

ADRIANA FERNANDES DA SILVA

**“ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA
PULPAR EM DENTES DE RATOS SUBMETIDOS À INDUÇÃO DE
CÁRIE E A DIFERENTES TRATAMENTOS RESTAURADORES”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Biologia Buco-Dental, Área de Concentração em Histologia e Embriologia.

Orientador: Profa. Dra. Silvana P. Barros

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro L. Rosalen

**Piracicaba
2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Si38a Silva, Adriana Fernandes da.
Análise morfológica e imunoistoquímica da resposta pulpar em
dentes de ratos submetidos à indução de cárie e a diferentes
tratamentos restauradores. / Adriana Fernandes da Silva. --
Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores: Silvana Pereira Barros, Pedro Luiz Rosalen.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cáries. 2. Proteínas. I. Barros, Silvana Pereira. II. Rosalen,
Pedro Luiz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Morphologic and immunohistochemistry analyze of the pulp response in
rats teeth submitted to caries induction and to restorative treatments different

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Caries. 2. Proteins

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Pedro Luiz Rosalen, Adriana Etges, Maria Luiza Ozores Polacow,
Pedro Duarte Novaes, Regina Maria Puppim-Rontani

Data da Defesa: 16-08-2007

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 16 de Agosto de 2007, considerou a candidata ADRIANA FERNANDES DA SILVA aprovada,

PROF. DR. PEDRO LUIZ ROSALEN

PROFa. DRa. ADRIANA ETGES

PROFa. DRa. MARIA LUIZA OZORES POLACOW

PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES

PROFa. DRa. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI

A Deus pelo amparo e fé

Aos meus pais pelo apoio incondicional

*Ao meu irmão Leandro (in memoriam) pela
companhia sempre alegre.*

*Ao meu esposo Evandro por todo apoio e
carinho dados em momentos importantes
de minha vida*

*À nossa filha Lívia que foi e está sendo
em nossas vidas uma dádiva de Deus*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A meus dois orientadores: **Profa. Dra. Silvana Pereira Barros** através da confiança depositada em mim pude realizar este trabalho e ao **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**, pela participação fundamental e que sem medir esforços colaborou para que a metodologia pudesse ser desenvolvida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, em especial à Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao Prof. Dr. Mario Alexandre Coelho Sinhoreti, coordenador geral da Pós-Graduação da FOP UNICAMP.

A coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental representada pelo **Prof. Dr. Fausto Berzin**, como também ao ex-coordenador do curso **Prof. Dr. Paulo H. Caria**, expresse minha gratidão pela compreensão sempre tida.

Ao prof. Dr. Luiz André Pimenta, professor da Universidade da Carolina do Norte/USA, pela contribuição e aprimoramento deste trabalho, meu muito obrigada!

Aos **professores** do Programa de Biologia Buco-Dental: área Histologia e Embriologia: **Dr. Sérgio Line, Dra. Darcy Tosello, Dr. Pedro Novaes e Dr. Merzel**; obrigada a todos pelos ensinamentos transmitidos no decorrer do curso.

Aos professores do Programa de Odontologia: área de Concentração Cariologia: **Dra. Cínthia Tabchoury, Dra. Altair Del Bel Cury e Dr. Jaime Cury**, pela oportunidade de conhecer novos horizontes de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: **141608/2004-8**) e à Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: **04/00276-7**) pelo suporte financeiro.

Ao **Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco**, o qual sempre me estimulou para a realização desta etapa de minha vida profissional.

Ao **Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho**, pela convivência sempre alegre e pelo espírito de amizade.

Ao Centro de Diagnóstico das Doenças Bucais da Faculdade de Odontologia de Pelotas, e em especial a **Prof. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio** também professora desta unidade, sem sua ajuda nos momentos necessários com certeza aqui não estaria.

A todos os funcionários do FOP, em especial a **Érica Sinhoreti (secretária da Pós-Graduação)**, **Eliene O. Romani (técnica da microscopia eletrônica)**, **Maria Ap. S. Varella (microscopia óptica)**, **Eliane Franco de Souza (técnica da farmacologia)**, **Joelma Aparecida Macchi (secretaria do Programa de Biologia Buco-Dental)**, gostaria de expressar aqui minha gratidão por vocês terem compartilhado comigo minhas aflições e momentos de grande alegria. Espero neste momento agora poder compartilhar também minha conquista. Muito obrigada!

Aos colegas do curso de pós-graduação: **Maximiliano S. Cenci**, **Tatiana Pereira**, **Alexandre R. do Espírito Santo**, **Cristiane P. B. Saito**, **Daniel Saito**, **Cristiane R. Salmon**, **Daniel P. Vasconcelos**, **Fabio Bianchi**, **Cíntia**

Carvalho, Ana Flávia, Renzo Vasques, Glaucete Almeida, Maria Isabela Campos, José R. Gomes, Isabel Porto, Caroline Aires, Marise Aidar, João Júnior, Juliana dos S. Neves, Sônia Vaz e Nádia F. Omar pela oportunidade de tê-los conhecido, e em especial a **Marcelo Rocha Marques**, ou “**Marcelão**” que sempre foi um grande amigo em todas as ocasiões. Espero poder sempre revê-los nesta curta jornada de nossas vidas e saibam que sempre poderão contar comigo onde quer que esteja.

A todos meus demais familiares, os quais sempre me incentivaram e acreditaram em mim para que até aqui chegasse. **A meu irmão Diego e cunhada Lia** pela atenção dada nos momentos difíceis.

Aos demais amigos que aqui fiz e mesmo não citando seus nomes saibam que sempre estarão em minha lembrança...

“É preciso escolher um caminho que não tenha fim, mas, ainda assim, caminhar sempre na expectativa de encontrá-lo”

Geraldo Magela Amaral

RESUMO

O objetivo deste estudo foi de investigar aspectos morfológicos e imunoistoquímicos do complexo dentina-polpa durante o processo de reparo diante a uma condição de cárie. Para isso, diferentes materiais restauradores foram empregados em diferentes tempos. Sessenta ratos Wistar machos foram utilizados neste estudo (protocolo aprovado pelo comitê de ética - CEEA/625-2). Em 40 animais foi induzida a lesão de cárie durante sete semanas. Os animais, sob anestesia geral, tiveram seus dentes restaurados. A lesão de cárie foi removida apenas nas paredes circundantes, sendo deixado tecido cariado no assoalho pulpar. O primeiro molar inferior esquerdo foi restaurado com cimento de óxido de zinco e eugenol modificado: OZE (IRM[®]) ou com sistema adesivo autocondicionante (Clearfil SE Bond[®]) e Resina Composta (Filtek Supreme[®]) (Adesivo). Outros 20 animais foram usados como o controle negativo, ou seja, nenhuma cárie induzida (CN). O molar inferior direito foi usado como controle positivo (CP) para a progressão da lesão de cárie divididos nos dois tempos analisados. Após 3 ou 15 dias do tratamento os animais foram mortos, suas mandíbulas removidas e fixadas em paraformaldeído a 10%, desmineralizados com EDTA a 4% por 6-7 semanas e emblocados em parafina (n=10). Os blocos foram seccionados e as amostras coradas por HE e analisadas por imunoistoquímica (IMH). As análises foram feitas sob microscopia de luz por dois examinadores calibrados. A análise histomorfológica foi estabelecida por índices considerando degradação de dentina primária/secundária, inflamação e integridade do tecido pulpar. O método estatístico empregado foi o teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). Para IMH foram usados cinco anticorpos: Anti-Colágeno Tipo I e III (COL I e III), Anti-Fibronectina (FNC), Anti-Osteonectina (OSN) e Fator de Crescimento Transformador β -1 (TGF β -1). Quanto à análise morfológica nenhuma diferença entre os materiais avaliados foi observada. Entretanto, foi possível verificar que após 15 dias do tratamento, o grupo CP do Sistema Adesivo apresentou acentuada resposta inflamatória ($p < 0,05$) e degradação de tecido dentinário ($p = 0,02$) maior que o grupo restaurado, sendo que nenhuma diferença foi observada para o grupo OZE em relação ao CP em nenhum dos critérios analisados. Os resultados de IMH demonstraram que todos os grupos com indução da cárie demonstraram maior marcação IMH quando comparados com o CN. Entre os materiais não existiu diferença quanto à intensidade de expressão de COL I e III e OSN, mas existiu diferença entre eles quanto à expressão do FNC aos 15 dias e TGF β -1 aos 3 dias pós-tratamento. De acordo com a metodologia empregada foi possível concluir que a restauração adesiva aplicada indiretamente não desencadeou processo inflamatório agudo no tecido pulpar e nem necrose à polpa, mas contribuiu para a ativação do reparo do tecido, já a restauração de OZE não demonstrou efetividade quanto à diminuição de progressão da lesão.

Palavras-chave: reparo pulpar, cárie, ratos, complexo dentina-polpa, remoção parcial de cárie

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate morphological and immunohistochemistry aspects in the dentin-pulp complex during the process of repair. Different restorative materials were used to restore affected dentin areas at different time points. Methods: Sixty male Wistar rats were used (approved by ethics committee -CEEAA/625-2). Caries lesions were induced in 40 animals during seven weeks. Caries affected dentin was partially removed and restoration performed with ZOE (GI) or Clearfil SE Bond and Filtek Supreme (GII) in the first left lower molar (LM). The right lower molar was used as positive control (PC). The other 20 animals were used as negative control, no caries induced (NC). After 3 and 15 days of treatment the animals were sacrificed, their jaws removed and fixed (10% paraformaldehyde), desmineralized (4%EDTA for 6-7 weeks) and paraffin embedded (n=10). The blocks were sectioned and the material stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and Immunohistochemistry (IMH). Light microscopy analyses were made by two calibrated examiners. For HE method the scores were taken based on following criteria: dentin degradation, tissue inflammation, pulp tissue integrity. Statistical analysis (Mann-Whitney test) were applied to compare treatments. For IMH were used five antibodies: anti-I Collagen (I COL), anti-III Collagen (III COL), anti-Fibronectin (FNC), anti-Osteonectin (OSN), and anti-Transforming Grow Factor β -1 (TGF β -1). Results: No statistical significant difference between materials was observed. However, it was possible to verify that 15 days after treatment the GII positive control group presented statistically higher scores of inflammatory response ($p < 0.05$) and degradation of dentine ($p = 0.02$); however, no statistical significant differences were observed for GI in relation to the positive control in none of the analyzed criteria. The IMH results demonstrated that all the groups with induction of caries was more accentuated the expression than negative control and it there is not different in intensity of expression I COL, III COL and OSN in relation to material used, but there are different between them in relation to the expression of FNC to the 15 days and TGF β -1 to the 3 days post-treatment. Inside of the limits this study was possible conclude that the IRM restoration did not diminish the progression of the lesion; while Adhesive restoration applied indirectly on pulp not unchains neither acute inflammatory process nor neither necrosis to pulp, but contributed for the activation of the tissue repair.

Key words: pulp repair, caries, rats, dentin-pulp complex, caries partial removal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 O complexo dentina-polpa.....	3
2.2 A matriz extracelular e seu papel no reparo do complexo dentino-pulpar.....	4
2.3 Colágeno Tipo I e III.....	09
2.4 Fibronectina	10
2.5 Osteonectina.....	11
2.6 Transforming Growth Factor β 1.....	12
2.7 A doença cárie e as diferentes possibilidades de remoção parcial de cárie em dentina profunda.....	13
3 PROPOSIÇÃO.....	16
4.MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Modelo experimental.....	17
4.2 Processamento da amostra para análise imunoistoquímica e morfológica.....	24
4.3 Métodos de análise dos resultados.....	27
5 RESULTADOS	
5.1 Análise Morfológica pelo Método de Hematoxilina-Eosina.....	29
5.2 Marcação Imunoistoquímica.....	34
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO 1.....	62
ANEXO 2.....	63
ANEXO 3.....	64
ANEXO 4.....	65

1 INTRODUÇÃO

Nos últimas décadas, no campo da cariologia tem-se alcançado um grande avanço no conhecimento da etiopatogenia da doença cárie, embora ainda existam poucas informações sobre o processo de reparo dentino-pulpar frente a uma situação de injúria provocada por cárie (Ricketts, 2001; Lee *et al.*, 2006). Assim, apesar de conhecerem-se os possíveis mecanismos envolvidos nesta resposta, pouco ainda se sabe sobre a seqüência e intensidade deles na presença de inflamação.

Diante disso, a dentística operatória tem mudado sua filosofia de tratamento cirúrgico-restaurador a uma dentística de mínima intervenção (Tyas *et al.*, 2000). Com esta nova forma de abordagem, muitas terapias têm surgido por meio de protocolos mais conservadores, os quais visam, na medida do possível, a mínima remoção de estrutura dentária ou mesmo a perda de vitalidade dentária.

Dessa forma, para evitar a exposição do tecido pulpar e minimizar as agressões possibilitando assim o reparo do complexo dentina-polpa têm sido empregados procedimentos cirúrgicos restauradores que removem parcialmente o tecido cariado. Esses tratamentos, conhecidos como ultraconservadores (Ricketts *et al.*, 2006), permitem a permanência da dentina afetada por cárie (desmineralizada, porém não infectada) no assoalho pulpar/parede de fundo e inserção de material “bioestimulador” sobre esta região possibilitando resposta inflamatória moderada estimulando a formação de tecido mineralizado neoformado pela deposição de dentina peritubular ou de dentina reacional (Goldberg & Smith, 2004).

Paralelamente, diferentes materiais vêm sendo usados para tratamentos restauradores conservadores, e até então na literatura poucas avaliações clínicas existem sobre o desempenho desses materiais (Weerheijm *et al.*, 1992; Bjorndal *et al.*, 1997; Mertz-Fairhurst *et al.*, 1998; Maltz *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006; Akimoto *et al.*, 2007), ou seja, pouco tem sido discutido sobre

a influência de cada material, uma vez que eles apresentam propriedades químicas diversas.

Sabe-se que a matriz extracelular participa diretamente nos processos de resposta inflamatória, de migração e proliferação celular, como também da atividade secretora (Alberts, 2002). Entretanto, existem poucas informações sobre a expressão, localização e relação desses componentes da matriz extracelular relacionadas com os eventos de reparo pulpar e dentinogênese estimulados por diferentes materiais restauradores.

Como a cinética do equilíbrio entre células e seu ambiente pode ser modificada pela presença de materiais, moléculas e íons da matriz extracelular (Kardos *et al.*, 1998) o objetivo deste estudo foi de avaliar os eventos de reparo pulpar diante de situação provocada por lesão de cárie em modelo animal utilizando diferentes materiais restauradores (óxido de zinco e eugenol modificado e sistema adesivo autocondicionante/compósito)

A hipótese deste trabalho é a de que a expressão, localização e relação dos componentes da matriz extracelular estudados (colágeno tipo I/III, fibronectina, osteonectina e fator de crescimento transformador β -1) podem estar relacionadas com os eventos de reparo dentino-pulpar e, ainda sendo modulados por diferentes materiais restauradores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O complexo dentina-polpa

A polpa dental possui populações de células diversificadas, incluindo odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, células perivasculares, células nervosas, células endoteliais, macrófagos, linfócitos, mastócitos, dentre outras. Estas células estão localizadas na matriz extracelular onde existem também glicoproteínas, como colágeno tipo I e III, fibronectina, tenascina e ainda glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fosfolipídeos e água (Goldberg & Lasfargues, 1995).

Os odontoblastos são células pós-mitóticas altamente diferenciadas responsáveis pela síntese e secreção de matriz dentinária e seus núcleos estão localizados na porção mais externa da polpa, sendo este local denominado de camada odontoblástica. Logo abaixo desta camada encontra-se a região subodontoblástica. Nesta região duas zonas existem, ou seja, a zona pobre em células ou zona de “Weill”, e subsequente a esta, a zona rica em células. Esta última apresenta como principal característica a presença de células indiferenciadas. Logo depois temos a região central pulpar. Neste local observa-se grande número de vasos e nervos (Katchburian & Arana, 2004).

A dentinogênese apresenta três fenômenos distintos. O primeiro conhecido como dentina primária é aquele onde a formação de dentina acontece antes da erupção do dente, sendo que esta dentina compreende a dentina do manto e a dentina circumpulpar (Katchburian & Arana, 2004). O segundo tipo de dentina denominado de dentina secundária ocorre por toda a vida do dente após a completa formação da raiz, de forma a compreender uma estreita faixa de dentina em torno do tecido pulpar (Ten Cate, 2001) que com o passar do tempo tende a diminuir o volume da câmara pulpar. Por fim, o terceiro tipo de dentina é denominado de dentina terciária. Sua ocorrência se faz em situações de injúria e compreende locais específicos, podendo manifestar-se por dois tipos

denominados de dentina reacional ou reparativa. Quando estímulos leves ou moderados fazem com que os odontoblastos aumentem a síntese de matriz esta dentina é denominada de dentina reacional (Smith, 2002). Entretanto, quando o agente agressor seja ele químico, mecânico ou bacteriano for intenso pode causar a morte dos odontoblastos e fazer com que surjam células chamadas de odontoblastóides, as quais apresentam fenótipo semelhante aos odontoblastos. Sendo assim, estas células acabam por produzir dentina denominada de reparativa (Smith *et al.*, 2001; Smith, 2002). Esta, muitas vezes, acaba por apresentar em seu interior inclusões celulares devido a síntese exacerbada da matriz (Mjor *et al.*, 1991).

A inflamação que ocorre no tecido pulpar é desencadeada pelos mesmos constituintes inflamatórios de qualquer outro tecido do corpo humano, entretanto, devido à particularidade de estar contida em paredes rígidas muitas vezes o desfecho se faz diferente. Desta forma, o processo de reparo está ligado a diversos fatores, em especial ao grau de inflamação existente.

Qualquer estímulo irritante é capaz de promover alterações no complexo dentino-pulpar, as quais começam desde alterações nos próprios odontoblastos (Goldberg & Lasfargues, 1995), assim o grau de inflamação será proporcional à intensidade do estímulo, sendo que injúrias leves podem causar pouca ou nenhuma inflamação, entretanto estímulos mais intensos geralmente causam alterações mais severas podendo levar até a necrose, se persistentes (de Lourdes Rodrigues Accorinte *et al.*, 2006).

2.2 A matriz extracelular e seu papel no reparo do complexo dentino-pulpar

Atualmente, sabe-se que os componentes da matriz extracelular (ME) desempenham e realizam funções complexas, os quais podem influenciar o desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função, com possível papel na atividade mitótica e secretória. Em suma, a ME interliga as células com o meio,

transmitindo até elas as forças externas e desempenhando importante papel na regulação das repostas celulares a esses estímulos.

As células mantêm contatos entre si por meio de junções celulares, mas também se relacionam por intermédio de uma complexa rede de proteínas e carboidratos secretados que preenchem os espaços intercelulares, constituindo a ME. Na polpa dental o tipo de tecido conjuntivo é o frouxo, enquanto que na dentina este tecido conjuntivo é altamente mineralizado. Esta ME representa uma complexa rede de macromoléculas composta por várias proteínas versáteis e polissacarídeos, que são secretados localmente e montados em uma organizada rede associada à superfície da célula. Esse complexo dinâmico é constituído por moléculas estruturais caracterizadas principalmente por proteínas colagênicas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, complexos de polissacarídeos, ácido hialurônico e íons diversos em variadas proporções, sendo que estas variações revelam seu grau de especialização.

Os componentes da ME participam na manutenção do arcabouço tecidual, influenciando também a dinâmica de adesão celular e, dessa forma, os processos de mobilidade das células, principalmente nos primeiros estágios de diferenciação celular. A ME também possui importante papel na manutenção e regulação da homeostase celular e tecidual. As fibras colágenas e polímeros solúveis funcionam como uma reserva de citocinas, como o Fator de Crescimento Transformador β e Proteína Morfogenética Osséa. As citocinas, por sua vez, consistem em um grupo de proteínas glicosiladas, estão envolvidas na sinalização celular, e sua liberação está diretamente relacionada com o processo de reparo (Alberts, 2002).

Entre os componentes da matriz extracelular, a fibronectina (FNC) e a tenascina (TNC) destacam-se como as duas maiores glicoproteínas. Essas glicoproteínas com conhecidas propriedades adesivas têm importância reconhecida nos processos cicatriciais (Chiquet-Ehrismann, 1990) e na odontogênese (Thesleff *et al.*, 1987). A FNC e a TNC fazem parte das proteínas

não-colagênicas e constituem 10% da matriz, enquanto as fibrilares como o colágeno tipo I domina o restante da matriz (Linde, 1989).

Hillmann & Geurtsen (1997) verificaram a distribuição de moléculas da ME, especialmente colágeno tipo I, III, IV, V e VI, na polpa dental de várias idades, utilizando microscopia de luz polarizada, imunofluorescência indireta e microscopia confocal. Os autores verificaram a presença de espessos feixes de fibras do colágeno tipo I, o qual é o maior componente da matriz do tecido conjuntivo pulpar. Delgadas fibras e feixes de colágeno III foram os elementos fibrilares mais presentes. O colágeno IV foi detectado na membrana basal dos vasos sanguíneos, em todas as idades examinadas. Colágenos do tipo V e VI formaram um denso aglomerado de delgadas microfibrilas através do estroma do tecido conjuntivo da polpa dental. Essas fibras estavam localizadas ao redor dos vasos sanguíneos e pareciam ser numerosas na camada sub-odontoblástica. Com o envelhecimento, a matriz conjuntiva parece condensar-se e agregar-se em feixes espessos de fibras. Além disso, foi observada a participação de vários tipos de colágeno nos processos de calcificações pulpares.

A grande maioria das informações a respeito dos eventos de reparo pulpar fundamenta-se em experimentos baseados na odontogênese. Durante esta fase células ectomesenquimais da papila dental, derivadas da crista neural, migram em direção à área de junção entre o epitélio interno do órgão do esmalte e a papila dental. Acontece um acúmulo gradual sob a membrana basal do epitélio do esmalte. As células tornam-se colunares, até se transformarem em odontoblastos e alinharem-se em uma única camada para realizar a formação da dentina. O curso desses eventos é regulado temporo-espacialmente por interações epitélio-mesenquimais (Thesleff *et al.*, 1995).

Além da participação dos componentes da matriz durante a odontogênese, também há o envolvimento desses durante a resposta de reparo pulpar frente a diferentes injúrias e estímulos locais. Os componentes da matriz dentinária também podem estimular a atividade odontoblástica através do estímulo à formação da dentina reacional (Smith *et al.*, 1994).

Seux *et al.* (1991) estudaram *in vitro* o efeito das partículas formadas a partir do cimento de hidróxido de cálcio na diferenciação das células pulpare humanas. Após quatro semanas em cultura, as células demonstraram vários mecanismos de diferenciação, como polarização nuclear, aspecto típico do aparelho de golgi, síntese do colágeno tipo I com ausência do tipo III, e acumulação apical de actina e vimentina. O estudo demonstrou ainda a capacidade de aderência da FNC em torno dos microcristais de calcita (carbonato de cálcio), produto da reação do hidróxido de cálcio com o dióxido de carbono. Essa adesão é considerada como o passo inicial da barreira de tecido mineralizado.

Tziafas *et al.* (1995b) estudaram o papel da FNC no processo da dentinogênese pós-desenvolvimento. Nesse estudo, os autores implantaram cimento de hidróxido de cálcio no parênquima pulpar, para avaliar a interação material-célula. Os autores concluíram que a resposta para a indução inespecífica do hidróxido de cálcio parece ser mediada por uma progressiva síntese de FNC pelas células pulpare. Essa interação adesiva, entre FNC e cimento de hidróxido de cálcio é que permite a ligação e a expressão do fenótipo de diferenciação das células, polarização e síntese de um modelo de pré-dentina que irá ser calcificada e formará a barreira dentinária.

Tziafas *et al.* (1995a) estudaram o efeito de componentes da matriz extracelular, através de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, após sua implantação em sítios centrais de exposições pulpare, mecanicamente induzidas em molares de cães. Os autores verificaram que após 8 dias, havia a presença de células colunares polarizadas próximas aos filtros cobertos com os componentes da matriz extracelular. Após 24 dias de implantação, secreção de matriz tubular pôde ser detectada em associação com células semelhantes a odontoblastos. Esse estudo demonstrou que a resposta ao capeamento com fatores indutivos específicos, ou seja, componentes da matriz dentinária desmineralizada, é iniciada pela formação de uma superfície contendo FNC. A adesão das células pulpare e a síntese de matriz rica em FNC são

características do desenvolvimento de nova dentina. Já a resposta a fatores inespecíficos, como o hidróxido de cálcio, é mediada pelo progressivo aumento da síntese de FNC nas células pulpares.

Yoshida *et al.* (1996) ao avaliar dentes humanos submetidos ao capeamento com hidróxido de cálcio observaram a imuno-localização da FNC durante o processo de reparo pulpar. Um dia após o capeamento, precipitações de estruturas cristalinas foram observadas em associação com “debris” celulares entre a zona de necrose superficial e a polpa subjacente. A zona de calcificação distrófica mostrou marcação positiva para a FNC e as células pulpares apareceram estritamente associadas com essa camada, após 7 e 10 dias. Aos 14 dias, células odontoblasto-símbles (odontoblastóides) foram visualizadas em área adjacente à matriz positiva para FNC, havendo a presença de fibras fluorescentes entre essas células. Aos 28 dias, a matriz irregular foi seguida pela formação de dentina tubular em contato com células semelhantes aos odontoblastos. De acordo com os autores, a FNC associada à camada de calcificação inicial, parece ter um papel importante como mediador na diferenciação de células pulpares em odontoblastos, durante o processo de dentinogênese após o capeamento da polpa com HC. Também, a matriz rica em FNC pode servir como um reservatório de fatores de crescimento ou como um substrato para a migração e adesão celular.

Com base nas evidências citadas, pode-se observar que na literatura existem poucos estudos que analisam o papel da ME no processo de reparo do complexo dentino-pulpar, especialmente em casos antecidos por lesão cariosa, sendo a maioria reparo em situações de exposição direta do tecido pulpar hígido. Um dos poucos trabalhos que analisou dentes acometidos por lesão de cárie foi o de Martinez *et al.* (2000). Os autores evidenciaram que em condições de exsudato inflamatório moléculas de TNC, FNC e COL tipo III não foram evidenciados. Em outro estudo, Farges *et al.* (1995) observaram a localização imunoistoquímica da FNC na camada odontoblástica sob lesões cariosas iniciais em humanos. Os autores verificaram que a FNC era detectada na dentina subjacente à lesão

cariosa, principalmente nas paredes dos túbulos. Tal localização não era observada em áreas de dentina sadia. Os autores concluíram que a FNC presente na dentina humana cariada poderia modular o comportamento da camada odontoblástica, por meio da expressão de uma proteína de 165 kD.

Os fatores de crescimento podem ser liberados da matriz de dentina durante o reparo, nos procedimentos restauradores e na presença de erosão ou desmineralização por cárie (Cassidy *et al.*, 1997; Roberts-Clark & Smith, 2000). Eles ainda são responsáveis pela regulação do comportamento celular. No reparo pulpar o fenômeno é complexo, pois muitos fatores estão envolvidos tais como, os fatores de crescimento transformadores betas, proteínas morfogenéticas ósseas, fator de crescimento “insulina-like” (IGFs), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF). Estes fatores têm demonstrado induzir a diferenciação dos odontoblastos e a formação de dentina reparativa em cultura de células pulpares e em experimentos com animais. Entretanto, a base celular para o reparo do complexo dentina-polpa ainda não está compreendida (Tziafas *et al.*, 2000).

2.3 Colágeno Tipo I e III

As proteínas colágenas fazem parte de uma família protéica do tipo fibrosa, sendo encontradas em todos os animais multicelulares constituindo 25% da massa protéica total dos mamíferos (Alberts, 2002). Existem cinco tipos de colágenos bem característicos: tipo I, II, III, IV e V. Os do Tipo I, II e III, os quais são chamados de colágenos intersticiais uma vez que formam estruturas fibrilares no espaço intercelular (Linde, 1985). Na dentina, o colágeno tipo I representa 98% da matriz orgânica secretada pelos odontoblastos, estando também presente em proporção menor o colágeno tipo III e V (Goldberg & Smith, 2004). O colágeno tipo IV é o constituinte das membranas basais (Yurchenco & Ruben, 1987). Os restantes 10% são constituintes protéicos não colagênicos (Goldberg & Smith, 2004). Na polpa dental, o colágeno tipo I representa 56%, tipo III 41% (Goldberg & Smith, 2004). O colágeno tipo I parece estar envolvido com a estrutura, enquanto

que o III com a característica elástica do tecido (Bronckers *et al.*, 1989). Segundo autores as proteínas colagênicas nos tecidos mineralizados estariam ligadas ao processo inicial de mineralização, de maneira a servir como guia para a mineralização em seu longo eixo.

2.4 Fibronectina

FNC é uma glicoproteína da matriz, com atividade multifuncional, associada à regulação de adesão celular, migração e diferenciação durante o desenvolvimento e reparo. É classificada como um dímero de 450 kD (KiloDaltons), composto por duas extensas subunidades, cada uma com peso molecular de 225 kD, ligadas por um par de pontes dissulfídicas através de seus terminais carboxilícos (Mohri, 1996).

A FNC possui múltiplos isomorfos, sendo reconhecidos 20 subtipos em humanos. A forma solúvel está presente no plasma, cuja maior fonte parece ser os hepatócitos, entretanto células endoteliais e macrófagos podem também contribuir para a sua produção. As outras formas são todas insolúveis e filamentosas, encontram-se presentes nos tecidos e são sintetizadas principalmente por fibroblastos e células endoteliais (Mohri, 1996).

A FNC tem papel importante na cicatrização de feridas (Willems *et al.*, 1996) inicialmente facilitando a agregação plaquetária através de sua deposição no colágeno e/ou fibrina. Também atua na neovascularização, pela estimulação da migração de células endoteliais, servindo como guia para o movimento das células epiteliais através do tecido de granulação e auxiliando no reconhecimento da MB subjacente, de tal forma que a ceratinização normal possa ocorrer (Grinnell, 1984).

Lesot *et al.* (1992) demonstraram o papel da proteína de ligação de 165-kDa da molécula de FNC, no controle através da membrana, da polarização odontoblástica e subsequente diferenciação celular. Essa proteína, localizada na superfície dos odontoblastos, media a interação transmembrana com a FNC e vinculina no controle da diferenciação odontoblástica. De acordo com as outras

evidências, as integrinas RGD (tripetide arginine-glycine-aspartic acid) – dependentes, não estiveram envolvidas na diferenciação dos odontoblastos. As integrinas são uma grande família de proteínas de ligação transmembrana homóloga que conectam a ME com o citoesqueleto celular. A sequência RGD para as proteínas adesivas da matriz, como a FNC são distinguidas pelo menos, por um membro das integrinas, sendo que estas proteínas e seus receptores constituem um sistema de reconhecimento avançado que proporciona ancoragem celular, tração para migração e sinalização para a polarização, posicionamento, diferenciação e possivelmente crescimento celular (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987).

Farges *et al.* (1995) investigaram o papel da FNC no reparo do tecido pulpar, comparando a distribuição de FNC com a sua proteína de ligação à membrana (molécula de 165 kDa, sediada na membrana citoplasmática) em odontoblastos adjacentes à região de esmalte sadio e cariado. Eles encontraram uma expressão de FNC na dentina adjacente à lesão cariosa, principalmente na superfície das paredes dos túbulos, embora a mesma FNC não tenha sido detectada em zonas sadias circundantes. A expressão do epítipo receptor esteve presente na membrana dos odontoblastos sob a lesão, embora o esmalte circundante também tenha expressado esse antígeno. Baseados nesses resultados, os autores sugeriram que a FNC presente na dentina humana cariada pode modular as características dos odontoblastos adjacentes, por intermédio da ação da proteína de adesão à FNC (165 kDa) expressada.

2.5 Osteonectina

A osteonectina é uma glicoproteína fosfatada não colagênica de 43 kDa e é sintetizada pelos osteoblastos e outras células (Liao *et al.*, 1998). Ela representa de 2 a 3% do total da quantidade de proteína no osso em desenvolvimento, tendo também sido detectada no dente humano (Fisher & Termine, 1985). A osteonectina mostra forte afinidade ao cálcio e a hidroxiapatita, provavelmente porque se liga ao colágeno. Sua principal função é manter a

estrutura óssea através da estabilização das moléculas de hidroxiapatita e a organização das fibrilas colágenas (Fisher & Termine, 1985), ou seja, ela está associada ao desenvolvimento, remodelamento, “turnover” celular e reparo (Yan & Sage, 1999). No germe dentário, a osteonectina tem sido encontrada na papila dentária, no órgão do esmalte e na matriz extracelular do órgão, com exceção do esmalte (Bronckers *et al.*, 1989). A expressão de osteonectina é limitada em tecidos adultos, sendo que na polpa dentária está restrita a camada odontoblástica e pouco se sabe sobre sua função neste tecido (Takano-Yamamoto *et al.*, 1994), bem com em condições de reparo do complexo dentina-polpa.

2.6 Fator de Crescimento Transformador beta 1 (TGF- β 1)

O TGF- β tem sido sugerido como o fator central para a regulação da resposta pulpar à cárie (Magloire *et al.*, 1992). Assim, alguns tratamentos conservadores têm sido realizados com o próprio fator de crescimento colocado diretamente sobre a polpa de animais e tem indicado sucesso, tanto em ratos (Hu *et al.*, 1998) como em cães (Tziafas *et al.*, 1998). Esses resultados implicam como sendo este um material com grande potencial clínico e tem sido sugerido seu uso nas terapias biológicas vitais (Tziafas *et al.*, 2001).

A expressão de TGF- β por odontoblastos, depois da diferenciação, geralmente leva ao seqüestro de reservas dessas moléculas na dentina. Quando esses fatores de crescimento são liberados, como no caso de uma desmineralização da dentina, tornam-se disponíveis para participar na mediação do reparo pulpar (Smith *et al.*, 1998). Com o objetivo de avaliar os efeitos regulatórios de TGF- β 1 na matriz dentinária e melhor entender o controle da atividade biológica, Smith *et al.* (1998) investigaram sua expressão, e encontraram apenas metade da quantidade de TGF- β na forma ativa. Os autores concluíram também que há uma associação de TGF- β 1 com peptídeo de associação à latência, betaglicano e decorina. Especula-se que essa interação regula a atividade biológica de TGF- β uma vez que os odontoblastos possuem receptores

TGF- β , tipo I e II. Os autores propuseram, portanto, que o estado de ativação e a natureza da associação entre as moléculas na ME podem controlar a atividade biológica celular, possuindo desse modo a habilidade de influenciar processos reparativos pulpare.

2.7 A doença cárie e as diferentes possibilidades de remoção parcial em dentina profunda.

A doença cárie pode, atualmente, ser tratada de diversas maneiras, as quais reduzem o dano causado ao elemento dentário, limitando também suas seqüelas. No entanto, é necessário lembrar que a cárie além de ser infecto-contagiosa é também de origem multifatorial e sua simples remoção do tecido acometido e selamento da cavidade não é o tratamento definitivo absoluto e isolado, tendo em vista que existem outros fatores determinantes e predisponentes ao início do processo carioso (Elderton & Nuttall, 1983).

O melhor esclarecimento da etiopatogenia e desenvolvimento da doença indicam a possibilidade de paralisação em qualquer estágio de progressão da lesão pela reestruturação do equilíbrio no processo DES-RE (desmineralização e remineralização) (Moreno Gonzalez *et al.*, 1983; Schroder, 1986). Essa evidência superou definitivamente a preconização de “Black” (1908), ou seja, a extensão para a prevenção, a qual perdurou por muito tempo norteando o preparo cavitário realizado com o enfoque cirúrgico-restaurador.

Assim, os recentes avanços no conhecimento da histopatogenia da cárie combinados com o desenvolvimento de novos materiais adesivos têm criado novas alternativas para o tratamento da dentina cariada (Fusayama, 1997) e baseado em uma filosofia de dentística de mínima intervenção (Tyas *et al.*, 2000), muitas pesquisas têm sido feitas para investigar as vantagens e desvantagens dos tratamentos ultraconservativos para remoção parcial de tecido cariado.

Três modalidades de tratamentos ultraconservadores têm sido citadas pela literatura (Kidd, 2004; Ricketts *et al.*, 2006). Todos os tratamentos trazem como principal vantagem a diminuição das chances de exposição pulpar, a qual

pode tornar o tratamento mais complicado devido aos baixos índices de sucesso do capeamento pulpar direto a longo prazo (Barthel *et al.*, 2000). A primeira modalidade a ser citada é aquela onde se insere o material restaurador diretamente dentro da cavidade dentária e nenhum tecido cariado da dentina é removido. Nesta modalidade de tratamento o material é aplicado sobre o tecido cariado amolecido (dentina infectada), sendo que somente remove-se cárie do esmalte, sendo que a maioria dos estudos aplica selante sobre o dente restaurado (Handelman *et al.*, 1981; Mertz-Fairhurst *et al.*, 1986; Weerheijm *et al.*, 1992). A segunda modalidade a ser citada é quando se remove a maior quantidade possível de dentina cariada, e imediatamente, após coloca-se um material restaurador provisório e após algumas semanas do tratamento este material é removido e todo o remanescente cariado amolecido ainda existente é removido e então se restaura “definitivamente” o dente. A maioria das pesquisas denomina esta modalidade de “stepwise excavation” ou tratamento expectante (Bjorndal *et al.*, 1997; Maltz *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006). Esta técnica antiga (King *et al.*, 1965) tem agora reaparecido com grande atenção, especialmente, porque tem demonstrado elevados índices de sucesso (Bjorndal *et al.*, 1997; Bjorndal & Thylstrup, 1998; Bjorndal & Larsen, 2000). A terceira técnica ultraconservadora é aquela em que se remove a maior parte do tecido cariado iminentemente à exposição e não remove a restauração posteriormente para averiguar clinicamente as condições do local, como é o caso da segunda modalidade. Então, nesta situação deixa-se a dentina cariada remanescente sob a restauração (Leksell *et al.*, 1996; Mertz-Fairhurst *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999; Maltz *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006). A principal vantagem desta última em relação ao tratamento expectante seria a não necessidade de retorno do paciente ao consultório e em relação à primeira técnica descrita diminuir-se-ia os riscos de falha da restauração devido à adesão ser apenas em esmalte.

Em relação às terapias citadas acima, é muito importante lembrar que o processo cárie é condicionado à atividade do biofilme. Assim, o processo deve ser paralisado simplesmente pelo selamento da cavidade, então a persistência de

poucos microrganismos pode ser irrelevante, especialmente porque no selamento não existe substratos viáveis, os quais são necessários para a progressão da lesão (Keyes, 1969).

Em relação aos materiais empregados observa-se que não existe um consenso quanto ao material “ideal” a ser empregado em dentina cariada profunda. Alguns autores indicam o uso de sistemas adesivos em cavidades profundas, outros contra-indicam e, apesar desses tratamentos não demonstrarem conseqüências adversas, muitas dúvidas ainda existem, especialmente pela dificuldade de obter um modelo padronizado de cárie onde se possa controlar ao máximo as variáveis, as quais são muitas em se tratando de resposta biológica de indivíduo para indivíduo. Além disso, nenhum estudo clínico demonstrou o que acontece biologicamente no processo inicial de reparo dentino-pulpar.

Portanto, estudos clínicos controlados são necessários devido à importância no conhecimento morfológico de quais eventos se estabelecem depois de restaurado o dente com diferentes materiais, em situações onde se removeu parcialmente a lesão cariada.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem por objetivo avaliar a resposta do complexo dentina-polpa frente à indução da lesão de cárie e posterior tratamento com dois diferentes materiais restauradores: óxido de zinco e eugenol modificado e sistema adesivo autocondicionante/compósito, utilizando-se de análise morfológica e imunoistoquímica para a expressão de colágeno tipo I (COL I), colágeno tipo III (COL III), fibronectina (FNC), osteonectina (OSN) e fator de crescimento transformador beta 1 (TGF β -1).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo experimental

A amostra foi constituída por sessenta ratos machos Wistar (Hannover, Germany) SPF (*specific free pathogenic*), provenientes do CEMIB/UNICAMP¹ aos 19 dias de idade e recém desmamados. Vinte animais foram incluídos no grupo controle negativo (CN): sem indução de cárie. Lesões de cárie foram induzidas em 40 animais a partir do 20º dia de idade (figura 1). Este protocolo de estudo foi previamente aprovado pelo Comitê em Experimentação Animal (UNICAMP/Campinas, SP, Brasil), sob nº 625-2 (em anexo 1).



Figura 1 – Modelo Experimental: após 3 ou 15 dias da realização do tratamento restaurador os animais foram mortos, obtendo n=10. No grupo CN não foi realizada nenhuma abordagem cirúrgica e nem tratamento restaurador. As restaurações foram realizadas somente nos primeiros molares inferiores esquerdos e os controles positivos do OZE e ADESIVO foram os primeiros molares inferiores direito do mesmo animal (modelo *split-mouth*), sendo que nestes não foi realizado tratamento restaurador e as cavidades mantiveram-se abertas.

Para a infecção dos microrganismos nos animais foram reativadas cepas de *Streptococcus sobrinus* 6715. Durante esta fase, houve a seleção dos

microrganismos mais virulentos. Esta foi obtida mediante passagem das bactérias de um caldo de BHI (*brain heart infusion*) para outro por meio de um dispositivo de vidro em forma de bengala denominado de “rod” (figura 2A, B). Este dispositivo possibilitou a seleção dos microrganismos com maior capacidade de aderência à superfície do vidro. A transferência do “rod” de um tubo de ensaio a outro contendo as bactérias aderidas a ele foi realizada uma vez ao dia por 3 dias, permanecendo incubado a 37°C numa atmosfera parcial de 10% de CO₂. No quarto dia as bactérias foram raspadas do “rod” e colocadas diretamente no meio de BHI, e então estimulados ao crescimento para a infecção propriamente dita nos animais.

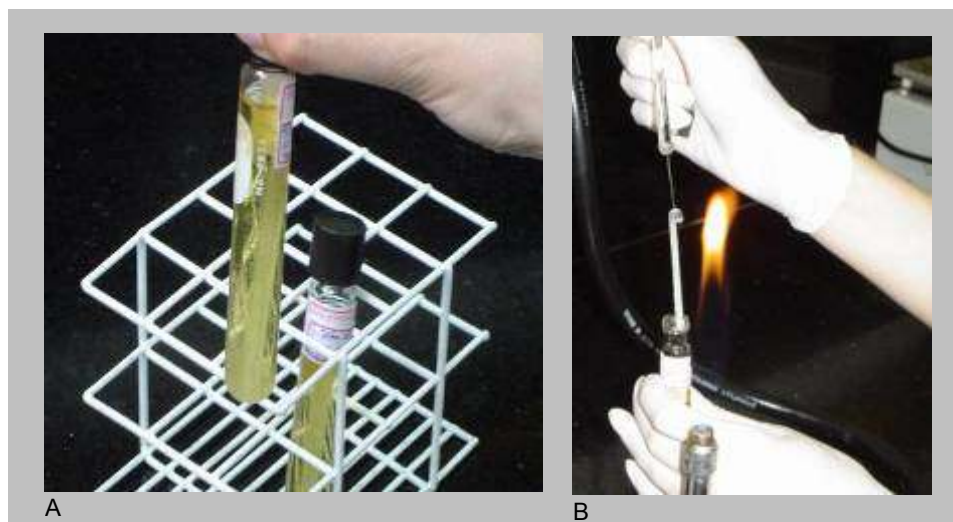


Figura 2 – (A) Bactérias aderidas ao “rod” dentro do tubo de ensaio contendo caldo de BHI . (B) Momento da transferência do “rod” de um tubo a outro de BHI.

Os 40 ratos foram infectados durante cinco dias consecutivos (uma vez/dia) com a cultura ativa de *Streptococcus sobrinus* 6715 em caldo BHI (*brain heart infusion*), em fase exponencial de crescimento, para estabelecimento da microbiota e indução das lesões (figura 3A). A suspensão bacteriana foi aplicada

¹ CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica; UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

com auxílio de um cotonete na cavidade bucal dos animais, especialmente sobre a superfície oclusal, em fase de erupção (figura 3B).



Figura 3- (A) Cultura em fase exponencial de crescimento para posterior infecção. (B) Rato ao 20º dia de idade sendo infectado com a suspensão de microrganismos com auxílio de um cotonete.

Após este período, ou seja, aos 25 dias de idade, uma avaliação foi realizada para verificar a homogeneidade da infecção na cavidade bucal dos animais, por meio de semeadura de esfregaço (com cotonete) bucal em meio MSS (*Mitis Salivarius Streptomycine*) (figura 4), o qual foi incubado por 48h, a 37°C, em 10% CO₂.



Figura 4 - Semeadura de esfregaço bucal em meio MSS (*MitisSalivarius Streptomycine*) confirmando a superpopulação de bactérias.

No 27º dia de idade, os 40 animais infectados foram igualmente divididos em dois grupos (tabela 1 e 2, figura 1):

Grupo OZE (n=10): Óxido de zinco e eugenol modificado- IRM® (Dentsply; Petrópolis, RJ, BR) (figura 5A)

Grupo Adesivo (n=10): Sistema adesivo autocondicionante - Clearfil SE Bond® (Kuraray; Osaka, JP) e compósito - Filtek Supreme® (3M ESPE; Sant Paul, MN, USA) (figura 5B).

A completa informação sobre os materiais encontra-se na tabela 2.

Tabela 1 – Modelo Experimental demonstrando os grupos utilizados, dias de análise pós-tratamento, número de dentes empregados, bem como qual deles foi empregado, quais grupos receberam a indução e quais receberam tratamento restaurador

Grupo	Dias pós-tratamento	Nº dentes/subgrupo	Dente analisado	Indução de cárie	Remoção de tecido cariado	Restauração dentária
CN ¹	3 ou 15	10	1º ME*	Não	Inexistente	Nenhuma
CP ²	3 ou 15	10	1º MD**	Sim	RIDC***	Nenhuma
OZE ³	3 ou 15	10	1º ME*	Sim	RIDC***	Sim
Adesivo ⁴	3 ou 15	10	1º ME*	Sim	RIDC***	Sim

¹CN: controle negativo

²CP: controle positivo

³IRM: grupo restaurado com óxido de zinco e eugenol modificado

⁴Adesivo: grupo restaurado com sistema adesivo e compósito

*1º ME: primeiro molar inferior esquerdo

** 1º MD: primeiro molar inferior direito

***RIDC: Remoção incompleta de dentina cariada

Split mouth: 2x3 ou 2x4

Tabela 2 – Materiais empregados no estudo: marca, composição e lote utilizado.

Material	Marca	Composição*	Lote
Óxido de zinco e eugenol modificado	IRM® Dentsply; Petrópolis, RJ, BR	Pó: óxido de zinco e eugenol, polimetacrilato de metila Líquido: ácido acético e eugenol	L420118
Sistema Adesivo autocondicionante	Clearfil SE Bond® Kuraray Medical Inc. Osaka, JP	<i>Primer</i> : MDP ¹ , HEMA ² , dimetracrilatos hidrofílicos, dl-canforoquinona, N, N –dietanol-p-toluidina e água <i>Adesivo</i> : MDP, Bis-GMA ³ , HEMA, dimetacrilato hidrofóbico, dl-canforoquinona, N, N-dietanol-p-toluidina e sílica coloidal	Primer: 0061A Adesivo: 00872A
Compósito	Filtek Supreme Universal Restorative® 3M ESPE St Paul, MN, USA	Bis-GMA ³ , Bis-EMA ⁴ , UDMA ⁵ , TEGDMA ⁶ , Zircônio e Sílica	4EB

¹MDP: 10-metacriloxidecila di-hidrogênio fosfato

²HEMA: 2-hidroxi-etil metacrilato

³Bis-GMA: bisfenol-glicidil-dimetacrilato

⁴bis-EMA: etoxi-bisfenol A glicidil dimetacrilato

⁵UDMA: uretano dimetacrilato

⁶TEGDMA: Trietilenoglicol dimetacrilato

*informações obtidas pelo fabricante



Figura 5 - Materiais empregados para a realização das restaurações. (A) Restauração do grupo OZE: IRM; (B) Restauração do grupo Adesivo: Sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond e Resina Filtek Supreme em cápsulas

Do 27º até os 76º e 77º dia de idade (quando da data da realização das restaurações= 7 semanas após a indução) os animais foram alimentados com dieta 2000 (Keyes, 1958), contendo 56% sacarose e água *ad libitum* com 5% (g/l) de sacarose (figura 6 e 7). Esta mistura foi realizada em laboratório e seus componentes (anexo 3) foram verificados quanto a presença de flúor (anexo 4). O grupo CN foi alimentado com dieta normal para ratos (Labina®, Purina, BR) e água sem sacarose.

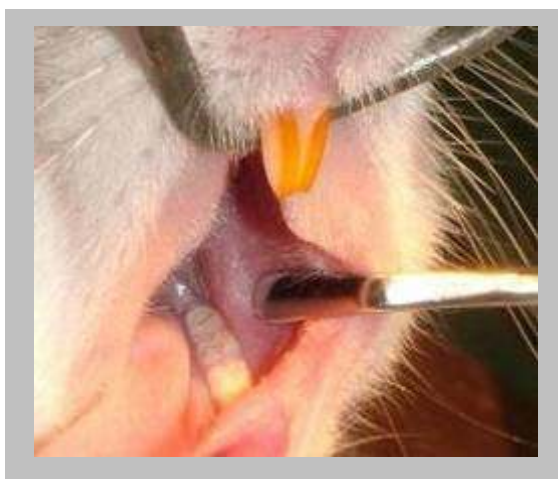


Figura 6 – Aspecto clínico da lesão de cárie após 7 semanas de indução nos molares inferiores

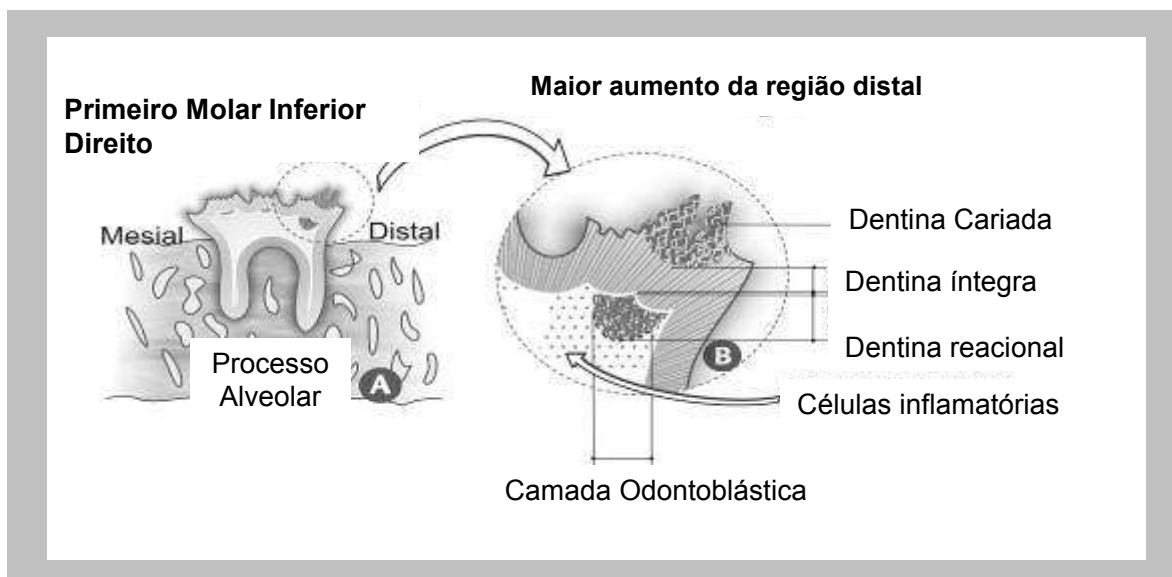


Figura 7 – (A) Esquema demonstrando o aspecto do desenvolvimento da lesão de cárie após 7 semanas de indução. (B) Note que na cúspide distal a progressão se dá em maior profundidade.

cloridrato de ketamina, Dopalen[®] e 0,7 mg/Kg de cloridrato de xilazina, Virbaxil[®]) com injeção intramuscular e os procedimentos restauradores para remoção incompleta de dentina cariada (figura 8) tiveram início, sendo que todos foram realizados com auxílio de microscópio cirúrgico em aumento de 40x. No CN nenhum foi realizado, sendo que o mesmo encontra-se nesta fase hígido. Já nos grupos CPs, embora o processo carioso tenha naturalmente desenvolvido cavidade, esta permaneceu aberta (sem tratamento restaurador).

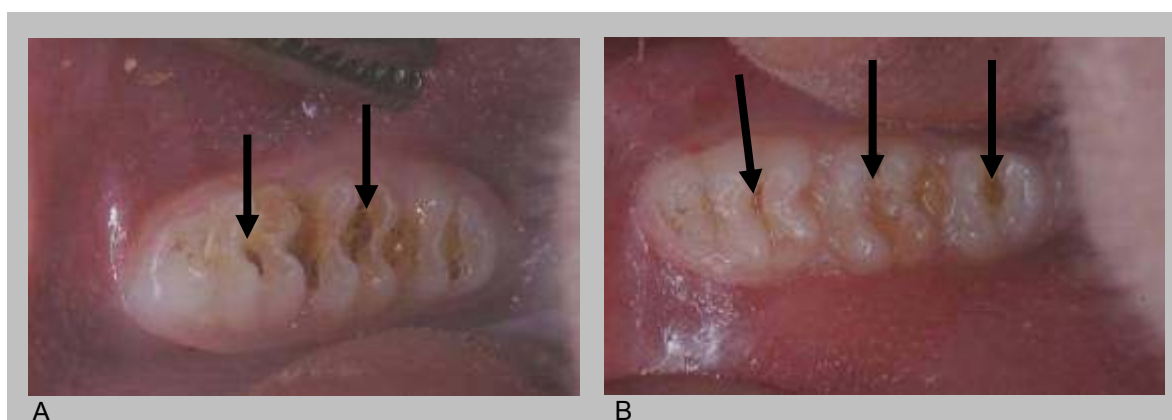


Figura 8 - (A) Aspecto clínico do dente antes da remoção do tecido cariado (setas). (B) Aspecto clínico da lesão de cárie após a remoção parcial de tecido cariado (setas).

Desta forma, o primeiro molar inferior esquerdo (ME) foi totalmente isolado com algodão e a pouca saliva existente na cavidade bucal foi controlada com gaze e sugador. Usando uma cureta adaptada foi removido inicialmente todo o tecido necrótico amolecido de dentro das cavidades formadas naturalmente pelo processo carioso. Num segundo momento, foi removido tecido cariado somente ao redor das paredes das três cavidades dentárias formadas, o critério adotado para a remoção foi de dureza. Foi tomado cuidado para que o tecido cariado do assoalho pulpar não fosse removido. Então a cavidade foi lavada com água destilada e seca com bolinhas de algodão. Depois, os dentes foram restaurados com os respectivos materiais restauradores: IRM e Sistema Adesivo/Compósito, sendo 20 dentes/animais para cada grupo (figura 9).

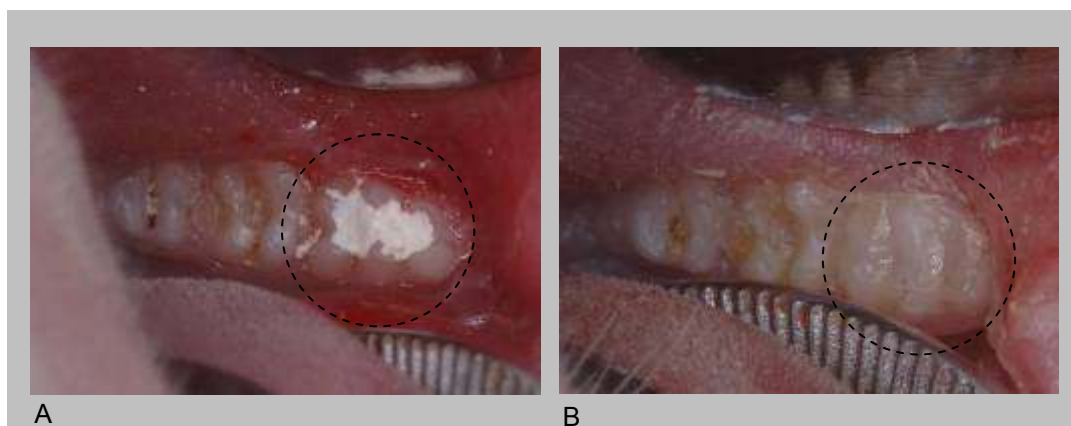


Figura 9 – (A) Primeiro molar inferior esquerdo restaurado com cimento de fosfato de zinco e eugenol modificado: IRM® (círculo tracejado) . (B) Primeiro molar inferior esquerdo restaurado com o sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond® e restaurado com Filtek Supreme® (círculo tracejado).

A manipulação de cada material foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Sendo que no grupo IRM o material foi inserido dentro da cavidade em apenas um incremento e depois de cinco minutos foi removido totalmente o isolamento. No grupo Adesivo, primeiro uma fina camada de *primer* foi inserida na cavidade e depois de 20s um leve jato de ar foi aplicado. Quando necessário foi reaplicado o primer. Imediatamente depois foi aplicado o adesivo e polimerizado por 20s. O principal cuidado foi de realizar o selamento de maneira eficiente em ambos os grupos. O molar inferior direito do mesmo rato foi

usado como controle positivo (CP) e nele foi removida também a maior parte do tecido cariado necrótico e nenhum tratamento restaurador foi realizado, ou seja, a cavidade permaneceu aberta. Esse modelo experimental, também conhecido como *split-mouth* (tabela 1) visa utilizar numa mesma cavidade os dois grupos experimentais, sendo assim no presente estudo o molar esquerdo recebeu tratamento restaurador e o molar direito foi utilizado como o controle positivo.

4.2 Processamento da amostra para análise imunoistoquímica e morfológica

Metade de todos os animais foram mortos após 3 dias e a outra metade depois de 15 dias do tratamento restaurador, sendo que a morte se deu por deslocamento cervical. As mandíbulas foram removidas e fixadas em paraformaldeído a 10% por 24h. Depois os molares inferiores foram dissecados juntamente com a parte óssea da mandíbula e os tecidos foram descalcificados em EDTA² (ácido etileno-diamino tetra-acético) 4% por 6-7 semanas mantidos a 4°C com trocas diárias do descalcificador.

Após a descalcificação, os espécimes foram lavados em água corrente por 24 h e desidratados em banhos de álcool 70%, 90% e dois banhos em álcool absoluto à temperatura ambiente, seguido de diafanização em xilol e inclusão em parafina.

Nos blocos foram realizados cortes longitudinais de 3 µm paralelos ao maior eixo do dente (figura 10A) com auxílio de um micrótomo semi-automático (Leica RM 2165). Os cortes foram semi-seriados (intervalos de 30 µm); sendo escolhidos para as análises cortes centrais de cada bloco (figura 10B), sendo dois para Hematoxilina-Eosina (HE) e outros cinco para imunoistoquímica. Outros dois cortes, também centrais, foram selecionados para se realizar técnica com a finalidade de evidenciar a presença de bactérias no interior dos túbulos (Brown & Hopps, 1973) (Figura 13).

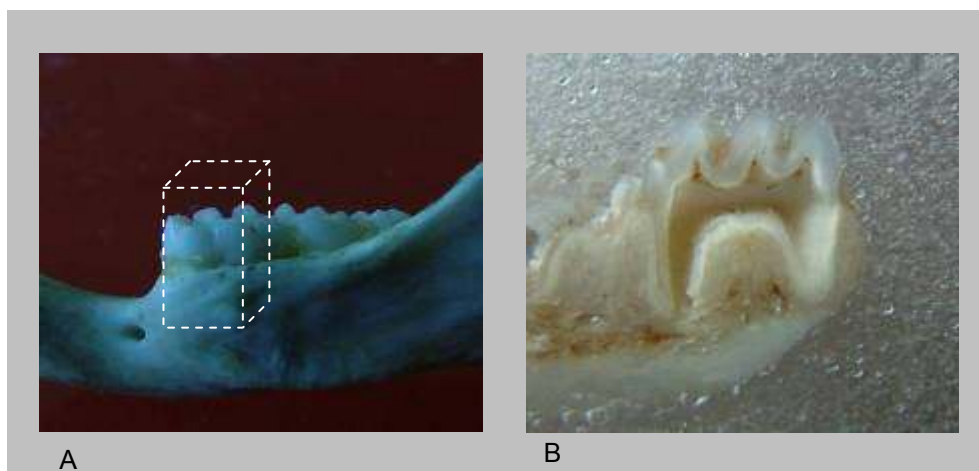


Figura 10 – (A) Esquema demonstrando a orientação do corte realizado no dente.
(B) Aspecto macroscópico da região analisada do tecido pulpar.

Para o método imunoistoquímico os cortes foram estendidos em lâminas de vidro, preparadas com adesivo organo-silano³ (3- aminopropyl-triethoxysilano), sendo que para a análise imunoistoquímica o método foi indireto utilizando o sistema estreptovidina-biotina, conforme os passos abaixo descritos:

- 1- desparafinização dos cortes em dois banhos de xilol, sendo o primeiro a 37°C/30min e segundo por 10 minutos cada à temperatura ambiente;
- 2- reidratação em cadeia descendente de etanol (100%, 95%, 85% e 80%) e passados em água destilada e lavados em TRIS-HCl (pH=7,4) por 5 min, consecutivamente;
- 3- recuperação antigênica específica para cada anticorpo (tabela 3);
- 4- bloqueio da atividade da peroxidase endógena através da lavagem em metanol com peróxido de hidrogênio 6% (H₂O₂; 1:1) por 5 min duas vezes, e então lavados em TRIS;
- 5- Incubação de cinco anticorpos primários policlonais diluídos em TRIS-HCl (pH 7.4) contendo albumina bovina 0.1% (BSA) e azida sódica, com o objetivo de reduzir a coloração inespecífica de fundo

² Merck®, Darmstadt, Alemanha

³ Sigma®, St Louis, MO, USA

(todas as concentrações e tempo de incubação estão descritas na tabela 3);

6- três lavagens em TRIS-HCl;

7- os cortes foram incubados pelo anticorpo secundário biotilado anti-coelho/camundongo para uso em ratos (DAKO LSAB2[®], DK-2600, Glostrup. Denmark) por 15 min;

8- após, os cortes foram incubados no complexo streptavidina-biotina (SABC) (Dako) por 15 min;

9- os cortes foram lavados duas vezes em TRIS-HCl;

10- imunomarcção específica foi visualizada pela incubação com diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, USA) contendo 0.03% de H₂O₂ por 5 min e lavados duas vezes com água destilada;

11-todos os cortes receberam contra-coloração através da Hematoxilina de Mayer por 12 min;

12-os cortes foram lavados rapidamente e então foram desidratados em etanol (70%, 80%, 90% e 100%, consecutivamente, por 3 min cada);

13-após os cortes foram diafanizados em xilol;

14-as lâminas foram montadas em Permount[®] (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA);

Todos os espécimes foram analisados em microscopia de luz. Para a completa informação sobre diluições dos anticorpos, fabricante, temperatura e tempo de incubação ver tabela 3. Os controles negativos foram feitos pela omissão do anticorpo primário e utilização de solução de albumina bovina 0,1% (BSA) e do mesmo soro dos anticorpos empregados (coelho). Os controles positivos foram usados de acordo com a recomendação do fabricante, sendo que a expressão de fibronectina nos vasos sangüíneos foi também utilizada como controle positivo interno (tabela 3).

Tabela 3 - Anticorpos policlonais primários, diluições, fabricante, recuperação antigênica, tempo de incubação e controles positivos usados.

Anticorpo	Diluição	Fabricante	Recuperação Antigênica	Incubação	Controle positivo
Fibronectina	1:400	Dako*	Pepsina a 1% pH 1.8 por 1h a 37°C	1 h a temperatura ambiente	Tecido Conjuntivo (<i>Epulis fissuratum</i>)
Colágeno I	1:500	Novotec**	Pepsina 0,5% pH 1.8 por 30 min a 37°C	18h a 4°C	Tecido Conjuntivo
Colágeno III	1:250	Novotec**	Pepsina 0,5% pH 1.8 por 30 min a 37°C	18h a 4°C	Tecido conjuntivo frouxo da polpa
Osteonectina	1:1000	Chemicon†	Pepsina 0,5% pH 1.8 por 30 min a 37°C	18h a 4°C	Tecido Ósseo
TGF-β1	1:50	Santa Cruz ***	Pepsina 0,5% pH 1.8 por 30 min a 37°C	18h a 4°C	Adrenal

*Dako, DK 2600, Glostrup, Denmark

**Novotec, Saint Martin La Garenne, France

***Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA

†Chemicon, Temecula, CA, USA

4.3 Métodos de análise dos resultados

Tanto para a análise histomorfológica quanto para a análise imunoistoquímica dos resultados o método empregado foi microscopia de luz, sendo que esta foi realizada, independentemente, por dois examinadores devidamente treinados. Quando havia divergência entre os valores obtidos, repetia-se a análise até um consenso.

A análise morfológica foi categorizada por critérios, os quais receberam índices (ver tabela 4), os quais depois de obtidos foram submetidos à análise estatística usando o programa Sigmastat para Windows versão 3.1 (Systat Software INC, San Jose, CA, USA). O teste empregado foi não paramétrico de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$), os quais analisaram resultados comparando dois grupos por vez em função das seguintes relações:

- 1- todos os grupos, tempo e material;
- 2- todos os grupos e o tempo (independente do material)

3- somente os grupos onde houve indução de cárie e o material empregado (independente do tempo)

4- somente os grupos onde houve indução de cárie, ou seja, cavidades abertas (CP) ou fechadas (dentes restaurados OZE/ADESIVO) (independentes do tempo e do material empregado)

Tabela 4 – Análise morfológica dos dentes molares de rato por escores, de acordo com os critérios empregados para a análise

Critérios	Índices			
	0	1	2	3
CDPS	Ausente	Até 1/3 da espessura	Até 2/3 da espessura	Mais de 2/3 da espessura
DR	Ausente	Leve	Moderada	Intensa
IP	Ausente	Leve	Moderada	Severa
IT	Tecido normal	Sem necrose, mas com desorganização da camada odontoblástica	Necrose local	Necrose generalizada

CDPS: Comprometimento da dentina primária/secundária

DR: Dentina reacional (leve: apenas uma camada; moderada: até 3 camadas; intensa: mais de 3 camadas produzidas)

IP: Inflamação pulpar (leve: restrito ao local adjacente a lesão; moderada: até 2/3 do volume do tecido pulpar; severa: mais de 2/3 do volume do tecido pulpar)

IT: Integridade do tecido pulpar

A análise imunoistoquímica foi descritiva, ou seja, foi analisado o padrão e intensidade de marcação nas regiões de dentina primária e secundária, dentina reacional, camada odontoblástica, região pobre em células, região rica em células e região central pulpar (n=10).

5 RESULTADOS

5.1 Análise Morfológica pelo Método de Hematoxilina-Eosina – HE (índices em anexo 2)

Para integridade de dentina secundária e primária (figura 11):

Existiu diferença aos 15 dias entre o grupo adesivo e seu respectivo controle positivo ($p \leq 0,02$), ou seja, houve maior degradação de dentina no controle positivo (cavidade aberta).

Independente do material empregado, aos 15 dias, os dentes restaurados tiveram menor destruição tecidual que cavidades abertas ($p = 0,003$). Entretanto, aos 3 dias não existiu diferença.

Nas demais análises por pares não houve diferença significativa.

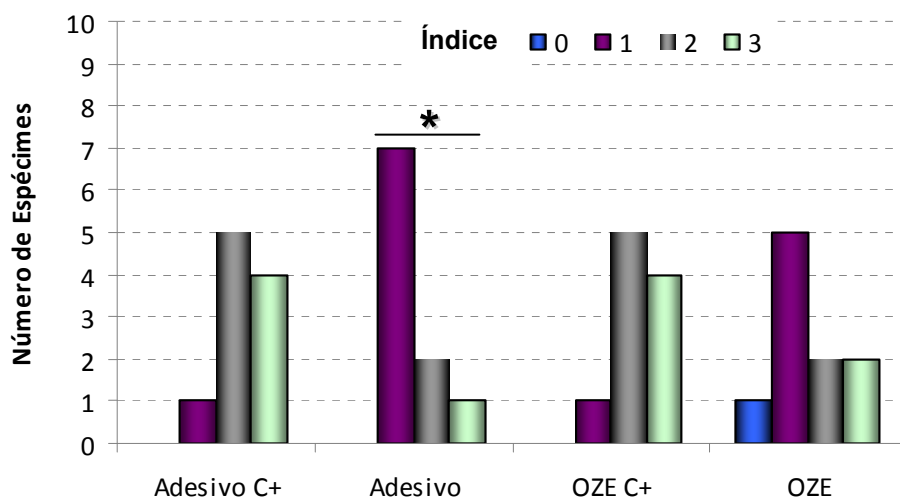


Figura 11 – Grupos onde houve a indução de cárie aos 15 dias pós-tratamento. Dados relativos à integridade de dentina. * $p = 0,02$ versus controle positivo (C+)

Para dentina reacional:

Existiu diferença entre o grupo controle negativo e os grupos onde houve indução de lesão ($p < 0,001$) independente do tempo, de cavidades restauradas ou não (CP) e do material empregado.

Nas demais análises por pares não houve diferença significativa.

Para inflamação tecidual (figura 12)

Foi possível observar menor inflamação tecidual no grupo adesivo aos 15 dias ($p < 0,05$) quando comparado com seu controle positivo.

Independente do tempo e material não existiu diferença quanto à inflamação para cavidades abertas e fechadas. Entretanto, quando levado em consideração o tempo, existiu diferença ($p < 0,001$) entre o controle positivo (dentes abertos) de 3 dias em relação aos 15 dias, ou seja, aos 15 dias a inflamação foi maior.

Todos os grupos onde existiu lesão de cárie apresentaram quantidade de inflamação tecidual maior em relação ao controle negativo ($p < 0,001$).

Nas demais análises por pares não houve diferença significativa.

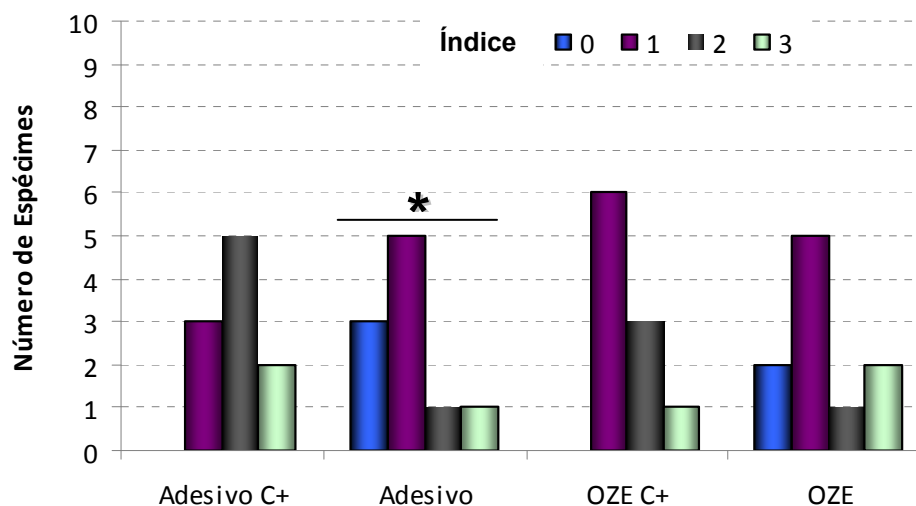


Figura 12 – Grupos onde houve a indução de cárie aos 15 dias pós-tratamento. Dados relativos à inflamação no tecido. * $p = 0,04$ versus controle positivo (C+)

Para integridade do tecido pulpar:

Nesta análise nenhuma diferença foi evidenciada quanto aos grupos onde foi induzida lesão de cárie. A única diferença observada foi em relação ao controle negativo (onde não foi induzida lesão de cárie) em relação aos grupos onde foi induzida lesão, sendo que nestes a camada odontoblástica demonstrou-se mais desorganizada ($p < 0,05$).

Nas demais análises por pares não houve diferença significativa.

Resultado do Brown & Hopps, demonstrando a presença de bactérias no interior dos túbulos dentinários.

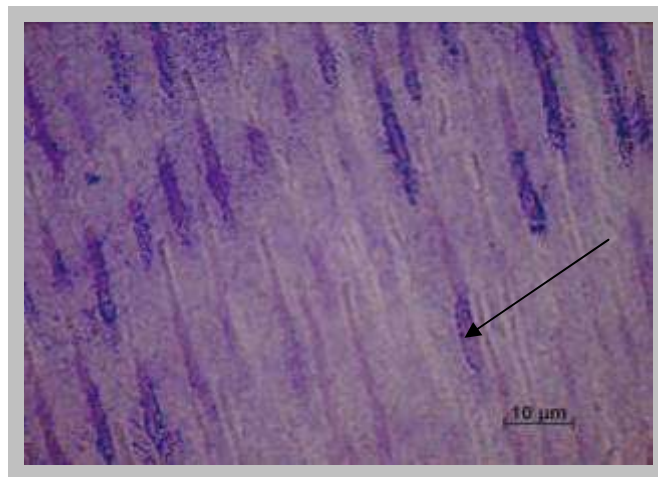


Figura 13 – Corte demonstrando a presença de bactérias dentro dos túbulos dentinários (seta) de um dente controle positivo (cavidade aberta). Brown & Hopps

Ver também pranchas de cortes histológicos de 3 (figura 14) e 15 (figura 15) dias, respectivamente.

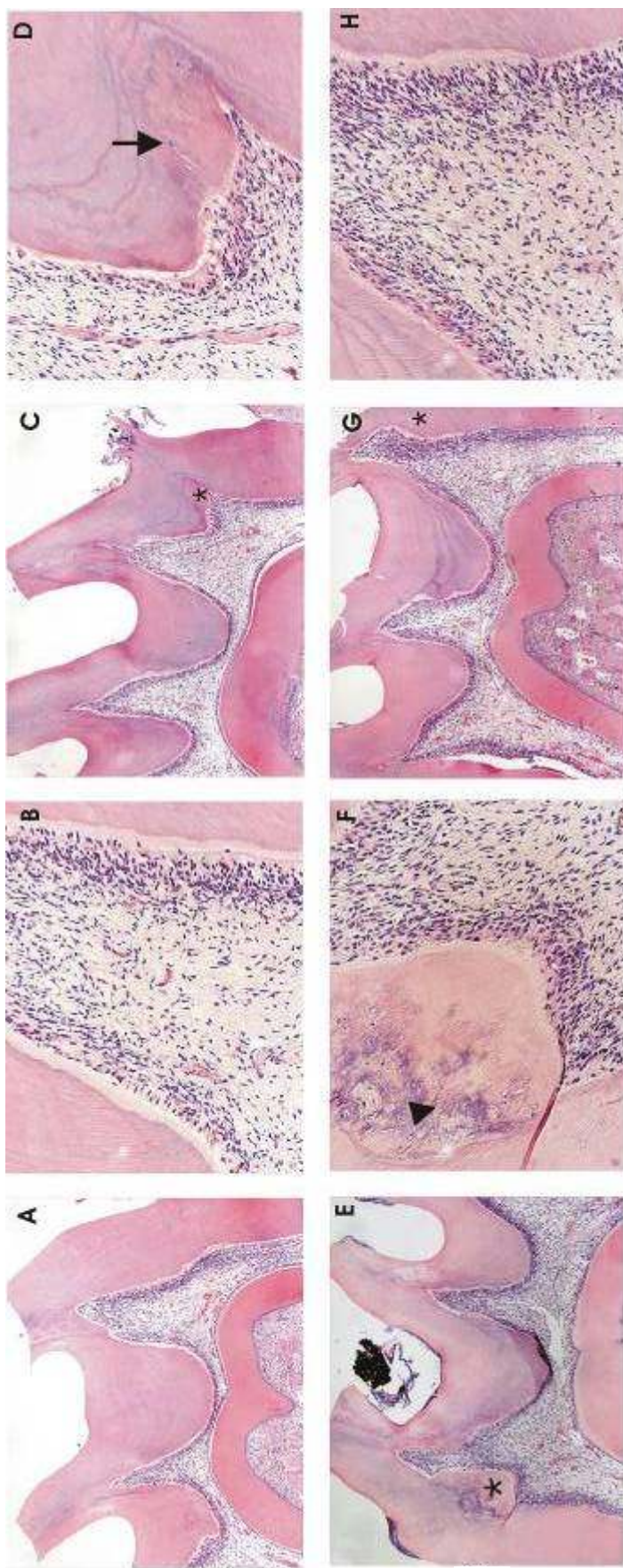


Figura 14 Período de 3 dias pós-tratamento demonstrando vários grupos experimentais.

A-Control Negativo (sem lesão). Observe o aspecto saudável do tecido pulpar e da dentina. 50x

B-Aumento maior de 200x de A.

C-Dente onde foi induzida a lesão cariosa e restaurado com IRM. Observe o aspecto de degradação da dentina e a resposta do tecido dentinário a esta agressão, especialmente no lado direito (asterisco). 50x

D-Maior aumento de C. É possível observar inclusões celulares nesta dentina (seta). 200x

E-Control positivo do mesmo período demonstrando a abundante reação de defesa do tecido dentinário à progressão da lesão cariosa (asterisco). 50x

F-Maior aumento de E. Observe o aspecto da dentina reacional produzida, bem como a presença de inclusões celulares nesta (cabeça de seta). 200x

G-Dente onde foi induzida a lesão cariosa e restaurado com Sistema Adesivo. Observe que a produção de dentina reacional na porção distal é mínima (asterisco). 50x

H-Maior aumento de G. 200x

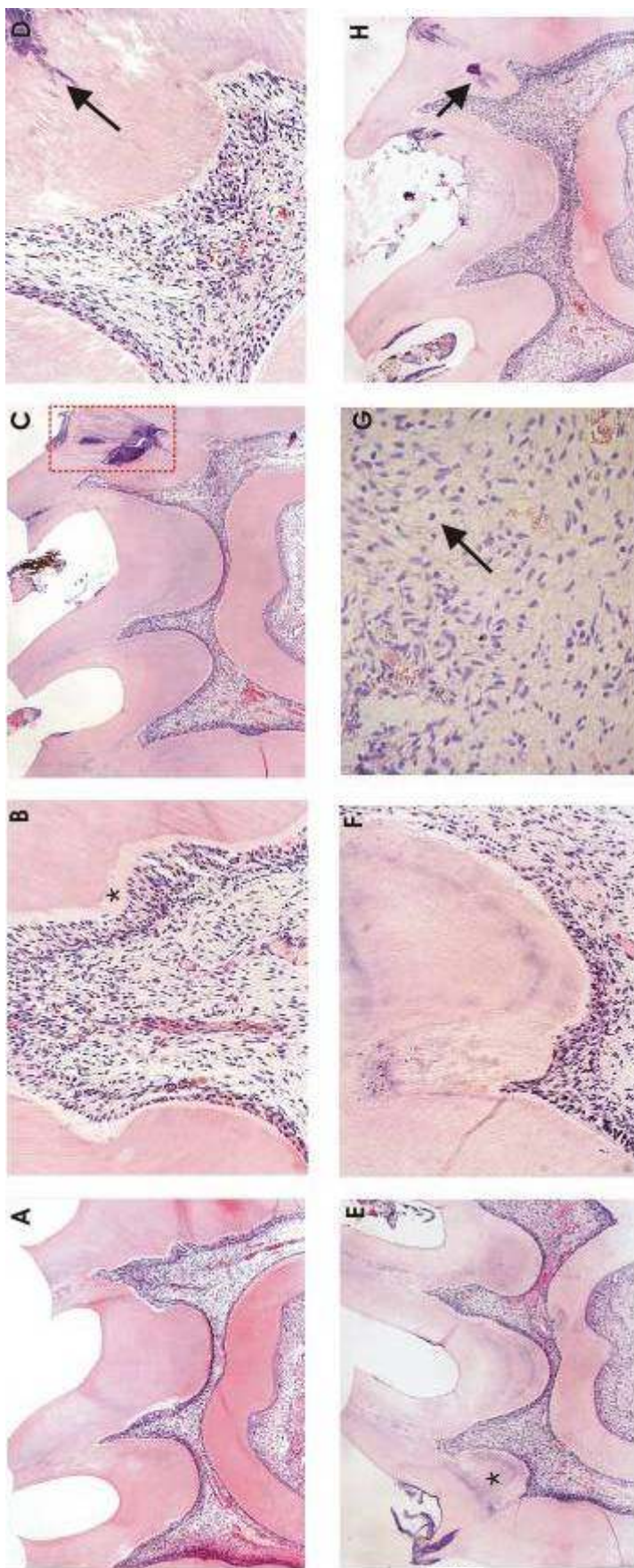


Figura 15 Período de 15 dias pós-tratamento demonstrando vários grupos experimentais.

- A-Control Negativo (sem lesão). Observe a ausência de dentina reacional e a integridade do tecido pulpar e da dentina. 50x
 B-Aumento maior de A. Note a presença de túbulos dentinários visíveis na dentina íntegra e a espessa pré-dentina depositada (asterisco). 200x
 C-Dente onde foi induzida a lesão cáries e restaurado com IRM. Observe o aspecto de degradação da dentina (quadro tracejado) e a produção exacerbada de dentina reacional, bem como a presença de grande densidade celular pulpar. 50x
 D-Maior aumento de C. É possível observar a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, bem como a degradação necrótica da dentina (seta). 200x
 E-Control positivo do mesmo período demonstrando a abundante reação de defesa do tecido dentinário por meio da produção de dentina reacional (asterisco). 50x
 F-Maior aumento de E. Observe mais uma vez o aspecto do infiltrado inflamatório com muitas células de defesa mononucleares. 200x
 G-Maior aumento do infiltrado inflamatório (seta). 500x
 H-Dente restaurado com Sistema adesivo. Observe que a lesão neste grupo também é possível evidenciar a produção de dentina reacional e degradação de dentina (seta). 50x

5.2 Marcação Imunoistoquímica

As análises descritivas levaram em consideração o padrão e intensidade de expressão de quatro glicoproteínas e um fator de crescimento no complexo dentina-polpa.

Quanto à reação imunoistoquímica propriamente dita, a especificidade do anticorpo no tecido foi confirmada pela ausência de marcação nos controles negativos⁴. Controles positivos e negativos confirmaram a sensibilidade do método usado. A expressão de fibronectina nos vasos sangüíneos, bem como de colágeno tipo III no tecido pulpar também serviu como controle positivo interno.

Características da imunomarcação do colágeno tipo I (COL I) (n=10) – Figura 16

Nos controles negativos a marcação foi moderada demonstrando nitidamente a diferença entre a camada odontoblástica da zona central pulpar e da rica em células, porém nos grupos onde foi induzida a lesão cariiosa a camada odontoblástica demonstrou-se positiva ao colágeno I demonstrando nesta e nas outras regiões aspecto fibrilar, independente do tempo e do material empregado. Houve também marcação na pré-dentina, sendo que nos grupos onde foi induzida a lesão esta se apresentou mais intensa. Em relação aos materiais e tempos empregados não houve diferença na intensidade de marcação.

⁴ Quando citamos neste caso o controle negativo estamos nos referindo à omissão do anticorpo primário da reação imunoistoquímica. Nos parágrafos abaixo referentes aos resultados, o controle negativo citado refere-se a grupos onde não foi induzida lesão de cárie.

**Características da imunomarcação do colágeno tipo III (COL III)
(n=10) – Figura 17**

Existiu diferença no padrão de marcação nos controles negativos, independente do tempo analisado, em relação aos grupos onde foi induzida a lesão cariosa. No controle negativo a marcação apresentou-se moderada e homogênea no tecido pulpar, porém nos grupos onde foi induzida a lesão, maior intensidade foi observada na camada rica em células quando comparada com a zona central. Outra importante observação foi em relação aos grupos OZE e Adesivo aos 3 dias pós-tratamento. Eles apresentaram forte intensidade de marcação e padrão semelhante entre si, mais seus respectivos controles positivos apresentaram intensidade ainda maior. O aspecto fibrilar de marcação foi apresentado em todos os espécimes, bem como a ausência de expressão de COL III na pré-dentina.

**Características da imunomarcação da fibronectina (FNC) (n=10) –
Figura 18**

O controle negativo de ambos os períodos demonstrou padrão menos intenso que os grupos onde houve a indução de cárie, sendo que houve diferença entre a zona central e rica em células, o que não foi distinguível nos grupos onde houve a indução. O grupo IRM aos 15 dias demonstrou induzir estímulo maior quando comparado a seu controle positivo, o que já não ocorreu com o grupo Adesivo onde o controle positivo demonstrou uma forte marcação no mesmo período. Nos grupos onde existiu indução de lesão foi possível também evidenciar a presença em abundância de FNC plasmática, bem como forte expressão de marcação na pré-dentina em relação ao grupo onde não foi induzida lesão.

Características da imunomarcação da Osteonectina (OSN) (n=10) –

Figura 19

Em todos os espécimes analisados a expressão foi muito mais evidente no citoplasma das células odontoblásticas do que em outros sítios, bem como houve positividade à OSN na dentina superficial das cúspides quando essa se apresentou com túbulos dilatados e expostos ao meio externo. Em todos os espécimes de 3 dias (CN, ZOE e Adesivo) foi tênue e homogênea a intensidade de expressão na zona central e rica em células, porém aos 15 dias, todos os grupos onde houve a indução de lesão, demonstraram expressão moderada, sendo esta mais evidente nos grupos controles positivo do que nos respectivos dentes restaurados. Levando em consideração respectivamente cada período estudado, não foi evidenciada diferença na intensidade e no padrão de marcação dos grupos ZOE e Adesivo.

Características da imunomarcação do fator de crescimento transformador beta 1(TGF-β1) (n=10) – Figura 20

Em ambos os períodos estudados o grupo controle negativo apresentou tênue marcação na pré-dentina, na camada odontoblástica e no restante do tecido pulpar, sendo que nesta última região o padrão de marcação foi homogêneo entre as zonas central e a rica em células. Entretanto, nos grupos onde foi induzida a lesão apresentaram moderada intensidade de expressão, especialmente na própria dentina secundária e reacional. Um achado marcante aos 3 dias foi em relação ao grupo Adesivo, pois observou-se forte marcação em pré-dentina e moderada no tecido pulpar quando comparado ao seu controle positivo e ao grupo ZOE do mesmo período. Aos 15 dias, todos os grupos onde houve a indução de lesão demonstraram uma maior intensidade de expressão na zona central quando comparado ao CN do mesmo período.

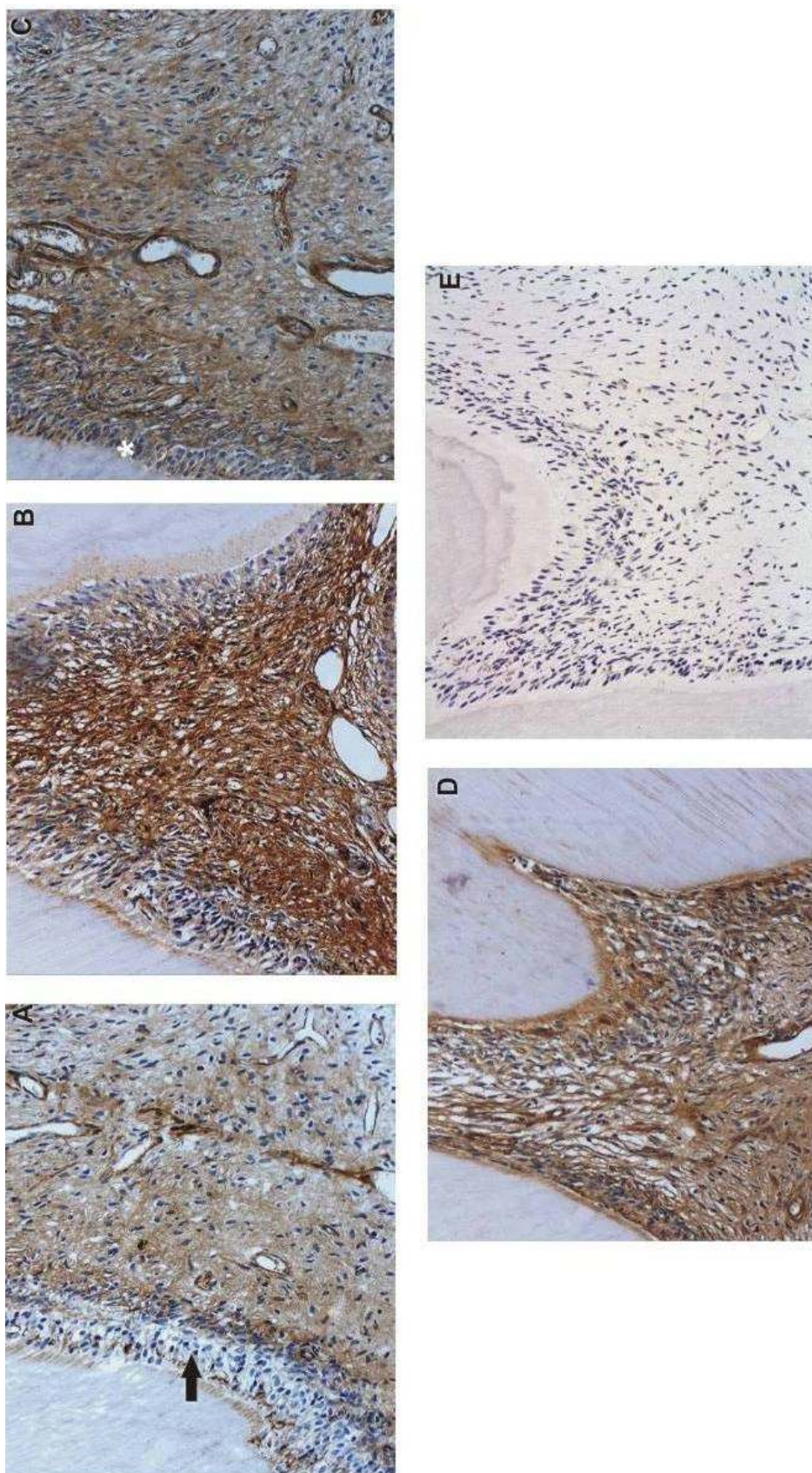


Figura 16- Marcação Imunoistoquímica do colágeno tipo I nas diferentes condições de tratamento.

A-Control Negativo do experimento (sem indução de cárie). Observe a ausência de marcação na camada odontoblástica (seta) e moderada expressão no tecido pulpar e pré-dentina. 200X.

B-Dente restaurado com sistema adesivo após três dias do tratamento restaurador. Observe a forte marcação, de aspecto fibrilar, no tecido pulpar e presença de expressão de Col I na camada odontoblástica. 200X.

C-Control positivo da lesão (sem tratamento restaurador) após três dias. Observe-se intensa expressão em todo o tecido pulpar, bem como na camada odontoblástica e pré-dentina (asterisco). 200X.

D-Dente restaurado com sistema adesivo após 15 dias do tratamento restaurador. Observe o mesmo aspecto e intensidade de marcação que o dente anterior (CP). 200X

E-Control Negativo da reação. 200X.

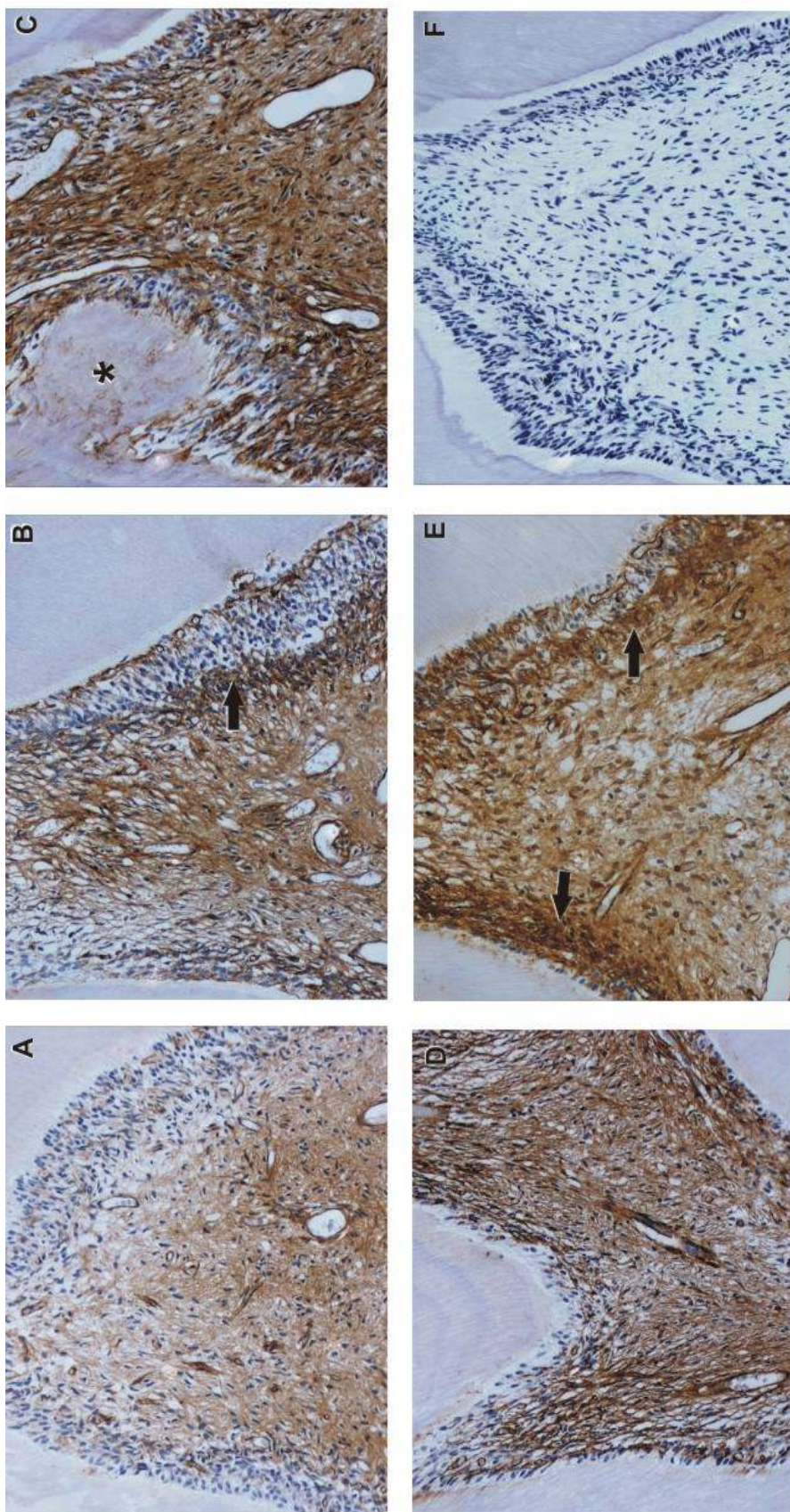


Figura 17. Marcação Imunoistoquímica do colágeno tipo III nas diferentes condições de tratamento.

A-Controle Negativo (sem indução de cárie) após 3 dias. Observar a ausência de marcação na pré-dentina. No tecido pulpar a marcação foi moderada e igualmente distribuída no tecido. 200X.

B-Dente restaurado com IRM após 3 dias do tratamento restaurador. Observar a forte marcação no tecido pulpar, sendo esta mais evidente na camada rica em células (seta), note também a ausência de marcação na camada odontoblástica. 200X.

C-Controle positivo da lesão (sem tratamento restaurador) após 3 dias do tratamento. Note a forte expressão de marcação em todo o tecido pulpar e ausência de marcação na pré-dentina. Entretanto, na dentina reacional formada leves traços de marcação puderam ser observados (asterisco). 200X.

D-Controle Negativo (sem indução de cárie lesão), após 15 dias do tratamento. Observe a homogênea expressão de Col III no tecido pulpar, bem como o padrão fibrilar de marcação. 200X.

E-Dente controle positivo (sem restauração) após 15 dias do tratamento restaurador. Observe a intensa expressão de Col III, especialmente na camada rica em células (setas). 200X.

F-Controle Negativo da reação. 200X.

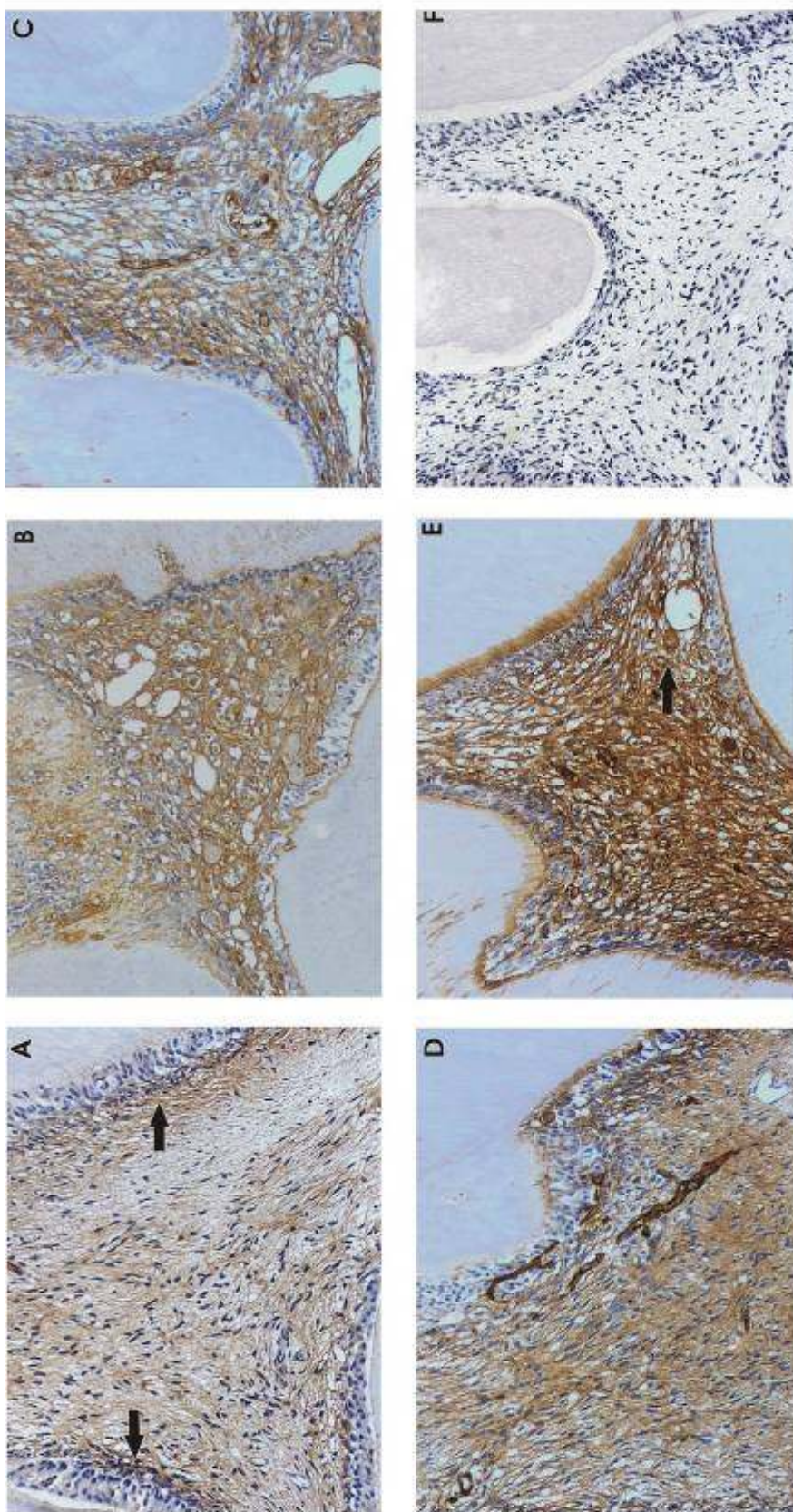


Figura 18. Marcação Imunoistoquímica de fibronectina nas diferentes condições de tratamento.

A-Control negativo (sem indução de cárie). Observar a moderada expressão de fibronectina no tecido pulpar, sendo esta mais intensa na camada rica em células (seta). 200X.

B-Dente restaurado com IRM após 15 dias do tratamento restaurador. Observar a intensa expressão de FNC no tecido pulpar e a grande quantidades de vasos no tecido. 200X.

C-Control positivo (cavidade aberta) de IRM, após 15 dias do tratamento restaurador. Observe a ausência de marcação ao redor do infiltrado inflamatório mononuclear. 200X.

D-Dente restaurado com sistema adesivo após 15 dias do tratamento conservador. Notar a forte intensidade de marcação em todo o tecido pulpar. 200X.

E-Dente controle positivo do Adesivo. Observar o forte padrão de marcação em todas as regiões, bem como a presença de FNC plasmática no interior dos vasos (seta). 200X

F-Control negativo da reação. 200X

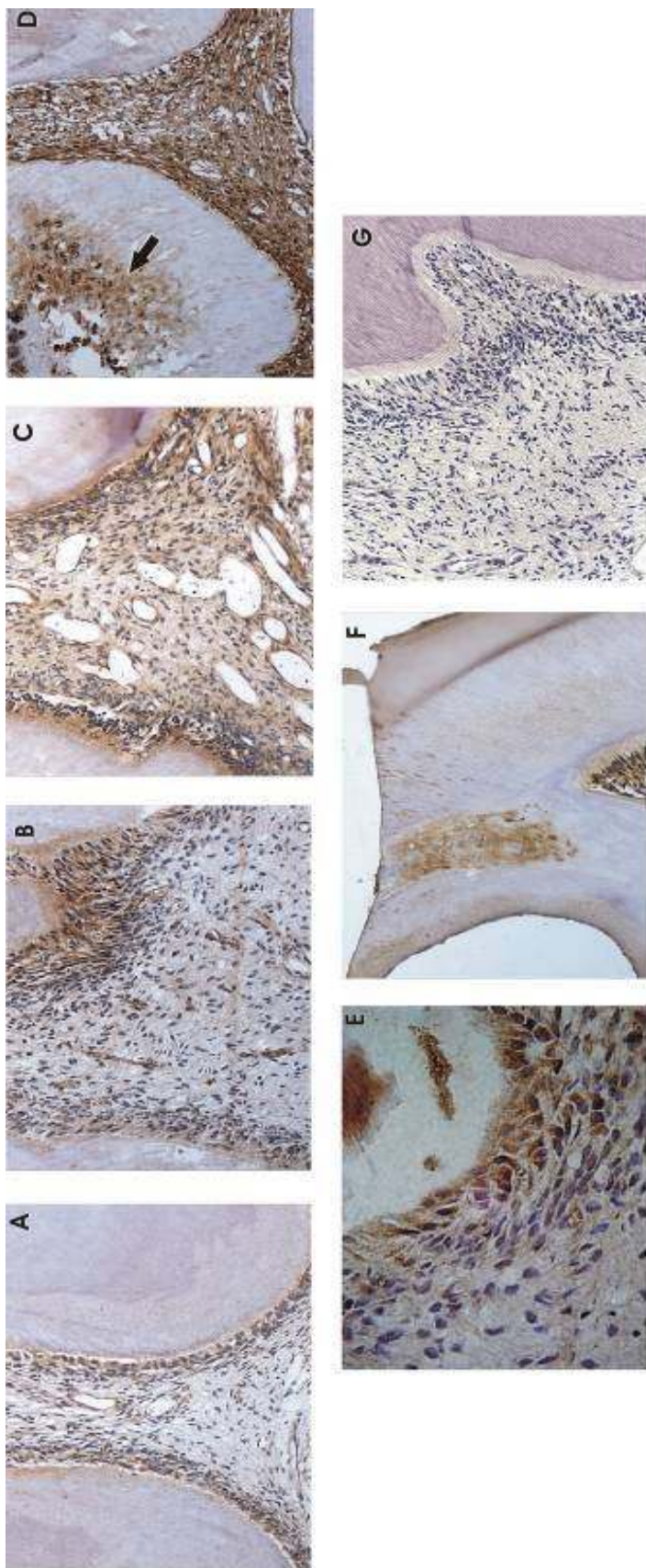


Figura 19. Marcação Imunoistoquímica de osteonectina nas diferentes condições de tratamento.

A-Control negativo (sem indução de cárie). Observar a tênue e homogênea marcação no tecido pulpar, porém na camada odontoblástica e pré-dentina esta expressão foi mais intensa. 200X.

B-Dente controle positivo (cavidade aberta) do adesivo após 3 dias do tratamento restaurador. Observar o mesmo padrão de marcação do que o dente anterior, ou seja, tênue na camada rica em células e pulpar central e moderado na camada odontoblástica e pré-dentina. 200X.

C-Dente restaurado com IRM 15 dias após o tratamento restaurador. Observar a moderada expressão no tecido pulpar e intensa na pré-dentina. 200X.

D-Dente controle positivo (cavidade aberta) de IRM após 15 dias do tratamento restaurador. Notar a forte expressão de OSN no tecido pulpar, bem como na pré-dentina e em áreas de necrose da dentina reacional (seta). 200X.

E-Control positivo de IRM 3 dias pós-tratamento. Observar a moderada expressão de OSN na camada odontoblástica quando comparada as demais regiões. 500X.

F-Dente restaurado com adesivo 15 dias após tratamento restaurador. Notar a positividade à OSN nas regiões de cúspide. 200X

G-Control negativo da reação. 200X.

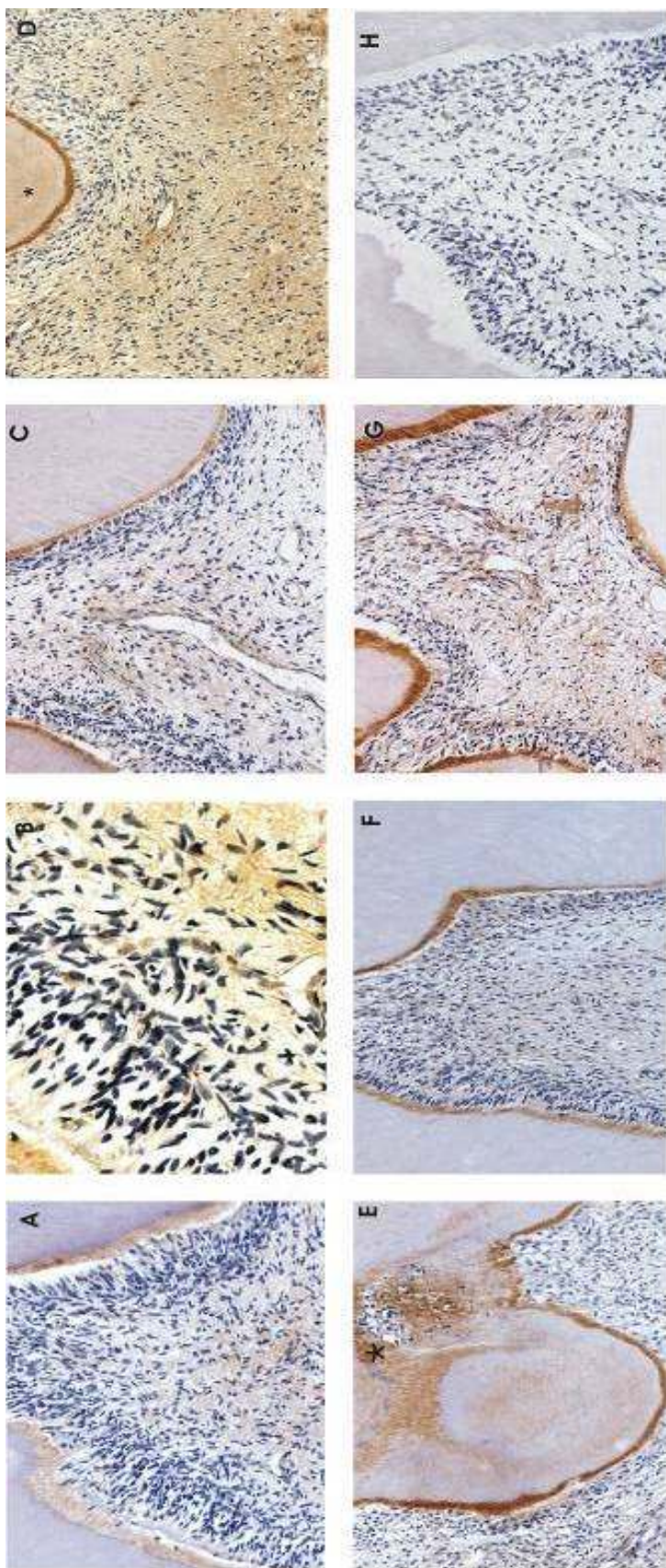


Figura 20. Marcação Imunoistoquímica de TGF- β 1 nas diferentes condições de tratamento.

A-Controlte negativo quanto à lesão (sem indução de cárie) após 3 dias. A expressão de TGF- β 1 se apresenta tênue em todo o tecido pulpar, bem como na pré-dentina. 200X.

B-Maior aumento da figura anterior mostrando detalhes do aspecto de marcação no tecido pulpar. 500X.

C-Dente restaurado com IRM após 3 dias do tratamento. Observar a tênue marcação no tecido pulpar e moderada na pré-dentina. 200X.

D-Dente restaurado com Adesivo após 3 dias do tratamento. Apresentando moderada expressão de TGF- β 1 no tecido pulpar e em região de dentina (asterisco). Note também a acentuada expressão na pré-dentina. 200X.

E-Controlte positivo do Adesivo após 3 dias. Note a expressão de TGF- β 1 na pré-dentina e na região de dentina reacional (asterisco). 200X.

F-Controlte negativo quanto à lesão após 15 dias. Observar o aspecto similar de marcação ao período de 3 dias (B). 200X.

G-Controlte positivo do Adesivo de 15 dias pós tratamento. Notar a expressão de TGF- β 1 no tecido pulpar. Esta foi mais evidente que o controle negativo do mesmo período (G). 200X.

H-Controlte negativo da reação. 200X.

6 DISCUSSÃO

A metodologia utilizada neste estudo foi baseada nos padrões da ISO 7405 (1997) para avaliação clínica da biocompatibilidade dos materiais. Como definido por esta normativa são preferidos animais mamíferos não-roedores a roedores, entretanto, no presente estudo foram usados ratos. A opção por estes animais foi devido ao método consagrado pela literatura de indução de cárie com esta espécie, os quais trazem como principal vantagem o fácil manuseio durante as diversas fases do processo de indução da lesão, como também facilidade de obtenção dos mesmos.

É importante enfatizar que para analisar sob o aspecto biológico o tratamento restaurador em dentes previamente acometidos por lesão cariosa, concomitantemente, mecanismos diferentes estão envolvidos, como os promovidos pelos componentes do agente agressor (endotoxinas, baixo pH), promovidos pela própria defesa do hospedeiro (inflamação) e promovidos pelo próprio reparo do complexo dentina-polpa (dentina reacional, esclerótica ou reparativa) (Smith, 2002). Adicionado a tudo isso, fatores advindos do próprio procedimento restaurador empregado também influenciam no desfecho do reparo dentino-pulpar, como por exemplo, o tipo de material empregado. Então, devido à complexa análise dos resultados em nosso estudo utilizamos um modelo experimental com grupos controles positivos e negativos, visando deste modo não sobrepor ou superestimar os resultados.

É sabido que a lesão de cárie em dentina pode se apresentar em duas camadas: infectada ou afetada. Ogushi & Fusayama (1975) e Fusayama (1979) identificaram uma camada externa, a qual se denominou de infectada e que apresentava intensa desmineralização, fibras colágenas desnaturadas, e foi considerada não passível de remineralização fisiológica. A outra camada interna, considerada afetada apresentava uma desmineralização intermediária, fibras colágenas saudáveis, podendo assim, ser remineralizada. O entendimento clínico tradicional é que a camada infectada deve ser totalmente removida durante o preparo cavitário para que a lesão não progrida. Porém, clinicamente não é

possível distinguir os dois tipos de dentina com objetividade e segurança (Kidd, 2000). No presente estudo, esta afirmação pode ser confirmada, pois além do agravante quanto à distinção entre essas duas camadas em uma dentina cariada existiu o agravante anatômico, pois os primeiros molares de ratos também são extremamente menores do que os de humanos. Assim, o risco de causar exposição pulpar foi aumentado. Devido a isto, no presente estudo optou-se por não remover nenhum tipo de dentina cariada da parede de fundo. Reforçando esta decisão, alguns trabalhos na literatura têm observado que, mesmo sob dentina infectada, o dente quando eficientemente selado por algum tempo pode causar a morte de bactérias (Thylstrup *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2006) , sem prejuízo a integridade pulpar (Pinto *et al.*, 2006) e remineralização desta dentina (Massara *et al.*, 2002). Entretanto, em dentes humanos embora não se possa remover totalmente esta pela dificuldade de distinguí-las, é possível que se possa remover o excesso de dentina infectada do assoalho pulpar de uma maneira mais eficaz, sem expor o tecido pulpar.

A escolha do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond foi devido a sua indicação em cavidades profundas (Hebling *et al.*, 1999; Bouillaguet, 2004), especialmente próximo à polpa, onde neste local a permeabilidade da dentina é maior, como também há maior umidade. Então, os adesivos autocondicionantes, em especial o Clearfil SE Bond, os quais preservam a maior parte da *smear plugs*⁵ nos túbulos impediriam esse maior molhamento como também limitariam a difusão de monômeros que não polimerizaram para a polpa (Tay *et al.*, 2000).

Por outro lado, testes *in vitro* de dentina afetada por cárie (Inoue *et al.*, 2001) não tem demonstrado resultados melhores dos adesivos autocondicionantes em relação aos de condicionamento dentário total, contudo em avaliação clínica de 10 anos, os autocondicionantes demonstraram alta taxa de sucesso com o emprego do Clearfil Liner Bond II (autocondicionante) sobre

⁵ *Smear plug* – camada que oblitera os túbulos dentinários e com isto diminui a permeabilidade da dentina

dentina afetada onde previamente remove-se tecido cariado parcialmente (Akimoto *et al.*, 2007).

O emprego de óxido de zinco e eugenol modificado no grupo OZE como material restaurador foi devido a sua indicação rotineira em tratamentos expectantes (*stepwise excavation*) e por suas boas propriedades como selador a curto-prazo (Oliveira *et al.*, 2006). Porém, no presente experimento não se utilizou material protetor pulpar, ou seja, o cimento de hidróxido de cálcio, porque o interesse foi de avaliar somente a ação isolada do IRM sobre o remanescente cariado do assoalho pulpar.

A quantidade de inflamação tecidual pulpar nos grupos onde foi induzida lesão de cárie foi maior que nos grupos CN, sendo que a inflamação na maioria dos casos apresentou-se com predominância de infiltrado inflamatório mononuclear. Esta avaliação foi somente confirmatória, tendo em vista que nos grupos CN a inflamação do tecido pulpar foi praticamente nula.

Já em relação à inflamação dos grupos onde houve a indução de cárie, foi possível verificar que o grupo Adesivo proporcionou menor quantidade de inflamação tecidual que seu respectivo controle positivo aos 15 dias. Através deste resultado pode-se inferir que o grupo Adesivo neste período obteve melhora no quadro inflamatório, sendo que o mesmo não foi possível ser observado no grupo OZE do mesmo período, apesar de também selar a lesão cariosa e impedir a chegada de nutrientes aos remanescentes bacterianos. Este acontecimento pode estar relacionado a diferentes fatores.

Em primeiro lugar, pode estar relacionado com o satisfatório selamento do material adesivo obtido não só pela retenção mecânica, mas também pela adesão micromecânica desenvolvida pela camada híbrida⁶, o qual impediria de forma mais efetiva em pouco tempo a chegada de nutrientes, ou seja, em um período maior de observação poderia extinguir completamente as bactérias devido

⁶ Camada híbrida – retenção por microinbricamento à rede colágena na região de dentina intertubular

à ausência de nutrientes e sendo assim, o dente poderia retornar a um estado clínico saudável.

Um segundo fator pode estar relacionado com a ação antimicrobiana obtida pelos monômeros ácidos deste material. Algumas pesquisas têm demonstrado que o pH do Clearfil SE Bond é em torno de 1,7 a 2,0 (Imazato, 2003; Nishitani *et al.*, 2006) e, segundo os autores, esta acidez pode reduzir o número de bactérias viáveis no local, com exceção de *Lactobacilos*. Contudo, é importante enfatizar que existe uma limitação em relação ao tempo, pois este baixo pH é neutralizado em questão de horas pela ação de tampão da dentina (Imazato, 2003), ou seja, embora auxilie com seu poder bactericida, sua ação é de curta duração.

O desempenho negativo do grupo OZE até o período analisado pode estar associado com a condição clínica da dentina cariada remanescente no assoalho pulpar. Esta por estar em uma situação de maior umidade devido ao maior diâmetro dos túbulos dentinários pode ter causado a difusão de eugenol da restauração para a polpa o que resulta em um quadro inflamatório mais severo devido à citotoxicidade do eugenol, e embora o eugenol seja um bom agente antimicrobiano, ele também possui um alto índice de citotoxicidade celular (Hume, 1988), o que poderia agravar a condição de uma polpa já previamente agredida ou mesmo retardar o processo de reparo pela morte dos odontoblastos.

Foi possível também verificar que a quantidade de dentina reacional formada foi maior em todos os grupos onde existiu indução de lesão de cárie do que nos CN. Como se sabe, a dentina reacional em dentes hígidos é praticamente inexistente, logo, em dentes acometidos por cárie a própria lesão induz a formação desta dentina pela estimulação aos odontoblastos de forma mais acentuada que em situação normal (Smith, 2002; Murray *et al.*, 2003).

No período de 15 dias pós-tratamento não foram observadas diferenças entre os materiais utilizados quanto à espessura de dentina reacional formada, ainda que na literatura exista relato de tal diferença entre os dois materiais (Murray *et al.*, 2001). Entretanto, é possível que o tempo empregado na

presente metodologia não tenha sido suficiente para evidenciar tal diferença, no qual em um período maior poderia ser observada, como no estudo citado que analisou a resposta pulpar depois de ± 68 dias depois do tratamento restaurador.

Na literatura existe relato de que o Zinco, componente do IRM, tenha capacidade de inibir metaloproteinases (MMPs) pulpare 9 e 2 (Santos *et al.*, 2004), as quais desencadeiam uma série de respostas celulares, ou seja, estas enzimas controlam a degradação de componentes da matriz extracelular em situações fisiológicas de forma a remodelar os tecidos (Alberts, 2002), como também em processos patológicos estimula o reparo, a angiogênese e a morfogênese (Santos *et al.*, 2001) dentre outras funções; contudo neste estudo esta relação não foi observada. Esta constatação possivelmente tenha se dado porque a quantidade de zinco desprendido do material foi nula ou praticamente inexistente.

Estudo similar em relação à metodologia por HE usada neste experimento foi realizado por Shimada *et al.* (2004). Os pesquisadores induziram a lesão de cárie em molares de ratos e restauraram sem remover nenhum tecido cariado. Os materiais empregados foram o cimento de ionômero de vidro e o mesmo sistema adesivo. Os resultados obtidos pelos autores não demonstraram diferenças entre os materiais utilizados passados 53 a 39 dias após o tratamento restaurador, embora tenha existido diminuição no processo carioso. Entretanto, no presente estudo aos 15 dias foi possível observar uma diferença na quantidade de espessura de dentina primária/secundária hígida em favor do grupo adesivo em relação ao seu controle positivo, bem como menor reação inflamatória, o que no OZE não foi demonstrado, ou seja, aos 15 dias, o grupo OZE demonstrou persistência similar do processo inflamatório e de degradação de dentina quando comparado com ao seu CP. Essa diferença encontrada em relação aos resultados dos dois trabalhos pode estar associada com o fato de que no presente estudo foi removida dentina cariada “amolecida” somente do assoalho pulpar, o que não foi feito no trabalho acima descrito. Outra questão, é que um dos materiais utilizado

pelos autores (Shimada *et al.*, 2004), ou seja, o ionômero também desenvolve um bom selamento químico, tanto quanto o sistema adesivo empregado.

As proteínas/glicoproteínas e o fator de crescimento transformador- β 1 estudados foram escolhidos devido à grande importância deles durante os processos de formação dentária (Takita *et al.*, 1987; Reichert *et al.*, 1992; Unda *et al.*, 2001), em algumas patologias genéticas, como por exemplo na *osteogenesis imperfecta* (Termine *et al.*, 1984), ou mesmo na sobre-regulação da resposta imunológica (Wahl *et al.*, 2000). Contudo, poucos trabalhos têm estudado estes componentes nos eventos que envolvem reparo dentino-pulpar mediante prévio acometimento por cárie.

Em relação à análise imunoistoquímica dos cinco componentes estudados, três não demonstraram diferenças quanto à expressão em relação aos materiais empregados, sendo estes o COL I, COL III e a OSN. Entretanto, foi verificado em todos estes, maior expressão nos grupos onde foi induzida a lesão de cárie em relação ao CN (onde não foi induzida lesão). Este achado demonstra claramente que sob condições patológicas, especialmente na doença infecciosa cárie, a matriz pulpar reage imediatamente no sentido de modular mecanismos que estimulem o reparo, quer seja diretamente à célula, quer seja indiretamente ativando mecanismos moleculares no complexo dentinopulpar.

Quanto à intensidade de expressão da FNC e TGF- β 1 existiram diferenças entre os materiais usados nos diferentes tempos. Aos três dias pós-tratamento a FNC demonstrou similar intensidade de expressão em relação ao Adesivo e ao OZE, porém aos 15 dias esta glicoproteína demonstrou no grupo OZE maior intensidade de expressão que o grupo Adesivo. Sabe-se que a fibronectina é importante para eventos celulares de migração, adesão, proliferação e diferenciação celular (Potts & Campbell, 1994). Farges *et al.* (1995) investigaram o papel desta molécula no reparo pulpar e baseados nos resultados sugeriram que a FNC está presente na dentina cariada humana para modular as características dos odontoblastos adjacentes a injúria, o que resultaria na produção de matriz dentinária. Assim, com base na literatura e em nossos

resultados imunoistoquímicos e morfológicos encontrados pode-se inferir que no grupo OZE aos 15 dias ainda houve a necessidade de estimular os odontoblastos, ou seja, pela necessidade de sobre-regular a secreção de matriz dentinária em maior quantidade que nos outros grupos. Este fenômeno provavelmente tenha ocorrido pela incapacidade do grupo OZE em diminuir a velocidade de progressão da lesão. Já, o grupo Adesivo demonstrou fatores positivos em relação à diminuição de progressão e em consequência disso este fenômeno não foi tão exacerbado neste período.

Em relação à OSN foi observado que houve a expressão desta proteína em locais de desgaste de cúspides do molar, independente de estar este dente comprometido pela lesão de cárie ou não (hígido). Este achado pode estar relacionado com o fenômeno da esclerose dentinária, ou seja, quando a dentina é exposta diretamente ao meio bucal mecanismos são estimulados para que ocorra a obliteração dos túbulos dentinários, através da deposição de minerais, sem, no entanto alterar o espaço pulpar (Katchburian & Arana, 2004); pois desta forma o tecido pulpar continuaria protegido, uma vez que seria impedida a entrada de microrganismos no interior do órgão. Esta hipótese, embora não esteja ainda relatada pela literatura ainda precisa ser melhor esclarecida em futuros trabalhos.

Diversas moléculas sinalizadoras têm sido consideradas capazes de induzir a produção de dentina terciária (Tziafas *et al.*, 1998; Smith, 2002; Farges *et al.*, 2003; Tziafas, 2004). Uma das mais estudadas atualmente é o Fator de Crescimento Transformador (TGF- β 1), o qual tem demonstrado ser um dos principais desencadeadores da diferenciação odontoblástica e também da sobre-regulação da dentina reacional (Smith, 2002), influenciando desta forma a defesa dentinopulpar.

Além dessas funções, lhe tem sido atribuído a capacidade de estimular a adesão celular, resposta imune e síntese de proteínas da ME (Xu *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2005; Wahl *et al.*, 2006). É reconhecido também que o TGF- β 1 tem função pró-inflamatória durante os períodos iniciais do processo inflamatório e anti-inflamatórios. As propriedades pró-inflamatórias do TGF- β 1 incluem

recrutamento de células do sistema imune, adesão, indução de secreção protéica (Wahl, 1999). Embora sua função estimulatória protéica tenha sido estudada, ainda pouco se sabe sobre o papel na resposta imune pulpar na doença cárie, ou seja, o quanto de estímulo é necessário ao TGF- β 1 para que seu acúmulo inativo presente na matriz dentinária se torne ativo.

De acordo com alguns autores (Zhao *et al.*, 2000) depois que esta molécula é afetada, quer seja por procedimentos ácidos da própria infecção cariosa, ela se dissolve através dos túbulos dentinários e chega até a polpa e sobre uma forma ativa desencadeia o processo de reparo, o qual deve incluir a produção de dentina reacional pelos odontoblastos e angiogênese (Smith, 2002). O TGF- β 1 ainda estimula a proliferação celular e secreção de COL I e OSN (Shiba *et al.*, 1998; Shiba *et al.*, 2001). Em nossas análises pudemos confirmar que a expressão de OSN se mostrou mais evidente nas amostras com a lesão de cárie, em regiões da camada odontoblástica e de dentina, então corroborando com o papel funcional do TGF- β 1 em induzir essas glicoproteínas, assim como outras tantas já descritas pela literatura.

Nossos resultados também demonstraram que a expressão de TGF- β 1 foi forte aos 3 dias no grupo Adesivo, ou seja, observou-se uma forte marcação na pré-dentina e moderada no tecido pulpar quando comparado com seu controle positivo e também ao grupo OZE do mesmo período. Este achado provavelmente esteja relacionado à capacidade do primer em desmineralizar a dentina. Esta capacidade é ofertada pelo MDP (monômero ácido do primer). Essa desmineralização da dentina, de certa forma, poderia colaborar para a liberação e ativação de moléculas de TGF- β 1. Em outros estudos, este fenômeno já está confirmando, por exemplo, utilizando o EDTA (Zhao *et al.*, 2000). Assim, a possível atividade do *primer* em dissolver moléculas de TGF- β 1 da dentina ainda necessita de melhores esclarecimentos em futuros estudos.

Em contra partida, é importante mencionar que estudos usando adesivos autocondicionantes em capeamentos pulpares, ou seja, diretamente sobre a polpa exposta têm sido contra-indicados, pois têm demonstrado quadro

de inflamação aguda, como também de necrose (Koliniotou-Koumpia & Tziafas, 2005; Silva *et al.*, 2006) ou ainda em algumas situações de não formação de dentina reparativa (Tziafas *et al.*, 2007). Oposto a isto, neste estudo o uso do sistema adesivo aplicado indiretamente sobre a polpa, apresentou resposta de reparo favorável, provavelmente pela ativação de TGF β -1, bem como ausência de necrose nos períodos analisados.

Outro aspecto a ser mencionado, é em relação à marcação dos componentes estudados em áreas de necrose dentino-pulpar, como foi o caso da OSN (figura 19D). É importante considerar que esta marcação pode ser um falso positivo, ou seja, em locais de área extensas de degradação podem existir muitos restos das próprias proteínas, especialmente no caso do próprio estudo onde foram empregados anticorpos policlonais, ou seja, anticorpos que se ligam a vários epítomos (local de ligação do antígeno ao seu anticorpo correspondente) de um mesmo antígeno. Por esse motivo, muitos pesquisadores ao trabalharem com o método imunoistoquímico têm utilizado como controle negativo um bloqueador, o qual é o próprio antígeno purificado. Entretanto, este método tem um custo elevado e no presente estudo não foi utilizado.

O método mais apropriado para avaliação das restaurações feitas sob remanescente cariado seria o clínico. Reportando na literatura existe o trabalho de Ribeiro *et al.* (1999). Os pesquisadores restauraram molares decíduos sem remover tecido cariado da dentina e condicionaram com o sistema adesivo pelo método condicionamento total diretamente sobre o tecido cariado e após um ano avaliaram radiograficamente as restaurações. Eles encontraram um aumento de 46% na radiopacidade e 30% permaneceram estáveis. Similar pesquisa realizada por Mertz-Fairhurst *et al.* (1998) avaliaram as restaurações adesivas em dentes humanos onde também tecido cariado foi deixado, e após 10 anos, os autores concluíram que estas lesões estavam clinicamente paralisadas. Recentemente, em outra avaliação clínica também de 10 anos Akimoto, Takamizu and Momoi (2007) obtiveram excelentes resultados com a remoção parcial da lesão cariosa

usando sistema adesivo autocondicionante previamente à restauração com compósito.

A grande vantagem do modelo animal empregado no presente estudo é a de que se pode juntar em uma mesma pesquisa o estudo clínico e morfológico, e embora não se possa extrapolar os resultados obtidos em pesquisas utilizando animais para humanos (Costa *et al.*, 2000), especialmente ratos onde o metabolismo é mais exacerbado do que em humanos; o não confronto com questões éticas, ou seja, da realização de um estudo clínico e morfológico através de um método padronizado de progressão de cárie, torna este modelo ainda mais atrativo para estimar as resposta do complexo dentina-polpa frente ao uso de diferentes materiais restauradores.

O uso direto do OZE em cavidades profundas sobre o remanescente cariado não é aconselhado pelos autores desde trabalho. Contudo, em relação ao emprego do sistema adesivo autocondicionante, embora não eficiente em capeamentos pulpaes diretos, mostra-se como uma boa alternativa de tratamento, tendo em vista não apenas os resultados biológicos encontrados neste estudo, mas também aliados ao que as avaliações clínicas têm demonstrado.

Conseqüentemente, em virtude das necessidades clínicas atuais, e fundamentado pelas evidências encontradas na literatura em relação aos aspectos morfológicos, como também na qualidade de expressão dos componentes da ME, é essencial que outros estudos sejam realizados para elucidar os eventos de reparo que se sucedem em longo prazo no complexo dentina-polpa depois de removida parcialmente a lesão de cárie.

CONCLUSÕES

Considerando o modelo utilizado neste estudo e suas limitações é possível concluir que:

Os resultados obtidos confirmam a importância dos componentes da ME estudados nos eventos que envolvem o reparo pulpar, como também a remineralização da matriz dentinária neoformada.

A inflamação no tecido pulpar potencializa a expressão de todos os componentes da matriz extracelular empregados em todos os períodos analisados.

O uso do sistema adesivo Clearfil SE Bond[®] sobre tecido pulpar previamente inflamado não desencadeou processo inflamatório agudo nem necrose pulpar, bem como ativou a formação de dentina reacional, sendo capaz de ser usado sob restaurações onde não se tem evidência clínica de exposição pulpar.

Referências⁷

- Akimoto N, Takamizu M, Momoi Y. 10-year clinical evaluation of a self-etching adhesive system. *Oper Dent*. 2007; 32(1): 3-10
- Alberts BJ, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P. *In: Molecular Biology of the Cell*. New York, NY, Garland Science, 2002: 1616.
- Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet JF. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. *J Endod*. 2000; 26(9): 525-8
- Bjorndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res*. 2000; 34(6): 502-8
- Bjorndal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res*. 1997; 31(6): 411-7
- Bjorndal L, Thylstrup A. A practice-based study on stepwise excavation of deep carious lesions in permanent teeth: a 1-year follow-up study. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1998; 26(2): 122-8
- Bouillaguet S. Biological Risks of Resin-Based Materials to the Dentin-Pulp Complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15(1): 47-60
- Bronckers AL, Lyaruu DM, Woltgens JH. Immunohistochemistry of extracellular matrix proteins during various stages of dentinogenesis. *Connect Tissue Res*. 1989; 22(1-4): 65-70
- Brown RC, Hopps HC. Staining of bacteria in tissue sections: a reliable gram stain method. *Am J Clin Pathol*. 1973; 60(2): 234-40
- Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol*. 1997; 42(3): 219-23

⁷ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH, Jeng JH. Effects of TGF-beta s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. Arch Oral Biol. 2005; 50(5): 469-79

Chiquet-Ehrismann R. What distinguishes tenascin from fibronectin? Faseb J. 1990; 4(9): 2598-604

Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. Dent Mater. 2000; 16(3): 188-97

de Lourdes Rodrigues Accorinte M, Reis A, Dourado Loguercio A, Cavalcanti de Araujo V, Muench A. Influence of rubber dam isolation on human pulp responses after capping with calcium hydroxide and an adhesive system. Quintessence Int. 2006; 37(3): 205-12

Elderton RJ, Nuttall NM. Variation among dentists in planning treatment. Br Dent J. 1983; 154(7): 201-6

Farges JC, Joffre A, Lesot H, Bleicher F, Magloire H. Immunocytochemical localization of fibronectin and a 165-kDa membrane protein in the odontoblast layer under initial carious lesions in man. Arch Oral Biol. 1995; 40(11): 1023-8

Farges JC, Romeas A, Melin M, Pin JJ, Lebecque S, Lucchini M, Bleicher F, Magloire H. TGF-beta1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. J Dent Res. 2003; 82(8): 652-6

Fisher LW, Termine JD. Noncollagenous proteins influencing the local mechanisms of calcification. Clin Orthop Relat Res. 1985; 200): 362-85

Fusayama T. The process and results of revolution in dental caries treatment. Int Dent J. 1997; 47(3): 157-66

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

Goldberg M, Lasfargues JJ. Pulpo-dentinal complex revisited. J Dent. 1995; 23(1): 15-20

Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: a Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15(1): 13-27

Grinnell F. Fibronectin and wound healing. J Cell Biochem. 1984; 26(2): 107-16

Handelman SL, Leverett DH, Solomon ES, Brenner CM. Use of adhesive sealants over occlusal carious lesions: radiographic evaluation. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1981; 9(6): 256-9

Hebling J, Giro EM, Costa CA. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent.* 1999; 27(8): 557-64

Hillmann G, Geurtsen W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. *Cell Tissue Res.* 1997; 289(1): 145-54

Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod.* 1998; 24(11): 744-51

Hume WR. In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Int Endod J.* 1988; 21(2): 130-4

Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater.* 2003; 19(6): 449-57

Inoue S, Vargas MA, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, Sano H, Van Meerbeek B. Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to dentin. *J Adhes Dent.* 2001; 3(3): 237-45

Kardos TB, Hunter AR, Hanlin SM, Kirk EE. Odontoblast differentiation: a response to environmental calcium? *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14(3): 105-11

Katchburian E, Arana V. *In: Histologia e Embriologia Oral.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004: 372.

Keyes PH. Dental caries in the molar teeth of rats. II. A method for diagnosing and scoring several types of lesions simultaneously. *J Dent Res.* 1958; 37(6): 1088-99

Keyes PH. Present and future measures for dental caries control. *J Am Dent Assoc.* 1969; 79(6): 1395-404

Kidd E. The Cartwright Prize. Caries removal and the pulpo-dentinal complex. *Dent Update.* 2000; 27(10): 476-82

Kidd EA. How 'clean' must a cavity be before restoration? *Caries Res.* 2004; 38(3): 305-13

King JB, Jr., Crawford JJ, Lindahl RL. Indirect pulp capping: a bacteriologic study of deep carious dentine in human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 20(5): 663-9

Koliniotou-Koumpia E, Tziafas D. Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent*. 2005; 33(8): 639-47

Lee YL, Liu J, Clarkson BH, Lin CP, Godovikova V, Ritchie HH. Dentin-pulp complex responses to carious lesions. *Caries Res*. 2006; 40(3): 256-64

Leksell E, Ridell K, Cvek M, Mejare I. Pulp exposure after stepwise versus direct complete excavation of deep carious lesions in young posterior permanent teeth. *Endod Dent Traumatol*. 1996; 12(4): 192-6

Lesot H, Fausser JL, Akiyama SK, Staub A, Black D, Kubler MD, Ruch JV. The carboxy-terminal extension of the collagen binding domain of fibronectin mediates interaction with a 165 kDa membrane protein involved in odontoblast differentiation. *Differentiation*. 1992; 49(2): 109-18

Liao H, Brandsten C, Lundmark C, Christersson C, Wurtz T. Osteonectin RNA and collagen alpha1(I) RNA in the developing rat maxilla. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106 Suppl 1(418-23

Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec*. 1989; 224(2): 154-66

Linde A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *J Dent Res*. 1985; 64 Spec No(523-9

Magloire H, Bouvier M, Joffre A. Odontoblast response under carious lesions. *Proc Finn Dent Soc*. 1992; 88 Suppl 1(257-74

Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int*. 2002; 33(2): 151-9

Martinez EF, Machado de Souza SO, Correa L, Cavalcanti de Araujo V. Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. *J Endod*. 2000; 26(12): 708-11

Massara ML, Alves JB, Brandao PR. Atraumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. *Caries Res*. 2002; 36(6): 430-6

Mertz-Fairhurst EJ, Curtis JW, Jr., Ergle JW, Rueggeberg FA, Adair SM. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Am Dent Assoc*. 1998; 129(1): 55-66

Mertz-Fairhurst EJ, Schuster GS, Fairhurst CW. Arresting caries by sealants: results of a clinical study. *J Am Dent Assoc.* 1986; 112(2): 194-7

Mjor IA, Dahl E, Cox CF. Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20(10): 496-501

Mohri H. Fibronectin and integrins interactions. *J Investig Med.* 1996; 44(8): 429-41

Moreno Gonzalez JP, Barberia Leache E, Andres Corada MC. [Review of the demineralization-remineralization process]. *Rev Esp Estomatol.* 1983; 31(4): 237-46

Murray PE, About I, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Restorative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc.* 2001; 132(4): 482-91

Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Windsor LJ, Smith AJ. Odontoblast morphology and dental repair. *J Dent.* 2003; 31(1): 75-82

Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjaderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(2): 160-6

Ogushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res.* 1975; 54(5): 1019-26

Oliveira EF, Carminatti G, Fontanella V, Maltz M. The monitoring of deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: results after 14-18 months. *Clin Oral Investig.* 2006; 10(2): 134-9

Pinto AS, de Araujo FB, Franzon R, Figueiredo MC, Henz S, Garcia-Godoy F, Maltz M. Clinical and microbiological effect of calcium hydroxide protection in indirect pulp capping in primary teeth. *Am J Dent.* 2006; 19(6): 382-6

Potts JR, Campbell ID. Fibronectin structure and assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; 6(5): 648-55

Reichert T, Storkel S, Becker K, Fisher LW. The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tissue Int.* 1992; 50(5): 468-72

Ribeiro CC, Baratieri LN, Perdigao J, Baratieri NM, Ritter AV. A clinical, radiographic, and scanning electron microscopic evaluation of adhesive restorations on carious dentin in primary teeth. *Quintessence Int.* 1999; 30(9): 591-9

Ricketts D. Management of the deep carious lesion and the vital pulp dentine complex. *Br Dent J*. 2001; 191(11): 606-10

Ricketts DN, Kidd EA, Innes N, Clarkson J. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; 3(CD003808)

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(11): 1013-6

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987; 238(4826): 491-7

Santos MC, de Souza AP, Gerlach RF, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Line SR. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. *J Oral Rehabil*. 2004; 31(7): 660-4

Santos MC, Souza AP, Gerlach RF, Tabchoury CM, Line SR. Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing. *Br J Dermatol*. 2001; 145(5): 854-5

Schroder FW. [Remineralization as a natural repair process of teeth]. *Quintessenz J*. 1986; 16(10): 975-84

Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol*. 1991; 36(2): 117-28

Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol*. 1998; 174(2): 194-205

Shiba H, Uchida Y, Kamihagi K, Sakata M, Fujita T, Nakamura S, Takemoto T, Kato Y, Kurihara H. Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res*. 2001; 80(7): 1653-9

Shimada Y, Kawashima M, Higashi T, Foxton RM, Tagami J. Histologic evaluation of adhesive restorations on dentin caries in rat molar teeth. *Quintessence Int*. 2004; 35(3): 200-5

Silva GA, Lanza LD, Lopes-Junior N, Moreira A, Alves JB. Direct pulp capping with a dentin bonding system in human teeth: a clinical and histological evaluation. *Oper Dent*. 2006; 31(3): 297-307

Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res*. 2002; 36(4): 223-32

Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106 Suppl 1(179-84

Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res*. 2001; 15(51-4

Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Plant CG, Browne RM, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Arch Oral Biol*. 1994; 39(1): 13-22

Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S. Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem*. 1994; 42(7): 885-96

Takita K, Ohsaki Y, Nakata M, Kurisu K. Immunofluorescence localization of type I and type III collagen and fibronectin in mouse dental tissues in late development and during molar eruption. *Arch Oral Biol*. 1987; 32(4): 273-9

Tay FR, Carvalho R, Sano H, Pashley DH. Effect of smear layers on the bonding of a self-etching primer to dentin. *J Adhes Dent*. 2000; 2(2): 99-116

Ten Cate R. *In: Histologia Bucal. Desenvolvimento, estrutura e função*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001: 439.

Termine JD, Robey PG, Fisher LW, Shimokawa H, Drum MA, Conn KM, Hawkins GR, Cruz JB, Thompson KG. Osteonectin, bone proteoglycan, and phosphophoryn defects in a form of bovine osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; 81(7): 2213-7

Thesleff I, Mackie E, Vainio S, Chiquet-Ehrismann R. Changes in the distribution of tenascin during tooth development. *Development*. 1987; 101(2): 289-96

Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Aberg T. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res*. 1995; 32(1-4): 9-15

Thylstrup A, Vinther D, Christiansen J. Promoting changes in clinical practice. Treatment time and outcome studies in a Danish public child dental health clinic. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997; 25(1): 126-34

Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry--a review. FDI Commission Project 1-97. *Int Dent J.* 2000; 50(1): 1-12

Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res.* 2004; 38(3): 314-20

Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, Ruch JV. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol.* 1995a; 40(10): 883-93

Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor-beta 1 on dog dental pulp cells in vivo. *Arch Oral Biol.* 1998; 43(6): 431-44

Tziafas D, Belibasakis G, Veis A, Papadimitriou S. Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles. *Adv Dent Res.* 2001; 15(96-100)

Tziafas D, Koliniotou-Koumpia E, Tziafa C, Papadimitriou S. Effects of a new antibacterial adhesive on the repair capacity of the pulp-dentine complex in infected teeth. *Int Endod J.* 2007; 40(1): 58-66

Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Komnenou A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol.* 1995b; 40(1): 23-31

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000; 28(2): 77-92

Unda FJ, Martin A, Hernandez C, Perez-Nanclares G, Hilario E, Arechaga J. FGFs-1 and -2, and TGF beta 1 as inductive signals modulating in vitro odontoblast differentiation. *Adv Dent Res.* 2001; 15(34-7)

Wahl SM. TGF-beta in the evolution and resolution of inflammatory and immune processes. Introduction. *Microbes Infect.* 1999; 1(15): 1247-9

Wahl SM, Orenstein JM, Chen W. TGF-beta influences the life and death decisions of T lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000; 11(1-2): 71-9

Wahl SM, Wen J, Moutsopoulos N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev.* 2006; 213(213-27

Weerheijm KL, de Soet JJ, van Amerongen WE, de Graaff J. Sealing of occlusal hidden caries lesions: an alternative for curative treatment? *ASDC J Dent Child.* 1992; 59(4): 263-8

Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J Pathol.* 1996; 179(3): 321-5

Xu Z, Shen MX, Ma DZ, Wang LY, Zha XL. TGF-beta1-promoted epithelial-to-mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF-beta1-enhanced cell migration in SMMC-7721 cells. *Cell Res.* 2003; 13(5): 343-50

Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem.* 1999; 47(12): 1495-506

Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res.* 1996; 75(8): 1590-7

Yurchenco PD, Ruben GC. Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol.* 1987; 105(6 Pt 1): 2559-68

Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J.* 2000; 32(8): 489-94

ANEXO 1 – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **625-2**, sobre **"EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR À APLICAÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS APÓS REMOÇÃO DE CÁRIE EM DENTINA PROFUNDA"** sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Silvana Pereira Barros / Adriana Fernandes da Silva** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 03 de Junho de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **625-2**, entitled **"IMMUNOLOCALIZATION OF COMPONENTS EXTRACELLULAR MATRIX TO TREAT DIFFERENT AFTER REMOVAL INCOMPLETE CARIES IN DEEP DENTIN"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 3, 2004.

Campinas, 03 de Junho de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
13081-970 - CAMPINAS - CO - RJACIT

TELEFONE 55 19 3788-6359
FAX 55 19 32893124

ANEXO 2 – Índices obtidos em cada critério

DS_CN3	DS_CN15	DS_Ic3	DS_Ie3	DS_Ic15	DS_Ie15	DS_Ac3	DS_Ae3	DS_Ac15	DS_Ae15
0	0	1	3	3	3	1	1	3	3
0	0	1	1	3	2	1	1	3	1
0	0	1	1	2	2	2	1	2	2
0	0	1	1	2	3	1	1	3	1
0	0	0	1	2	1	1	1	2	1
0	0	1	1	2	1	1	2	3	2
0	0	1	1	3	1	1	0	2	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	3	0	1	1	2	1
0	0		3	2	1	1	1	2	1

DR_CN3	DR_CN15	DR_Ic3	DR_Ie3	DR_Ic15	DR_Ie15	DR_Ac3	DR_Ae3	DR_Ac15	DR_Ae15
1	1	3	3	3	3	3	2	3	3
1	1	3	3	3	3	2	3	3	3
1	1	3	2	3	3	3	3	3	3
1	1	3	3	3	3	3	2	3	3
1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
1	1	3	2	3	3	3	3	3	3
1	1	3	3	3	3	3	2	3	2
1	1	3	3	3	3	3	2	3	3
1	1	2	3	3	3	3	3	3	3
1	1		3	3	3	3	3	3	3

Inf_C_3	Inf_C_15	Inf_Ic3	Inf_Ie3	Inf_Ic15	Inf_Ie15	Inf_Ac3	Inf_Ae3	Inf_Ac15	Inf_Ae15
0	0	1	3	3	3	1	1	2	3
0	0	1	1	1	1	1	1	2	1
0	0	1	1	2	2	1	2	1	1
0	0	1	1	1	3	1	0	3	0
0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
0	0	1	2	1	1	0	1	2	2
0	0	1	1	1	1	0	0	2	0
0	0	0	2	1	1	1	0	3	1
0	0	0	0	2	0	0	0	1	0
0	0		3	2	0	0	0	2	1

TP_CN3	TP_CN15	TP_Ic3	TP_Ie3	TP_Ic15	TP_Ie15	TP_Ac3	TP_Ae3	TP_Ac15	TP_Ae15
0	0	1	2	1	3	1	1	1	3
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	2	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0		1	1	1	1	1	1	

ANEXO 3 – Componentes da dieta 2000 empregada no estudo

Componentes	g
Fígado dissecado	10
Sal iodado	20
Alfafa	30
Extrato de levedura	40
Farinha de trigo integral	60
Leite em pó desnatado	280
Sacarose	560
Quantidade total	1000

ANEXO 4- Curva de calibração para análise de flúor na placa pelo método de microdifusão (Taves)

Padrão	vol. mL	ppm F	log [F]	mV	log [F] calc.	ppm F Calc.	c.v. %
0.050	0.4	0.125	-0.903	136.5	-0.900	0.126	0.6
0.100	0.4	0.25	-0.602	119.1	-0.606	0.248	-1.0
0.250	0.4	0.625	-0.204	93.5	-0.174	0.671	6.8
0.500	0.4	1.25	0.097	80.3	0.049	1.121	-11.5
1.000	0.4	2.5	0.398	58.6	0.416	2.608	4.1
2.000	0.4	5	0.699	40.3	0.726	5.315	5.9

intercepção	1.407		inclinação	-0.0169
		RQUAD.	0.99676	

	ppmF	mV	vol.mL	ppm F esp	log [F] calc.	ppm F calc.	C.V. %
Blank	0	166.3	0.4	0	-1.404	0.04	
Teste	0.4	80.9	0.4	1	0.039	1.09	
Teste	0.4	81.5	0.4	1	0.029	1.07	
					média	1.08	-8.22

	Primeira	Segunda	Terceira	Média
Blank	169.1	161.1	168.8	166.3
0.025	148.8	145.2	145.7	146.6
0.050	135.0	131.8	142.8	136.5
0.10	120.9	118.2	118.2	119.1
0.25	94.6	93.4	92.4	93.5
0.50	80.2	83.9	76.8	80.3
1.00	58.9	59.0	58	58.6
2	41.1	39.4	40.5	40.3
Teste	80.9	80.9	81.5	81.1

Continuação anexo 4

Grupo	mV	log [F] calc.	ppm F calc.	ug F amostra	peso (g)	µg F/ g amostra
sal 1	92.5	-0.157	0.697	0.279	0.2283	1.22
sal 2	95.4	-0.206	0.623	0.249	0.2109	1.18
sal 3	92.8	-0.162	0.689	0.276	0.2109	1.31
lev 1	106.1	-0.387	0.411	0.164	0.2013	0.82
lev 2	106.1	-0.387	0.411	0.164	0.2085	0.79
lev 3	105.2	-0.371	0.425	0.170	0.2099	0.81
far 1	168.2	-1.436	0.037	0.015	0.2214	0.07
far 2	163.9	-1.363	0.043	0.017	0.2109	0.08
far 3	163.7	-1.360	0.044	0.017	0.2147	0.08
acu 1	165.8	-1.395	0.040	0.016	0.1921	0.08
acu 2	165.5	-1.390	0.041	0.016	0.1998	0.08
acu 3	130.7	-0.802	0.158	0.063	0.2037	0.31
leit 1	129.7	-0.785	0.164	0.066	0.2048	0.32
leit 2	131.5	-0.816	0.153	0.061	0.2021	0.30
leit 3	131.9	-0.823	0.150	0.060	0.2017	0.30
fig 1	68.1	0.256	1.802	0.721	0.1991	3.62
fig 2	68.2	0.254	1.795	0.718	0.2019	3.56
fig 3	82.0	0.021	1.049	0.420	0.2073	2.02
alfa 1	110.1	-0.454	0.351	0.141	0.1914	0.73
alfa 2	111.5	-0.478	0.333	0.133	0.1999	0.67
alfa 3	111.9	-0.485	0.328	0.131	0.1958	0.67