineralização em dentina (metade interna da dentina) foi detectada em 2,2% (com uso de estereomicroscopia) e 48,4% com uso de radiomicrografia. Esses resultados indicam que grande parte das lesões cariosas de esmalte apresentou a maior espessura de dentina subjacente com túbulos alargados, o que foi consistente com o achado de um transporte facilitado de líquido da câmara pulpar até a lesão de esmalte ³⁵.

Dessa forma, os aspectos de dentina normal e esclerótica ao EM podem ser, na verdade, desmineralização ¹⁴. Isso significa que, por exemplo, um aspecto de lesão cariiosa proximal ao EM com desmineralização envolvendo menos da metade de 2/3 da camada de esmalte, e tendo esclerose na dentina externa, pode, ao ser analisada pela RxTh, representar uma lesão com desmineralização indo até o limite dentina-polpa³⁶.

2.1.1 Histopatologia das lesões cariosas proximais

No tocante às faces proximais, a evidência mais aceita indica que a lesão cariiosa de esmalte se inicia de forma cônica, com a base voltada para a superfície e a ponta (região de maior profundidade) voltada para a dentina, sendo a variação na profundidade da lesão (partes laterais menos profundas e parte central mais profunda) resultado da variação da atividade do biofilme oral presente na superfície do esmalte ¹¹.

Uma vez que a progressão da cárie sobre o esmalte dentário microporoso ocorre de forma lenta, o tecido dentinário neste mesmo tempo reage aos estímulos atuantes sobre essa superfície, ou seja,³⁷ as reações dentinárias

ocorrem associadas à progressão da lesão cáriosa no esmalte com a finalidade de minimizar a possibilidade de ocorrência de injúrias pulpares como inflamação e exposição ³⁷.

Quando as lesões cárias de esmalte atingem a junção amelodentinária, a dentina já se encontra alterada, apresentando desmineralização associada à progressão da cárie de esmalte ²⁶. Nesses casos, principalmente porque ainda não há cavitação, a colonização bacteriana é baixa ³⁸.

As lesões cárias incipientes progridem mais lentamente que as lesões cavitárias ³⁹. A presença da mancha branca na superfície do esmalte indica a redução do volume dos cristais na subsuperfície e o aumento do volume e os espaços ou poros intercristalinos⁴⁰. Essas lesões de cárie incipientes podem ser paralisadas ou até regredirem, desde que sejam empregados métodos adequados. Porém, se não tratadas, as lesões de mancha branca podem progredir até cavitações de esmalte.

2.2 Biofilme e meio bucal

O biofilme dental é formado por uma comunidade bacteriana diversa encontrada na superfície do dente, incorporada em uma matriz de polímeros de origem bacteriana e salivar. O biofilme é associado a duas das mais prevalentes doenças que afetam sociedades industrializadas, nomeadamente cárie dentária e doença periodontal. A microflora do biofilme residente consiste em uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo facultativamente espécies aeróbicas e obrigatoriamente anaeróbicas ³.

Uma vez que uma superfície do dente é limpa, uma película de proteínas e glicoproteínas é adsorvida rapidamente à superfície do dente, essa se forma naturalmente nos dentes e atua como parte da defesa do hospedeiro, ajudando a prevenir a colonização por microorganismos exógenos e muitas vezes patogênicos. A formação do biofilme envolve a interação entre colonizadores bacterianos precoces e essa película, chamada de película adquirida de esmalte³.

Para facilitar a colonização da superfície do dente, alguns receptores em moléculas salivares somente são expostos a bactérias uma vez que a molécula é adsorvida em uma superfície. Posteriormente, os colonizadores secundários

aderem aos colonizadores iniciais já fixados (co-agregação) através de interações moleculares específicas. Essas podem implicar interações proteína-proteína ou carboidrato-proteína (lectina), e esse processo contribui para determinar o padrão de sucessão bacteriana. À medida que o biofilme é formado, desenvolvem-se gradientes em fatores biologicamente significativos, e estes permitem a coexistência de espécies que seriam incompatíveis entre si em um ambiente homogêneo ³.

O desenvolvimento da cárie dental envolve uma série de eventos relacionados a esse biofilme, podemos elencar: interações bacterianas com a superfície dental, mudanças ecológicas conduzidas pela dieta, aspectos físico-químicos inerentes ao processo e a composição e propriedades dentárias ⁴¹.

A sacarose presente em nossa dieta causa grandes alterações bioquímicas e fisiológicas durante o processo de formação de biofilmes, o que, por sua vez, favorece as condições para a formação da cárie. A produção de ácido a partir do metabolismo da sacarose interrompe o equilíbrio da comunidade microbiana, favorecendo o crescimento de espécies cariogênicas. A sacarose é um carboidrato cariogênico único, porque é fermentável e também serve como substrato para síntese de glucano extracelular por glucosiltransferases (GTFs) de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ⁴¹.

Cury et al. (2000) ⁴¹, em um estudo do biofilme formado na presença de sacarose ou na presença de uma mistura de seus monossacarídeos componentes (glicose + frutose), pode concluir que o biofilme formado na presença da sacarose ou de seus constituintes foi mais cariogênico que o grupo controle, e seu maior volume pode ser atribuído à formação de polissacarídeos extracelulares.

O glucano é o principal polissacarídeo extracelular do biofilme, sendo sintetizado na presença de sacarose poderia tornar o biofilme mais cariogênico ⁴¹, ⁴². Glucanos melhoram a patogenicidade do biofilme, promovendo a adesão e o acúmulo de estreptococos cariogênicos na superfície do dente e contribuindo para uma maior integridade estrutural do biofilme ⁴³.

O *S. mutans* é uma bactéria gram-positiva que tem papel central no início das cáries nas superfícies lisas e fissuras das coroas dos dentes de adultos e crianças, além de ser um fator etiológico poderoso também na indução de cáries da superfície da raiz ⁴⁴. Essas bactérias metabolizam açúcares rapidamente, e crescem bem no ambiente ácido que é gerado ³, podendo estar consistentemente

associadas à decomposição dentária ⁴⁵. Sua característica acidogênica (capacidade de produzir ácidos a partir de carboidratos fermentáveis) e acidúrica (capacidade de viver bem em ambientes ácidos), em conjunto com sua capacidade de sintetizar glucanos extracelulares, são os principais fatores para o desenvolvimento e o estabelecimento de biofilmes cariogênicos ⁴³.

Os polissacarídeos nos biofilmes podem ser divididos em duas categorias: polissacarídeos extracelulares (PEC) e polissacarídeos intracelulares (PIC). PEC e PIC influenciam a cariogenicidade dos biofilmes dentários em pelo menos duas vias: PEC promovem a aderência e, por serem fonte de energia extracelular, a acumulação bacteriana nas superfícies dos dentes, além de causar mudanças bioquímicas e estruturais na matriz dos biofilmes; e PIC, sendo uma fonte de energia intracelular, promovem menores níveis de pH em jejum durante períodos de privação de nutrientes, o que pode resultar na seleção de microorganismos cariogênicos e desenvolvimento de cáries ⁴².

Os PEC, em especial, desempenham um papel importante na patogênese da cárie dentária, mais especificamente através de: (i) reforço da aderência bacteriana e acumulação adicional de microorganismos, (ii) fornecimento de integridade estrutural e volume para biofilmes e (iii) aumento da acidogenicidade da matriz do biofilme. Os PEC podem ainda ser divididos em solúveis e insolúveis, sendo os insolúveis mais envolvidos nos mecanismos acima descritos ⁴².

Além da quantidade de polissacarídeos formados, a virulência do biofilme também está relacionada com o pH do meio. O biofilme formado em presença de sacarose seria mais cariogênico devido à porosidade da sua matriz extracelular, que contém polissacarídeos. Dessa forma, substratos difundem facilmente através do biofilme atingindo a interface dente-biofilme onde eles são fermentados para ácidos, resultando em maiores quedas de pH. A cariogenicidade da sacarose pode ser atribuída a um sinergismo de uma alta porosidade ácida do biofilme e consequente difusão desse carboidrato fermentável através da matriz de polissacarídeos. Um aumento na frequência de exposição a carboidratos resulta no biofilme sendo submetido a um período prolongado abaixo do pH crítico para a desmineralização do esmalte ⁴¹.

O pH 5,5 é chamado de crítico, pois até esse limite o produto iônico das concentrações de Ca e P na saliva da maioria dos indivíduos é maior do que a dos íons em equilíbrio de uma suspensão de hidroxiapatita. O contrário disso, havendo

uma redução desse pH, a doença cárie ocorre pelo desequilíbrio entre os fatores de des-remineralização entre os tecidos dentários e o meio bucal, resultando na lesão de cárie como sinal clínico ⁴⁶.

Algumas outras hipóteses foram sugeridas para explicar como a sacarose altera as concentrações inorgânicas em biofilmes: (1) Os valores constantes de pH baixo obtidos na matriz de biofilme, devido à fermentação persistente de sacarose, dissolveriam reservatórios minerais ou inviabilizariam o armazenamento; (2) o esmalte poderia absorver esses íons do fluido dental de biofilme; (3) os baixos valores de pH causados pela fermentação de sacarose em biofilmes liberariam o reservatório de íons ligados a paredes de células bacterianas; (4) baixa densidade bacteriana devido ao elevado teor de EPS insolúvel pode resultar em menos locais de ligação para esses íons; e (5) baixas concentrações de proteínas específicas de ligação iônica podem resultar em menos reservatórios minerais em biofilmes formados na presença de sacarose ⁴².

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo *in vitro* foi testar a hipótese de que o tipo de superfície do esmalte (sadio ou cariado naturalmente, com clorexidina ou com cloreto de sódio no fluido dentinário subjacente) afeta a composição do biofilme de uma espécie.

Fator:

1) Tipo de substrato dental (nível de medida pareado nominal: lesão cariada inativa não cavitária de esmalte, com solução aquosa de clorexidina a 2% ou com solução de cloreto de sódio [NaCl] a 0,9%; e superfície de esmalte normal, com solução aquosa de clorexidina [CLX] a 2% ou com solução de cloreto de sódio a 0,9%), dividido em quatro níveis:

A- superfície de lesão cariada com solução de clorexidina na câmara pulpar (LECLX);

B- superfície de lesão cariada com solução de NaCl na câmara pulpar (LENACL);

C- superfície de esmalte normal com solução de clorexidina na câmara pulpar (ENCLX);

D- superfície de esmalte normal com solução de NaCl na câmara pulpar (LENACL);

Desfechos:

1) quantidade de polissacarídeos extracelulares solúveis do biofilme (nível de medida normal)

2) quantidade de polissacarídeos extracelulares insolúveis do biofilme (nível de medida normal)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

Esta pesquisa foi conduzida em conformidade as diretrizes e normas vigentes que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob protocolo: CAAE: 73755417.7.0000.5183 (ANEXO A).

4.2 Caracterização do estudo

O presente estudo caracterizou-se como quantitativo, laboratorial, experimental, analítico, prospectivo, com técnica de observação direta. Foi testada a hipótese nula de que o tipo de superfície de esmalte não afetaria a composição do biofilme formado in vitro sobre a superfície de esmalte.

4.3 Cálculo amostral

Para o cálculo amostral, foi considerado a diferença entre os dois grupos mais díspares, o que é um procedimento aceitável quando se planeja estudo com mais de dois grupos⁴⁷. Com um nível de significância de 1% bicaudal e um poder de 90%. Com relação à magnitude de efeito de diferença para as quantidades de PEC solúveis e insolúveis, foram utilizados valores de um estudo piloto com amostras pareadas: magnitude g de Hedge de 3,2. O tamanho amostral ficou em 5 amostras. Estimando perdas de 30%, o tamanho amostral final ficou estabelecido em 7 amostras⁴⁸.

4.4 Seleção da amostra

Os elementos dentários utilizados nesta pesquisa, pré-molares permanentes irrompidos com lesão cariosa proximal de esmalte não cavitária, foram obtidos mediante doação de pacientes maiores de 18 anos de idade, individualmente. As doações foram realizadas após o paciente ser esclarecido

sobre os objetivos deste estudo, assim como a necessidade da sua concordância de participação mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os dentes foram extraídos por diversas indicações, identificadas por um cirurgião-dentista não participante desta pesquisa.

4.4.1 Critérios de inclusão e exclusão

Tendo em vista a segurança quanto à integridade do esmalte e da dentina avaliados, os elementos dentários foram selecionados de forma a excluir da amostra os dentes inclusos, semi-inclusos, com trincas ou fraturas de esmalte que atingissem a polpa, com pigmentações, com presença de depósitos macroscópicos de cálculo dentário nas superfícies proximais, com esmaltes fluoróticos, com restaurações e malformações de desenvolvimento (amelogênese e dentinogênese imperfeitas). Para tanto, os dentes foram examinados utilizando uma lupa estereomicroscópica nos aumentos de 2x e 4x e microtomografia computadorizada tridimensional de raios X (microCT).

4.4.2 Microtomografia computadorizada tridimensional de raios X

Para padronização do escaneamento e reconstrução no microCT, realizado num equipamento Skyscan 1172 (Bkuker, Estados Unidos da América), foram definidos parâmetros, comuns a todas as amostras, quais sejam: para aquisição da imagem: pixel de 13,8 μm (matriz de pixels de tamanho grande), filtro de alumínio e cobre, passo de rotação de 0,4°, média de quadros de 4, movimento aleatório de 10, e 100 kV de energia, com rotação de 360°. Para a reconstrução da tomografia 3D, foram usados os seguintes parâmetros: suavização de 4, correção de endurecimento de feixe de 30% e correção de artefato de anéis de 4.

4.5 Limpeza e desinfecção

Depois dessa primeira seleção, cada elemento dentário foi limpo com o auxílio de curetas periodontais Trinity® (Brasil), através das quais tiveram seus remanescentes de tecido mole e cálculos dentários cervicais removidos. O processo de desinfecção foi realizado mediante utilização de pelotas de algodão embebidas em solução de hipoclorito de sódio 1% Asfer® (São Paulo - Brasil),

aplicados em movimentos ativos, no sentido coroa-ápice radicular, durante 30 segundos, com o objetivo de remover possíveis remanescentes de biofilme da superfície do esmalte que ainda pudessem estar presentes.

Em seguida, os dentes foram lavados com jato ar/água da seringa tríplice durante 30 segundos e secos apenas com jato de ar pelo mesmo tempo. Desta forma os elementos dentários foram preparados para a etapa seguinte de diagnóstico visual de cárie dentária.

4.6 Exame visual e teste de confiabilidade do sistema ICDAS-II

Com o objetivo de padronização, as lesões cariosas proximais foram selecionadas com base nos critérios de diagnóstico visual⁴⁹. Para isto, foi realizado o exame visual a olho nu, com iluminação ambiente, estando a face proximal avaliada a 25 cm dos olhos do examinador (Figura 01).



Figura 01: Imagem de dente sendo examinado para classificação no sistema ICDAS II.

A avaliação foi realizada por um examinador calibrado. Para calibração, foram utilizados 30 elementos dentários, que foram analisados duas vezes quanto à presença e atividade de mancha branca de esmalte (esmalte hígido, mancha branca ativa e inativa sem cavitação). Para cada um desses escores foi calculado o índice de confiabilidade Kappa máximo. O examinador foi considerado por ter um valor de Kappa máximo de 0,87.

Foram considerados para esta pesquisa os dentes que apresentaram esmalte normal (ICDAS 0) e lesão cariosa de esmalte (mancha branca) inativa (ICDAS 2).

4.7 Armazenamento

Os elementos dentários que não estivessem sendo estudados, analisados ou mesmo em processo de hidratação, eram armazenados em solução aquosa de azida sódica 0,02% (pH 7,0) até sua posterior utilização ³⁵.

4.8 Preparo dos dentes (separação da coroa, exérese do tecido pulpar e desinfecção)

Os dentes selecionados foram seccionados transversalmente, 2 mm abaixo da junção amelo-cementária, com auxílio de um disco diamantado dupla face KG Sorensen® (São Paulo, Brasil), montado em mandril para peça de mão em baixa rotação sob refrigeração constante (Dabi Atlante®, Ribeirão Preto, Brasil), com o objetivo de separar a coroa da raiz (Figura 02). Este primeiro corte foi realizado para facilitar o acesso e melhorar a visualização do conteúdo pulpar, facilitando sua completa remoção e desinfecção. Os elementos dentários que após o corte ainda apresentaram obstrução do acesso à câmara pulpar, tiveram a região cervical alargada com brocas esféricas diamantadas de alta rotação (1012 FG - KG Sorensen).



Figura 02: Corte transversal do dente para separar a coroa das raízes.

Para a limpeza e desinfecção da câmara pulpar, foram utilizadas limas endodônticas dos tipos Hedström (Maillefer/Dentsply®, Ballaigues, Suíça), extirpa nervo (Maillefer/Dentsply®, Ballaigues, Suíça) e curetas de dentina (Golgran®, São Paulo - Brasil), seguidos do processo de irrigação e aspiração com solução de hipoclorito de sódio a 1% (Solução de Milton) e água.

Em seguida, os elementos dentários foram imersos em recipientes cilíndricos individuais contendo água destilada e submetidos à agitação ultrassônica a 37°C, através do aparelho BioWash® (BioArt®, São Carlos, Brasil) onde permaneceram por 30 minutos, até a completa remoção dos detritos pulpares, possivelmente, ainda presentes.

4.9 Definição dos grupos

Após a seleção prévia dos dentes viáveis, e considerando um número de falhas maior que o esperado no decorrer da pesquisa, foram escolhidos para o estudo 10 dentes que apresentaram as condições necessárias. Foram considerados quatro grupos pareados com um tamanho amostral de 10. Os grupos foram assim constituídos: (I) superfície com lesão cariada de esmalte não cavitária inativa (ICDAS 2) com solução de clorexidina 2% na câmara pulpar (LECLX); (II) superfície com lesão cariada de esmalte não cavitária inativa (ICDAS 2) com solução de cloreto de sódio 0,9% na câmara pulpar (LECNACL); (III) superfície com esmalte normal (ICDAS 0) com solução de clorexidina 2% na câmara pulpar (ENCLX); e (IV) superfície com esmalte normal (ICDAS 0) com solução de cloreto de sódio 0,9% na câmara pulpar (ENNACL).

Os grupos foram constituídos de amostras pareadas, onde as amostras de um grupo foram novamente utilizadas nos outros três grupos após serem esterilizadas (ver item 4.10). O teste com a Clorexidina 2% na lesão foi realizado primeiro, tendo em vista que se esperava que a formação do biofilme com NaCl fosse maior, podendo esse aspecto interferir na extensão da lesão, causando alteração da amostra.

4.10 Preparo dos espécimes para o ensaio

As coroas de todos os elementos dentários foram unidas a cilindros plásticos através da sua região cervical (Figura 03). A união dessas estruturas se deu por meio de resina composta fotopolimerizável e Super cola, usadas de maneira isolada (uma de cada vez) e simultânea (primeiro a resina e depois a cola).

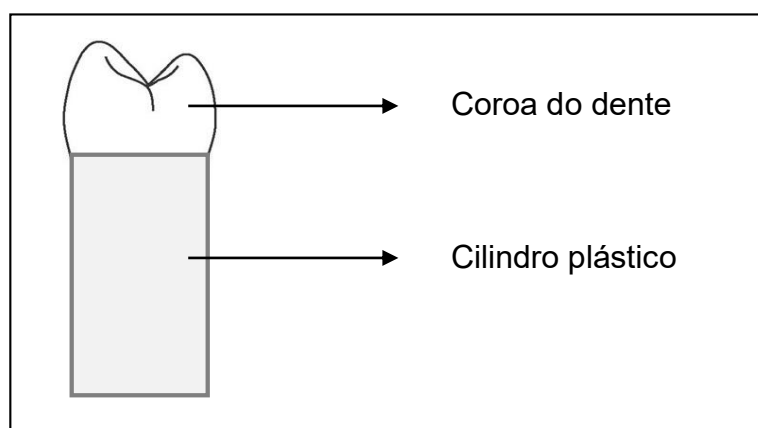


Figura 03: Desenho esquemático mostrando a coroa do dente unida ao cilindro plástico.

Para a constatação de ausência de fendas entre as estruturas, foi realizado um teste de vazamento no qual a amostra foi fixada com a face oclusal voltada para baixo, dentro do cilindro plástico cheio de água. Abaixo da amostra foi colocado um papel absorvente intacto, o qual foi observado após 12 h, Estando o mesmo intacto, não houve vazamento, apresentando indícios de gotículas de água, a amostra seria desprezada.

Após cada etapa de formação de biofilme e antes de cada etapa de esterilização, cada amostra teve a câmara pulpar lavada com água destilada por cinco minutos.

4.10.1 Preparo das amostras dos grupos I (LECLX) e II (LECNACL)

Para a realização do ensaio com os grupos I e II, os dentes tiveram toda a coroa isolada com verniz de unha vermelho de forma que apenas a lesão permaneceu exposta. Essa etapa teve a importância de garantir que qualquer

transporte de líquido entre a câmara pulpar e o meio externo se desse através da lesão (Figura 04).

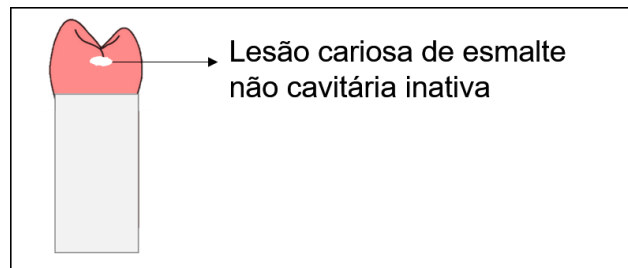


Figura 04: Desenho esquemático mostrando o isolamento da coroa e exposição da lesão cariosa de esmalte não cavitária inativa.

Após isso, o conjunto coroa-cilindro plástico foi fixado à tampa de um tubo para centrífuga de 15ml por um fio ortodôntico, de forma que dentro desse tubo se pudesse dispor de dois compartimentos isolados, um sendo o próprio tubo (externo ao dente) e outro dentro do cilindro plástico (interno ao dente, com acesso à câmara pulpar) (Figura 5). O objetivo de haverem dois compartimentos isolados foi para que o dente pudesse ter contato com duas substâncias diferentes ao mesmo tempo: na sua superfície externa (superfície do esmalte) e internamente (na câmara pulpar). Dessa forma esperava-se poder observar a interferência da substância colocada no reservatório 2 (Clorexidina 2% ou NaCl 0,9%) na formação de biofilme na superfície do esmalte. No reservatório 1 foi colocado 1ml do meio de cultura Extrato de Levedura e Triptona (TYE) + sacarose 1%, comum aos três grupos.

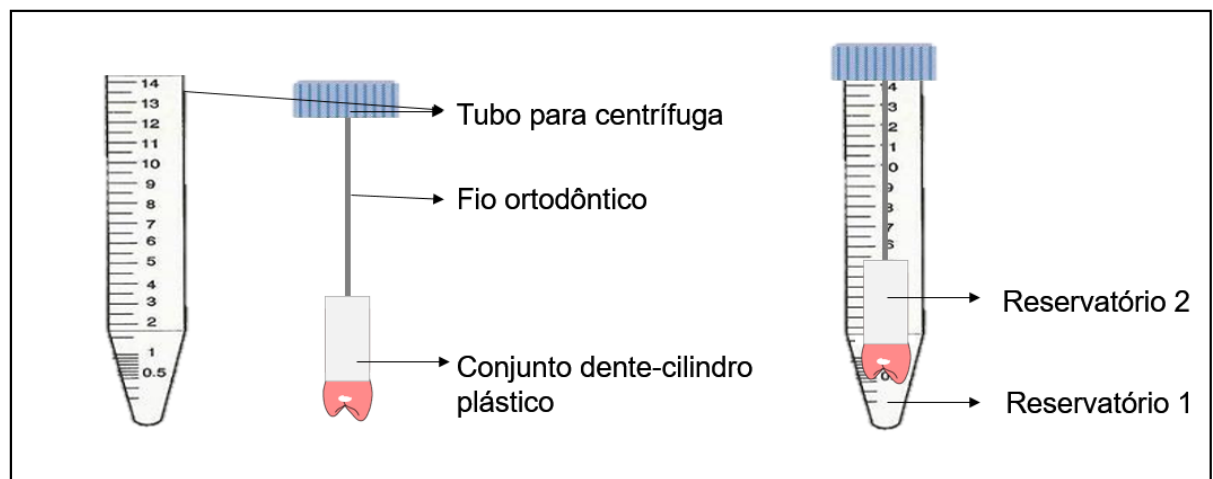


Figura 5: Desenho esquemático demonstrando os corpos de prova prontos. Onde no reservatório 1 foi inserido o meio de cultura e no reservatório 2 foi colocada a substância teste.

4.10.2 Preparo das amostras dos grupos III (ENCLX) e IV (ENNACL)

Para a realização do ensaio com os grupos III e IV, por se tratar das mesmas amostras ensaiadas nos grupos I e II, foi necessário remover o verniz de unha com removedor de esmalte à base de acetona e novamente pintar o dente de forma a deixar exposta uma área do esmalte sadio de iguais dimensões às da lesão cariiosa do mesmo dente (Figura 06).

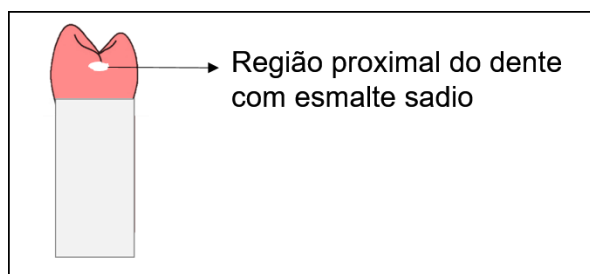


Figura 06: Desenho esquemático demonstrando a exposição de pequena porção de esmalte sadio e o isolamento do restante da coroa (inclusive da lesão).

O ensaio dos grupos III e IV se deu com o mesmo mecanismo descrito na Figura 05. No ensaio do grupo III no reservatório 1 foi colocado o meio (TYE+sacarose) e no reservatório 2 foi colocado a Clorexidina 2%. No ensaio do grupo IV no reservatório 1 foi colocado o meio (TYE+sacarose) e no reservatório 2 foi colocado o NaCl 0,9%.

Esperava-se que não houvesse interferência nem da Clorexidina nem do NaCl na formação de biofilme sobre a superfície de esmalte em ambos os grupos, tendo em vista que o meio por si só é propício a isso.

4.11 Esterilização do espécimens

Os espécimens foram esterilizados com Óxido de Etileno previamente ao início do experimento, bem como a cada novo ensaio (Figura 07).

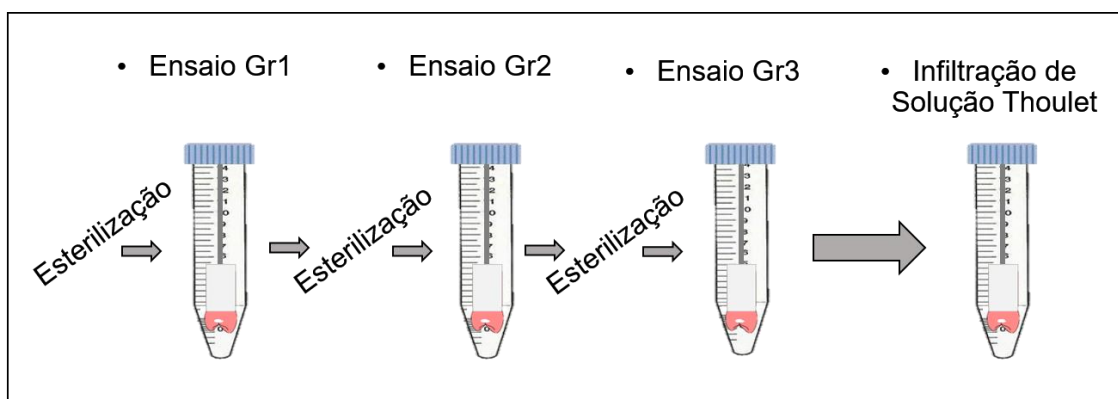


Figura 07: Desenho esquemático demonstrando as etapas de esterilização as quais cada amostra foi submetida.

4.12 Preparo do meio de cultura

Para o preparo de 100ml do meio (TYE + sacarose 1%), colocou-se 1g de Sacarose, 2,5g de Triptona e 1,5g de Extrato de levedura em um balão volumétrico. A essa mistura foi adicionada uma quantidade de água destilada de forma a obter um volume de 100ml. Para tanto, inicialmente foi colocada uma pequena quantidade de água destilada e misturado, em seguida foi adicionado mais até atingir 100ml. A mistura foi aquecida ao microondas por 1min para garantir a homogeneização. Transferiu-se o conteúdo para um tubo falcon e reservou-se na geladeira. Para que pudesse ser usado posteriormente, o meio deveria apresentar-se translúcido, indicando que não houve crescimento de microrganismos.

4.13 Crescimento do *S. mutans*

Inicialmente, foi realizado um esfregaço da cepa UA 159 do *Streptococcus mutans* numa placa de petri com meio MSA, que foi colocada em estufa de CO₂ a 10% por 24 horas.

Em seguida, colônias de bactérias foram coletadas com alça e colocadas em um tubo falcon contendo o meio (TYE + sacarose). O meio contendo o *S. mutans* retornou para a estufa de CO₂ a 10% por 72 horas, juntamente com um meio sem microrganismo para controle de esterilização e crescimento.

4.14 Padronização do Inóculo

A padronização da quantidade de *S. mutans* presente no inóculo se deu através de leituras de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 600 nanômetros (A600nm). Previamente à leitura, o aparelho foi zerado (Blank) com o valor do meio puro. O meio misturado ao *S. mutans* foi diluído até que o inóculo apresentasse $\cong 1 \times 10^8$ células viáveis, que correspondia ao valor entre 0,08 e 0,12 obtido do espectrofotômetro (Figura 08).



Figura 08: Espectrofotômetro.

4.15 Ensaio de formação de biofilme

Após serem esterilizadas, as dez amostras passaram pelo ensaio durante 5 dias, quando não estavam sendo manipuladas permaneceram em estufa bacteriológica (37°C). A substância teste (CLX ou NaCl) não foi trocada durante os 5 dias, o meio foi trocado após 48h de início do experimento e desprezado ao final do 5º dia.

4.16 Dosagem de Polissacarídeos Extracelulares

Após o período de 120 horas de desenvolvimento dos biofilmes, o meio de cultura foi removido e o biofilme formado foi re-suspendido em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%), por meio de pipetagem e agitação em vórtex (60 s). A suspensão foi transferida para microtubos e posteriormente utilizada para dosagem de biomassa e de polissacarídeos extracelulares solúveis (PECs) e polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECi). A metodologia de extração e dosagem de

polissacarídeos foi previamente descrita na literatura ^{50,51,52}. Segue abaixo a descrição de forma detalhada:

- Após a solubilização do biofilme em 1 mL de solução salina, deve-se reservar um volume mínimo de 400-500 µL;
- Os microtubos pré-pesados contendo a suspensão dos microrganismos devem ser centrifugados (3000 g) por 5 min;
- Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser transferido para um novo tubo, com auxílio de uma micropipeta. O pellet deve permanecer ao fundo do microtubo, tomando-se cuidado para não o romper durante o processo de aspiração;
- O sobrenadante é transferido para outro microtubo com igual volume de álcool a 99% para precipitação do PECs (solução 1). O tubo contendo o sobrenadante do biofilme e álcool 99% deve ser levado para o congelador (-20° C), permanecendo por no mínimo 30 min;
- Nesse momento o microtubo contendo o pellet é pesado para a determinação do peso úmido do biofilme através da equação: Peso final - peso inicial do microtubo;
- Ao pellet é adicionado 500 µL de NaOH 1 M para extração/solubilização do PECi (solução 2). Após adicionar NaOH, os tubos devem ser posicionados em mesa agitadora por 15 min ou agitados no vórtex por 1 min;
- Em seguida, a solução 2 (pellet + NaOH) é centrifugada por 5 min;
- Após centrifugação, é o sobrenadante da solução 2 é removido e transferido para um novo microtubo, para precipitação do PECi; O pellet remanescente pode ser solubilizado novamente com 100 uL de NaOH 1M, centrifugado e coletado o sobrenadante.
- Após esse processo, o tubo contendo o pellet da solução 2 deve ser desprezado ou utilizado para extração de PIC.
- Ao sobrenadante obtido da centrifugação da solução 2, adiciona-se igual volume de álcool 99% e armazena-se o microtubo no congelador (-20°C) por no mínimo 30 min;
- Nesse momento, o PECs (resultante da solução 1) deve ter precipitado. O tubo contendo solução 1 + álcool 99% é retirado do congelador e centrifugado (3000 g) por 5 min;

- Em seguida, descarta-se o sobrenadante (álcool 99%), observa a formação de um pequeno pellet. Verte-se o microtubo sobre uma folha de papel absorvente e reserva-se o microtubo com a tampa aberta dentro da capela para secar;
- Quando o microtubo da solução 1 (PECs) estiver seco, inserir 250 μ L de NaOH 1M. A diluição do pellet de PECs com NaOH 1 M nesta etapa consiste em preparar a amostra para dosagem. O volume de 250 μ L consiste no valor mínimo a ser utilizado, uma vez que se utiliza 200 μ L para cada dosagem.
- Nesse momento, o PECi (resultante da solução 2) deve ter precipitado. O tubo contendo o sobrenadante da solução 2 + álcool 99% é removido do congelador e centrifugado (3000 g) por 5 min;
- Em seguida, descarta-se o sobrenadante (álcool 99%), observa a formação do pellet de PECi. Verte-se o microtubo sobre uma folha de papel absorvente e reserva-se o microtubo com a tampa aberta dentro da capela para secar;
- Quando o microtubo da solução 2 (PECi) estiver seco, inserir 250 μ L de NaOH. A diluição do pellet de PECs com NaOH 1 M nesta etapa consiste em preparar a amostra para dosagem. O volume de 250 μ L consiste no valor mínimo a ser utilizado, uma vez que se utiliza 200 μ L para cada dosagem.
- Identificar os tubos de vidro correspondentes PECs e PECi e inserir 200 μ L de fenol 5%;
- Em seguida, inserir 200 μ L de cada amostra no tubo de vidro correspondente;
- Preparar a curva com padrões de glicose conhecidos (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200).
- Para reação fenol-sulfúrico, utilizar, por amostra: 200 μ L de fenol + 200 μ L da amostra (PECs, PECi ou Ponto da curva Padrão) + 1 mL de ácido sulfúrico;
- Inserir 1 mL de ácido sulfúrico P.A. em cada tubo de vidro contendo 200 μ L de fenol + 200 μ L da amostra (ou do padrão);
- Fazer a leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm – Anotar valores de absorbância;
- Após a leitura, descartar o conteúdo em um recipiente apropriado (não descartar na pia) e colocar os tubos de vidro em um recipiente com água.

Observação: Para preparar o fenol, é necessário aquecê-lo (estufa ou waterbath) que possibilite controlar a temperatura, visto que o ponto de fusão do fenol ocorre a 41° C. Na fase líquida, utilizar 5 mL de Fenol P.A para cada 100 mL de água destilada e deionizada.

A metodologia de extração e dosagem de PEC está representada de maneira simplificada no esquema abaixo (Figura 09).

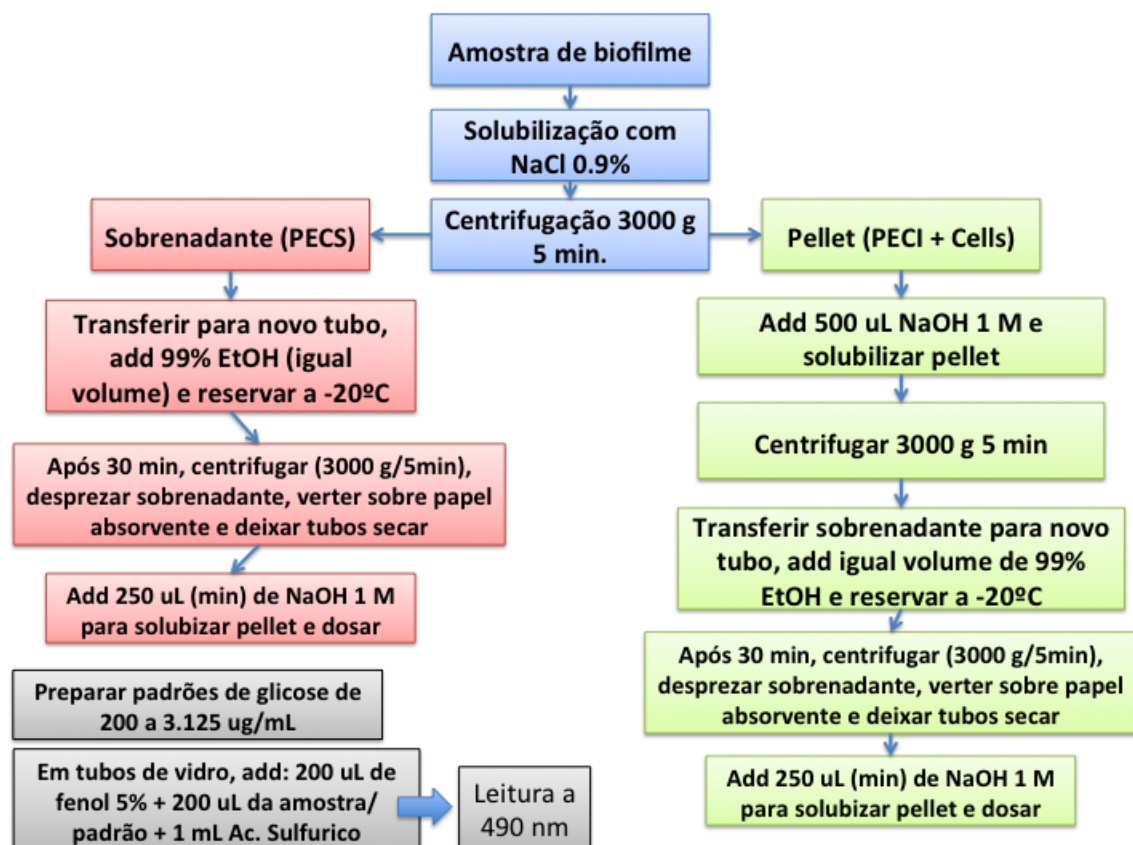


Figura 09: Esquema representativo da metodologia de extração e dosagem de PEC.

4.17 Infiltração de solução de *Thoulet*

Ao final dos quatro períodos de formação de biofilme, cada elemento dentário teve sua câmara pulpar totalmente preenchida pela solução aquosa de iodeto de mercúrio e iodeto de potássio com índice de refração de 1,47. O índice de refração foi quantificado em refratômetro de Abbe de bancada. Tal solução é conhecida como solução de *Thoulet* e foi aqui usada como contraste radiográfico por apresentar elementos químicos (mercúrio) com alta absorção de raios X. A solução de contraste foi inserida na câmara pulpar e o dente ficou posicionado da mesma forma, dentro do tubo para centrífuga, imóvel por 24 horas. Decorrido esse tempo, os dentes foram removidos dos seus suportes de fixação e passaram por uma análise em microCT, onde foi avaliada (qualitativamente) a infiltração da solução de *Thoulet* na dentina e esmalte relacionados às superfícies de esmalte analisadas.

4.18 Análise dos dados

Os dados foram analisados considerando a Análise de Variância de um fator com medidas repetidas, sendo também testados quanto à normalidade e quanto à homogeneidade de variâncias.

Para o teste de normalidade, foram considerados normais os dados que apresentassem variações de até ± 2 na assimetria e na curtose^{53, 54}. Considerando os valores centrais para assimetria (zero) e curtose (três), foram considerados normais valores com assimetria entre -2 e 2 e valores de curtose entre 1 e 5.

Com relação à homogeneidade das variâncias, a ANOVA é pouco afetada por variâncias heterogêneas quando os tamanhos amostrais dos grupos são idênticos^{55, 56}. Uma vez que todos os grupos tiveram tamanho amostral igual, não foi testada a homogeneidade das variâncias.

O teste t pareado foi aplicado para comparar grupos relacionados (dados de duas camadas das mesmas amostras). Não foi feita correção para o erro tipo I devido ao fato de todas as análises terem sido planejadas no projeto⁵⁷. Foram analisados significância (valor de p), magnitude de efeito g de Hedge, seu intervalo de confiança de 95% e o poder estatístico.

5. RESULTADOS

Os dados a seguir mostram, respectivamente, os dados de média e desvio-padrão para o desfecho PECs ($\mu\text{g/mL}$) (Quadro 01) e os resultados da análise estatística (Quadro 02). A hipótese nula foi rejeitada para PECs ($p < 0,001$), mostrando que o tipo de superfície do esmalte afetou a formação de polissacarídeos extracelulares solúveis no biofilme, com uma magnitude de efeito eta ao quadrado de 36,7% (poder de 97,76%).

Quadro 01 – Valores de média ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ desvio padrão (DP) de PEC solúveis.

Grupo	Tipo de superfície de esmalte	Média ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ desvio padrão
LECLX	Superfície de lesão cariiosa com solução de clorexidina na câmara pulpar	152,7651641 $\pm$ 33,17578649
LENACL	Superfície de lesão cariiosa com solução de cloreto de sódio na câmara pulpar	286,9815203 $\pm$ 73,75772154
ENCLX	Superfície de esmalte normal com solução de clorexidina na câmara pulpar	703,3267294 $\pm$ 379,3980316
ENNACL	Superfície de esmalte normal com solução de cloreto de sódio na câmara pulpar	936,2986185 $\pm$ 524,3012408

Quadro 2 – Resultados da análise de variância (ANOVA) de um fator com medidas repetidas para PECs ($\mu\text{g/mL}$).

	SQ	GL	QM	F	p	η^2	poder
Entre grupos	2226368,92	3	742122,9733	9,1316627	0,0002442*	0,3677062	0,977627504
Intra grupos	3828379,426	36	81269,2054				
Total	6054748,346						

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio; η^2 : eta ao quadrado;

*significância estatística ($p < 0,001$)

Para o desfecho quantidade de PECi ($\mu\text{g/mL}$), seguem os quadros 03 e 04. O Quadro 3 mostra os dados de média e desvio padrão. Os resultados da análise estatística estão descritos no Quadro 4. A hipótese nula foi rejeitada também para PECi ($p < 0,001$), mostrando que o tipo de superfície do esmalte afetou a formação de polissacarídeos extracelulares insolúveis no biofilme com uma magnitude de efeito eta ao quadrado de 29,2% (poder de 90,79%).

Quadro 03 – Valores de média ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ desvio padrão (DP) de PEC insolúveis.

Grupo	Tipo de superfície de esmalte	Média ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ desvio padrão
LECLX	Superfície de lesão cáriosa com solução de clorexidina na câmara pulpar	78,01419386 $\pm$ 60,65587664
LENACL	Superfície de lesão cáriosa com solução de cloreto de sódio na câmara pulpar	329,5060084 $\pm$ 53,15281834
ENCLX	Superfície de esmalte normal com solução de clorexidina na câmara pulpar	550,675294 $\pm$ 231,913982
ENNACL	Superfície de esmalte normal com solução de cloreto de sódio na câmara pulpar	768,119028 $\pm$ 583,9586404

Quadro 04 – Resultados da análise de variância (ANOVA) de um fator com medidas repetidas para PECi ($\mu\text{g/mL}$). $\pm$

	SQ	GL	QM	F	p	η^2	poder
Entre grupos	1496106,467	3	498702,1556	5,338162255	0,005103423	0,292907853	0,907934669
Intra grupos	3611665,316	36	93422,0677				
Total	5107771,783						

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio; η^2 : eta ao quadrado;

*significância estatística ($p < 0,001$)

O Quadro 05 mostra a razão entre PECi e PECs por amostra nos diversos grupos.

Quadro 05: Razão entre PECi e PECs por amostra nos diversos grupos.

	LECLX	LENACL	ENCLX	ENNACL
1	0,694436179	1,147227205	1,241517997	1,083702011
2	0,979672273	1,0344683	0,511075688	0,79511463
3	0,502574404	1,012149623	0,43086346	0,367865329
4	0,06396124	1,201551776	0,498682461	0,455610732
5	0,270856238	1,977515368	0,558947985	0,839348383
6	0,109861274	0,962575007	1,340520335	1,803575637
7	0,11136648	1,189644257	0,960806697	0,842331139
8	1,007756674	1,202655013	2,184090307	1
9	0,330555889	0,952713728	0,927712682	0,471501264
10	1,015276361	1,350733488	0,599173054	1,262257049
MÉDIA	0,508631701	1,203123376	0,925339067	0,892130617

Após a comparação geral dos quatro grupos, foram realizados testes t de Student para comparar os grupos dois a dois, conforme descrito no Quadro 06 para o desfecho PECs e no Quadro 07 para o desfecho PECi.

Quadro 06 – Dados de significância, magnitude de efeito e seu intervalo de confiança de 95% e poder estatístico para os testes pareados (teste T) com dados de PEC solúveis.

GRUPOS	valor de p	g de Hedge	IC lim sup	IC lim inf	Poder
LECLX x LENACL	0,000189126*	1,91503651	3,136777564	0,693295456	0,997870878
LECLX x ENCLX	0,001064296	1,497780741	2,642538838	0,353022643	0,982338196
LECLX x ENNACL	0,000940533*	1,52577079	2,67524809	0,37629349	0,984725598
LENACL x ENCLX	0,011499093	1,175368729	2,270909959	0,079827499	0,910136314
LENACL x ENNACL	0,004351817	1,260097005	2,367621317	0,152572693	0,940472203

ENCLX x ENNACL	0,047390534	0,725722039	1,77015981	-0,31871573	0,512716257
-----------------------	-------------	-------------	------------	-------------	-------------

IC lim sup: limite superior do intervalo de confiança. IC lim inf: limite inferior do intervalo de confiança, *significância estatística ($p < 0,001$).

Quadro 07 – Dados de significância, magnitude de efeito e seu intervalo de confiança de 95% e poder estatístico para os testes pareados (teste T) com dados de PEC insolúveis.

GRUPOS	valor de p	g de Hedge	IC lim sup	IC lim inf	Poder
LECLX x LENACL	3,02776E-06	3,226287447	4,760929373	1,691645521	0,99998825
LECLX x ENCLX	0,000167841*	1,946171539	3,17419078	0,718152297	0,998168608
LECLX x ENNACL	0,005941698*	1,131722489	2,221368381	0,042076597	0,889754246
LENACL x ENCLX	0,028975566	1,097942649	2,183158057	0,012727241	0,871421494
LENACL x ENNACL	0,047855892	0,774784928	1,823721839	-0,27415198	0,572449011
ENCLX x ENNACL	0,197632494	0,439893441	1,463723019	-0,58393614	0,203169805

IC lim sup: limite superior do intervalo de confiança. IC lim inf: limite inferior do intervalo de confiança.

Nas Figuras 10, 11 e 12 extraídas do microCT é possível observar as lesões antes da realização dos ensaios das amostras e posterior à infiltração com solução de *Thoulet*. Após a infiltração da referida solução de contraste podemos notar espalhamento desta em toda a região dentinária, inclusive em direção à lesão. Na Figura 10, imagem “d” podemos ver a lesão parcialmente preenchida pela solução, evidenciando o transporte da solução da câmara pulpar (onde ela foi inserida) até a região da lesão.

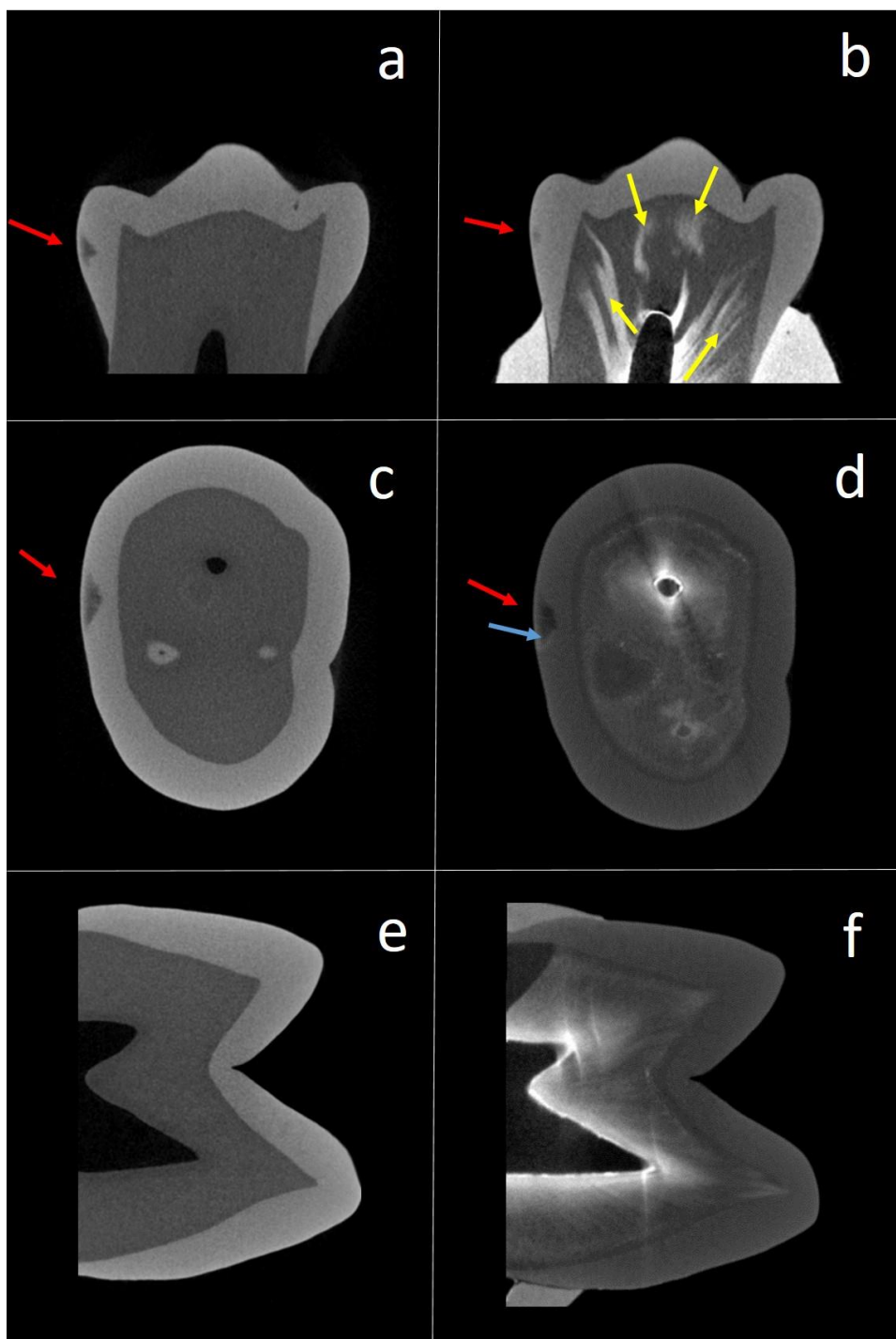


Figura 10: Em **a**, **c** e **e** podemos ver o dente previamente à realização dos testes. Em **b**, **d**, e **f** podemos ver o dente posteriormente à realização dos testes e infiltração com solução de *Thoulet*. Seta vermelha (→): Lesão cáriosa de esmalte não cavitária inativa. Seta amarela (→) Regiões de dentina infiltradas por solução de *Thoulet*. Seta azul (→): Região da lesão parcialmente infiltrada por solução *Thoulet*.

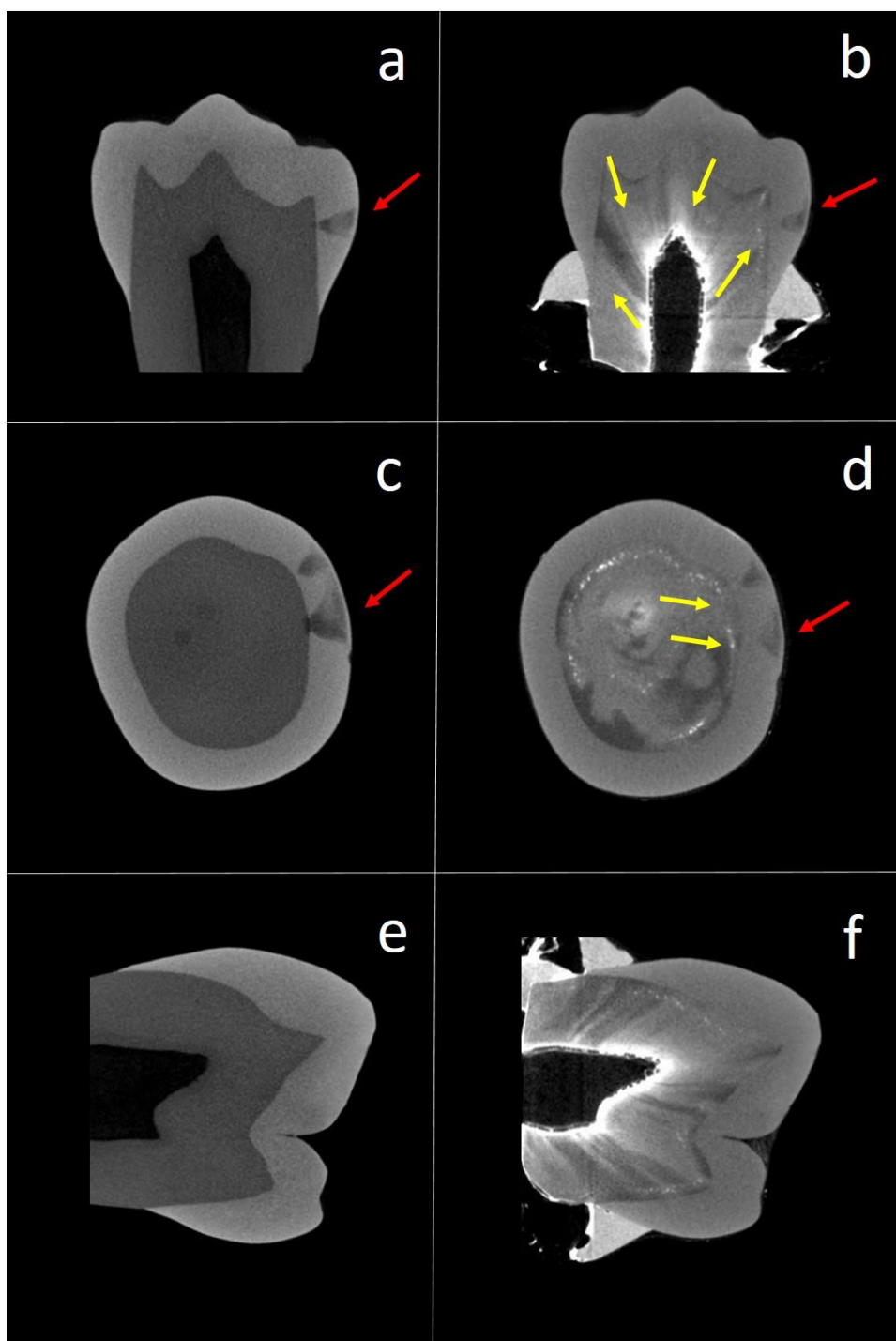


Figura 11: Em **a**, **c** e **e** podemos ver o dente previamente à realização dos testes. Em **b**, **d**, e **f** podemos ver o dente posteriormente à realização dos testes e infiltração com solução de *Thoulet*. Seta vermelha (→): Lesão cariosa de esmalte não cavitária inativa. Seta amarela (→) Regiões de dentina infiltradas por solução de *Thoulet*.

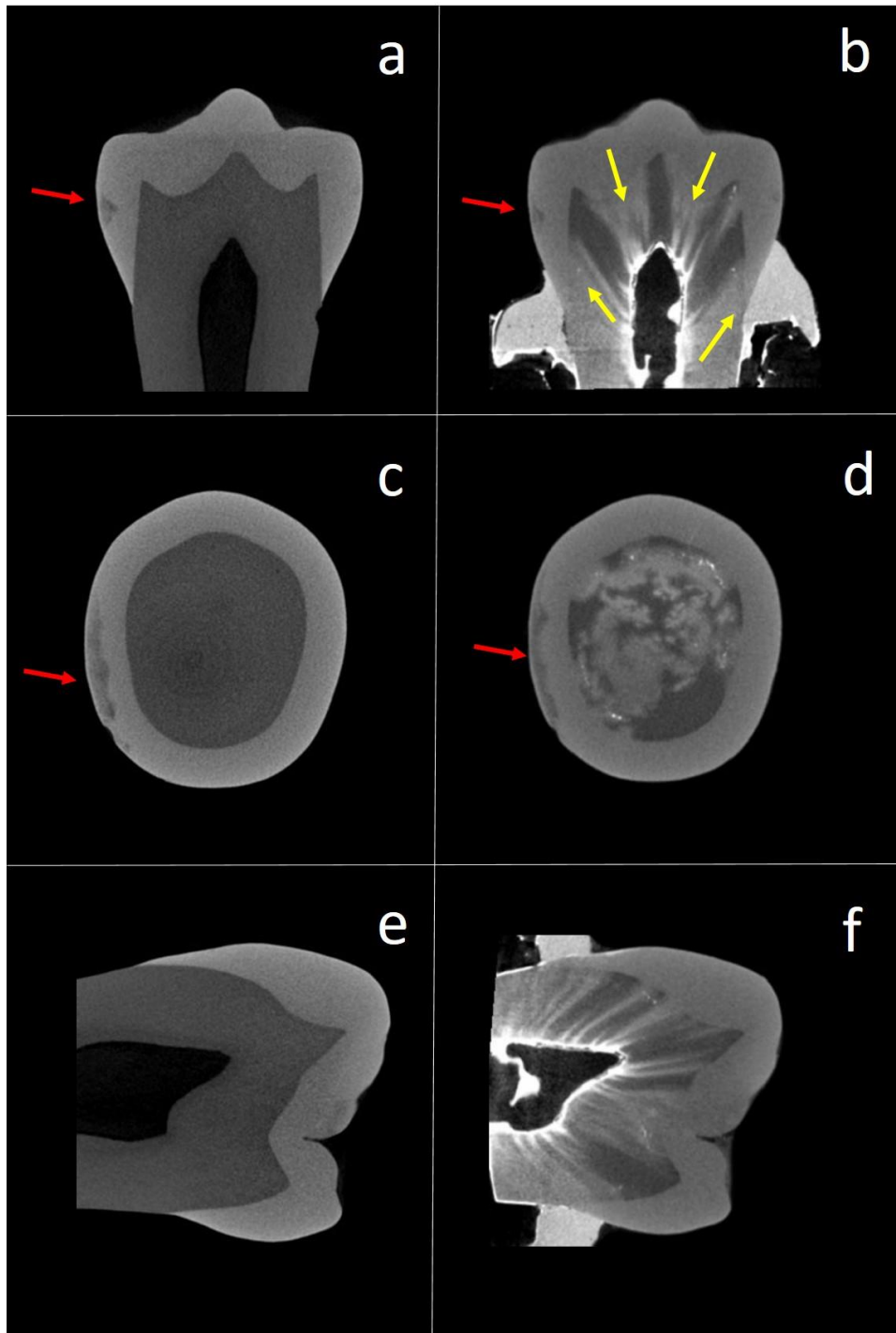


Figura 12: Em **a**, **c** e **e** podemos ver o dente previamente à realização dos testes. Em **b**, **d**, e **f** podemos ver o dente posteriormente à realização dos testes e infiltração com solução de *Thoulet*. Seta vermelha (→): Lesão cariosa de esmalte não cavitária inativa. Seta amarela (→) Regiões de dentina infiltradas por solução de *Thoulet*.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi verificado que a composição do biofilme formado sobre lesão cariosa de esmalte não cavitária inativa foi afetada pelo tipo de superfície do esmalte (sadio ou cariado naturalmente, com clorexidina ou com cloreto de sódio no fluido dentinário subjacente).

A questão principal do presente estudo gira em torno das reações dentinárias subjacentes a uma lesão cariosa de esmalte não cavitária inativa. A descrição mais amplamente aceita atualmente é de que existe uma considerável camada de dentina esclerótica entre a polpa e o limite amelo-dentinário subjacente a uma lesão cariosa proximal de esmalte ^{11, 58, 59, 60}. De acordo com essa descrição, antes da desmineralização chegar à dentina já há formação de dentina esclerótica na dentina externa (mais próxima da lesão de esmalte). Os dados encontrados nesse estudo não são consistentes com uma presença de transporte dificultado da polpa até o esmalte.

Antes de nos aprofundarmos nos resultados do presente estudo, podemos chamar a atenção para a técnica usada para a detecção das reações de esmalte e dentina antes e após a realização dos ensaios de formação de biofilme.

Atualmente a esteromicroscopia é uma técnica considerada padrão-ouro pra detecções de reações dentinárias ao processo carioso ^{32, 61, 62, 63}. Em cortes histológicos, os túbulos dentinários obturados por esclerose aparecem translúcidos, pois os minerais em seu interior o tornam homogêneo, reduzindo a dispersão de luz que passa através deles ⁵⁹. Dessa forma, a esclerose dentinária pode ser denominada de zona translúcida⁵⁹. A credibilidade na ideia de que dentina translúcida é esclerótica embasou o uso da estereomicroscopia na detecção da extensão da desmineralização cariosa³² em dentina, porém, essa técnica tem baixa precisão para detectar dentina cariada e esclerótica¹⁴.

Neste estudo, as amostras foram analisadas antes e após os ensaios utilizando microCT. MicroCT é uma técnica de pesquisa não destrutiva cada vez mais popular na pesquisa odontológica, que permite que os tecidos duros sejam medidos volumetricamente e avaliados em sua densidade mineral^{64,65,66}. Segundo NEVES (2010)⁶⁴, com a padronização da análise em microCT, correção de artefatos, calibração de densidade e processamento de dados adequados, é

possível usar com sucesso este método para o estudo da densidade mineral de tecidos dentais.

A permeabilidade dentinária foi verificada ao final dos experimentos usando a solução *Thoulet* para contrastar dentina cariada da dentina normal e da esclerótica, facilitando assim a identificação das reações dentinárias.

As análises em microCT do presente estudo identificaram um caminho facilitado da solução de contraste da câmara pulpar até o esmalte (Figuras 10, 11 e 12). A quantidade de PEC (solúveis e insolúveis) do biofilme formado *in vitro* foi menor quando se aplicou clorexidina na câmara pulpar. Esses são indícios de que a formação do biofilme foi afetada pela composição do líquido inserido na câmara pulpar. O mecanismo mais provável é que o líquido tenha se deslocado por capilaridade através da dentina e penetrado no esmalte, daí se deslocando (por uma mistura de capilaridade e difusão) até a superfície da face proximal onde o biofilme foi formado.

Neste estudo, a sacarose foi acrescida ao meio de cultura (renovado no meio do período de 5 dias de indução de biofilme), diferentemente de outros estudos com biofilme de *S. mutans* que usaram aplicações intermitentes (períodos de “festa e fome”) de sacarose⁵². Assim, a razão entre PECi e PECs, que variou entre os grupos (Quadro 5), deve ser analisada considerando a maior disponibilidade de sacarose neste estudo em comparação com outros que usaram o método “festa e fome. No grupo LECLX, a razão PECi/PECs foi a menor de todos os grupos. Considerando que, na presença de sacarose, os PECi influem mais amplamente na cariogenicidade do biofilme do que os PECs ⁴¹, os resultados sugerem que há maior redução na cariogenicidade do biofilme quando este foi formado sobre a lesão cariosa estando o fluido dentinário subjacente sob influência da clorexidina inserida na câmara pulpar. Considerando que alguma clorexidina deve ter permanecido nos poros da lesão cariosa no grupo LENACL, a maior razão PECi/PECs sugere que o efeito da clorexidina foi maior nos PECs, mas isso precisa ser melhor investigado em estudos futuros. A razão PECi/PECs voltou a diminuir nos grupos de esmalte normal, possivelmente em decorrência do fornecimento contínuo de sacarose no meio de cultura.

A menor quantidade de PEC no grupo LENACL em comparação com os grupos de esmalte normal (ENCLX e ENNACL) pode ser explicada por uma quantidade residual de clorexidina nos poros da lesão cariosa após o curto

procedimento de lavagem realizado ao final da indução de biofilme no grupo LECLX. Meira et al (2015) ⁶⁷ mostraram que em cortes histológicos finos (0,1 mm) de lesões cariosas naturais inativas de esmalte, a penetração (por capilaridade) de soluções de *Thoulet* 1,40 e 1,47 (esta última sendo a mesma usada neste estudo como solução de contraste radiográfico) ocorre inicialmente pelas bainhas dos prismas (os maiores poros do corpo da lesão cariosa), e depois prossegue nos poros intraprismáticos (menores poros do corpo da lesão cariosa), e que 24 h de imersão na solução de contraste não são suficientes para que ocorra penetração completa de todos os poros. A penetração das soluções de *Thoulet* no estudo de Meira et al (2015) ocorreu em condições muito mais facilitadas (eram cortes histológicos finos) do que aquelas que foram criadas no presente estudo com dentes íntegros. Considerando que a penetração de soluções aquosas bastante fluidas (soluções de *Thoulet* 1,4 e 1,47 têm coeficientes de penetração de 3212 cm/s e 2297 cm/s a 25° C, respectivamente; próximos do coeficiente de penetração da água, 4039 cm/s a 25°) na lesão cariosa natural de esmalte foi incompleta após 24 h de imersão, a remoção dessa solução por lavagem com água também não deve ser um processo rápido. Nesse contexto, a menor quantidade de PEC nos grupos LENACL em relação aos grupos de esmalte normal é consistente com o conhecimento atual sobre transporte de materiais nos poros do esmalte cariado.

Os grupos de esmalte normal apresentaram uma magnitude de efeito de diferença na quantidade de PEC que teve baixo poder. No que pese o fato de que um maior tamanho amostral pudesse resultar numa significância baixa e em um poder alto, os valores absolutos de PEC nesses grupos estão num patamar bem mais alto que aqueles dos grupos de esmalte cariado, indicando que sua virulência (cariogenicidade) foi bem mais alta.

Nos dentes polpados funcionais, há uma pressão originária da polpa que injeta fluidos em direção à dentina a uma pressão de aproximadamente 15-30 cm de água ⁶⁸. O fluido injetado se torna o fluido dentinário. Estudos in vitro mostraram que a composição do fluido pulpar na câmara pulpar despolpada afetou a severidade da lesão cariosa em dentina quando a superfície dentinária estava exposta ao agente cariogênico. A ação do fluido pulpar nesses estudos foi no interior da dentina. No presente estudo, a ação do fluido pulpar ocorreu na superfície do esmalte. Aqui usamos a solução de *Thoulet*, com índice de refração de 1,47, que não penetra no esmalte normal mesmo após dias de imersão ⁶⁹.

Assim, o esmalte interno das lesões analisadas provavelmente tinha, em relação ao esmalte normal, aumento das porosidades, possibilitando o transporte do líquido da câmara pulpar até a superfície do esmalte num intervalo de 24h.

Não se sabe se esse transporte facilitado seria encontrado em todas as lesões cariosas proximais de esmalte, pois existiria a possibilidade de haver dentina esclerótica, em algum grau, entre a câmara pulpar e o esmalte. Neste contexto, é importante destacar o estudo de Ogawa et al. (1983)⁷⁰ com lesões cariosas naturais dentinárias cavitárias, no qual foi mostrado (através de microscopia eletrônica de transmissão) que a zona de dentina esclerótica apresenta uma dentina intertubular com maior porosidade que a dentina normal adjacente. Além disso, os túbulos dentinários na dentina esclerótica não são totalmente obliterados por minerais^{70,71}. Esses dados indicam que a dentina na zona esclerótica pode já ter sido afetada pela desmineralização e ainda assim apresentar a aparência de translúcida. Os túbulos parcialmente preenchidos e a dentina intertubular desmineralizada podem ser as vias de transporte facilitado para o fluido pulpar chegar até o esmalte.

A formação do biofilme dentário e a simulação dele *in vitro* já foi elucidada na literatura^{3, 41, 43}. Neste estudo foi utilizada a sacarose, considerada o carboidrato mais cariogênico implicado na formação de biofilme dental⁴¹. Também se utilizou o inóculo de *S. Mutans*, embora saibamos da implicação de outras bactérias na formação do biofilme⁴⁴.

Inúmeros estudos já foram realizados com fins de inibir o crescimento de biofilme, sendo a clorexidina a substância mais bem aceita^{4, 5, 6}. Utilizando-se desse conhecimento prévio sobre o efeito da clorexidina na inibição do crescimento do biofilme na superfície do esmalte, ela foi inserida na câmara pulpar das amostras, e em seguida a coroa contendo a lesão foi submergida dentro de um meio enriquecido com sacarose, de forma que qualquer inibição do biofilme que ocorresse seria por motivo da perfusão da clorexidina da câmara pulpar em direção à superfície do esmalte através da lesão. Tomou-se o cuidado de impermeabilizar o restante da coroa para garantir que o transporte da clorexidina se desse apenas através da lesão. Não foram encontrados outros trabalhos na literatura que tenham utilizado semelhante metodologia.

Em relação à formação do biofilme propriamente dita, Mars e Bradshaw (1995)³ chamam a atenção para sua composição, segundo eles aproximadamente 80-90% do seu peso é água, cerca de 70% do peso seco é bactéria, e o restante é

uma matriz de polissacarídeos, proteínas salivares e glicoproteínas. Polímeros extracelulares de glicose e frutose são formados a partir de sacarose dietética por bactérias enzimas. Alguns desses polímeros são solúveis e podem ser quebrados e metabolizados no biofilme por bactérias que produzem as hidrolases apropriadas, enquanto outros são insolúveis e acredita-se que desempenham um papel significativo na determinação da arquitetura do biofilme.

No presente estudo a análise quantitativa do biofilme formado sobre a superfície do esmalte revelou que o tipo de substrato dental afetou a composição do biofilme considerando os dois desfechos, polissacarídeos extracelulares solúveis e polissacarídeos extracelulares insolúveis, rejeitando assim a hipótese nula de que o tipo de superfície do esmalte (sadio ou cariado naturalmente, com clorexidina ou com cloreto de sódio no fluido dentinário subjacente) não afeta a composição do biofilme de uma espécie. As análises qualitativas das amostras em microCT antes e após os testes sugerem permeabilidade dentinária à solução *Thoulet* da câmara pulpar em direção à lesão.

A implicação do nosso estudo na patogênese da lesão cáries está na evidência de que o fluido dentinário pode alcançar o interior da lesão cáries natural de esmalte e interagir com o fluido do biofilme cariogênico. Em um dente vital, os tipos de líquido usados na câmara pulpar neste estudo seria representado pelo fluido pulpar. Nesse contexto, é importante salientar que há evidências de que a administração de antibióticos por via oral resulta em uma concentração relativamente alta do antibiótico no fluido pulpar após algumas horas^{72, 21, 73}. Foi relatado que o nível de antibiótico no fluido pulpar chega (após 1-2 h de administração oral) a 60% do nível do antibiótico no soro sanguíneo^{72, 21}. Caso o antibiótico chegue nos poros do esmalte, poderá interagir com o fluido do biofilme e afetar o metabolismo bacteriano, afetando o crescimento de bactérias cariogênicas e a quantidade e composição da matriz e do fluido do biofilme. Em pacientes que recebem tratamento com antibiótico por razões de saúde geral, um efeito secundário benéfico poderia ser a redução da patogenicidade do biofilme dental, contribuindo para reduzir ou parar a progressão das lesões cáries de esmalte.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a modificação do fluido dentinário alterou a composição do biofilme formado sobre superfície do esmalte, indicando existência de um caminho de transporte facilitado da câmara pulpar até a superfície da lesão cariosa natural de esmalte, com importantes implicações na patogênese e no tratamento de lesões cariosas de esmalte.

8. REFERÊNCIAS*

1. Schwendicke, F, et al. "Managing carious lesions: consensus recommendations on carious tissue removal." *Advances in dental research*. 2016;28(2):58-67.
2. Fejerskov, O. "Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care." *Caries research*. 2004;38(3):182-191.
3. Marsh, PD, Bradshaw DJ. "Dental plaque as a biofilm." *Journal of industrial microbiology*. 1995;15(3):169-175.
4. Queiroz, V S, et al. "Influence of the Culture Medium in Dose-Response Effect of the Chlorhexidine on Streptococcus mutans Biofilms." *Scientifica* 2016 (2016).
5. Addy, M, Moran JM. "Evaluation of oral hygiene products: science is true; don't be misled by the facts." *Periodontology 2000*. 1997;15(1):40-51.
6. Strydom, DAC, et al. "Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review." *Journal of clinical periodontology*. 2012;39(11):1042-1055.
7. Shellis, RP. "A scanning electron-microscopic study of solubility variations in human enamel and dentine." *Archives of oral biology*. 1996;41(5):473-484.
8. Anderson P, Elliott JC. "Subsurface demineralization in dental enamel and other permeable solids during acid dissolution." *Journal of dental research*. 1992;71(8):1473-1481.
9. Atkinson HF, An investigation into the permeability of human enamel using osmotic methods. *Brit. Dent. J.* 1947; 83: 205-14.
10. Haldi J, Winfrey WYNN, Culpepper WD. "Dental pulp fluid—I: Relationship between dental pulp fluid and blood plasma in protein, glucose and inorganic element content." *Archives of Oral Biology*. 1961, 3(3): 201-IN11.
11. Bjørndal, L, Thylstrup A. "A structural analysis of approximal enamel caries lesions and subjacent dentin reactions." *European journal of oral sciences*. 1995;103(1):25-31.
12. Lee, HS, et al. "Long term evaluation of the remineralization of interproximal caries-like lesions adjacent to glass-ionomer restorations: A micro-CT study." *American journal of dentistry*. 2008;21(2):129.
13. Paris, S, Hopfenmuller W, Meyer-Lueckel H. "Resin infiltration of caries lesions: an efficacy randomized trial." *Journal of dental research*. 2010;89(8):823-826.24.
14. Ammari, MM, et al. "Is non-cavitated proximal lesion sealing an effective method for caries control in primary and permanent teeth? A systematic review and meta-analysis." *Journal of dentistry*. 2014;42(10):1217-1227.

15. Ekstrand, KR, Ricketts DNJ, Kidd EAM. "Reproducibility and accuracy of three methods for assessment of demineralization depth on the occlusal surface: an in vitro examination." *Caries research*. 1997;31(3):224-231.
16. Silva, PFI, et al. "Dentin reactions to caries are misinterpreted by histological "gold standards"." *F1000Research* 3 (2014).
17. Applebaum, E. "Tissue changes in caries." *Dent Cosmos*. 1935;77(10):931-941.
18. Gottlieb, B. "The formation of secondary dentin and related problems." *Journal of dental research*. 1946;25(1):29-34.
19. Gottlieb, B., M. Diamond, and E. Applebaum. "The caries problem." *American journal of orthodontics and oral surgery*. 1946;32(6):A365IN1A371-A370A379.
20. Sousa, FB, Silva PF, Chaves AMB. "Stereomicroscopy has low accuracy for detecting the depth of carious lesion in dentine." *European Journal of Oral Sciences*. 2017;125(3):229-231.
21. Akimoto Y, Komiya M, Kaneko K, Fujii A, Tamura, T. "Ampicillin concentrations in human serum, gingiva, mandibular bone, dental follicle, and dental pulp following a single oral administration of bacampicillin". *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1986, 44(2), 107-112.
22. Theuns, HM, et al. "The mineral content of human enamel studied by polarizing microscopy, microradiography and scanning electron microscopy." *Archives of oral biology*. 1983;28(9):797-803.
23. Macena, MSA, et al. "A comparative study on component volumes from outer to inner dental enamel in relation to enamel tufts." *Archives of oral biology*. 2014;59(6):568-577.
24. Elliott, JC, et al. "Determination of mineral concentration in dental enamel from X-ray attenuation measurements." *Connective tissue research*. 1998;38(1-4):61-72.
25. Sousa, FB, Vianna SS, MAGALHÃES NS. "A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel mineral content using polarizing microscopy." *Journal of microscopy*. 2006;221(2):79-83.
26. Medeiros, RCG, Soares JD, Sousa FB. "Natural enamel caries in polarized light microscopy: differences in histopathological features derived from a qualitative

- versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence." *Journal of microscopy*. 2012;246(2):177-189.
27. Sousa, FB, Soares JD, Vianna SS. "Natural enamel caries: a comparative histological study on biochemical volumes." *Caries research*. 2013;47(3):183-192.
 28. Nyvad, B. "Diagnosis versus detection of caries." *Caries research*. 2004;38(3):192-198.
 29. Bjorndal, L., Kidd EAM. "The treatment of deep dentine caries lesions." *Dental update*. 2005;32(7):402-413.
 30. Innes, NPT, et al. "Managing carious lesions: consensus recommendations on terminology." *Advances in dental research*. 2016;28(2):49-57.
 31. Black GV. Operative Dentistry: The pathology of the hard tissues of the teeth. 3. Ed. Londres; 1901.
 32. Gomez J, Tellez M, Pretty IA, Ellwood RP, Ismail AI. Non-cavitated carious lesions detection methods: A systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013;41(1):55–66.
 33. Applebaum E, Hollander F, Bodecker C. Normal and Pathological Variations in Calcification of Teeth as Shown by the Use of Soft X-rays. *Dent Cosmos*. 1933; 75: 1097–1105.
 34. Stanley HR, Pereira JC, Spiegel EH et al. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin, and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *J Oral Pathol*. 1983; 12: 257–289.
 35. Campos, SAG, Vieira MLO, Sousa FB. "Correlation between ICDAS and histology: Differences between stereomicroscopy and microradiography with contrast solution as histological techniques." *PloS one*. 2017;12(8):e0183432
 36. CAMPOS, S.A.G. Correlação entre ICDAS e profundidade de lesão cariiosa: comparação entre estereomicroscopia e radiomicrografia como técnicas de validação. Dissertação de mestrado: Universidade Federal da Paraíba. 2016.
 37. Kidd EAM, Fejerskov O. Dental caries: The disease and its clinical management. London: Wiley-Blackwell; 2008.

38. Bjorndal L. Dentin caries: Progression and clinical management. Buonocore Memorial Lecture. Operative Dentistry, 2002; 27: 211–7.
39. Ratledge DK, Kidd EA, Beighton D. A clinical and microbiological study of approximal carious lesions. Part 1: the relationship between cavitation, radiographic lesion depth, the site-specific gingival index and the level of infection of the dentine. Caries Res. 2001 Jan-Feb;35(1):3-7.
40. Bergman G; Lind PO. A quantitative microradiographic study of incipient enamel caries. J Dent Res. 1966; 45: 1477-1484.
41. Cury, JA, et al. "Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose." *Caries research*. 2000;34(6):491-497.
42. Leme, AFP, et al. "The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight." *Journal of dental research*. 2006;85(10):878-887. 42
43. Koo, H, et al. "Inhibition of Streptococcus mutans biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(5):782-789.
44. Tanzer, JM, Livingston J, Thompson AM. "The microbiology of primary dental caries in humans." *Journal of dental education*. 2001;65(10):1028-1037.
45. Loesche, WJ. "Role of Streptococcus mutans in human dental decay." *Microbiological reviews*. 1986;50(4):353.
46. Featherstone, JDB. "The continuum of dental caries—evidence for a dynamic disease process." *Journal of dental research*. 2004;83(1_suppl):39-42.
47. Cohen J. Statistical power analysis for behavioral sciences, 2^a ed. Nova Iorque: Lawrence Erlbaum; 1988.
48. Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences (Revised Ed.). 1997.
49. Nyvad B, Machiulskiene V, Bælum V. "Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions". *Caries research*. 1999; 33(4): 252-260.
50. Ayres, MCC, et al. "Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de Copernicia prunifera." *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(1):90-7.

51. Dubois, M, et al. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical chemistry*. 1956;28(3):350-356.
52. Ccahuana-Vásquez, Renzo Alberto, and Jaime Aparecido Cury. "S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization." *Brazilian oral research*. 2010;24(2):135-141.
53. Field A. *Discovering Statistics Using SPSS*. London: SAGE; 2009
54. Dean A, Voss D. *Design and Analysis of Experiments*. New York: Springer; 1999).
55. Michael H Kutner, Christopher J. Nachtsheim, John Neter, William Li , *Applied Linear Statistical Models*. MCGRAW HILL: NEW YORK, 2004;
56. Cohen, BH. *Explaining psychological statistics*. JOHN WILEY: NEW YORK, 2013
57. Armstrog RA. "When to use the Bonferroni correction". *Ophthalmic Physiol. Opt.* 2014; 34(5): 502-508. doi:10.1111/opo.12131
58. Fabregas R, Rubinstein J. "On the initial propagation of dental caries." *Journal of The Royal Society Interface*. 2014;11(100):20140809.
59. Kidd EAM, Fejerskov O. "What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms." *Journal of dental research*. 2004;83(1_suppl):35-38.
60. Bjorndal L, Darvann T, Thylstrup A. "A quantitative light microscopic study of the odontoblast and subodontoblastic reactions to active and arrested enamel caries without cavitation." *Caries research*. 1998;32(1):59-69.
61. Rodrigues JA, Hug I, Diniz MB, Lussi A. Performance of fluorescence methods, radiographic examination and ICDAS II on occlusal surfaces in vitro. *Caries Res*. 2008;42(4):297–304.
62. Ekstrand KR, Zerob DT, Martignond S, Pittsc NB. *Lesion Activity Assessment*. In: Pitts N. *A Detection, Assessment, Diagnosis and Monitoring of Caries*. [monografia]; 2009.
63. Hintze H, Wenzel A, Larsen MJ. Stereomicroscopy, film radiography, microradiography and naked eye inspection of tooth sections as validation for occlusal caries diagnosis. *Caries Res*. 1995; 29: 359-363.

64. NEVES, AA. et al. Micro-CT based quantitative evaluation of caries excavation. **Dental materials**, 2010; 26(6):579-588.
65. NEVES, AA. et al. Caries-removal effectiveness and minimal-invasiveness potential of caries-excitation techniques: a micro-CT investigation. *Journal of dentistry*, 2011; 39(2): 154-162.
66. SOVIERO, V. M. et al. Validity of MicroCT for in vitro detection of proximal carious lesions in primary molars. *Journal of dentistry*. 2012; 40(1): 35-40.
67. Simoes Meira KR, de Mattos Brito CS, De Sousa FB, Meira KRS, de Mattos Brito CS, De Sousa FB. Predicting infiltration of the surface layer of natural enamel caries. *Arch Oral Biol*. 2015;60(6):883-893. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.03.001.
68. Vongsavan, N, Matthews B. "Fluid flow through cat dentine in vivo." *Archives of Oral Biology*. 1992;37(3):175-185.
69. Houwink, B. "The limited usefulness of Thoulet's solution in imbibition experiments in dental enamel." *British dental journal*. 1969;126(10):447.
70. Ogawa, K., et al. "The ultrastructure and hardness of the transparent of human carious dentin." *Journal of Dental Research*. 1983;62(1):7-10.
71. Shellis, RP. "Effects of a supersaturated pulpal fluid on the formation of caries-like lesions on the roots of human teeth." *Caries research*. 1994;28(1):14-20.
72. Akimoto, Y., Nishimura, H., Komiya, M., Shibata, T., Kaneko, K., Fujii, A., & Tamura, T. (1984). Ampicillin concentrations in human serum and dental pulp following a single oral administration. *The Journal of Nihon University School of Dentistry*, 26(2), 148-154.
73. Fos, P, Forner, L, Llena, C, Anadon, A. "Analysis of clarithromycin in dental pulp with and without inflammation." *Int Dent SA* 13 (2011): 50-54.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

ANEXO A



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DO BIOFILME SOBRE LESÃO CARIOSA NATURAL DE ESMALTE EM RESPOSTA A LÍQUIDOS PRESENTES NA CÂMARA PULPAR.

Pesquisador: MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 73755417.7.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.263.720

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas, a ser desenvolvida pela aluna Maria Luiza Lima Alves de Lira sob a orientação do Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa.



Continuação do Parecer: 2.253.720

uma vez que, após aprovação da pesquisa o CEP-HULW torna-se co-responsável.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_970089.pdf	17/08/2017 21:26:27		Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCE.pdf	17/08/2017 21:23:06	MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_execucao.pdf	17/08/2017 21:22:48	MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MARIA_LUIZA.pdf	17/08/2017 21:22:26	MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia.pdf	17/08/2017 21:11:58	MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA	Aceito
Outros	Ficha_de_cadastro.pdf	17/08/2017 21:09:53	MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_infraestrutura.pdf	17/08/2017 21:07:54	MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	17/08/2017 20:49:55	MARIA LUIZA LIMA ALVES LIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 07 de Setembro de 2017

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador)

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre **AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DO BIOFILME SOBRE LESÃO CARIOSAS NATURAL DE ESMALTE EM RESPOSTA A LÍQUIDOS PRESENTES NA CÂMARA PULPAR** e está sendo desenvolvida pela mestrandia Maria Luiza Lima Alves Lira, do programa de pós graduação em odontologia da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do(a) Prof(a) Frederico Barbosa de Sousa.

Os objetivos do estudo são avaliar se lesões de macha branca inativas de esmalte (que geralmente a gente não restaura) predispõe o aparecimento de um caminho de maior permeabilidade partindo delas até a parte interna do dente (câmara pulpar), para tanto pretende-se avaliar in vitro se o biofilme dental (placa bacteriana) é afetado por substâncias colocadas na câmara pulpar através de lesões de mancha branca inativas. A finalidade deste trabalho é contribuir para mudança no tipo de tratamento de escolha para esse tipo de lesão.

Solicitamos a sua colaboração através da doação do(s) seu(s) dente(s) que será(ão) extraído(s) por outros motivos, NÃO para fins dessa pesquisa, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto. Informamos que essa pesquisa apresenta baixo risco para você, tendo em vista que o procedimento de extração será realizado de forma padrão.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a colaborar com a doação proposta pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

Considerando, que fui informado(a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento.

João Pessoa, ____ de _____ de _____

Impressão dactiloscópica

Assinatura do participante ou responsável legal

Contato com o Pesquisador(a) Responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o (a) pesquisador (a) Maria Luiza Lima Alves Lira. Telefone: 99981-8357. Ou para o Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley -Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW – 2º andar. Cidade Universitária. Bairro: Castelo Branco – João Pessoa - PB. CEP: 58059-900. E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br Campus I – Fone: 32167964.