

LUIZA DE ALMEIDA QUEIROZ FERREIRA

**MÉTODOS QUIMIOMECÂNICOS NO TRATAMENTO DE LESÕES
CARIOSAS PROFUNDAS: UM ESTUDO *IN VITRO***

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2021**

Luiza de Almeida Queiroz Ferreira

**MÉTODOS QUIMIOMECÂNICOS NO TRATAMENTO DE LESÕES
CARIOSAS PROFUNDAS: UM ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ivana Márcia Alves Diniz

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mila Fernandes Moreira Madeira

Coorientador: Prof. Dr. Allyson Nogueira Moreira

Belo Horizonte
2021

Ficha Catalográfica

F383m Ferreira, Luiza de Almeida Queiroz.
2021 Métodos quimiomecânicos no tratamento de lesões cárias profundas: um estudo in vitro / Luiza de Almeida Queiroz Ferreira. -- 2021.

T

101 f. : il.

Orientadora: Ivana Márcia Alves Diniz.
Coorientadora: Mila Fernandes Moreira Madeira.
Coorientador: Allyson Nogueira Moreira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Anti-infecciosos. 2. Cárie dentária. 3. Fotoquimioterapia. 4. Lactobacillus casei. 5. Streptococcus mutans. I. Diniz, Ivana Márcia Alves. II. Madeira, Mila Fernandes Moreira. III. Moreira, Allyson Nogueira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. V. Título.

BLACK - D047



FOLHA DE APROVAÇÃO

MÉTODOS QUIMIOMECÂNICOS NO TRATAMENTO DE LESÕES CARIOSAS PROFUNDAS: UM ESTUDO IN VITRO

LUIZA DE ALMEIDA QUEIROZ FERREIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Clínica Odontológica.

Aprovada em 27 de julho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Ivana Márcia Alves Diniz

Prof(a). Ivana Márcia Alves Diniz – Orientadora
FO-UFMG

Mila Fernandes Moreira Madeira

Prof(a). Mila Fernandes Moreira Madeira
UFMG

Giovanna Ribeiro Souto

Prof(a). Giovanna Ribeiro Souto
PUC-MINAS

Carolina Bosso Andre

Prof(a). Carolina Bosso Andre
UFMG

Belo Horizonte, 27 de julho de 2021.

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em 09 / 08 /2021.

Isabela Almeida Pordeus

Prof^á. Isabela Almeida Pordeus
Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG

Para D. Luzia e Sr. Bombeiro, luzes que me guiam.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Cibele e Gerson, por acreditarem e principalmente, por confiarem em mim. Obrigada por me darem a liberdade e o suporte para realizar os meus sonhos, por mais ousados que eles fossem. Por compreender todo o tempo passado longe de casa e o meu desejo de passar mais tempo estudando, mas cada voo que eu alcei foi porque vocês permitiram. Eu me orgulho tanto de vocês, por incentivarem a minha educação e a da minha irmã, nos ensinar a serem honestas e a seguir em frente. Vocês são guerreiros, e a ânsia que tenho de conquistar meu lugar vem de vocês. Sempre os carregarei e seus ensinamentos junto ao meu coração. Vocês são o meu mundo e as luzes do meu caminho.

À Luana, minha irmã, minha outra metade e meu porto seguro. Você é a melhor parte de mim, a que mais me orgulho e nada seria possível sem você ao meu lado. Obrigada por me fazer ser mais feliz, mais honesta, menos egoísta e por trilhar este caminho junto comigo. Por me reconhecer, sempre, e me aceitar como sou, mesmo quando duvidei de mim mesma. Por ser meu ponto de equilíbrio no início e nos fins dos dias. Cada passo de toda a minha caminhada, seja ela profissional ou pessoal, foi dado de forma significativa, pois eu a tenho ao meu lado. Se há alguém capaz de me fazer ser melhor, esta pessoa é você. A vida é melhor contigo.

À Ivana Márcia Alves Diniz, minha orientadora, e quando digo orientadora o faço na essência da palavra. Você me ensinou o que nunca sonhei em aprender e o fez com cuidado, delicadeza, dedicação e respeito. Obrigada por me acolher, compreender minhas dificuldades, confiar em mim, e me cobrar nos meus pontos fracos, me fazendo crescer durante essa jornada. Além disto, obrigada por percorrer este caminho, tão especial para mim, junto comigo. Obrigada pela linda amizade que construímos, pelo companheirismo e carinho. Ao seu lado tudo ocorreu com fluidez e com amor. Você, sem dúvidas, é um exemplo de inspiração para continuar essa longa caminhada, e meu exemplo que a pesquisa, a clínica e a docência podem sim caminhar juntas. Carregarei você e seus ensinamentos junto comigo, sempre.

Aos meus coorientadores, Prof. Allyson Nogueira Moreira e Prof.^a Mila Fernandes Moreira Madeira, pelos aprendizados, dedicação e pelo carinho dispensados durante à realização deste trabalho. Mila, meu muito obrigada por abrir às portas do seu laboratório a mim, pelo carinho ao me convidar para as reuniões de laboratório, pela disposição ao me ensinar e me auxiliar sempre que foi preciso nesta jornada.

À Rogéli Tibúrcio Ribeiro da Cunha Peixoto, minha amiga, meu anjo, companheira de caminhada e meu exemplo. Nunca me esquecerei que os primeiros passos rumo a esta jornada foram dados ao seu lado. Obrigada por regar todos os meus sonhos, quando eles eram meras sementinhas, e por estar ao meu lado quando eu acreditava que as coisas não dariam certo. Obrigada por me ensinar, sempre, que quando nossos atos são repletos de amor e dedicação eles tendem a dar certo.

As professoras da área de Clínica, Prof.^a Amália e Prof.^a Soraia, pelos ensinamentos durante as disciplinas. Um agradecimento especial, a Prof.^a Cláudia Silami de Magalhães pelas oportunidades de crescimento, pelos ensinamentos e pela extrema dedicação, calma e prontidão em me auxiliar em tudo o que foi preciso.

À professora Marina Diniz que nesta reta final doou tanto do seu tempo para este trabalho. Foi um prazer aprender com você e sou grata por toda a ajuda para que conseguíssemos realizar o ensaio de zimografia.

Agradeço, em especial, a Prof.^a Maria Inês Barreiros Senna. Esse caminho foi mais fácil, porque você me preparou para este momento, sempre dispensando seu tempo ao me ensinar.

À Prof.^a Carolina Martins por compartilhar seu conhecimento sobre revisões sistemáticas e me orientar na condução da revisão sobre o tema. Nosso trabalho permitiu um entendimento maior sobre os resultados deste estudo.

À Prof.^a Sílvia Ferreira por abrir as portas do seu laboratório no momento da pandemia, para que eu pudesse finalizar os meus experimentos.

Também aos professores Ricardo Gomez e Tarcília Silva por permitirem a utilização dos seus laboratórios em determinados experimentos.

Ao Professor Thadeu Poletto que gentilmente abriu as portas de seu consultório inúmeras vezes para me ceder a água ozonizada utilizada nos experimentos.

À Natália e ao Humberto, neste mestrado eu ganhei de presente dois irmãos, vocês. A companhia dos dois tornaram os meus dias melhores e mais felizes. Obrigada pelo companheirismo, pelas ligações e por estarem sempre presentes, seja nos momentos de diversão ou nos finais dos dias cansativos. Eu, com certeza, aprendi muito com vocês e levarei os dois comigo.

Ao grupo de pesquisa, por me acolherem e me ensinarem. Obrigada pelos momentos que tornaram essa jornada mais leve e por dividir as responsabilidades durante à execução dos trabalhos. Em especial, agradeço à Luiza Diniz e a Rafaela Férrer pela prontidão em me auxiliar e me ouvir, sempre. E a Karen por aceitar a minha colaboração em seu Trabalho de Conclusão de Curso.

As minhas amigas de longa data, Mariana, Raís, Bárbara e Thainá, por crescermos juntas e mesmo passando tempos longes, saber que vocês sempre estarão lá para me divertir, aconselhar e me fazer seguir em frente. Obrigada por acreditarem tanto em mim e me ensinar o que amizade significa.

Ao Pedro, meu outro verdadeiro anjo. Obrigada por acreditar em mim mais do que eu mesma. Por dividir comigo os melhores momentos, meus sonhos, me dar os mais sábios conselhos e nunca me deixar desistir. Obrigada por ser minha pessoa.

À Lorrany, Isadora e Ana Cláudia, companheiras de outras caminhadas.

À Bruna, Renata, meus padrinhos e tios. Obrigada por torcerem por mim nessa jornada.

À minha casa, a Escola de Odontologia, onde eu me encontrei, descobri todos os meus anseios e identifiquei onde eu pertenceo neste mundo. Obrigada por fazer meus sonhos tomar vida e se realizarem.

Ao Thales Anestino, obrigada por me auxiliar na redescoberta do mundo da microbiologia. Grande parte deste trabalho só foi possível por você me auxiliar nos experimentos.

Ao Abatedouro Frigorífico Dimeza Alimentos por permitir e abrir seu espaço para que fosse possível a realização da extração dos dentes bovinos.

À CDTN pela prontidão em esterilizar as amostras, todas as vezes em que foi necessário, para que os experimentos pudessem ser realizados.

Ao Centro de Microscopia por analisar as amostras em tempo hábil para finalização deste trabalho.

Aos técnicos da Faculdade de Odontologia, Bruno e Fernanda, e a Gil do ICB. Meu muito obrigada pelo auxílio para que os experimentos ocorressem.

Ao Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa da coordenadora, Professora Isabela Almeida Pordeus, pela condução do nosso programa de excelência, junto ao professor Mauro Nogueira. Um agradecimento também a sua secretaria, pela prontidão em me auxiliar sempre que foi necessário.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio institucional aos Programas de Pós-Graduação da UFMG na condução de suas pesquisas. Em especial, à FAPEMIG, pela bolsa concedida que permitiu minha dedicação exclusiva a Pós-Graduação.

“É a vida que importa, nada além da vida, o processo da descoberta, perene, perpétuo processo.”

Virginia Woolf

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar as propriedades antimicrobianas de substâncias utilizadas em métodos quimiomecânicos e seus efeitos na dentina e em células pulpares. Uma lesão de cárie artificial em dentina foi desenvolvida em cavidades padronizadas realizadas em dentes bovinos com amostras de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Lactobacillus casei* (ATCC 7463). As cavidades foram tratadas de acordo com os grupos: G1 - Tampão Fosfato-Salino (PBS); G2 - Clorexidina (CHX); G3 - Papacárie®; G4 - Água ozonizada (O₃) e G5 - Terapia Fotodinâmica (PDT). O depósito microbiano coletado foi diluído e cultivado para obtenção de colônias isoladas na técnica *pour-plate*. A atividade de metaloproteinases dentinárias gelatinases (MMP-2 e MMP-9) foi avaliada pelo ensaio de zimografia qualitativamente. A viabilidade celular foi avaliada em células pulpares após 24, 72 e 120h e a osteodiferenciação após 10 dias. A CHX e PDT apresentaram redução bacteriana em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$). O tratamento feito com PBS, CHX e PDT apresentou atividade gelatinolítica após o tratamento para as MMP-2 e MMP-9. A viabilidade celular reduziu em 120 h para todos os grupos em relação ao controle. CHX, O₃ e PDT induziram maior osteodiferenciação em relação ao PBS e ao Papacárie. Concluiu-se que CHX e PDT promoveram leve diminuição da carga bacteriana na lesão cáries artificial. Todos os tratamentos causaram, em parte, atividade gelatinolítica, por meio da expressão de MMP-2 e MMP-9. Apesar de diminuírem a viabilidade celular, nenhum tratamento interferiu com a diferenciação das células pulpares. A utilização dos métodos quimiomecânicos testados resultou em baixa redução bacteriana nas lesões cáries artificiais. Concomitantemente, alguns desses tratamentos podem ativar metaloproteinases e interferir com funções essenciais de células pulpares.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Cárie dentária. Fotoquimioterapia. *Lactobacillus casei*. Metaloproteinase. Mineralização. Ozônio. Papáina. *Streptococcus mutans*. Viabilidade celular.

ABSTRACT

This work aimed to investigate the antimicrobial properties of substances used in chemo mechanical methods and their effects on dentin and pulp cells. An artificial caries lesion was developed in standardized cavities performed in bovine teeth with strains of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Lactobacillus casei* (ATCC 7463). The cavities were treated according to the following groups: G1 - Phosphate Buffer Saline (PBS); G2 - Chlorhexidine (CHX); G3 – Papacárie®; G4 - Ozonized water (O₃) and G5 - Photodynamic Therapy (PDT). A microbial sample was collected, diluted, and cultivated to obtain isolated colonies through pour-plate technique. The activity of dentin gelatinase metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) was qualitatively evaluated by zymography assay. Cell viability was evaluated in pulp cells after 24, 72, and 120h and osteodifferentiation after 10 days. CHX and PDT caused bacterial reduction compared to the other groups ($p < 0.05$). PBS, CHX, and PDT showed gelatinolytic activity through the expression of MMP-2 and MMP-9. Cell viability was reduced at 120 h for all groups in comparison to control. CHX, O₃, and PDT induced greater osteodifferentiation compared to PBS and Papacárie®. It was concluded that CHX and PDT promoted a slight decrease in bacterial load in the artificial carious lesion. All treatments caused, in part, gelatinolytic activity, through the expression of MMP-2 and MMP-9. Despite decreasing cell viability, no treatment interfered with the differentiation of pulp cells. The use of chemo mechanical methods has a slight biological significance in reduction of bacterial load in artificial carious lesions. In addition, some of these treatments can activate metalloproteinases and interfere with essential pulp cell functions.

Keywords: Cell viability. Disinfectants. Dental caries. *Lactobacillus casei*. Metalloproteases. Mineralization. Papain. Photodynamic therapy. *Streptococcus mutans*. Ozone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Preparo inicial dos dentes.....	31
Figura 2 – Dispositivos utilizados na padronização do preparo cavitário.....	32
Figura 3 - Preparo Cavitário Padronizado	33
Figura 4 – Dente posicionado dentro de tubo Falcon com a superfície de interesse em contato com o inóculo.....	35
Figura 5 – Dispositivo de Câmara Pulpar Artificial.....	41
Figura 6 – Radiografia confirmando desmineralização de parte da dentina após indução da lesão cariiosa artificial.....	44
Gráfico 1 – Análise antimicrobiana expressa em Log CFU/mL para os grupos experimentais.....	44
Figura 7 - Representação da atividade gelatinolítica.....	46
Figura 8 – Imagens representativas de um dente hígido e da lesão cariiosa artificial.....	47
Figura 9 – Imagens representativas da dentina para cada grupo experimental.....	49
Gráfico 2 - Viabilidade celular para os tratamentos em 24, 48 e 120 h.....	51
Figura 10 - Coloração de AZR para verificação da osteodiferenciação.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padronização da concentração bacteriana para inóculo	34
Tabela 2 - Distribuição dos grupos e forma de aplicação do tratamento.....	35
Tabela 3 - Atividade gelatinolítica após tratamento para as MMP-2 e MMP-9.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI *Brain Heart Infusion*

Ca Cálcio

CHX Clorexidina

CM² Centímetro Quadrado

DMEM *Dulbecco's Modified Essential Medium*

DO Densidade Óptica

EDTA *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

J Joules

MEC Matriz Extracelular

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

MMPs Metaloproteinases

MRS *De Man Rogosa & Sharpe*

mW Miliwatts

NM Nanômetros

OMI Odontologia Minimamente Invasiva

PDT *Photodynamic Therapy*

RIPA *Radioimmunoprecipitation Buffer*

TIMPs *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*

UFC Unidade Formadora de Colônia

Zn Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Cárie dentária e remoção do tecido cariado.....	19
2.2 Aspectos da Dentina	21
2.3 Agentes antimicrobianos e método quimiomecânico	23
2.3.1 Clorexidina (CHX)	24
2.3.2 Terapia Fotodinâmica	24
2.3.3 Papaína.....	26
2.3.4 Ozônio	26
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 METODOLOGIA	20
4.1 Cálculo amostral	30
4.2 Seleção, limpeza e armazenamento dos dentes	30
4.3 Preparo dos dentes	31
4.4 Análise Antimicrobiana	33
4.4.1 Desenvolvimento do inóculo e cultivo bacteriano	33
4.4.2 Indução da Lesão Cariosa Artificial	34
4.4.3 Antissepsia das cavidades e teste microbiológico	35
4.5 Zimografia	37
4.6.1 Extração da amostra.....	37
4.6.2 Extração de proteínas.....	37
4.7 Citotoxicidade	39
4.7.1 Isolamento das Células Pulpaes de Dentes Decíduos Humanos	39
4.7.2 Confeção dos discos.....	40
4.7.3 Cultura Celular	41
4.7.4 Aplicação das substâncias antimicrobianas	42
4.7.6 Viabilidade Celular	42
4.7.7 Mineralização	42
4.8 Análise estatística	43
5 RESULTADOS	34
5.1 Lesão Cariosa Artificial.....	44
5.2 Análise Antimicrobiana	44

5.3 Zimografia	45
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	46
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE A	72
APÊNDICE B.....	72
APÊNDICE C	78
ANEXO 1.....	80

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que afetam os tecidos dentais, a cárie dentária é a mais prevalente, mundialmente, e, geralmente, resulta na redução da qualidade de vida (PERES et al., 2019; WATT et al., 2019). A cárie dentária é uma doença que resulta de uma disbiose da microbiota bucal e é caracterizada pela desmineralização da estrutura dentária (MACHIULSKIENE et al., 2019).

No estudo epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde em 2010 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), apesar do Brasil apresentar uma diminuição de indivíduos livres de cárie, os índices apontam que, para crianças e adolescentes, o principal problema refere-se à cárie não tratada, enquanto, em adultos e idosos, a perda dentária em decorrência da cárie é o problema mais prevalente. O componente obturado do índice CPO – que avalia o número de dentes cariados (C), perdidos (P) e obturados (O) – cresceu em termos relativos, evidenciando o maior acesso da população ao serviço odontológico. No entanto, quando não tratadas, as lesões cáries progredem para cavitações, desconforto, dor e, eventualmente, perda dentária.

A dentina é um tecido vital, pois contém processos odontoblásticos capazes de captar sinais de estímulos físicos, químicos e biológicos. Quando na presença de danos, como o processo cariogênico, este tecido possui uma reação de defesa, que consiste na deposição de conteúdo mineral dentro dos túbulos dentinários, chamada esclerose tubular. Outra forma de reação da dentina aos danos é a produção da dentina reacional, que se inicia-se mesmo antes de ocorrer a progressão da lesão cáries para a dentina (KIDD; FEJERSKOV, 2004). Ou seja, a dentina é um tecido capaz de responder aos danos decorrentes da lesão cáries, como também de se remineralizar (YOSHIHARA et al., 2020). Em última análise, essas reações são relevantes para a proteção do tecido pulpar subjacente.

As lesões cáries em dentina consistem em duas camadas e estas apresentam diferentes propriedades. A mais externa, ou primeira, é altamente desmineralizada e não passível de remineralização. É denominada dentina infectada e apresenta distorção na estrutura dos túbulos dentinários, desnaturação das fibras colágenas e uma extensa invasão bacteriana. A mais interna apresenta desmineralização intertubular, sendo, portanto, passível de remineralização e recuperação do dano decorrente do processo cariogênico. Esta dentina é considerada afetada, apresentando deposição de cristais de minerais nos túbulos dentinários, mínima destruição da matriz de colágeno e possui uma penetração bacteriana significativamente menor quando

comparada à dentina infectada. (BANERJEE, 2018; HAMAMA; YIU; BURROW, 2014; KUBOKI; LIU; FUSAYAMA, 1983).

Para fins de conservação da estrutura dental, a remoção menos invasiva – ou seletiva – do tecido cariado foi proposta para a paralisação das lesões de cárie, particularmente naquelas que acometem profundamente a dentina. Considerando-se a Odontologia Minimamente Invasiva (OMI), a camada interna da lesão cariada, ou seja, a dentina afetada, deve ser mantida para, conseqüentemente, reduzir o risco de exposição pulpar e induzir uma reação protetora do complexo dentina-polpa (SCHWENDICKE; PARIS; TU, 2015).

Ao colocar em prática esta filosofia, os aspectos funcionais e estéticos das restaurações também devem ser considerados. Uma abordagem minimamente invasiva, removendo-se principalmente a dentina infectada, irá conservar significativamente a estrutura dentária para reter e suportar uma restauração com margens adequadas. Atualmente, com o advento de materiais adesivos, o uso de resinas compostas é considerado uma parte integral da OMI, visto que este material não requer cavidades auto retentivas quando comparado ao seu predecessor, o amálgama (FRENCKEN et al., 2012; SCHWENDICKE et al., 2016).

Mesmo após o diagnóstico clínico e radiográfico de lesões cariosas em dentina, há dificuldade de se determinar o limite entre a dentina infectada e a afetada, i.e., delimitar a mínima remoção possível do tecido irreversivelmente comprometido, previamente ao tratamento restaurador. De forma geral, os parâmetros utilizados consistem em avaliar a cor da lesão cariada por meio de inspeção visual e a dureza da dentina com auxílio de um escavador, a qual deve se apresentar em lascas ou com textura similar ao couro (IWAMI et al., 2004). Entretanto, nenhum desses parâmetros é critério clínico seguro para se definir o limite de remoção da dentina infectada, visto que são subjetivos e dependentes do operador (NEVES et al., 2011).

Pela subjetividade dos parâmetros de diferenciação da dentina afetada e infectada e pela consistência úmida e menos rígida da dentina próxima à polpa dentária, o risco da remoção excessiva de tecido dentinário cariado é maior em lesões cariosas profundas (BARROS et al., 2020; INNES et al., 2016). Este procedimento apresenta alto risco de exposição ou complicações pulpares, que podem resultar em capeamento pulpar, pulpotomia ou tratamento endodôntico radical – todos estes tratamentos podem levar a diferentes prognósticos e culminar, inclusive, na perda precoce do dente (ELHENNAWY et al., 2018). O risco de exposição pulpar em lesões cariosas profundas é estimado em 40% para dentes permanentes e em 53% para dentes decíduos (RICKETTS; SCHWENDICKE, 2018), justificando a aplicação de novos métodos para minimizar a remoção do tecido cariado.

O método quimiomecânico é considerado um dos mais conservadores e convenientes para remoção da lesão de cárie dentária (HAMAMA; YIU; BURROW, 2014). Este método é caracterizado pelo uso complementar de substâncias químicas, ao contrário de se utilizar exclusivamente instrumentos manuais, reduzindo a subjetividade da escavação da dentina contaminada. Algumas dessas substâncias auxiliariam ainda na quebra do colágeno da dentina já amolecida, maximizando também a remoção do biofilme de micro-organismos localizado na cavidade (BANERJEE, 2018).

Estudos clínicos e revisões sistemáticas já demonstraram que a remoção incompleta do tecido cariado, em dentina, reduz o risco de exposição pulpar quando este método é comparado à remoção completa do tecido (ALI et al., 2018; BARROS et al., 2020). Por conseguinte, as técnicas de antissepsia permitem maior preservação tecidual comparada à escavação do tecido cariado. São exemplos: a aplicação de ozônio, da Terapia Fotodinâmica (PDT), e a aplicação local de antissépticos, como a Clorexidina (CHX) (NOACK; WICHT; HAAK, 2004). Estas terapias são conservadoras e possuem aceitabilidade pelos pacientes, diminuindo o risco de recorrência das lesões cariosas, e a necessidade de retratamento (BANERJEE, 2018; CUSICANQUI MENDEZ et al., 2018). Por outro lado, estudos apresentam resultados *in vitro* e *in vivo* conflitantes no que diz respeito à eficácia dos tratamentos quimiomecânicos (GOYAL et al., 2015; HAUSER-GERSPACH et al., 2009a; KAPDAN; ÖZTAŞ; SÜMER, 2013; MODIMI et al., 2016; MÜLLER; GUGGENHEIM; SCHMIDLIN, 2007). Além disso, a investigação dos efeitos dessas substâncias na superfície dentinária – à luz da aplicação de futuras técnicas adesivas – ainda são pouco conhecidos. Finalmente, apesar de ser desejável que os tratamentos apresentem propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, é também necessário que tenham mínima influência no tecido pulpar subjacente, preservando assim sua capacidade reparadora.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades antimicrobianas de diversas substâncias químicas para antissepsia de lesões cariosas profundas *in vitro*, avaliando-se a eficácia na redução dos micro-organismos presentes nas lesões cariosas e os efeitos sobre a estrutura dentinária e em células pulpares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cárie dentária e remoção do tecido cariado

A cárie dentária é uma doença dinâmica, multifatorial e não transmissível. É mediada pelo biofilme bucal em disbiose, modulada pela dieta, e determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais. Resultante deste processo patogênico, há perda mineral dos tecidos dentários, e conseqüentemente, o surgimento da lesão cariada (MACHIULSKIENE et al., 2019).

A lesão cariada afeta de forma diferente os tecidos dentários. Enquanto o esmalte é avascular e acelular, e por conseguinte, incapaz de responder às injúrias decorrentes do processo cariado, o contrário acontece na dentina. A dentina, tecido derivado do componente mesenquimal, apresenta prolongamentos de odontoblastos em seus túbulos dentinários. Ainda constituída majoritariamente por hidroxiapatita, a dentina apresenta prolongamentos celulares de odontoblastos e matéria orgânica, como o colágeno, em sua constituição (KATCHBURIAN, 2017).

A formação do biofilme bucal é um processo dinâmico que envolve adesão, crescimento, dispersão e uma nova adesão de micro-organismos à superfície (FEJERSKOV; KIDD, 2011). Com relação ao aspecto microbiológico, bactérias endógenas presentes no biofilme bucal, como por exemplo o *Streptococcus mutans*, produzem ácidos orgânicos, resultante do processo de metabolização de carboidratos. Estes ácidos são responsáveis pela diminuição do pH, e conseqüentemente, resultam na desmineralização dos tecidos dentários, seja o esmalte, ou a dentina (FEATHERSTONE, 2004; FEJERSKOV, 2004). *Lactobacillus*, por sua vez, desempenham um papel fundamental na progressão da cárie dentária na dentina, que não está associada exclusivamente a produção de ácidos, mas também a capacidade das bactérias de se ligarem ao colágeno presente no substrato dentinário (CAUFIELD et al., 2015). O papel do biofilme bucal no processo de progressão da cárie dentária possui extrema importância clínica. A tomada de decisões clínicas quanto à remoção total ou parcial do tecido cariado é capaz de paralisar a perda mineral, ou revertê-la em ganho mineral. Independente do estágio de uma lesão cariada, esta pode ser paralisada (KIDD; FEJERSKOV, 2004). Devido à capacidade de remineralização por parte da dentina afetada, esta deve ser preservada, principalmente considerando-se o prognóstico do dente, a perda biológica e os custos dos tratamentos odontológicos em longo prazo (SCHWENDICKE et al., 2016a).

Black, em 1908, propôs os princípios que regem o preparo cavitário e afirmou que uma vez que o preparo cavitário estivesse em uma forma adequada, nenhuma dentina cariada deveria permanecer. Sendo assim, preconizou-se que o tecido cariado deveria ser removido até atingir a dentina hígida. Para a abordagem de lesões cariosas profundas, ele afirmou que seria melhor expor a polpa dental do que deixá-la recoberta com apenas uma camada de dentina amolecida (BLACK, 1908). No entanto, esse pressuposto data de mais de um século atrás, quando tanto a Odontologia quanto os princípios e as pesquisas que embasavam os procedimentos eram diferentes. Sendo assim, a remoção completa do tecido cariado – remoção não seletiva – não é uma técnica recomendada atualmente (INNES et al., 2016; MACHIULSKIENE et al., 2019).

Uma revisão sistemática recente demonstrou que a remoção seletiva do tecido cariado resulta na manutenção da vitalidade pulpar, quando comparada à remoção gradual (*stepwise*) e a remoção não seletiva, total, do tecido cariado. Apesar das análises microbiológicas, de qualidade da restauração e de deposição dentinária serem similares em todas as técnicas, a remoção seletiva em dentes permanentes, realizada em única sessão, resulta em uma maior preservação da estrutura dentária e na manutenção da vitalidade pulpar (BARROS et al., 2020).

Com relação às abordagens do tratamento operativo da cárie dentária, atualmente considera-se a filosofia minimamente invasiva, cujo objetivo principal é a preservação dos tecidos dentais. O diagnóstico precoce da cárie, os tratamentos não operatórios e a realização de procedimentos restauradores conservadores alinham-se ao objetivo principal da OMI (FRENCKEN et al., 2012). De acordo, consensos preconizam a remoção seletiva do tecido cariado como parte de um tratamento minimamente invasivo (INNES et al., 2016; MACHIULSKIENE et al., 2019).

Mesmo com os riscos de exposição pulpar e complicações pós-operatórias, o tratamento de lesões cariosas em dentina, empiricamente, envolve a remoção completa da dentina afetada e infectada previamente ao selamento da cavidade (SCHWENDICKE; PARIS; TU, 2015).

Do contrário, a abordagem de lesões cariosas profundas deve consistir no selamento da dentina afetada ou amolecida, mesmo com a proximidade de micro-organismos à polpa dental. Este protocolo é recomendado para evitar exposição e alteração do tecido pulpar (GANAS; SCHWENDICKE, 2019). Apenas as margens periféricas da lesão cariada devem ser mantidas na dentina mais firme, ou rígida, permitindo uma adequada inserção e selamento do material restaurador (RICKETTS; SCHWENDICKE, 2018).

Há uma indicação de que os cirurgiões-dentistas não apoiam a remoção seletiva do tecido cariado, mesmo para lesões profundas, mas aceitam a exposição pulpar como consequência da escavação completa (SCHWENDICKE et al., 2016a). A remoção seletiva, seja

essa incompleta ou parcial, evita que o dente adentre um ciclo restaurador, reduzindo a necessidade de intervenções endodônticas e permitindo que o dente seja mantido com menores custos (SCHWENDICKE; PARIS; TU, 2015). Uma vez que o dente adentra ao ciclo restaurador, tratamentos endodônticos são realizados e estes são considerados mais invasivos biologicamente. Além do mais, esta é uma terapia considerada complexa, de alto custo e que requer maior tecnologia e treinamento. No sistema público de saúde brasileiro, o tratamento endodôntico é realizado na atenção secundária e o acesso limitado a este setor pode ser considerado na alta prevalência de perda dentária no Brasil (WEBER; ALVES; MALTZ, 2011).

Entretanto, ainda há uma resistência clínica ao se considerar os princípios da OMI, como a manutenção da dentina cariada e/ou a remoção seletiva do tecido cariado. A rejeição ao procedimento é motivada pelo medo de que os micro-organismos possam causar dano pulpar ou que após o selamento da lesão cariosa esta poderia progredir e/ou causar danos à restauração. Em alguns casos a remoção seletiva é negligenciada, sendo considerada antiprofissional por parte dos clínicos. No entanto, o processo de tomada de decisão clínica deve levar em consideração as informações particulares de cada caso e basear-se em evidências (SCHWENDICKE et al., 2013, 2016b; WEBER; ALVES; MALTZ, 2011).

2.2 Aspectos da Dentina

Posteriormente ao condicionamento ácido da dentina e/ou aplicação dos sistemas adesivos convencionais (*etch and rinse*) ou universais, as fibras colágenas presentes na matriz orgânica da dentina tornam-se susceptíveis à degradação pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) (MAZZONI et al., 2007). Na verdade, o ambiente ácido, ou seja, com baixo pH, criado na dentina seja pela ação de bactérias ou pelo condicionamento ácido, induzem a ativação das MMPs endógenas (TJÄDERHANE et al., 2001).

As MMPs são endopeptidases Ca/Zn dependentes e participam da degradação da matriz extracelular (MEC). Em condições fisiológicas ideais, as MMPs estão envolvidas nos processos de transcrição, ativação de precursores enzimáticos e interagem com componentes da MEC. Além da interação com a MEC, as MMPs podem atuar na quebra de moléculas celulares e em outras proteínas não constituintes da MEC, regulando o comportamento celular, diferenciação celular e modelação tecidual. Por desempenhar um importante papel na homeostase e estarem envolvidas nos processos citados acima, as MMPs podem influenciar processos fisiológicos e patológicos, como artrite, câncer, aterosclerose, úlceras e fibrose (STERNLICHT; WERB, 2001; VISSE; NAGASE, 2003). Uma vez atuando na MEC, o controle de possíveis

degradações é essencial para a manutenção da remodelação tecidual, angiogênese e remodelação óssea (JAIN; BAHUGUNA, 2015).

Na dentina, as MMPs possuem um papel fundamental na organização da MEC, na modulação da progressão de lesões cariosas, regulação da mineralização e, conseqüentemente, na formação da dentina secundária (JAIN; BAHUGUNA, 2015; TJÄDERHANE et al., 2001). As MMPs que se encontram na dentina são secretadas pelos odontoblastos durante a produção da matriz e, possivelmente, estão envolvidas do processo de dentinogênese (PALOSAARI et al., 2003). Uma vez finalizado o processo de mineralização da dentina, as MMPs permanecem quiescentes, aprisionadas na matriz calcificada. Com o desenvolvimento da cárie dentinária, elas são novamente expostas e potencialmente, ativadas devido à produção de ácidos por bactérias bucais (MAZZONI et al., 2015).

Durante a progressão da cárie dentária, as formas ativas das MMPs desenvolvem ação proteolítica. Neste processo estão envolvidas as seguintes formas ativas de MMPs: MMP-1 e MMP-8 (colagenases); MMP-2 e MMP-9 (gelatinases); MMP-3 (estromelisina) e MMP-20 (enamelisina) (CHAUSSAIN-MILLER; GOLDBERG; MENASHI, 2006; TJÄDERHANE et al., 2001). Após o dinâmico processo de desmineralização, diversas modificações ocorrem na estrutura da dentina, como a redução de minerais e o aumento de porosidades devido às mudanças na estrutura do colágeno e na distribuição de proteínas não colagenases. Estas mudanças alteram mecanicamente e fisicamente a dentina (MAZZONI et al., 2015; TJÄDERHANE et al., 2001).

A ativação de MMP-2, MMP-8 e MMP-9 em lesões cariosas resultam na degradação do colágeno, incluindo o colágeno fibrilar e não fibrilar, fibronectina, laminina e glicoproteínas da membrana basal (SANTOS et al., 2017). O colágeno é uma das principais proteínas encontradas na dentina e constitui 90% da matriz orgânica. A instabilidade do colágeno tem conseqüências potenciais na patogênese da cárie de dentina e inicia-se com a degradação da matriz de colágeno posteriormente à desmineralização pelo condicionamento ácido. Essa degradação é caracterizada pela redução ou desaparecimento das fibrilas de colágeno da dentina (HEBLING et al., 2005).

Os efeitos da degradação de colágeno têm conseqüências particulares nos procedimentos adesivos dos materiais restauradores. A camada híbrida, descrita pela primeira vez por Nakabayashi et al. (1991) é apresentada com a estrutura formada pela interpenetração dos monômeros que compõem os sistemas adesivos e as fibrilas de colágeno desmineralizadas pelo condicionamento ácido. Esta estrutura é responsável pela retenção micromecânica das

restaurações de compósitos e sua funcionalidade depende diretamente da integridade das fibras de colágeno e da qualidade da matriz polimérica que a compõe (DELGADO et al., 2015; NAKABAYASHI; NAKAMURA; YASUDA, 1991).

A degradação da interface adesiva entre o compósito e a dentina é um processo complexo, que envolve a hidrólise do compósito e do colágeno, ambos componentes da camada híbrida. A dentina, após o condicionamento ácido, apresenta MMPs -2, -3, -8, -9 e -20, assim como também catepsinas, em suas formas ativadas. As MMPs, expostas e ativadas pelo condicionamento ácido, podem degradar lentamente o colágeno fibrilar presente na camada híbrida, resultando em uma perda da resistência de união de 36 - 70%, entre 12 e 14 meses (SCHEFFEL et al., 2014).

Sendo assim, as pesquisas têm se voltado para inibidores de MMPs (TIMPs) endógenos e exógenos, que poderiam promover a prevenção da cárie dentária e/ou a remineralização da dentina. A maioria dos TIMPs são capazes de quelar os íons cálcio ou substituir estes com íons zinco no sítio ativo das MMPs. Demais agentes são capazes de interagir com os fragmentos peptídicos das MMPs, prevenir o acesso às MMPs e inibir a atividade das MMPs revestindo o substrato. A CHX, por exemplo, um agente terapêutico reconhecido com um TIMP atua na inibição da atividade de MMPs pela sua propriedade quelante, atuando nos íons cálcio (MAZZONI et al., 2015). Por outro lado, até o momento, o efeito de outras substâncias antimicrobianas/tratamentos quimiomecânicos além da CHX sob a atividade de MMPs na dentina ainda é pouco conhecido.

2.3 Agentes antimicrobianos e método quimiomecânico

O método quimiomecânico para remoção do tecido cariado foi desenvolvido para superar as limitações da escavação tecidual convencional, pois este pode consistir em uma técnica para melhor preservação do tecido dentinário saudável. Este método pode ser uma alternativa eficaz, pois é atraumático e as substâncias utilizadas possuem ações bactericidas e bacteriostáticas, além de degradar o colágeno da dentina infectada sem dor ou efeitos colaterais ao tecido subjacente (BANERJEE, 2018). Múltiplos agentes químicos têm sido utilizados na prática clínica, embora com eficácia questionada com relação às suas propriedades antimicrobianas e aos possíveis efeitos à estrutura dentinária (BIN-SHUWAISH, 2016).

2.3.1 Clorexidina (CHX)

A Clorexidina (CHX) é um agente antisséptico que possui um amplo espectro de atividade para as bactérias bucais e por isso é amplamente utilizado. Este agente catiônico apresenta propriedades de inibição da formação biofilme dental, devido, principalmente, às suas substantividade e ação antimicrobiana. A ação antimicrobiana da CHX depende da absorção das moléculas catiônicas pelas paredes celulares das bactérias, resultando em um desequilíbrio osmótico e na perda de componentes intracelulares (GENDRON et al., 1999; MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Em baixas concentrações, a CHX é bacteriostática e resulta em lise celular e da membrana citoplasmática. Por outro lado, em altas concentrações, a CHX é bactericida e causa a coagulação dos componentes intracelulares, que resulta em um vazamento (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Nos tecidos bucais, suas importantes propriedades como substantividade e efeito residual fazem com que seu deslocamento ocorra pelos íons cálcio, mantendo concentrações altas de CHX após 24 horas de aplicação. Logo, há um maior contato da substância com os micro-organismos, prolongando os efeitos antimicrobianos (LAMARQUE et al., 2019).

Além de ser um agente antisséptico popular na Odontologia, a CHX é tida como um inibidor potente das MMPs (GENDRON et al., 1999). Devido à sua propriedade quelante, a CHX já teve sua capacidade de inibição nas MMP-2, -9 e -8 comprovada. Os agentes inibidores de MMPs promovem a formação de uma rede mais estável de colágeno na dentina e, conseqüentemente, garantem a estabilidade da camada híbrida (MAZZONI et al., 2015). No entanto, ainda há uma preocupação com relação aos efeitos da CHX na força de adesão. *In vitro*, em espécimes de dentina humana, a CHX 2% manteve a durabilidade da camada híbrida e força de adesão imediata, possivelmente pela sua atividade nas MMPs (CARRILHO et al., 2007; HEBLING et al., 2005). *In vivo*, a aplicação da CHX causou baixos valores na força de adesão imediata, após a extração dos dentes tratados. Em outro grupo, os dentes foram extraídos seis meses após o tratamento com a CHX e estes apresentavam uma maior força de adesão quando comparado aos dentes que tiveram a avaliação imediata após tratamento (GUNAYDIN; YAZICI; CEHRELI, 2016). Apesar de uma revisão sistemática recente concluir que a desinfecção de cavidades com a CHX é positiva e apresenta adequada preservação da adesão em dentina, a certeza desta evidência não foi avaliada (COELHO et al., 2021).

2.3.2 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (PDT) tem sido considerada uma opção terapêutica para tratamento de doenças locais causadas por micro-organismos. A PDT consiste na utilização de moléculas fotossensibilizantes (PS), que absorvem um determinado comprimento de onda do espectro de luz visível. Esta associação gera dois tipos de reações fotoquímicas (KHARKWAL et al., 2011).

Para a reação do tipo I, a molécula PS no estado de excitação tripleto reage com as biomoléculas – ácidos nucleicos, lipídios e proteínas – e transfere uma carga elétrica que produz radicais. Estes, por sua vez, reagem com as moléculas de oxigênio formando espécies reativas de oxigênio (ROS). Na reação do tipo II, a molécula PS no estado de excitação tripleto transfere energia ao oxigênio também neste estado, gerando o oxigênio singleto. Ambos produtos dessas reações são citotóxicos para os micro-organismos (KHARKWAL et al., 2011; SCHERER et al., 2017). Reações do tipo III e IV também já foram propostas. Nelas, o efeito citotóxico ocorre pela falta de oxigênio nas estruturas intracelulares. Para a reação tipo III, as moléculas PS, antioxidantes, diminuem a concentração de radicais gerando o oxigênio singleto. No tipo IV, os PS não se ligam à uma molécula, mas após a irradiação o processo de fotoisomeração ocorre, facilitando a ligação do PS à molécula (SCHERER et al., 2017).

A PDT possui diversas aplicações dentro da Odontologia e uma delas é no tratamento da cárie dentária. Esta terapia é apontada como um potencial coadjuvante no controle dos micro-organismos relacionados à cárie sem, no entanto, causar resistência (ARAÚJO et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2019a; DINIZ et al., 2015).

Comparada aos agentes antimicrobianos convencionais, a PDT resulta em uma rápida morte bacteriana, fazendo-se desnecessário o uso de agentes químicos em altas concentrações, longos tratamentos e, conseqüentemente, diminui a possibilidade de resistência bacteriana. Os corantes apresentam vantagens como um baixo custo e exercem um significativo efeito fototóxico em micro-organismos, mesmo quando aplicado em baixas concentrações (LAMARQUE et al., 2019). Quanto às moléculas PS, o azul de metileno é um corante fenotiazina catiônico com baixo peso molecular e possui absorção de luz no comprimento de onda de 660 nm. Em associação com o laser, é um efetivo agente antimicrobiano para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ALEJANDRA et al., 2017), frequentemente investigado em biofilmes cariogênicos *in vitro* e *in vivo* (COSTA-SANTOS et al., 2019a).

Sendo assim, a PDT apresenta-se como uma ferramenta alternativa à remoção total da lesão cáriosa, visto que é não invasiva, é segura, possui um bom custo-benefício e é uma técnica simples (ALVES et al., 2019a). Considerando a filosofia de OMI de preservação da estrutura

dental, a PDT pode ser considerada uma terapia coadjuvante promissora para remoção dos micro-organismos em lesões cariosas, particularmente nas lesões profundas (COSTA-SANTOS et al., 2019b; MENDEZ et al., 2018).

2.3.3 Papaína

A papaína é uma enzima proteolítica, que apresenta propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias. Esta enzima é obtida do látex das folhas e frutos dos mamões verdes adultos. Similar às pepsinas humanas, a papaína age como um agente anti-inflamatório capaz de acelerar o processo cicatricial e tida como incapaz de causar danos ao tecido saudável (BUSSADORI; CASTRO; GALVÃO, 2005).

Disponível comercialmente desde 2003, o Papacárie® (Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil) tornou-se objeto de diversos estudos (ABDUL KHALEK et al., 2017; ALVES et al., 2019b; KOCHHAR et al., 2011). A substância possui apresentação comercial na forma de gel e sua composição consiste em papaína e cloraminas. Esta interação tem sido sugerida como responsável por propriedades relacionadas à antissepsia (BUSSADORI et al., 2011).

A composição do Papacárie®, obtida em sua bula, prega apenas a facilitação na remoção da dentina desmineralizada, amolecendo a porção necrosada do tecido cariado, sem menção à atividade antibacteriana. Estudos que reportam resultados positivos associam os benefícios da utilização do Papacárie considerando ao tempo de procedimento, conforto para o paciente, custo e diminuição da dor pós-operatória (DENG et al., 2018; GOYAL et al., 2015). Determinados estudos sugerem o gel como um protocolo alternativo para tratamento de lesões cariosas em crianças (MATSUMOTO et al., 2013; SILVA et al., 2019).

Uma revisão sistemática de estudos controlados randomizados e não randomizados (RCT/NRCT) realizada recentemente por nosso grupo de pesquisa – dados ainda não publicados (ANEXO 1) – mostra que, em determinados estudos, o tratamento com a papaína apresentou concentrações bacterianas elevadas quando comparado ao grupo controle, ou grupo sem antisséptico em lesões cariosas dentinárias (ASWATHI et al., 2017; GOYAL et al., 2015). Sendo assim, o grupo controle apresentou eficácia similar a este tratamento. Sendo assim, sugere-se que a eficácia antibacteriana do Papacárie® seja questionável e variável entre estudos.

2.3.4 Ozônio

O Ozônio (O_3), variedade alotrópica do oxigênio, é constituído por moléculas triatômicas deste elemento. Apresenta-se na natureza na forma de gás e é obtido a partir da dissociação do oxigênio molecular (O_2) em átomos de oxigênio ativado, que então reage com moléculas suplementares de O_2 , mediante uma descarga elétrica, reações fotoquímicas ou artificialmente por geradores elétricos. É um potente agente oxidante e decorrente disto, é considerado também um agente antimicrobiano. Devido às suas propriedades bactericida, fungicida e virucida vem sendo estudado e utilizado no tratamento de lesões cariosas, na Estomatologia, Endodontia, Periodontia e Cirurgia (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2008; BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000; STÜBINGER; SADER, 2006).

O potencial oxidante do ozônio induz a destruição da parede celular e da membrana citoplasmática de micro-organismos, além de destruir glicoproteínas, glicolipídeos, outros aminoácidos e inibir o controle enzimático da célula (NAGAYOSHI *et al.*, 2004; POLYDOROU *et al.*, 2006; CELIBERTI *et al.*, 2006; HODSON *et al.*, 2007). Esta alta atividade oxidante é também tida como responsável por degradar compostos orgânicos e abrir os túbulos dentinários (HOLMES; DALEY, 2003).

Em diferentes tipos de estudos, *in vitro*, *in vivo* e em revisões sistemáticas que avaliaram a atividade antimicrobiana do ozônio, os resultados são controversos (BRAZZELLI *et al.*, 2006; HAUSER-GERSPACH *et al.*, 2009a; MÜLLER; GUGGENHEIM; SCHMIDLIN, 2007; SANTOS *et al.*, 2020; WALKER *et al.*, 2003). Apesar de ser bem tolerado pelos tecidos bucais, sendo sugerido como uma terapia segura, a variabilidade nos resultados abordando o uso do ozônio como coadjuvante no tratamento da cárie dentária apontam que ainda há necessidade de mensurar os efeitos antimicrobianos desta terapia (SANTOS *et al.*, 2020).

Nossos resultados apresentados na revisão sistemática demonstram que quando analisada uma mesma intervenção (Papaína, Ozônio, PDT, CHX, Agentes Naturais ou Carisolv), a concentração bacteriana é variável entre os estudos analisados, de forma que o número de bactéria total na amostra controle (não antisséptica) é similar ou excedido após o tratamento. Sendo assim, os demais grupos apresentaram similaridade ao grupo controle – tratamento não antisséptico – e em sua maioria não apresentaram ação antisséptica. Para estudos clínicos randomizados (RCTs) somente três comparações geraram resultados conclusivos com relação a redução média do total de bactéria em lesões cariosas dentinárias, sendo elas: CHX *versus* PDT; Carisolv e Agentes Naturais *versus* controle não-desinfetante. Com relação aos estudos controlados não randomizados (NRCTs), a CHX foi o tratamento mais efetivo, quando comparada ao controle. No entanto, resultados inconclusivos foram obtidos ao se comparar a

CHX com o ozônio. Novos estudos poderiam agregar evidências científicas para suportar ou não o uso destes métodos como coadjuvantes no tratamento da cárie dentária e como afetam quimicamente o tecido dentinário e pulpar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades antimicrobianas de diversas substâncias químicas para antissepsia de lesões cáries profundas, como também investigar os efeitos destes tratamentos sobre a estrutura dentinária e em células pulpares.

3.2 Objetivos Específicos

- Induzir desmineralização semelhante à lesão de cárie dentária em cavidades padronizadas, realizadas em dentes bovinos, utilizando uma amostra de *Lactobacillus casei* (ATCC 7463) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175);
- Comparar o efeito antimicrobiano de: tampão fosfato-salino (controle); água ozonizada; terapia fotodinâmica com laser vermelho e azul de metileno 0,005 mg/ml; Papacárie®; e digluconato de clorexidina (2%) aplicados às cavidades padronizadas em dentina bovina, por meio de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans* utilizando a técnica *pour plate*;
- Analisar a dentina superficial e profunda por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), após todos os tratamentos antimicrobianos realizados nos dentes bovinos;
- Verificar e comparar os efeitos promovidos pelos tratamentos antimicrobianos na atividade de metaloproteinases gelatinases da matriz dentinária (MMP-2 e MMP-9), por meio de zimografia;
- Mensurar a curto prazo a proliferação celular de células pulpares de dentes decíduos após cada tratamento por meio do ensaio de MTT em 24, 48 e 120 horas;
- Mensurar a capacidade de produção de depósitos minerais (odontodiferenciação), por meio da coloração de vermelho de alizarina.

4 METODOLOGIA

4.1 Cálculo amostral

A determinação da quantidade definitiva de amostras que foram utilizadas neste estudo ocorreu por meio do cálculo amostral. Este foi realizado utilizando-se o *software* G*Power (Versão 3.1, Düsseldorf, Alemanha) e os valores de média e desvio-padrão foram obtidos por meio de um trabalho publicado que realizou o teste antimicrobiano semelhante ao realizado neste estudo (KAPDAN; ÖZTAS; SÜMER, 2013). A probabilidade de realizar um erro do tipo I (α) foi ajustada em 0,5 e do tipo II (β) em 20%. Logo, o n resultante para este trabalho foi de seis amostras por grupo.

Foram utilizados um total de 75 dentes bovinos durante o estudo. Considerando-se cinco grupos experimentais foram utilizados 30 dentes bovinos para o teste antimicrobiano, enquanto 30 espécimes foram preparados para o ensaio de zimografia e microscopia eletrônica de varredura (MEV), n igual a 6 para cada teste. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicatas, sendo utilizados 15 dentes bovinos para a preparação dos discos dentinários ($n=3$).

Para a obtenção de células pulpares, o cálculo amostral também foi realizado no mesmo *software* e com os mesmos parâmetros de probabilidade descritos anteriormente. Os valores de média e desvio-padrão foram obtidos em um trabalho publicado que realizou o teste de citotoxicidade de forma semelhante (DINIZ et al., 2015). Logo, o n para esta análise foi de cinco dentes decíduos. Esse número de dentes foi suficiente para a obtenção de tecido pulpar para o isolamento celular em número adequado para o estudo.

4.2 Seleção, limpeza e armazenamento dos dentes

As pinças laterais bovinas foram extraídas no Abatedouro Frigorífico Dimeza Alimentos (CNPJ: 09.021.512/0001/09), registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Inscrição Estadual: 001.041.438.0029) e devidamente regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mediante um termo de doação dos dentes (ANEXO A).

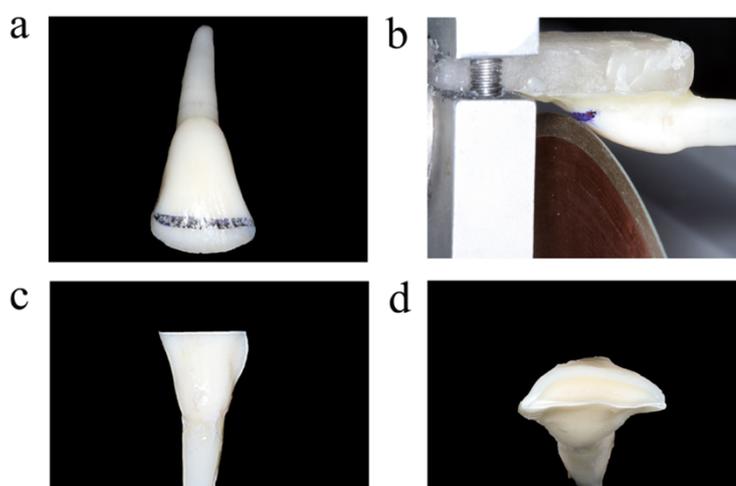
Para o estudo, foram selecionados 75 dentes com dimensões coronais similares e estes foram mantidos em solução de timol 0,1% para desinfecção, sob refrigeração. Posteriormente, todo o tecido gengival e ósseo, como também restos de ligamento foram removidos com lâmina

de bisturi nº 15, montada em cabo de bisturi e/ou curetas periodontais. Em seguida, foram limpos em baixa rotação com escova de Robinson e pedra-pomes. Após a limpeza, os dentes foram visualmente inspecionados com auxílio de uma lupa para verificar se estavam livres de trincas ou defeitos estruturais. Em seguida, os dentes permaneceram em água destilada, sob refrigeração (4°C), em recipientes plásticos até o início dos procedimentos experimentais, evitando-se desidratação.

4.3 Preparo dos dentes

Inicialmente, todos os dentes selecionados foram incluídos em bases de resina acrílica quadrangulares, com auxílio de cera pegajosa, a fim de estabilizar o dente para o preparo inicial. Com relação à superfície incisal, os dentes foram seccionados no sentido méso-distal com um disco diamantado (Diamond Wafer Blade, série 15 HC, Buehler, EUA) em máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, EUA), sob irrigação constante. A profundidade deste corte foi determinada em seis milímetros, por meio de exame radiográfico. O objetivo desta secção foi remover o esmalte, expondo o substrato dentinário, sem, no entanto, expor a câmara pulpar (FIGURA 1). Para a planificação da superfície do substrato dental, todas as superfícies dentinárias foram lixadas na Politriz com lixas d'água de carbeto de silício, granulação #600 (3M, Brasil), sob irrigação.

Figura 1 - Preparo inicial dos dentes



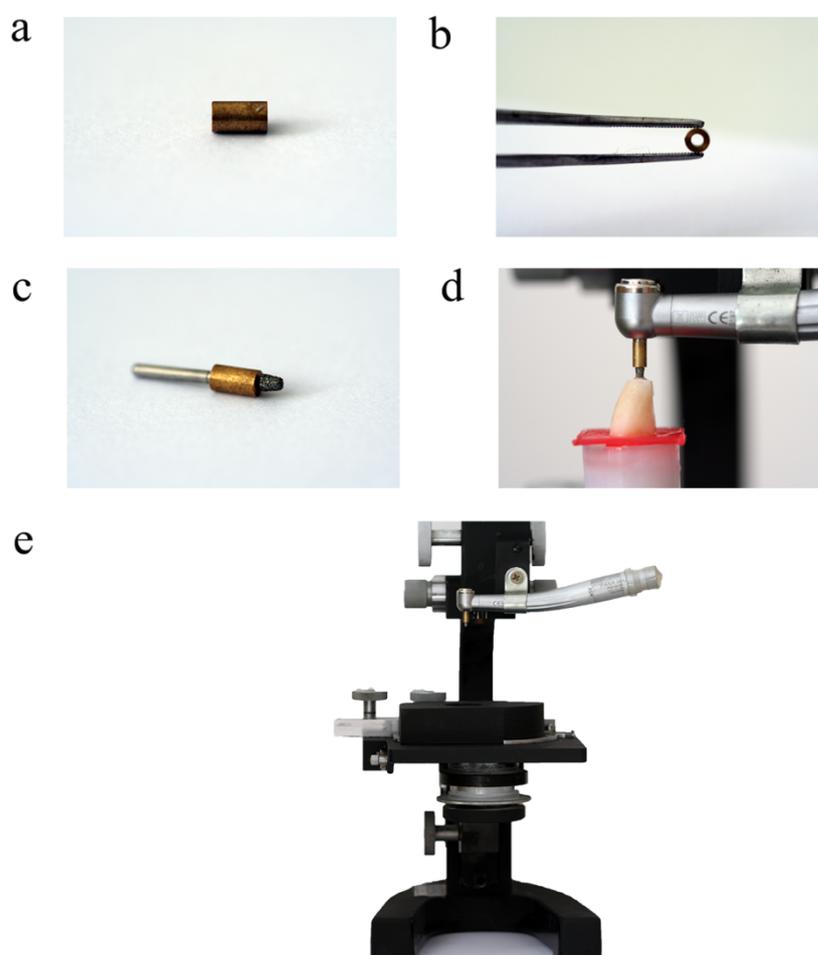
Legenda: a) Dente limpo e demarcado na altura do preparo;

- b) Dente embutido em base de acrílico sendo seccionado no sentido méso-distal na Isomet;
- c) Dente após corte com superfície dentinária exposta;
- e) Superfície dentinária após planificação na Politriz.

Fonte: Autoria Própria, 2021.

Posteriormente, na superfície dentinária incisal foi realizada uma cavidade padronizada com ponta diamantada tronco-cônica invertida #2131 (Diâmetro ponta ativa: 2,1 mm, comprimento ponta ativa: 2,4 mm; KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil). A profundidade e largura da cavidade foi determinada pelo tamanho da ponta ativa, sendo que a penetração da ponta foi limitada por uma anilha acoplada à haste (FIGURA 2). O preparo foi realizado com uma alta rotação adaptada a um microscópio (PEIXOTO et al., 2002), sob irrigação, de modo que a ponta diamantada ficasse paralela à superfície incisal. As pontas diamantadas foram trocadas e descartadas a cada cinco preparos.

Figura 2 – Dispositivos utilizados na padronização do preparo cavitário

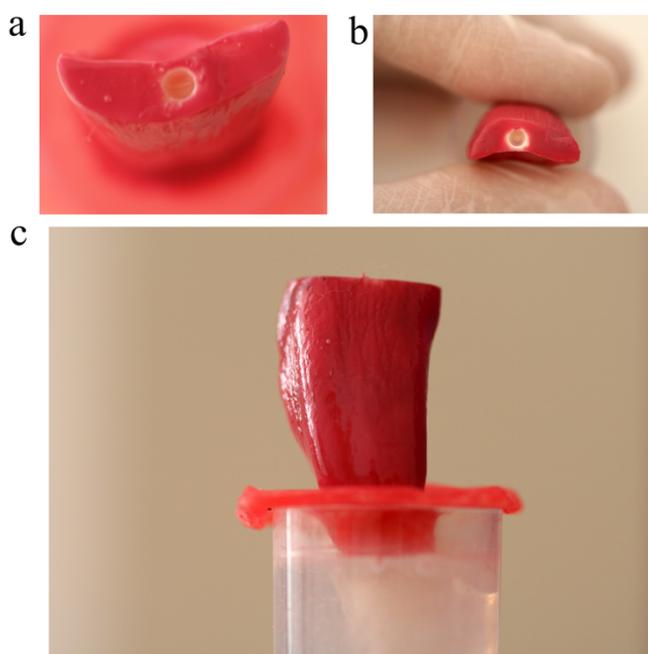


Legenda: a-b) Anilha confeccionada para a ponta diamantada #2135;
 c) Anilha acoplada na haste na ponta diamantada #2135;
 d) Ponta diamantada paralela a superfície incisal durante o preparo cavitário;
 e) Microscópio adaptado com alta rotação utilizado durante os preparos cavitários.

Fonte: Autoria própria, 2021.

Posteriormente ao preparo, toda a superfície coronária dos dentes foi recoberta por esmalte cosmético ácido-resistente (Colorama[®], São Paulo, Brasil), exceto a cavidade presente na superfície incisal (FIGURA 3). Os dentes foram alocados para cada grupo por ordem de realização do preparo cavitário e, depois, os grupos foram randomizados no *software* Microsoft Excel (Versão 16.48).

Figura 3 - Preparo Cavitário Padronizado



Legenda: a-b) Preparo cavitário realizado na superfície dentinária incisal;

c) Superfície coronária dos dentes recobertas com esmalte cosmético ácido-resistente.

Fonte: Autoria própria, 2021.

Em seguida, os dentes foram esterilizados por irradiação de raios gama (25kGy) e mantidos sob refrigeração (-70°C) até o seu uso.

4.4 Análise Antimicrobiana

4. 4.1 Desenvolvimento do inóculo e cultivo bacteriano

Para verificar a ação antimicrobiana das soluções e seus efeitos sobre a morfologia da dentina, lesões cáries artificiais foram produzidas nas cavidades preparadas na superfície incisal dos dentes ($n = 30$). Para este fim, foram utilizadas duas amostras de bactérias,

Streptococcus mutans (ATCC #25175) e *Lactobacillus casei* (ATCC #7463), cultivadas, respectivamente, em meio BHI (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Alíquotas das amostras foram mantidas congeladas em meio suplementado com 10% de glicerol, a -70°C , durante todo o experimento. Para a expansão e reposição das alíquotas, as bactérias foram cultivadas em ágar (48 h) e depois transferidas para o caldo (24 h). Para estimar a quantidade de bactérias para a padronização do inóculo, foi realizada a técnica de plaqueamento em microgota. Ambas as amostras foram expandidas em meio caldo por 24 h, em jarra de anaerobiose, e incubadas em estufa à 37°C . Após o crescimento, as bactérias foram transferidas para tubos de 50 mL e centrifugadas a 5.000 rpm, durante 5 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as bactérias foram resuspendidas em PBS para formação do inóculo. A concentração bacteriana de cada inóculo foi determinada por meio da densidade óptica (OD) mensurada em placa de 96 poços, em espectrofotômetro (MQX200, BioTeK, USA), nos respectivos comprimentos de onda (Tabela 1).

Posteriormente, o inóculo foi submetido à diluição seriada de 10^{-4} a 10^{-7} , plaqueado e cultivado a 37°C , em estufa, por 24 H. Foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e os valores corrigidos para mL. Na Tabela 1 estão dispostos os valores de comprimento de onda, OD e a concentração final de UFC/mL, para cada bactéria utilizada neste estudo.

Tabela 1 - Padronização da concentração bacteriana para inóculo

Microorganismo	Comprimento de Onda (nm)	OD	UFC/mL
<i>S. mutans</i>	650	0.5	6.56×10^9
<i>L. casei</i>	600	1.0	1.8×10^9

Fonte: Autoria própria, 2021.

4.4.2 Indução da Lesão Cariosa Artificial

A desmineralização da superfície dentinária nos dentes ocorreu por sete dias para simular a lesão cariosa artificial. Para este fim, diariamente, as bactérias foram cultivadas para obtenção do inóculo, substituído a cada 24 h.

Os dentes foram posicionados em tubos Falcon (50 mL) e a base de acrílico permitiu que estes ficassem suspensos com a superfície de interesse plenamente em contato com o inóculo bacteriano em meio de cultura (Figura 4). Para o crescimento das bactérias neste ambiente, foi utilizada a concentração bacteriana descrita acima e foram utilizados, também, 5 mL de caldo BHI suplementado com 5% de sacarose. A incubação ocorreu em jarras de microaerofilia, em estufa, à 37°C. A cada troca do inóculo, os dentes foram transferidos para novos tubos Falcon estéreis, com auxílio de uma pinça. A fim de verificar contaminação, o meio de cultura puro também foi incubado e a cada dois dias foi realizada a coloração de Gram do inóculo.

Após os sete dias, um dente sobressalente foi submetido ao exame radiográfico para confirmação da desmineralização.

Figura 4 – Dente posicionado dentro de tubo Falcon com a superfície de interesse em contato com o inóculo.



Fonte: Autoria própria, 2021.

4.4.3 Antissepsia das cavidades e teste microbiológico

Após a desmineralização ter ocorrido por sete dias, o excesso de micro-organismos aderidos à superfície dentária da lesão artificial cariiosa foi removido com gaze estéril, exceto na região interna da cavidade. Posteriormente, prosseguiu-se com a aplicação dos tratamentos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos grupos e forma de aplicação do tratamento.

Distribuição dos grupos	Tempo de Aplicação	Parâmetros
RG1: Tampão Fosfato-Salino (PBS) (Controle)	01 minuto	PBS
G2: Digluconato de Clorexidina	02 minutos	Clorexidina 2% (Clorhexidina; FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil) ^a
G3: Terapia Fotodinâmica (PDT)	05 minutos – Pré-Exposição; 42 segundos - Irradiação	Azul de Metileno 0,005 mg/ml (Chimiolux, Aptivalux, Belo Horizonte, MG, Brasil); ^b Irradiação por meio de laser diodo (Twin Flex II, MM Optics, São Carlos, SP, Brasil), comprimento de onda de 660 nm, potência 40 mW, densidade de energia 60 J/cm ² . ^b
G4: Água Ozonizada	1 minuto	Concentração de 40 µg/mL – obtida com gerador (O&LSS DIGITAL, Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil) ^c
G5: Papacárie®	30 segundos	Fórmula & Ação, São Paulo, SP, Brasil ^d

Legenda: ^a ZHOU et al., 2010; ^b DINIZ et al., 2015; ^c DURMUS et al., 2019; ^d Instrução do fabricante.

Fonte: Autoria própria, 2021.

As soluções foram depositadas em volumes iguais com seringa de insulina (1 gota – 10µL) e mantidas em contato com a cavidade, passivamente, de acordo com os tempos apresentados na Tabela 1. Todas as cavidades foram lavadas com 1 mL de água destilada estéril e secas, externamente, com gaze estéril.

Após a lavagem dos tratamentos, um *microbrush* (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) foi inserido e rotacionado no interior da cavidade para coletar o depósito microbiano. Em

seguida, o *microbrush* foi imerso passivamente em 1 mL de PBS estéril e esta amostra foi submetida a uma diluição seriada (de 10^{-1} a 10^{-4}). A diluição de 10^{-4} foi pipetada em uma placa de Petri e, em seguida, sobre ela, foram espalhados 20 mL de ágar BHI (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), na técnica *pour plate*, para obtenção de colônias isoladas. As placas foram colocadas em jarras de microaerofilia, que foram incubadas em estufa à 37° C por 48 h.

As placas foram fotografadas (Canon; Canon EOS Digital Rebel XT, Tóquio, Japão) e as imagens transferidas ao *software* Image J (NIH, MD, EUA), onde as colônias foram quantificadas na superfície e no meio do ágar, por meio da ferramenta de análise de colônias.

4.5 Zimografia

4.6.1 Extração da amostra

Para avaliação da atividade de MMPs foram utilizados novos dentes ($n = 30$), que foram submetidos ao preparo, à indução de lesão cáriosa artificial e aos tratamentos antimicrobianos como descritos anteriormente. O objetivo de induzir a lesão cáriosa artificial foi causar a desmineralização superficial da estrutura dentinária. No entanto, a acidificação do substrato pelo processo cárioso ou substâncias exógenas pode levar à ativação de MMPs dentinárias.

Após a realização do tratamento antimicrobiano e lavagem da cavidade, o tecido desmineralizado foi raspado completamente da cavidade com colher para dentina nº. 5. Amostras individuais coletadas de três dentes foram reunidas em *pool*, totalizando dois *pools* por grupo. As amostras foram coletadas em 30 μ L de PBS, em gelo, até posterior armazenamento a -70°C.

4.6.2 Extração de proteínas

Para otimizar a extração das MMPs eventualmente presentes, 30 μ L de tampão RIPA (Tampão de Radioimunoprecipitação) foram adicionados às amostras. As amostras foram mantidas em gelo por 30 minutos e, posteriormente, centrifugadas à 12.000 x g, 4 ° C, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e o total de proteínas quantificado com o kit de ensaio de proteínas Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher). Dessa forma sendo que 1 μ L da amostra foi

utilizado para determinar a concentração de proteína em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ na amostra (Tabela 1 - Apêndice).

Observação: um estudo piloto de quantificação de proteínas foi realizado nas amostras congeladas em PBS após centrifugação à $12.000 \times g$, 4°C , por 15 minutos. Entretanto, os níveis proteicos estavam abaixo do desejável para o carregamento dos géis. Dessa forma, foi optado por adicionar o tampão RIPA para auxiliar no isolamento proteico.

4.6.2 Preparação de gel e corrida para atividade gelatinolítica

A fim de detectar a presença e a atividade genatinolítica/proteolítica das MMPs, foi preparado um gel de corrida/separação à 7,5%, contendo poliacrilamida 29:1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e gelatina A (1%) em tampão Tris-HCl 1,5 M (pH: 8,8) (Tabela 2 – Apêndice). O gel de corrida foi colocado entre as placas de vidro com auxílio de uma micropipeta e sobre ele foi acrescentado água destilada, impedindo o contato com o ar. Após a polimerização do gel, a água foi removida com papel absorvente e foi preparado o gel de empilhamento 4% em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH: 6,8) (Tabela 3 - Apêndice). O gel de empilhamento também foi colocado entre as placas com auxílio de uma micropipeta até o limite da placa de vidro. O pente foi posicionado e removido após o tempo da polimerização completa do gel.

Seguidamente, as amostras foram preparadas para a corrida. Para este fim, todas as amostras foram utilizadas na concentração de $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, e a elas foram adicionados $6 \mu\text{L}$ de tampão de amostra concentrado (5 x) (Tabela 4 - Apêndice) e PBS (se necessário), totalizando o volume final de $30 \mu\text{L}$ para todas as amostras. Após preparadas, as amostras foram mantidas em estufa à 37°C por 15 minutos. Os poços do gel foram lavados com tampão de corrida 1x (Tabela 4 - Apêndice) e a amostras pipetadas nos respectivos poços. Em um poço remanescente foram colocados $20 \mu\text{L}$ de amostra padrão (*Ladder*; Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard, Bio-rad Laboratories, CA, EUA), a fim de monitorar a corrida e identificar os pesos moleculares das MMPs.

A eletroforese foi realizada em cuba, em gelo, a 110V, e a amperagem foi controlada durante a corrida (todos Bio-Rad). O tempo médio da duração da corrida foi de três horas. Após terminada, o gel foi removido das placas e lavado duas vezes em solução de Triton X-100 2% (Tabela 5 - Apêndice), por 30 minutos, em temperatura ambiente, sob constante agitação. Após esta solução ser removida, o gel foi lavado com água destilada, e colocado em tampão de

incubação por 30 minutos (Tabela 6 - Apêndice), também, sob agitação suave. O tampão de incubação foi substituído 1x por tampão fresco e o gel incubado em estufa a 37° C por 24 h.

A fim de verificar a atividade de degradação, o gel foi corado com solução de Coomassie Blue R-250 0,1% filtrada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) durante uma hora, sob agitação. Posteriormente, uma solução aquosa descorante com 50% de metanol foi utilizada para remoção do excesso de corante até o aparecimento das bandas de lise.

Para a análise de dados, o gel foi escaneado e as imagens importadas para o *software* Image J. As bandas foram quantificadas na forma invertida da imagem e identificadas com base no peso molecular do *ladder*.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a coleta da lesão cáriosa artificial para o ensaio de zimografia, os dentes utilizados foram destinados à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Primeiramente, foi realizada a fixação inicial com solução de glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2-7,4), *overnight*. Após este período, os dentes foram mantidos em geladeira em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2-7,4) até a realização das análises.

Para o processamento das amostras, como também análise microscópica, os dentes foram encaminhados ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (CM-UFMG). As amostras foram submetidas à fixação secundária com tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,2). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em uma série ascendente de etanol à 25, 50, 75, 95 e 100%, por 20 minutos em cada banho. A imersão em etanol 100% ocorreu por três vezes, em banhos de 10 minutos de duração cada. A secagem das amostras foi realizada em aparelho de ponto crítico de CO₂ (Leica EM CPD020; Leica, Wetzlar, Alemanha). As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro, com corrente de 50 mA, pelo método *sputtering* (BALTEC MED 020; Baltec, Los Angeles, CA, EUA). A análise microscópica ocorreu em microscópio eletrônico de baixo vácuo (FEG – Quanta 200; FEI, Hillsboro, OR, EUA).

4.7 Citotoxicidade

4.7.1 Isolamento das Células Pulpare de Dentes Decíduos Humanos

Como citado acima, para a obtenção das células pulpare, foram utilizados 5 dentes decíduos, de pacientes saudáveis, de até 11 anos de idade, que foram esfoliados ou apresentaram necessidade de extração. Para este fim, este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de

Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE: 37612820.1.0000.5149) (ANEXO B). A obtenção ocorreu mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos responsáveis e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) pelas crianças. Os dentes que apresentaram lesões cáries em sua superfície foram excluídos deste estudo.

Após a exodontia ou esfoliação espontânea (menos de 24 h fora da boca e manutenção em leite), os dentes foram desinfetados por fricção com gaze umedecida em álcool 70%, durante 01 minuto, e colocados num frasco contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de penicilina, 1% estreptomicina e 0,2% de anfotericina B (GIBCO/Invitrogen, Grand Island, NY, EUA).

As células pulpares foram isoladas em uma capela de fluxo laminar, sob condições estéreis. O tecido pulpar foi coletado por acesso direto à polpa dentária devido à reabsorção da porção radicular do dente decíduo. Para o isolamento celular, o tecido pulpar foi fragmentado com uma lâmina de bisturi nº 15 C em uma placa de Petri contendo meio base (DMEM). Os fragmentos foram depositados em um tubo Falcon estéril de 15 ml e incubados à 37°C por 60 minutos em meio base contendo um coquetel enzimático (4 mg/ml de dispase e 3 mg/ml de colagenase tipo I) (GIBCO/Invitrogen). O sobrenadante foi centrifugado à 0,5 x g por 5 minutos. O *pellet* foi suspenso em meio DMEM completo, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de penicilina, 1% de estreptomicina, e 10 µg/mL de gentamicina. Em seguida, as células foram individualizadas utilizando uma rede de poliestireno (poro de 70µm) e incubadas à 37° C em atmosfera umidificada de CO₂ 5% e 95% de ar. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Quando as células se tornaram subconfluentes (80%), foram colhidas com solução de tripsina-EDTA à 0,025% e transferidas para novas garrafas para expansão. Para este estudo foram utilizadas apenas as células obtidas entre a 4^a e 8^a passagem. Aliquotas foram congeladas para viabilizar o estudo durante sua execução.

4.7.2 Confeccção dos discos

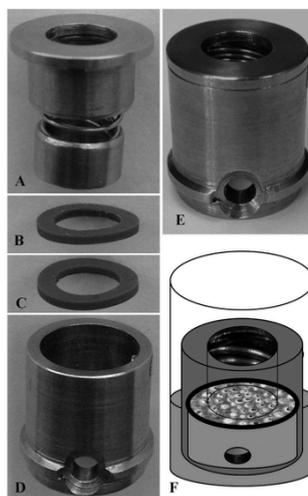
Foram confeccionados 15 discos de dentina bovina para adaptação em câmara pulpar artificial ($n = 3$ por grupo). Para este fim, os dentes foram seccionados na junção cimento-esmalte utilizando-se um disco diamantado dupla-face (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) acoplado à peça de mão. As coroas foram seccionadas transversalmente em uma cortadeira

metalográfica (Isomet Low Speed Saw; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), obtendo-se discos de espessura de $1,0 \text{ mm} \pm 0,05$. Após o preparo, os discos foram imersos em EDTA 0,5 M, pH 7,2, por 30 segundos, para remoção da *smear layer* (DINIZ et al., 2015). Posteriormente, os discos foram submetidos à desmineralização, de modo semelhante ao descrito acima para a indução da lesão cariiosa, em microplacas. Após sete dias de desmineralização, os discos foram esterilizados por irradiação gama (25 kGy).

4.7.3 Cultura Celular

Para o teste nas câmaras pulpares artificiais, as células foram plaqueadas em placas de 24-poços na densidade de 1×10^4 células/poço para o ensaio de viabilidade celular e 5×10^5 /poço para o ensaio de osteodiferenciação. Os discos de dentina foram adaptados na câmara metálica, com o objetivo de criar um arcabouço. O dispositivo metálico de câmara pulpar (FIGURA 5) foi colocado em cada um dos poços das placas de 24-poços, após o plaqueamento, sendo que o disco foi mantido em contato direto com o meio de cultura.

Figura 5 – Dispositivo de Câmara Pulpar Artificial



Legenda: A) Dispositivo de câmara pulpar aberto, composto por uma câmara superior, uma mola e um compartimento central;

B-C) Anéis de elásticos onde, entre eles, os discos dentinários foram posicionados;

D) Compartimento inferior;

F) Diagrama demonstrando a cultura celular em um poço de microplacas com o disco dentinário posicionado entre os anéis.

Fonte: DINIZ et al., 2015.

4.7.4 Aplicação das substâncias antimicrobianas

As soluções antimicrobianas foram depositadas em volumes iguais com auxílio de micropipetas – 10 µL – na superfície dos discos e foram mantidas indiretamente em contato com as células (de forma passiva pelos discos dentinários bovinos interpostos), de acordo com os tempos apresentados para cada substância na Tabela 1. Imediatamente após os tratamentos, as células foram lavadas com 1 mL de PBS, removendo-se o excesso dos tratamentos antimicrobianos. Os tempos experimentais para cada análise estão apresentados nas próximas sessões.

4.7.6 Viabilidade Celular

A fim de verificar o efeito dos tratamentos antimicrobianos na viabilidade celular foi realizado o ensaio de sal de metiltetrazólio – MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) diphentetrazolium bromide*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio de MTT foi realizado em três tempos experimentais – 24, 72h e 120 horas do tratamento. As células foram supridas com meio base e 40 µl da solução de MTT (5 mg/mL) foram depositados nas mesmas. As placas foram incubadas por 2-3 horas à 37° C em atmosfera umidificada com 5% CO₂ e 95% de ar. Após este período, o meio de cultura foi descartado e os cristais de formazan foram solubilizados com 300 µl dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma- Aldrich). Após 15 minutos, a leitura de absorbância ocorreu em espectrofotômetro a 540 nm (SpectraMax 190 Microplate Reader; Molecular Devices, San Jose, EUA).

4.7.7 Mineralização

Nesta etapa foi realizada a indução da osteodiferenciação das células da polpa dentária. Para este fim, as células foram semeadas (5×10^5 /poço) em placa de 24 poços, em triplicata. As células foram tratadas de acordo com os grupos experimentais e, em seguida, estimuladas por 10 dias com meio de diferenciação DMEM suplementado com dexametasona 10 µM, 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), 20% de soro fetal bovino, 1% de penicilina, 1% estreptomicina e 10 µg/mL de gentamicina (todos da GIBCO).

A coloração de vermelho de alizarina foi utilizada para determinar a formação de depósitos minerais. Após o período de estimulação, as células foram lavadas com PBS e fixadas em isopropanol 75% por 5 minutos e, posteriormente, foram reidratadas com água destilada. A matriz extracelular mineralizada foi corada com solução de alizarina vermelho 1%, pH 4,2, por

5 minutos. As células foram lavadas com PBS até não haver desprendimento de corante e secas. A documentação dos poços foi realizada utilizando-se um leitor multimodo (Cytation 5 Cell, Biotek Instruments). Para a análise quantitativa foi adicionada uma solução de 10% de ácido acético e metanol (4:1) nos poços e esta foi mantida por 30 minutos, sob agitação. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 490 nm (Cytation 5 Cell).

4.8 Análise estatística

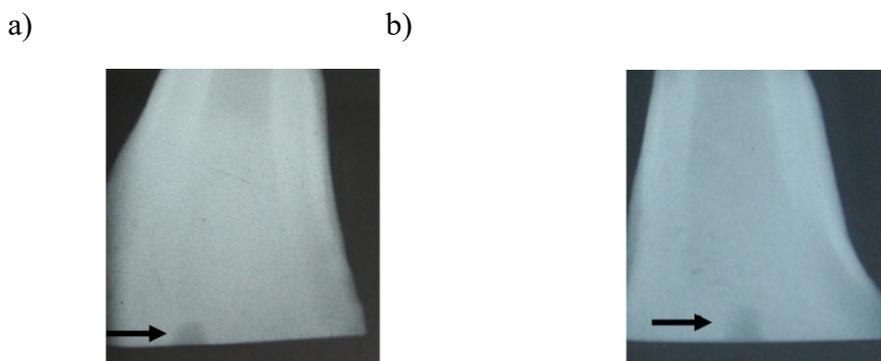
Os resultados obtidos foram tratados preliminarmente pelo teste de aderência Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). Os dados que apresentaram normalidade, foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA ($p < 0,05$) seguido pelo *posthoc* de Tukey para comparação entre os grupos. Nesses casos os dados são apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM). No caso de dados não paramétricos, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e os dados apresentados pela média \pm desvio-padrão (SD).

5 RESULTADOS

5.1 Lesão Cariosa Artificial

A figura 6 demonstra a zona de desmineralização da dentina após o desenvolvimento da lesão cariosa artificial em comparação com um dente com apenas a cavidade padronizada. Observa-se que a zona de desmineralização aumentou, particularmente em profundidade, a cavidade.

Figura 6 – Radiografia confirmando desmineralização de parte da dentina após indução da lesão cariosa artificial.



Legenda: a) Dente apenas com cavidade padronizada realizada na superfície incisal;
b) Dente com lesão cariosa artificial.

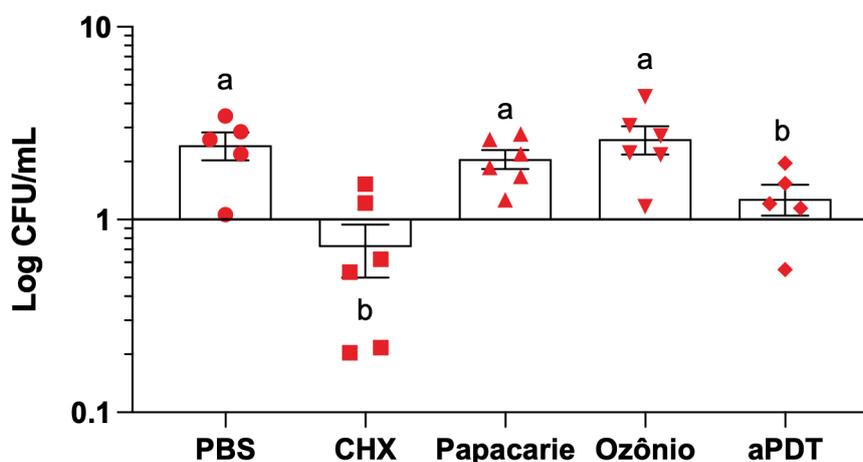
Fonte: Autoria própria, 2021.

5.2 Análise Antimicrobiana

A análise antimicrobiana demonstrou que houve semelhança estatística entre o grupo controle, Papacárie e Ozônio. Os grupos CHX e PDT foram estatisticamente diferentes dos demais grupos ($p < 0,05$), mas semelhantes entre si.

Gráfico 1 – Análise antimicrobiana expressa em Log_{10} UFC/mL para os grupos experimentais.

Pour-plate



Legenda: Contagem total contabilizando colônias na superfície e dentro do ágar. UFC = unidades formadoras de colônia; PBS = tampão fosfato-salino CHX= clorexidina; PDT = terapia fotodinâmica. Dados apresentados pela média \pm erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria, 2021.

5.3 Zimografia

A tabela 3 apresenta a atividade das MMPs gelatinolíticas para amostras coletadas imediatamente após o tratamento. Considerando o total de cinco corridas, a atividade gelatinolítica de MMPs foi identificada pela presença das formas complexadas de MMP-9 (225 e 125 kDa), de MMP-9 em sua forma latente ou pró-forma (92 kDa), e de MMP-2 em sua forma ativa (67 kDa). O grupo controle (PBS) expressou a forma complexada MMP-9 (225 kDa) em duas corridas (++) , enquanto atividade de MMP-9 latente (92 kDa) e MMP-2 (67 kDa) em sua forma ativa em uma corrida cada (+). De cinco corridas, a CHX induziu expressão eventual (+) de MMP-9 em sua forma complexada (225 kDa) e MMP-9 na forma latente (92 kDa). Os demais grupos, Papacárie e Ozônio, apresentaram expressão de uma das formas complexadas da MMP-9 apenas uma vez cada (+) (Tabela 3). O grupo PDT expressou ambas as formas complexadas de MMP-9 em três corridas (+++).

Tabela 3 - Atividade gelatinolítica após tratamento para as MMP-2 e MMP-9

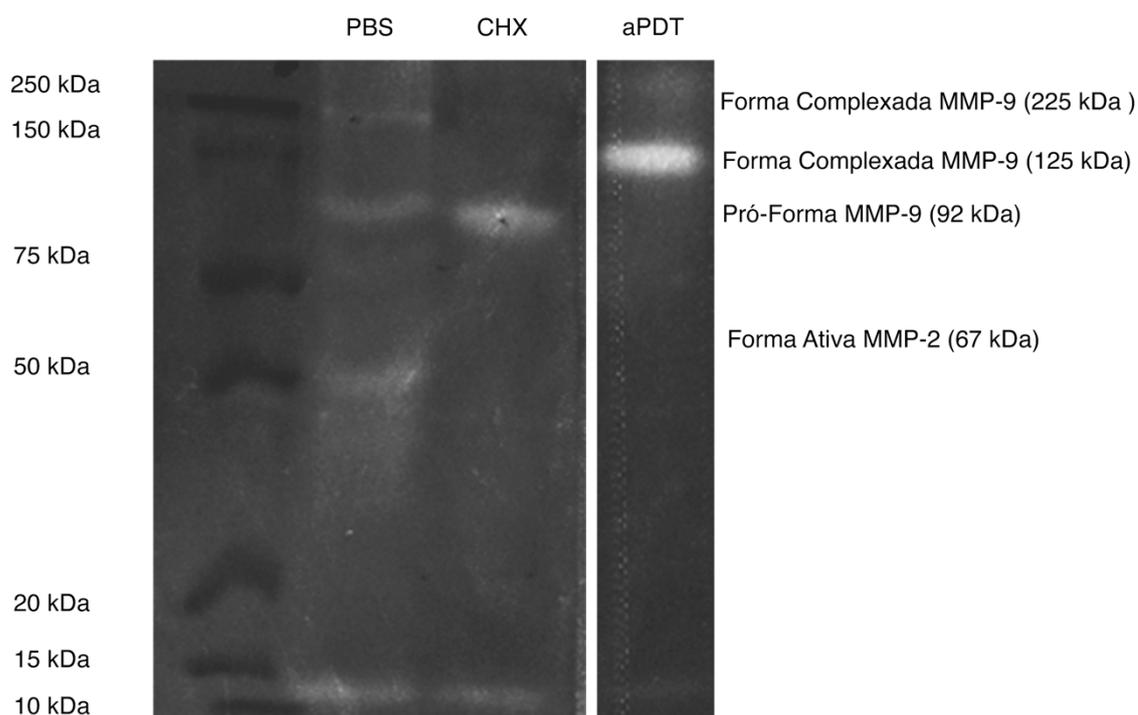
	PBS	CHX	Papacárie	Ozônio	PDT
Forma Complexada MMP-9 (225 kDa)	++	+	+		+++

Forma Complexada MMP-9 (125 kDa)				+	+++
MMP-9 (92 kDa)	+	+			
MMP-2 (67 kDa)	+				

Legenda: (+) representa o número de vezes que houve aparecimento de bandas de lise em cada gel para cada grupo experimental, totalizando cinco corridas. Foram analisadas as bandas correspondentes as formas complexadas e pró-forma para MMP-9 (MAZZONI et al., 2007) e forma ativa da MMP-2.

Fonte: A autoria própria, 2021.

Figura 7 - Representação da atividade gelatinolítica



Fonte: A autoria própria, 2021.

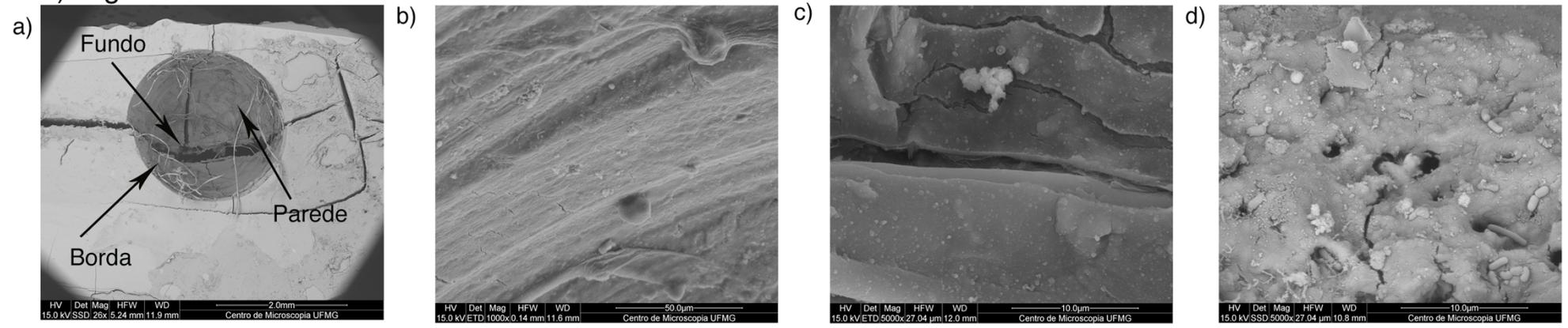
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A figura 8 mostra fotomicrografias eletrônicas representativas de diferentes regiões da cavidade, como borda, parede interna e do fundo. No dente hígido (A) é possível observar a presença de *smear layer* e que os túbulos dentinários não estão majoritariamente expostos, pois a estrutura dentinária não foi desmineralizada (a-d). Alguns micro-organismos podem ser observados (c). Na lesão cáriosa artificial (B) após 7 dias de indução, observa-se densa massa microbiana na parede lateral da cavidade (b). Em maior aumento, na borda interna da cavidade observam-se túbulos dentinários abertos (b), contendo, algumas vezes, bacilos e cocos em seu

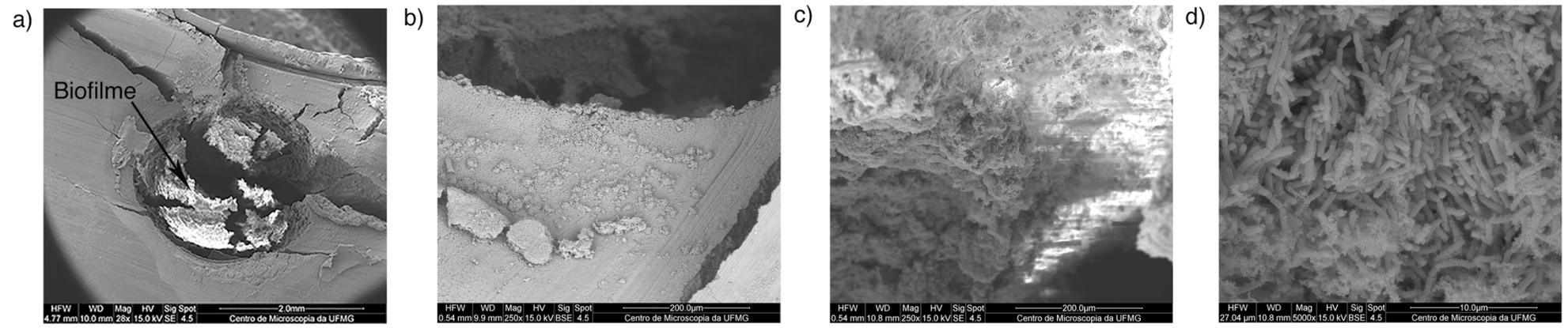
interior. Na parede lateral da cavidade, em maior aumento, numerosas células bacilares embebidas em matriz extracelular (MEC) puderam ser observadas recobrimdo o substrato dentinário (d).

Figura 8 – Imagens representativas de um dente hígido e da lesão cariosa artificial

A) Hígido



B) Lesão Cariosa Artificial



Legenda: A) Imagens representativas para um dente com apenas a cavidade padronizada realizada na superfície incisal: a) Cavidade (28x);
b) Parede lateral da cavidade (1000x);
c) Fundo da cavidade (5000x);
d) Borda interna da cavidade (5000x).

Para a lesão cariiosa artificial (B):

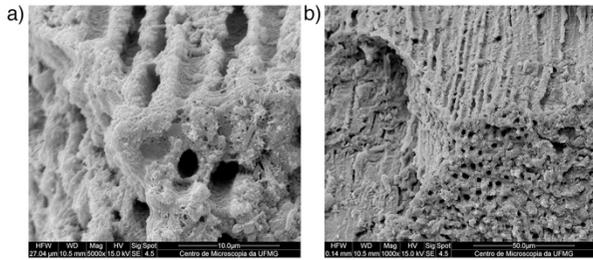
- a) Cavidade (28x);
- b) Borda da cavidade (250x);
- c) Parede lateral da cavidade (250x);
- d) Parede lateral da cavidade (5000x).

Fonte: Autoria própria, 2021.

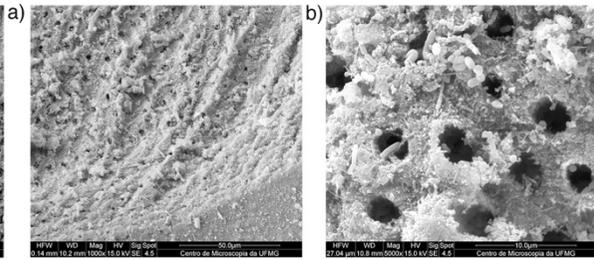
A figura 9 é constituída de fotomicrografias eletrônicas representativas da dentina após os tratamentos antimicrobianos. Todos os dentes demonstraram algum grau de abertura dos túbulos dentinários, como também túbulos dentinários obliterados. Mesmo após a remoção mecânica do biofilme desprendido da cavidade, foi detectada a presença de bactérias – cocos e bastonetes, respectivamente, *Streptococcus* e *Lactobacillus* – associadas à MEC do biofilme em diferentes regiões da cavidade, para todos os grupos experimentais. No grupo PBS, coleções de micro-organismos e uma rede filamentosa de produtos do biofilme pôde ser observada nas paredes lateral e de fundo da cavidade (c, d). Nos grupos CHX e a PDT, o biofilme apresentou-se mais esparsa e foi possível visualizar o substrato dentinário subjacente (d). No grupo Papacárie, observou-se que os túbulos dentinários estão qualitativamente mais abertos em relação aos demais grupos. Adicionalmente, uma densa camada de células bacterianas aparece aderida à dentina peritubular (b-d). O grupo do Ozônio apresenta biofilme bacteriano denso e heterogêneo, contendo cocos e bacilos em seu interior (c,d).

Figura 9 – Imagens representativas da dentina para cada grupo experimental.

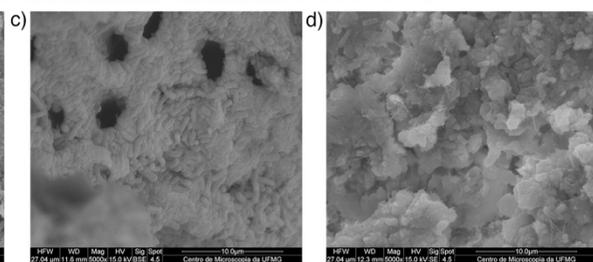
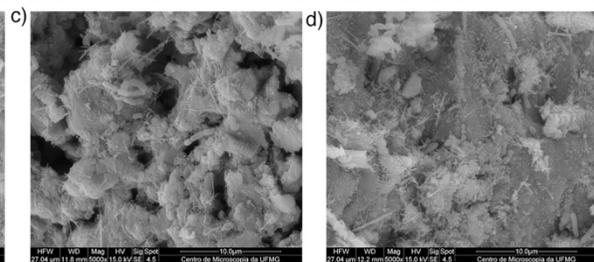
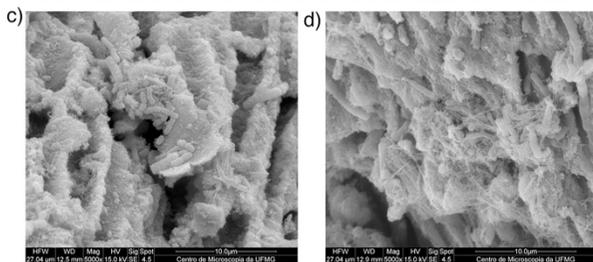
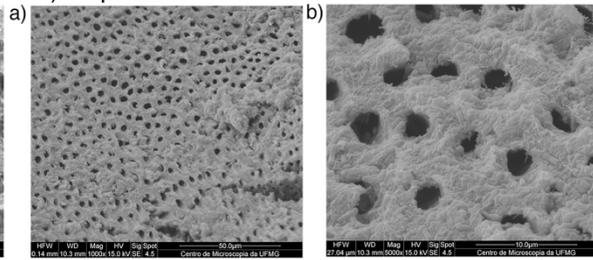
A) PBS



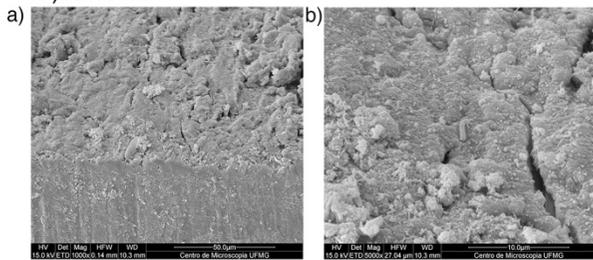
B) CHX



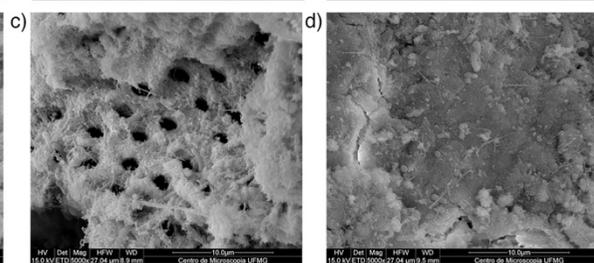
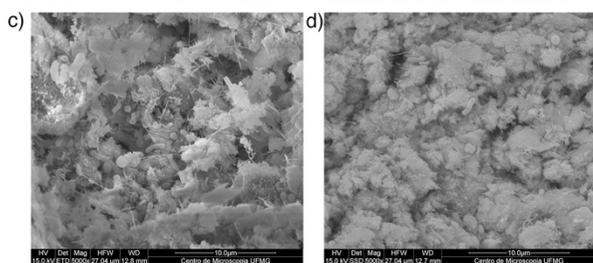
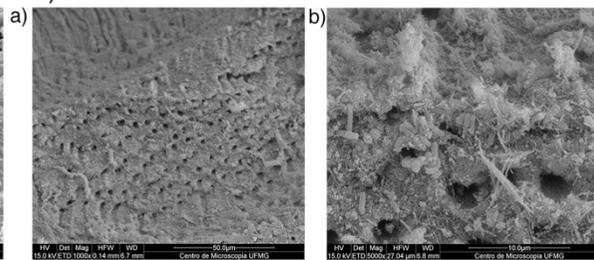
C) Papacárie



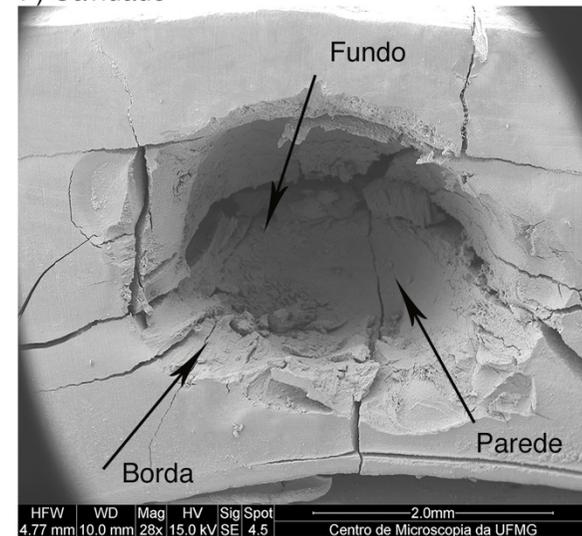
D) Ozônio



E) aPDT



F) Cavidade



Legenda: Imagens representativas da dentina para cada grupo experimental. (A) = Tampão Fosfato-Salino; (B) = Clorexidina; (C) = Papacárie; (D) = Terapia Fotodinâmica. Aumentos e regiões similares para cada grupo.

a) Borda interna (1000x);

b) Borda interna (5000x);

c) Parede lateral da cavidade (5000x);

d) Fundo da cavidade (5000x).

Cavidade demonstrada em um aumento de 28x com demarcação das regiões analisadas (E).

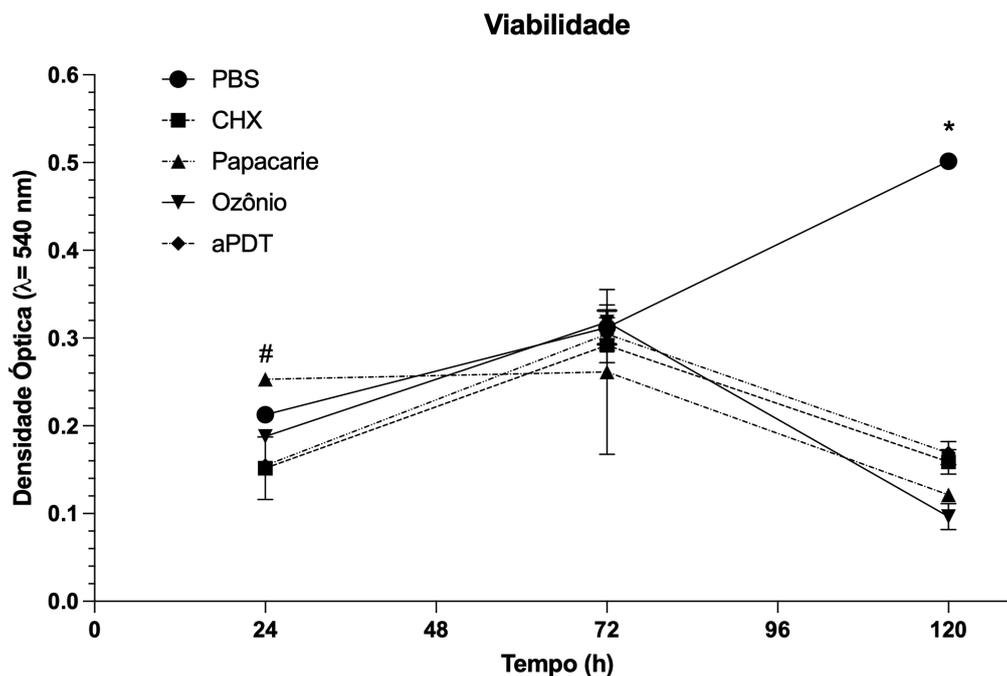
Fonte: Autoria própria, 2021.

5.4 Viabilidade Celular

Gráfico 2: Viabilidade celular em 24h, 72h e 120h após cada tratamento antimicrobiano.

Para avaliar o efeito dos tratamentos antimicrobianos sob as células pulpare, as substâncias foram aplicadas sobre a superfície dentinária dos discos desmineralizados artificialmente. Os discos “cariados” foram instalados em dispositivos metálicos de forma a manter contato indireto com o meio de cultivo para simulação do complexo dentino-pulpar (DINIZ et al. 2015). Após 24 H, o ensaio de MTT demonstrou que o tratamento com Papacárie resultou em maior viabilidade celular, quando comparado aos demais grupos, incluindo o grupo controle (PBS). Após 72 H dos tratamentos, não houve diferenças entre os em todos os grupos experimentais. Após 120 H, foi observada uma queda na viabilidade celular em todos os grupos experimentais, em relação ao controle (PBS), o qual proliferou significativamente em todos os tempos experimentais ($p < 0,05$) (GRÁFICO 2). Os grupos Ozônio, CHX e PDT apresentaram proliferação celular entre 24 e 72 H. Entretanto, esses mesmos tratamentos antimicrobianos tiveram queda significativa na viabilidade celular no tempo de 120 H em relação ao tempo de 72 H. A viabilidade celular no grupo Papacárie se manteve similar em todos os tempos experimentais ($p > 0,05$).

Gráfico 2 - Viabilidade celular para os tratamentos em 24, 48 e 120 H.



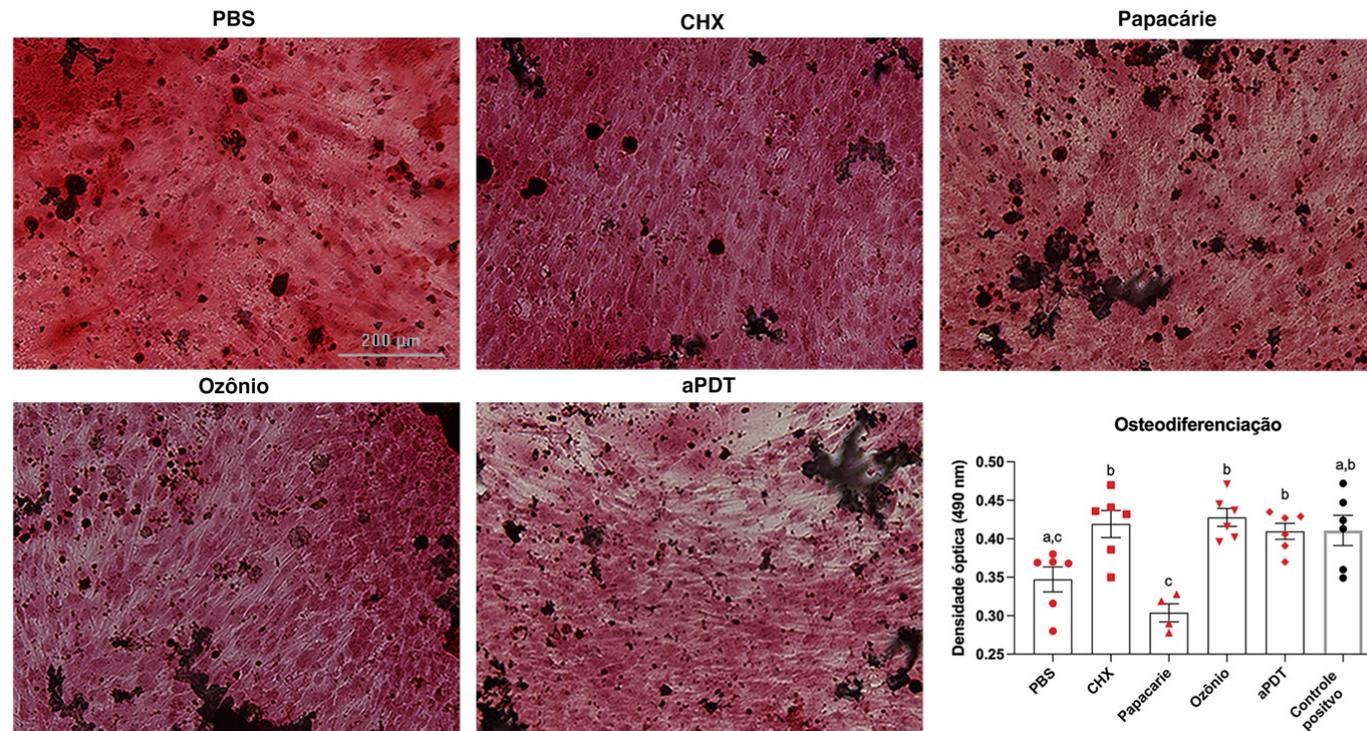
Legenda: Viabilidade de células pulpares de dente decíduo ao longo de 5 dias sob os diferentes tratamentos antimicrobianos. PBS = tampão fosfato-salino CHX= clorexidina; PDT = terapia fotodinâmica. Dados apresentados pela média \pm erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: A autoria própria, 2021.

5.5 Osteodiferenciação

A figura 10 mostra fotomicrografias de campo colorido representativas da formação de depósitos minerais para todos os grupos experimentais, por meio da coloração de vermelho de alizarina (AZR), seguida da análise quantitativa de osteodiferenciação pela solubilização dos nódulos. Após os tratamentos antimicrobianos e posterior indução da osteodiferenciação nas células pulpares, a capacidade de diferenciação e formação de depósitos minerais foi similar entre os grupos controle (PBS) e Papacárie ($p > 0,05$) (Figura 10). A mineralização nos grupos CHX, Ozônio e PDT foi semelhante entre si, embora significativamente maior que nos grupos PBS e Papacárie ($p < 0,05$).

Figura 10 - Coloração de AZR para verificação da osteodiferenciação



Legenda: Coloração de vermelho de alizarina para detecção de osteodiferenciação das células pulpares de dente decíduo após 10 dias de indução. Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais demonstrando a marcação avermelhada e depósitos minerais concêntricos na cor preta dispersos na monocamada. PBS = tampão fosfato-salino CHX= clorexidina; PDT = terapia fotodinâmica. Dados apresentados pela média \pm erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria, 2021.

6 DISCUSSÃO

No que diz respeito à remoção do tecido cariado em lesões de dentina profundas, a recomendação para realização da remoção parcial do tecido cariado é um consenso, mesmo que baseada em parâmetros clínicos subjetivos (MACHIULSKIENE et al., 2019; SCHWENDICKE et al., 2016). No entanto, esta técnica pode ser interpretada como um ato de negligência por parte de alguns clínicos, que, conseqüentemente, aceitam a exposição pulpar de lesões cáries profundas como um resultado da escavação completa do tecido cariado (SCHWENDICKE et al., 2013, 2016b). Clinicamente, por ser uma doença caracterizada pelo aspecto microbiológico, há receio de que bactérias remanescentes sejam agentes de lesões secundárias nas cavidades. Portanto, culturalmente, a eliminação de toda carga microbiana é um eventual motivo para a realização da remoção total do tecido cariado (KIDD; FEJERSKOV, 2004; SCHWENDICKE et al., 2016b). Evidências sobre os agentes antimicrobianos disponíveis no mercado poderiam então encorajar os clínicos a realizar a remoção seletiva do tecido cariado, permitindo assim a manutenção da dentina passível de recuperação e remineralização.

De todas as substâncias testadas, apenas a PDT e CHX apresentaram redução bacteriana, embora dentro de um mesmo *log*. Entretanto, apesar de reduzirem a carga microbiana presente na lesão cáries artificial com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, a redução de ordem de magnitude, ou seja, igual a um *log* ou mais, não foi observada. Apesar da diferença estatística, do ponto de vista biológico, a redução de menos de 1 *log* de magnitude poderia ter pouco significado clínico quando se almeja eliminar o biofilme presente dentro das cavidades dentárias. Os demais grupos foram similares ao controle e não apresentaram atividade antimicrobiana.

O Papacárie tem sido apontado com um eficaz método auxiliar para diferenciação da dentina infectada e afetada (BUSSADORI; CASTRO; GALVÃO, 2005). No entanto, com relação à atividade antimicrobiana, ele não foi eficaz em reduzir micro-organismos cariogênicos nas condições experimentais deste estudo. Em teste de difusão em ágar, o gel também foi ineficaz e não apresentou atividade antibacteriana em lesões cáries oclusais em dentes decíduos ou em micro-organismos isolados (BORTOLETTO et al., 2005; GUPTA et al., 2013). Clinicamente, após a remoção de toda a dentina infectada e limpeza da cavidade, o Papacárie apresentou atividade antimicrobiana estatisticamente significativa comparado ao grupo controle – considerando a primeira amostra de dentina removida previamente à

antisepsia (GOYAL et al., 2015; MODIMI et al., 2016; REDDY et al., 2015). No entanto, a redução ocorreu dentro de um mesmo *log* (MODIMI et al., 2016; REDDY et al., 2015). Apesar de resultados conflitantes na literatura, a atividade antimicrobiana do Papacárie parece estar associada à remoção mecânica da dentina infectada, ou seja, ao desempenho final do tratamento quimiomecânico.

Apesar de ser descrito como um potente agente antimicrobiano, a literatura é controversa com relação ao uso do Ozônio para redução da carga bacteriana em desenhos de estudo com biofilmes artificiais. Em um modelo de biofilme polimicrobiano (*Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sobrinus*, *S. oralis* e *Candida albicans*) criado em discos de esmalte bovino, o tratamento com Ozônio, em sua forma gasosa e líquida, não foi eficaz em reduzir a carga bacteriana, corroborando os resultados deste estudo para o biofilme obtido com co-cultura de *S. mutans* e *L. casei*. De fato, comparado ao hipoclorito de sódio (NaOCl) em diversas concentrações, o Ozônio foi similar a PDT, com diferença igual a um \log_{10} apenas para a CHX 2% (MÜLLER; GUGGENHEIM; SCHMIDLIN, 2007). Clinicamente, já foi demonstrado que Ozônio em sua forma gasosa e CHX 1% não foram eficazes em reduzir a quantidade de microorganismos presentes em lesões cariosas oclusais. A quantidade bacteriana apresentada após o tratamento encontrava-se na ordem de 10^7 e todas as reduções após tratamento ocorreram neste mesmo *log* (HAUSER-GERSPACH et al., 2009b). Ainda assim, em um modelo de biofilme *in vitro*, o Ozônio apresentou diferença estatisticamente significativa com relação ao controle, embora esta redução tenha ocorrido em ordem de magnitude similar (KAPDAN; ÖZTAŞ; SÜMER, 2013).

Nossos resultados apontaram para redução bacteriana após PDT. Os resultados da PDT foram similares para modelos de biofilme simplificados, desenvolvidos com apenas *Streptococcus mutans* (DINIZ et al., 2015). Outros estudos, com diferentes PSB – Eritrosina - e fontes de luz - Luz Azul - tiveram redução em ordem de magnitude em biofilmes polimicrobianos (*S. mutans*, *L. casei* e *C. albicans*) em discos de hidroxiapatita (GONG et al., 2019). No entanto, em lesões dentinárias, micro-organismos são mais resistentes à PDT (REIS; REGIS; RODRIGUES, 2019). Diferentes parâmetros são apresentados na literatura científica para a PDT e estes influenciam seus efeitos antimicrobianos. De acordo, revisões sistemáticas recentes apontam esta terapia como coadjuvante para a eliminação de micro-organismos cariogênicos e confirmam a necessidade de parâmetros apropriados para seu uso (CIEPLIK et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2019).

Apesar de modelos de biofilme variados serem desenvolvidos *in vitro*, com diferentes complexidades e reprodutibilidades, estes são distintos do processo cariogênico *in vivo*, devido

à alta complexidade do ambiente bucal (MASKE et al., 2017). A efetividade de agentes antimicrobianos apresenta variações entre diversos modelos artificiais de biofilme. Modelos de biofilmes devem mimetizar uma acumulação bacteriana em superfícies dentais, expondo estas a um desafio cariogênico e, conseqüentemente, simulando um processo de lesão cariosa (FERNÁNDEZ; TENUTA; CURY, 2016). A presença da MEC é uma das principais características do biofilme e consiste em um dos fatores responsáveis por suas características (JAKUBOVICS et al., 2021). Nas fotomicrografias obtidas por meio da MEV observa-se a presença de MEC, sugerindo-se então a formação de um biofilme.

Streptococcus mutans são os micro-organismos responsáveis por promover a adesão bacteriana na superfície dentária. Por sua vez, os *Lactobacillus* estão fortemente associados com lesões cariosas dentinárias, devido à fermentação de açúcares em produtos ácidos, diminuindo o pH e promovendo o desenvolvimento de biofilme (CCAHUANA-VÁSQUEZ; CURY, 2010; KRZYŚCIAK et al., 2014). Alguns estudos apontaram que a co-cultura de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, modelo similar ao utilizado neste estudo, aumentou significativamente a concentração de *Lactobacillus* na formação do biofilme, devido à interação entre ambas espécies. Decorrente da baixa habilidade de adesão do *L. casei* isolado, a adesão bacteriana do biofilme poderia estar correlacionada a pela produção de glucanos de alto peso molecular e presença de fimbrias por parte dos *Streptococcus mutans* (WEN et al., 2010, 2017). Outro fator ao se considerar a adesão bacteriana em dentina é a ligação ao colágeno exposto, que se comporta como um substrato (LOVE; JENKINSON, 2002; WEN et al., 2010). Esta interação bacteriana poderia então reduzir a sensibilidade do conjunto aos agentes antimicrobianos, como a CHX, e estes possuem uma ação antibacteriana mais superficial (HAUSER-GERSPACH et al., 2009; KARA et al., 2007; ZAURA-ARITE; VAN MARLE; TEN CATE, 2001). A capacidade de difusão dos agentes pelas camadas do biofilme também pode influenciar na baixa sensibilidade dos micro-organismos com relação aos agentes antimicrobianos (JAKUBOVICS et al., 2021). No entanto, a interação entre estes dois micro-organismos em co-cultura é pouco explorada (WEN et al., 2017).

Modelos de co-cultura, entre *S. mutans* e *Veillonella parvula* por exemplo, podem apresentar resistência antimicrobiana à CHX (KARA et al., 2007). Mesmo em biofilmes complexos, como o de lesão cariosa presente clinicamente, a efetividade dos agentes antimicrobianos é conflitante. Concomitante, em nossa revisão sistemática de estudos controlados randomizados e não randomizados ainda não publicada, foram comparados todos os tratamentos utilizados neste estudo e o Carisolv. Apenas a PDT e CHX apresentaram atividade antimicrobiana para micro-organismos associados à cárie dentária (Total de bactéria

presente na lesão cariosa, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*), com efetividade similar (FERREIRA et al., 2021) (ANEXO 1). No presente estudo *in vitro*, não foi realizada a remoção mecânica do biofilme, mas a coleta do material microbiológico foi realizada pela passagem de um *microbrush* nas cavidades. A remoção da camada externa, contaminada, da dentina, poderia auxiliar na redução da concentração bacteriana em lesões cariosas *in vivo* (BANERJEE, 2018; INNES et al., 2016; SCHWENDICKE et al., 2016a).

As MMPs dentinárias desempenham um importante papel na progressão da cárie dentária, como também são capazes de interferir na matriz de colágeno e na destruição da interface adesiva (TJÄDERHANE et al., 2013). O uso de inibidores de MMPs (TIMPs) pode vir a aperfeiçoar a integridade e estabilidade das restaurações em longo prazo (MONTAGNER et al., 2014). Com relação aos efeitos no tecido dentinário, todos os tratamentos apresentaram atividade em pelo menos uma das MMPs analisadas, incluindo o tratamento com CHX nas condições experimentais testadas, desenvolvendo então atividade gelatinolítica, ainda que eventual. Possivelmente, estes agentes não possuem a capacidade constante de interferir no mecanismo de troca de íons cálcio e zinco.

Classicamente, diversos trabalhos apresentam a CHX como um potente inibidor de MMP (TIMP) (HEBLING et al., 2005; MAZZONI et al., 2011). De fato, há evidências do potencial da CHX em minimizar a degradação da camada híbrida, embora estudos também tenham demonstrado que o efeito da CHX é limitado visando a preservação da integridade adesiva (MONTAGNER et al., 2014). Neste estudo, a avaliação imediata da CHX sobre o tecido dentinário revelou atividade enzimática de MMP em dois géis, embora em um deles a MMP detectada estivesse em estado latente. De fato, é de conhecimento que a efetividade antimicrobiana e antiproteolítica da CHX está relacionada a sua propriedade de substantividade (CARRILHO et al., 2010; FRANCO et al., 2003). Considerando a investigação imediata da atividade de MMPs no presente trabalho, estudos para avaliar o efeito prolongado da CHX (e de antemão das outras substâncias antimicrobianas de interesse) no tecido dentinário são necessários, para confirmar a inibição total ou parcial da atividade de MMPs frente a esses tratamentos.

É digno de nota que, em sua maioria, os trabalhos avaliam a atividade das MMPs após a realização de tratamentos ácidos com EDTA ou ácido fosfórico (HEBLING et al., 2005; MAZZONI et al., 2007, 2015). Devido à produção de ácidos durante o processo de fermentação de carboidratos na patogênese da cárie dentária, a atividade de MMPs foi avaliada em amostras coletadas após o desenvolvimento da cárie dentária artificial, visto que estas endopeptidases

estão envolvidas neste processo (CHAUSSAIN-MILLER; GOLDBERG; MENASHI, 2006; KIDD; FEJERSKOV, 2004).

Até o momento, nenhum outro trabalho parece ter avaliado o efeito de substâncias antimicrobianas como o Ozônio, Papacárie e PDT na atividade de MMPs dentinárias. No tecido cardiovascular, o ozônio apresentou um aumento na atividade da MMP-9 em sua forma ativa (THAM et al., 2017). Por outro lado, no tecido dentinário, a probabilidade de ocorrer a expressão dessas enzimas com atividade gelatinolítica nos grupos tratados por Ozônio ou Papacárie parece ser baixa. Em contraste, o tratamento com PDT consistentemente levou à ativação de alguma das formas complexadas de MMP-9 (3x cada uma). Estudos sobre os efeitos da ativação dessas MMPs pela a PDT sobre o tratamento restaurador subsequente, particularmente após procedimentos adesivos, ainda não são bem conhecidos. Entretanto, clinicamente, já foi apontado que a PDT não comprometeu o comportamento de restaurações de resina composta após seis meses da intervenção, quando foram avaliados os seguintes parâmetros: retenção, adaptação e descoloração marginal, ocorrência de cárie secundária e alteração de cor (ALVES et al., 2019).

Além da atividade das MMPs, as características estruturais da dentina podem afetar a longevidade das restaurações. Fatores como a presença de água neste tecido, a permeabilidade após a remoção da *smear layer* e a orientação dos túbulos dentinários interferem nos procedimentos adesivos (CARVALHO et al., 20012; ERHARDT et al., 2008). Por sua vez, durante a progressão da cárie dentária o tecido dentinário sofre alterações microestruturais, por meio da redução do conteúdo mineral e da redistribuição das fibras colágenas (CARVALHO et al., 2012). Os resultados da MEV mostram a desmineralização na dentina, como também uma diferença na abertura dos túbulos dentinários, principalmente para o grupo experimental tratado com Papacárie. Diante de alterações como estas, a força de adesão na dentina afetada é menor do que na dentina hígida, embora sistemas adesivos como o *etch-and-rinse* tendem a promover uma maior força de adesão imediata neste tecido (CEBALLOS et al., 2003). Apesar de relatos de caso em que a longevidade de restaurações adesivas não foi comprometida com a adesão na dentina afetada, ainda há necessidade de mais estudos na literatura para compreender a adesão neste tecido (BRESCHI et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; JARDIM et al., 2020; NAKRATHOK et al., 2020).

Apesar de reduzir a viabilidade de células da polpa dentária a partir do 3º dia, os tratamentos promoveram, em sua maioria, a osteodiferenciação das células e a produção de nódulos minerais até o 10º dia. Em estudos prévios de citocompatibilidade da PDT realizados com parâmetros similares ao deste estudo, observou-se redução progressiva da viabilidade de

osteoblastos e células pulpares ao longo de determinados tempos experimentais, como por exemplo 24h, 48h e 72h após o tratamento (ATEŞ et al., 2017; DINIZ et al., 2014). Por outro lado, corroborando nossos resultados para o ensaio de osteodiferenciação, também já foi demonstrada a capacidade da PDT em aumentar a atividade de osteoblastos humanos – adjuvantes no processo de mineralização – após sete dias de cultivo celular (ATEŞ et al., 2017). Em contraste com os resultados deste estudo, o Papacárie apresentou redução da viabilidade celular após 24 H de contato com células pulpares de camundongos quando aplicado na concentração de 5% (BASTOS et al., 2019). Para a concentração de 0,5%, entretanto, nenhuma redução na viabilidade das células foi observada (BASTOS et al., 2019). No presente estudo, o gel foi utilizado em sua forma comercial (concentração não informada pelo fabricante), sem nenhuma diluição, devido à indicação clínica de que o material deve ser utilizado desta forma. Embora uma maior viabilidade celular tenha sido observada após 24 H de contato com o Papacárie em comparação aos demais grupos testados, em nenhum tempo experimental o material estimulou a proliferação celular. Além disso, o mesmo foi numericamente o tratamento com menor indução de osteodiferenciação. A redução da viabilidade celular pode estar relacionada ao tipo de célula, visto que, em um diferente estudo, a viabilidade celular de fibroblastos não foi afetada quando analisada pelo ensaio de Azul de Trypan (MARTINS et al., 2009). Até o momento, este é o primeiro estudo a avaliar o efeito do ozônio na osteodiferenciação celular e sua citotoxicidade *in vitro*, impedindo a discussão desses resultados com estudos prévios da literatura.

7 CONCLUSÃO

- Em modelo de biofilme com co-cultura de *S. mutans* e *L. casei* desenvolvido em lesões cáries artificiais, nenhuma substância utilizada como antimicrobiano nos métodos quimiomecânicos foi eficaz em reduzir, em ordem de magnitude, a carga bacteriana da lesão;
- Para atividade antimicrobiana superficial, a PDT e CHX 2% foram eficazes, enquanto os demais grupos foram similares ao grupo controle;
- Todas as substâncias avaliadas demonstraram algum grau de atividade gelatinolítica, por meio da atividade de MMP-2 e MMP-9, sugerindo-se possível implicação com o substrato dentinário subjacente;
- Os tratamentos apresentaram, em curto prazo, moderada citotoxicidade em células da polpa dentária;
- A capacidade de osteodiferenciação e produção de nódulos minerais das culturas de células foram preservadas.

REFERÊNCIAS

- ABDUL KHALEK, A. et al. Effect of Papacarie and Alternative Restorative Treatment on Pain Reaction during Caries Removal among Children: a Randomized Controlled Clinical Trial. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v. 41, n. 3, p. 219-224, 2017.
- ALEJANDRA, D. et al. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. **Lasers Medical Science**, Londres, v. 33, n.3, p. 479-487, Abr. 2017.
- ALI, A. H. et al. Self-Limiting versus Conventional Caries Removal: A Randomized Clinical Trial. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 97, n. 11, p. 1207–1213, Out. 2018.
- ALVES, L. et al. Influence of antimicrobial photodynamic therapy in carious lesion. Randomized split-mouth clinical trial in primary molars. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Boston, v. 26, p. 124-130, Jun. 2019a.
- ARAÚJO, P. V. et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions in vivo, using culture and real-time PCR methods. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Boston, v. 12, n. 3, p. 401–407, Set. 2015.
- ASWATHI, K. et al. Comparison of efficacy of caries removal using polymer bur and chemomechanical caries removal agent: A clinical and microbiological assessment - An in vivo study. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, Chandigarh, v. 35, n. 1, p. 6–13, Jan/Mar. 2017.
- ATEŞ, G. B. et al. Methylene blue mediated photobiomodulation on human osteoblast cells. **Lasers in Medical Science**, Londres, v. 32, n. 8, p. 1847–1855, Nov. 2017.
- AZARPAZHOOH, A.; LIMEBACK, H. The application of ozone in dentistry : A systematic review of literature. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 36, n. 2, p. 104–116, Fev. 2008.
- BANERJEE, A. Selective Removal of Carious Tissue. In: SCHWENDICKE, F. **Selective Removal of Carious Dentin**. 1. ed. New York: Springer, 2018. p. 55–70.
- BARROS, M. M. A. F. et al. Selective, stepwise, or nonselective removal of carious tissue: which technique offers lower risk for the treatment of dental caries in permanent teeth? A systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, Berlim, v. 24, n. 2, p. 521–532, Fev. 2020.

BASTOS, L. A. et al. Effects of papain-based gel used for caries removal on macrophages and dental pulp cells. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 5, p. 484–490, Out. 2019.

BAYSAN, A.; WHILEY, R. A.; LYNCH, E. Antimicrobial Effect of a Novel Ozone-Generating Device on Micro-Organisms Associated with Primary Root Carious Lesions in vitro. **Caries Research**, Nova York, v. 34, n. 6, p. 498–501, Nov./Dez. 2000.

BIN-SHUWAISH, M. S. Effects and effectiveness of cavity disinfectants in operative dentistry: A literature review. **Journal of Contemporary Dental Practice**, Cincinnati, v. 17, n. 10, p. 867–879, Out. 2016.

BLACK, G. V. **A work on operative dentistry**. 1. ed. Chicago: Medico-Dental Publishing Company, 1908.

BORTOLETTO, C. C. et al. Atividade antimicrobiana de um novo biomaterial utilizado na remoção químico-mecânica da cárie. **Rev. odontol. UNESP**, v. 34, n. 4, p. 199–201, 2005.

BRAZZELLI, M. et al. Systematic review of the effectiveness and cost-effectiveness of HealOzone for the treatment of occlusal pit/fissure caries and root caries. **Health Technology Assessment**, Winchester, v. 10, n. 16, p. iii–50, Mai. 2006.

BRESCHI, L. et al. Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 24, n. 1, p. 90–101, Jan. 2008.

BUSSADORI, S. K. et al. Clinical and radiographic study of chemical-mechanical removal of caries using papacarie: 24-Month follow up. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v. 35, n. 3, p. 251–254, 2011.

BUSSADORI, S. K.; CASTRO, L. C.; GALVÃO, A. C. Papain gel: A new chemo-mechanical caries removal agent. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v. 30, n. 2, p. 115–119, 2005.

CARRILHO, M. R. et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 86, n. 1, p. 90-94, Jan. 2007.

CARRILHO, M. R. et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 26, n. 8, p. 779–785, Ago. 2010.

CARVALHO, R. M. et al. Dentin as a bonding substrate. **Endodontic Topics**, v. 21, n. 1, p. 62–88, Jul. 2009.

CAUFIELD, P. W. et al. Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 94, n. September, p. 110S-118S, Set. 2015.

CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; CURY, J. A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 2, p. 135–141, Jun. 2010.

CEBALLOS, L. et al. Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 31, n. 7, p. 469–477, Set. 2003.

CHAUSSAIN-MILLER, C.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Human Caries. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 85, n. 1, p. 22–32, Jan. 2006.

CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions—A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Boston, v. 18, p. 54–62, Jun. 2017.

COELHO, A. et al. Effect of cavity disinfectants on dentin bond strength and clinical success of composite restorations—a systematic review of in vitro, in situ and clinical studies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 1, p. 1–27, Dez. 2021.

COSTA-SANTOS, L. et al. The effect of antimicrobial photodynamic therapy on infected dentin in primary teeth: A randomized controlled clinical trial protocol. **Medicine**, Hagerstown, v. 98, n. 15, p. e15110, Dez. 2019.

CUSICANQUI MENDEZ, D. A. et al. Curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Boston, v. 24, p. 102–108, Dez. 2018.

DE OLIVEIRA, A. B. et al. Effect of photodynamic therapy on microorganisms responsible for dental caries: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 14, Jul. 2019.

DELGADO, C. C. et al. Redução da atividade proteolítica da dentina após curtos períodos de aplicação de proantocianidina. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 44, n. 6, p.

355–359, Nov./Dez. 2015.

DENG, Y. et al. Effects of Papacarie on children with dental caries in primary teeth: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Paediatric Dentistry**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 361–372, Jul. 2018.

DINIZ, I. M. A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: A promise candidate for caries lesions treatment. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Boston, v. 12, n. 3, p. 511–518, Set. 2015.

DINIZ, I. M. A. et al. Evaluation of antibacterial photodynamic therapy effects on human dental pulp cell cultures. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, Boston, v. 11, n. 3, p. 300–306, Set. 2014.

DURMUS, N. et al. Effectiveness of the ozone application in two-visit indirect pulp therapy of permanent molars with deep carious lesion: a randomized clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, Berlim, v. 23, n. 10, p. 3789–3799, Out. 2019.

ELHENNAWY, K. et al. Selective vs stepwise removal of deep carious lesions in primary molars: 12-Months results of a randomized controlled pilot trial. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 77, n. July, p. 72–77, Out. 2018.

ERHARDT, M. C. G. et al. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: Effects of long-term water exposure. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 24, n. 6, p. 786–798, Jun. 2008.

FEATHERSTONE, J. D. B. The continuum of dental caries - Evidence for a dynamic disease process. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 83, n. SPEC. ISS. C, p. 39-42, 2004.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. **Caries Research**, Nova York, v. 38, n. 3, p. 182–191, Mai./Jun. 2004.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 2 Ed. São Paulo: Santos. 2011.

FERNÁNDEZ, C. E.; TENUTA, L. M. A.; CURY, J. A. Validation of a cariogenic biofilm model to evaluate the effect of fluoride on enamel and root dentine demineralization. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 11, n. 1, p. 1–13, Jan. 2016.

FRANCO, C. F. et al. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. **Artificial Organs**, Cleveland, v. 27, n. 5, p. 486–491, Mai. 2003.

FRENCKEN, J. E. et al. Minimal intervention dentistry for managing dental caries - A review: Report of a FDI task group. **International Dental Journal**, Londres, v. 62, n. 5, p. 223–243, Out. 2012.

GANAS, P.; SCHWENDICKE, F. Effect of reduced nutritional supply on the metabolic activity and survival of cariogenic bacteria in vitro. **Journal of Oral Microbiology**, Filadélfia, v. 11, n. 1, Abr. 2019.

GENDRON, R. et al. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 6, n. 3, p. 437–439, Mai. 1999.

GONG, J. et al. Effect of Photodynamic Therapy on Multispecies Biofilms, Including *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, and *Candida albicans*. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, New Rochelle, v. 37, n. 5, p. 282–287, Mai. 2019.

GOYAL, P. A. et al. Efficacy and tolerance of papain gel with conventional drilling method: a clinico-microbiological study. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v. 39, n. 2, p. 109–112, 2015.

GUNAYDIN, Z.; YAZICI, A. R.; CEHRELI, Z. C. In Vivo and In Vitro Effects of Chlorhexidine Pretreatment on Immediate and Aged Dentin Bond Strengths. **Operative Dentistry**, Seattle, v. 41, n. 3, p. 258–267, Mai./Jun. 2016.

GUPTA, S. et al. Clinical and microbiological evaluation of the carious dentin before and after application of papacarie gel. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v. 38, n. 2, p. 133–138, 2013.

HAMAMA, H. H.; YIU, C. K.; BURROW, M. F. Viability of intratubular bacteria after chemomechanical caries removal. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 40, n. 12, p. 1972–1976, Dez. 2014.

HAUSER-GERSPACH, I. et al. Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children in vivo. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 13, n. 3 CC-Oral Health, p. 287-291, Set. 2009a.

HEBLING, J. et al. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in

vivo. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 84, n. 8, p. 741–746, Ago. 2005.

INNES, N. P. T. et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. **Advances in Dental Research**, Washington, v. 28, n. 2, p. 49–57, Mai. 2016.

IWAMI, Y. et al. Relationship between bacterial infection and evaluation using a laser fluorescence device, DIAGNOdent. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 112, n. 5, p. 419–423, Out. 2004.

JAIN, A.; BAHUGUNA, R. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 212–218, Set./Dez. 2015.

JAKUBOVICS, N. S. et al. The dental plaque biofilm matrix. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 86, n. 1, p. 32–56, Jun. 2021.

JARDIM, J. J. et al. Restorations after selective caries removal: 5-Year randomized trial. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 99, n. April, p. 103416, Ago. 2020.

KAPDAN, A.; ÖZTAŞ, N.; SÜMER, Z. Comparing the antibacterial activity of gaseous ozone and chlorhexidine solution on a tooth cavity model. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, Espanha, v. 5, n. 3, p. 3–7, Jul. 2013.

KARA, D. et al. Microstructural differences between single-species and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula*, before and after exposure to chlorhexidine. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 271, n. 1, p. 90–97, Jun. 2007.

KATCHBURIAN, E. **Histologia e Embriologia Oral**. 4. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2017.

KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, Nova York, v. 43, n. 7, p. 755–767, Set. 2011.

KIDD, E. A. M.; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 83, p.35-38, 2004.

KOCHHAR, G. K. et al. An evaluation of different caries removal techniques in primary teeth: a comparative clinical study. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v. 36, n. 1, p. 5-9, 2011.

KRZYŚCIAK, W. et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 33, n. 4, p. 499–515, Abr. 2014.

KUBOKI, Y.; LIU, C.; FUSAYAMA, T. Mechanism of Differential Staining in Carious Dentin. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 62, n. 6, p. 713–714, Jun. 1983.

LAMARQUE, G. C. C. et al. Could chlorhexidine be an adequate positive control for antimicrobial photodynamic therapy in- in vitro studies? **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Boston, v. 25, n. October 2018, p. 58–62, Mar. 2019.

LOVE, R. M.; JENKINSON, H. F. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, Boca Raton, v. 13, p. 171–183, 2002.

MACHIULSKIENE, V. et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. **Caries Research**, Nova York, v. 54, n. 1, p. 7-14, Out. 2020.

MARTINS, M. D. et al. Biocompatibility analysis of chemomechanical caries removal material papacarie on cultured fibroblasts and subcutaneous tissue. **Journal of Dentistry for Children**, Chicago, v. 76, n. 2, p. 123–129, Mai./Ago. 2009.

MASKE, T. T. et al. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. **Biofouling**, Nova York, v. 33, n. 8, p. 661–675, Set. 2017.

MATSUMOTO, S. F. et al. Assessment of chemomechanical removal of carious lesions using Papacarie Duo™: randomized longitudinal clinical trial. **Indian Journal of Dental Research**, Ahmedabad, v. 24, n. 4, p. 488-492, Jul.Ago. 2013.

MAZZONI, A. et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 86, n. 5, p. 436–440, Mai. 2007.

MAZZONI, A. et al. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: Biochemical and immunohistochemical analysis. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 39, n. 7, p. 470–477, Jul. 2011.

MAZZONI, A. et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 94, n. 2, p. 241–251, Fev. 2015.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147–179, Jan. 1999.

MENDEZ, D. A. C. et al. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. **Lasers in Medical Science**, Londres, v. 33, n. 3, p. 479–487, Abr. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**. Brasília, DF: SVS. 2012.

MODIMI, K. V. et al. Microbiological Assessment of Carious Dentine using Chemomechanical Caries Removal and Conventional Hand Excavation in Primary and Permanent Teeth: A Clinical Study. **Journal of International Oral Health**, Ahmedabad, v. 8, n. 7, p. 760–766, 2016.

MONTAGNER, A. F. et al. MMP inhibitors on dentin stability: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 93, n. 8, p. 733-743, Ago. 2014.

MÜLLER, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMIDLIN, P. R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 77–80, Fev. 2007.

NAKABAYASHI, N.; NAKAMURA, M.; YASUDA, N. Hybrid Layer as a Dentin-Bonding Mechanism. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, Filadélfia, v. 3, n. 4, p. 133–138, Jul./Ago. 1991.

NAKRATHOK, P. et al. The effect of selective carious tissue removal and cavity treatments on the residual intratubular bacteria in coronal dentine. **Journal of Dental Sciences**, Taiwan, v. 15, n. 4, p. 411–418, Dez. 2020.

NEVES, A. D. A. et al. Caries-removal effectiveness and minimal-invasiveness potential of caries-excitation techniques: A micro-CT investigation. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 39, n. 2, p. 154–162, Fev. 2011.

NOGALES, C. G. et al. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry. **Journal of Contemporary Dental Practice**, Cincinnati, v. 9, n.4, p. 1-9, Mai. 2008.

PALOSAARI, H. et al. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue

inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 111, n. 2, p. 117–127, Abr. 2003.

PEIXOTO, R. T. R. C. et al. The Influence of Occlusal Finish Line Configuration on Microleakage of Indirect Composite Inlays. **Journal of Adhesive Dentistry**, New Malden, v. 4, n. 2, 2002.

PERES, M. A. et al. Oral diseases: a global public health challenge. **The Lancet**, Londres, v. 394, n. 10194, p. 249–260, Jul. 2019.

REDDY, M. V. et al. Efficacy of antimicrobial property of two commercially available chemomechanical caries removal agents (Carisolv and Papacarie): An ex vivo study. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, Mumbai, v. 5, n. 3, p. 183, Mai./Jun. 2015.

REIS, A. C. M.; REGIS, W. F. M.; RODRIGUES, L. K. A. Scientific evidence in antimicrobial photodynamic therapy: An alternative approach for reducing cariogenic bacteria. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Boston, v. 26, p. 179-189, Mar. 2019.

RICKETTS, D.; SCHWENDICKE, F. Selective Removal of Carious Tissue. **Monographs in Oral Science**, Nova York, v. 27, p. 82–91, Mai. 2018.

SANTOS, G. M. et al. Effectiveness and Safety of Ozone Therapy in Dental Caries Treatment: Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, Saint Louis, v. 20, n. 4, p. 101472, Dez. 2020.

SANTOS, V. E. et al. Mecanismo de ação da clorexidina sobre as enzimas metaloproteinases e sua repercussão clínica: um estudo de revisão. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, Passo Fundo, v. 21, n. 3, p. 306–311, Set./Dez. 2017.

SCHEFFEL, D. L. et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. **Operative Dentistry**, Seattle, v. 39, n. 2, p. 152-158, Mar. Abr. 2014.

SCHERER, K. M. et al. New approaches to photodynamic therapy from types I, II and III to type IV using one or more photons. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, São Francisco, v. 17, n. 2, p. 171-189, 2017.

SCHWENDICKE, F. et al. Attitudes and behaviour regarding deep dentin caries removal: A survey among German dentists. **Caries Research**, Nova York, v. 47, n. 6, p. 566–573, Jul.

2013.

SCHWENDICKE, F. et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. **Advances in Dental Research**, Washington, v. 28, n. 2, p. 58–67, Mai. 2016a.

SCHWENDICKE, F. et al. Patients ' preferences for selective versus complete excavation : A mixed-methods study. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 46, p. 47–53, Mar. 2016b.

SCHWENDICKE, F.; PARIS, S.; TU, Y. K. Effects of using different criteria for caries removal: a systematic review and network meta-analysis. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 43, n. 1, p. 1–15, Jan. 2015.

SILVA, Z. S. et al. The effects of photodynamic therapy with blue light and papain-based gel associated with Urucum, on collagen and fibroblasts: a spectroscopic and cytotoxicity analysis. **Lasers in Medical Science**, Londres, v. 35, n. 3, p. 767-775, Ago. 2019.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 17, p. 463–516, 2001.

STÜBINGER, S.; SADER, R. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery : A review. **Quintessence International**, Berlim, v. 37, n. 5, p. 353–360, Mai. 2006.

THAM, A. et al. Modeling Vascular Inflammation and Atherogenicity after Inhalation of Ambient Levels of Ozone: Exploratory Lessons from Transcriptomics. **Inhalation Toxicology**, Nova York, v. 29, n. 3, p. 96–105, 2017.

TJÄDERHANE, L. et al. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). **Advances in Dental Research**, Washington, v. 15, p. 55–58, Ago. 2001.

TJÄDERHANE, L. et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 116–135, Jan. 2013.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827–839, Mai. 2003.

WALKER, J. T. et al. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3327–3332, 2003.

WATT, R. G. et al. Ending the neglect of global oral health: time for radical action. **The Lancet**, Londres, v. 394, n. 10194, p. 261–272, 2019.

WEBER, C. M.; ALVES, L. S.; MALTZ, M. Treatment decisions for deep carious lesions in the Public Health Service in Southern Brazil. **Journal of Public Health Dentistry**, Raleigh, v. 71, n. 4, p. 265–270, 2011.

WEN, Z. T. et al. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. **BMC Microbiology**, Londres, v. 10, p. 111, Abr. 2010.

WEN, Z. T. et al. *Streptococcus mutans* displays altered stress responses while enhancing biofilm formation by *Lactobacillus casei* in mixed-species consortium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1-12, Dez. 2017.

YOSHIHARA, K. et al. Three-dimensional observation and analysis of remineralization in dentinal caries lesions. **Scientific Reports**, Londres, v. 10, n. 1, p. 4387, Mar. 2020.

ZAURA-ARITE, E.; VAN MARLE, J.; TEN CATE, J. M. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 80, n. 5, p. 1436–1440, Mai. 2001.

ZHOU, J. et al. Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. **The Journal of Adhesive Dentistry**, New Malden, v. 12, n. 1, p. 27–31, Fev. 2010.

APÊNDICE A

DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES BOVINOS

O Abatedouro Frigorífico Dimeza Alimentos de Contagem, localizado na Avenida Doutor Antônio Chagas Diniz, nº 555, Bairro Cidade Industrial, CEP 32210-160, Contagem, Minas Gerais, com CNPJ 09.021.512/0001-09, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo a supervisora do controle de qualidade a médica veterinária Isabela Castro Oliveira e Assis, CRMV-MG 19994, declara a doação de 150 dentes bovinos de animais abatidos a fins produtivos do abatedouro à professora Ivana Márcia Alves Diniz, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, com fins a utilização no desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “Métodos Antimicrobianos Coadjuvantes para Tratamento de Lesões Cariosas Profundas: Um estudo *in vitro*”.

Contagem, Minas Gerais, 23 de outubro de 2019.

Isabela Castro O. e Assis
CRMV/MG 19.994
Supervisora Controle de Qualidade



Isabela Castro Oliveira e Assis
Médica Veterinária
CRMV MG 19994

APÊNDICE B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E CITOTOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO QUIMIOMECÂNICO DE LESÕES CARIOSAS PROFUNDAS: UM ESTUDO IN VITRO

Pesquisador: Ivana Márcia Alves Diniz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37612820.1.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.487.068

Apresentação do Projeto:

A fim de conservação da estrutura dentária, a remoção parcial do tecido cariado deve ser uma prerrogativa em lesões cariosas profundas. Entretanto, até o momento, não há um critério clínico que defina o limite seguro de remoção deste tecido, visto que os parâmetros a serem observados são subjetivos e dependentes do operador. Diante desse desafio, o clínico pode remover mais tecido sadio que o desejável, fragilizando a estrutura dentária e/ou precipitando tratamentos conservadores ou radicais da polpa dentária. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar as propriedades antimicrobianas, a morfologia dentinária e a citotoxicidade de diversas substâncias químicas passíveis de serem utilizadas como coadjuvantes no tratamento restaurador da lesão de cárie. Para a análise de eficácia antimicrobiana será desenvolvido um modelo in vitro de cárie dentária artificial, em dentes bovinos, que será tratada seguindo os grupos: G1 Tampão Fosfato-Salino (controle sem tratamento); (G2) Digluconato de Clorexidina (2%); (G3) Azul de Metileno; (G4) Laser Vermelho; (G5) Terapia Fotodinâmica (aPDT); (G6) Água Ozonizada e (G7) Papacárie®. Posteriormente, estes dentes serão preparados e analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), para descrição da morfologia da dentina e quantificação da abertura dos túbulos dentinários no software Image J. Essas substâncias também serão testadas em células-tronco da polpa dentária, in vitro, e analisadas em relação aos efeitos citotóxicos na viabilidade/proliferação e capacidade de mineralização. Para isso, serão utilizados 5 dentes deciduos para o isolamento de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.487.068

suas células pulpares. Para avaliar a citotoxicidade, 1 x 10⁴ células serão semeadas em câmaras pulpares artificiais (utilizando um disco de dentina bovino de 0,8 mm interposto) em placas de 24-poços, em seguida tratadas segundo os grupos experimentais e, após 48 horas, submetidas aos ensaios de viabilidade/proliferação e mineralização. Para a viabilidade celular, as células serão coradas com o kit Live/Dead e avaliadas por microscopia de fluorescência. A proliferação celular será avaliada por meio do teste de MTT (Metiltetrazólio). Para avaliar a mineralização, as células serão induzidas e será realizada a coloração com vermelho de alizarina. Para análises estatísticas, serão realizados os testes de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, visando realizar uma comparação entre os grupos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar as propriedades antimicrobianas, os efeitos sobre a estrutura da dentina e a citotoxicidade dos seguintes tratamentos utilizados como agentes químicos no tratamento quimiomecânico da cárie dentária: Tampão Fosfato-Salino (controle sem tratamento), Digluconato de Clorexidina (2%), Azul de Metileno (0,025 mg/ml), Laser Vermelho, Terapia Fotodinâmica (aPDT), Água Ozonizada e Papacárie®.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco apresentado está relacionado a cirurgia de extração dos dentes, caso o procedimento seja necessário. Se tratando de dentes decíduos (de leite), eles podem esfoliar, ou seja, cair, e serem armazenados em leite por 24 horas, e serem destinados à pesquisa. No TCLE foi acrescentado "As extrações não serão realizadas com o propósito de obter material para este estudo, mas sim como indicação clínica. Em determinados casos, quando o dente de leite não esfolia (cai) sozinho, há necessidade da extração para que o dente permanente possa vir a nascer neste local. Isto será realizado como parte do plano de tratamento odontológico que ele está recebendo na AMR."

Benefícios:

Para minimizar o desgaste do tecido dentário e exposição do tecido polpa dentária (nervo do dente), substâncias podem ser utilizadas para diminuir o número de microorganismos (bactérias) presentes na cárie dentária. Queremos, então, minimizar o desgaste da dentina (parte dura do dente) ao remover o tecido cariado, e para isso utilizaremos estas substâncias. Vamos avaliar se essas substâncias possuem compatibilidade com as células da polpa dentária em laboratório.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.487.068

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a Odontologia. Término previsto para 30/07/2021. Trata-se do projeto de pesquisa de uma dissertação de Mestrado. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo departamento em 17/08/2020. Foi apresentado cronograma de execução e orçamento, ambos viáveis.

As pendências foram acatadas e alteradas.

A pesquisa propõe utilização de dentes bovinos e de dentes decíduos humanos. Foi anexado um Termo de doação de dentes bovinos (anexo A do projeto detalhado) e foram realizadas as adequações no termo de constituição de biorrepositório.

Em relação a recomendação do projeto de pesquisa ao CEUA, os(as) pesquisadores (as) justificaram: "Visto que os dentes bovinos são destinados ao descarte, utilizamos como documentação um termo de doação destes. O termo está anexado ao projeto (Projeto A – página 25). A Comissão de Experimentação e Uso Animal (CEUA) da UFMG é fundamentada nas normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), o qual desobriga a submissão de projetos realizados exclusivamente com dentes bovinos à apreciação ética. Uma vez que esses animais já têm como destino final o abate, a utilização de seus dentes não necessita avaliação prévia. As amostras foram coletadas em abatedouro registrado, respeitando os princípios de bem-estar. Segundo o site do CONCEA, a coleta de materiais biológicos após ter sido realizado o abate como rotina da atividade do frigorífico, não há necessidade de passar pela avaliação prévia da CEUA (<https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/FAQs.html>). Acesso em 22 dez. 2020."

Os termos (TCLE e TALE) foram adequadamente modificados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este parecer foi elaborado com base nos seguintes documentos, anexados à Plataforma Brasil:

- Informações Básicas do Projeto;
- Carta-resposta às diligências;
- TALE;
- TCLE;
- Termo de constituição de biorrepositório;
- Parecer consubstanciado aprovado pelo departamento, contendo carimbo e assinatura da chefe do departamento;
- Projeto Detalhado / Brochura Investigador;

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 4.487.068

- Folha de Rosto.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa "AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E CITOTOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO QUIMIOMECÂNICO DE LESÕES CARIOSAS PROFUNDAS: UM ESTUDO IN VITRO" da pesquisadora responsável Profª Drª Ivana Márcia Alves Diniz.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1612960.pdf	22/12/2020 16:11:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	22/12/2020 16:10:38	Ivana Márcia Alves Diniz	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	22/12/2020 16:10:12	Ivana Márcia Alves Diniz	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrepositorio.pdf	22/12/2020 16:09:53	Ivana Márcia Alves Diniz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale.pdf	22/12/2020 16:09:39	Ivana Márcia Alves Diniz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	tcle.pdf	22/12/2020 16:09:22	Ivana Márcia Alves Diniz	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.487.068

Ausência	tcle.pdf	22/12/2020 16:09:22	Ivana Márcia Alves Diniz	Aceito
Parecer Anterior	Parecer.pdf	02/09/2020 17:33:48	Ivana Márcia Alves Diniz	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	02/09/2020 17:32:06	Ivana Márcia Alves Diniz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 30 de Dezembro de 2020

Assinado por:

Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

APÊNDICE C

Tabela 1 – Concentração de proteína nas amostras para Zimografia

Grupos experimentais	<i>Pool-Ripa</i>
PBS	2,66
CHX	3,12
Papacárie	2,92
Ozônio	2,86
PDT	2,30

Tabela 2 – Constituintes do Gel de Corrida

	Gel 7,5%
Água Destilada	2 mL
Acrilamida	2 mL
Tris 1,5 M (pH: 8,8)	2 mL
Gelatina 1%	2 mL
SDS 10%	80 µL
APS	80 µL
TEMED	10 µL

Tabela 3 - Constituintes do gel de empilhamento

	Gel 4%
Água Destilada	2,7 mL
Acrilamida	670 µL
Tris 0,5 M (pH: 6,8)	1 mL
SDS 10%	40 µL
APS	40 µL
TEMED	5 µL

Tabela 4 - Tampão da Amostra 5x

Concentração Final	Para 250 mL
SDS 4%	10 g
Glicerol 20%	50 mL de 100%
Azul de Bromofenol	0,025 g
Tris-HCl 125 mM, pH: 6,8	4.91 g

Tabela 5 - Tampão de Corrida 10x

Tris-Base	30,3 g
Glicina	14,4 g
SDS	10 g
Água Destilada	1 L

Tabela 6 - Solução de Triton X-100 2%

Triton X-100	10 mL
Água Destilada	500 mL

Tabela 7 - Tampão de Incubação

	Para 250 mL
Triton x 100 1%	2,5 mL (100%)
Tris-HCl 50 mM pH: 7,5	12,5 mL (1M)
CaCl ₂ 50 mM	625 µL (2M)

Fonte:

Tabela 8 - Solução Descorante

Metanol	400 mL
Ácido Acético	100 mL
Água Destilada	500 mL

ANEXO 1 – Artigo submetido ao periódico Plos One (Fator de Impacto: 2.740; Qualis: A1)

Efficacy of disinfection after dentin caries removal: a systematic review with GRADE approach

Disinfection after caries removal: a systematic review with GRADE approach

Luiza de Almeida Queiroz Ferreira¹, Ivana Márcia Alves Diniz^{1*}, Rogéli Tibúrcio Ribeiro da Cunha Peixoto¹, Natália Aparecida Gomes¹, Camila de Sousa Caneschi¹, Loukia Maria Spineli², Carolina Castro Martins^{3*}

¹Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Midwifery Research and Education Unit, Hannover Medical School, Hannover, Germany.

³Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: ivanadiniz@ymail.com (IMAD)

carolcm10@gmail.com (CCM)

Abstract

This systematic review aimed to compare the efficacy of antibacterial agents used before the restoration of dentin carious lesions in randomized and non-randomized controlled trials (RCTs/ NRCTs). We searched eight databases from inception to October 2020. Paired reviewers independently screened studies, extracted data, and assessed the risk of bias. The primary outcome was the reduction in the number of total bacterial in dentin, and the secondary outcomes were reduction in the number of *Lactobacillus* and *Streptococcus mutans*. Pooling of trials in a pairwise or network meta-analysis was impossible due to trial scarcity in the

comparisons. We used the ratio of ratio of post-treatment to baseline means between two interventions in the logarithmic scale as a proper effect measure. Certainty of evidence was assessed with the Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation approach. We included 13 RCTs and 8 NRCTs, with nine interventions. The number of bacteria at baseline was similar or exceeded that after the intervention, particularly in NRCTs for three outcomes. The evidence was inconclusive for the majority of comparisons. Among RCTs, chlorhexidine (CHX) resulted in an average of 1.14 times [95% confidence interval (CI): 1.08 – 1.21] more total bacterial than photodynamic therapy. The control resulted in eight times (95% CI: 4 – 17) more total bacterial on average than Carisolv (SHAA). Among NRCTs, the natural agents resulted in five times more total bacterial on average than CHX (95% CI: 2 – 11). The certainty of the evidence was very low for all comparisons showing uncertainty whether one treatment could be more effective than another for dentin disinfection. The disinfectant agents reduced the count of bacteria in most treatments or were similar to the non-disinfectant control. So far, the removal of infected carious dentin would be enough to reduce bacterial count.

Introduction

After the selective removal of carious tissue, a set of procedures may be carried out before the restoration of the dental cavity, such as dentin disinfection [1]. Ultimately, the use of disinfectants before dental fillings may encourage the maintenance of the affected dentin – still prone to remineralization – and which the limit with the infected dentin is hard to detect clinically. Even though multiple disinfectant techniques and products are commercially available to be used before dental fillings, their effectiveness is still questionable, such as ozone, naturally based disinfectants, and papain gel [2].

Although several systematic reviews have tried to determine the reasonability of using adjunctive antimicrobial therapies as part of the minimally invasive treatment, the substantial methodological and statistical heterogeneity of the studies have impaired a more robust conclusion [3–5]. Heretofore, no previous study has compared the effectiveness of antimicrobial agents addressed to carious lesions considering the certainty of the evidence, except for one study, which found low certainty for the antimicrobial outcome [6]. Moreover, multiple disinfectants' effect in reducing the bacterial load was never assessed in any systematic review of randomized or non-randomized controlled trials (RCTs/NRCTs). This systematic review of RCTs and NRCTs aimed to analyze the efficacy of several disinfectant agents in

reducing the number of bacteria in deep carious lesions before dental fillings. Furthermore, the interpretation of results followed the certainty of the evidence assessed using the Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) approach.

Material and Methods

This systematic review was registered a priori at the PROSPERO database (#CRD42020168101) and had one change from the original proposal of a possible subgroup analysis that was not feasible in the end. We report the review according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses [7].

Eligibility Criteria

The PICO question is:

- Population (P): patients (adults or children) with dentin carious lesion;
- Intervention (I): antibacterial agents [ozone, chlorhexidine (CHX), papain gel, sodium hypochlorite and amino acids (Carisolv - SHAA) and photodynamic therapy (PDT)];
- Comparison (C): negative controls (no use of an antimicrobial treatment) or placebo;
- Outcome (O): reduction of the number of bacteria in dentin before and after treatment.

The inclusion criteria comprised RCTs and NRCTs conducted with patients at any age; with deep carious lesions, carious lesions compromising dentin or with the need of restorative treatment; testing any antimicrobial agent before dental filling; and measuring the bacterial count before and after the treatment. We excluded studies with a single treatment arm, studies evaluating antimicrobial therapies efficacy in reducing dental biofilm or microorganisms in saliva; studies that evaluated the performance of antimicrobial therapies in preventing dental caries, or as a treatment for enamel carious lesions and periodontal diseases; studies evaluating mouthwashes or substances not directly applied in the dental cavity.

Information Sources

We searched MedLine through Ovid, Embase through Ovid, Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL), Cochrane Database of Systematic Reviews, Web of Science and SCOPUS from inception to October 2020, with no restrictions regarding language and date. We also searched ongoing trials in the WHO International Clinical Trials Registry Platform

(ICTRP) and the grey literature in ProQuest Dissertation & Theses Database. The search strategies are presented in table A in S1 text. We organized the references list in Endnote Software (Version X9; Clarivate Analytics).

Study Selection

Paired reviewers (LAQF, IMAD, RTRCP, NAG, CSC) independently select studies based on titles and abstracts, and later by reading the full texts using the Rayyan platform [8]. Before each screening stage, the reviewers underwent two calibration and training exercises. For screening of titles and abstracts, the reviewers trained with 100 studies. For full-text screening, the reviewers trained with five studies. Disagreements during the calibration and screening were solved by discussion and consensus.

Data Extraction and Risk of Bias Assessment

Paired reviewers independently extracted data and assessed the risk of bias of included studies, using a standardized data abstraction form, previously created and tested. We collected author, year, the language of publication, funding, conflict of interests, country, setting, design of the study, percentage of males and females, initial and final sample, number of drop-outs, number of intervention arms, number of follow-ups, age, type of dentition, type of carious lesion (Black's Classification) [9], complementary exams (X-Ray, Vitality Tests), depth of the lesion, method of carious tissue removal, isolation, anesthesia, number of dentin samples, and bacterial data. We extracted the formulation, concentration, type of carious removal, and dentin limit for every treatment when reported by studies.

For each outcome, we assessed the risk of bias using the Cochrane Risk of Bias Tools for Randomized Trials (RoB 2.0) and The Risk of Bias in Non-Randomized Studies of Interventions (ROBINS I). For ongoing studies, we contacted the three authors regarding the stage of their clinical trials and if they already had data published. Only one author responded that the study was not complete. We also contacted two authors asking for full-text papers when the study was not available, with no response. Nine authors were contacted to provide means and standard deviations (SD) that were not available in the manuscript. Four authors replied by sending the requested data.

Outcomes

The primary outcome was the reduction of total bacterial in deep carious lesions assessed by Real-Time Polymerase Chain Reaction (RTq-PCR) or Colony Forming Unit (CFU) assays. The secondary outcomes were reduction of counts of total *Lactobacillus* and

Streptococcus mutans. We collected mean, standard deviation (SD), standard error (SE), 95% CI – whether reported – for baseline and after treatment for each microorganism; and pain measurement; and side effects data, when reported.

Data Synthesis and Statistical Analysis

We planned to perform a Bayesian random-effects network meta-analysis (NMA) to accommodate multi-arm trials and include consistency equations for all outcomes, where applicable. Incorporating both designs (RCTs and NRCTs) in the NMA was not plausible since we could not investigate the impact of the design on the NMA results via a meta-regression (lack of sufficient trials from both designs in each comparison). The networks of all outcomes were characterized by scarce trials in the observed comparisons, rendering the evaluation and defense of the transitivity assumption conceptually and statistically challenging. Therefore, we abstained from applying NMA since we would not be able to defend the credibility of the indirect effects. Furthermore, we did not perform a pairwise meta-analysis for the few comparisons with two or three trials due to substantial clinical and methodological heterogeneity in the included trials. Alternatively, for each outcome, we estimated the treatment effect and variance for every comparison in each trial. This analysis corresponds to the fixed-effects model that considers the underlying treatment effects as unrelated and independent for the same comparison [10]. We used the ratio of ratio of means (RoRoM) in the logarithmic scale as a proper effect measure. That is the ratio of ratio of post-treatment to baseline means between two compared interventions [11]. Herein, a positive log RoRoM (or $\text{RoRoM} > 1$) favors the second intervention in the comparison, a negative log RoRoM (or $\text{RoRoM} < 1$) favors the first intervention in the comparison, and log RoRoM equal zero (or $\text{RoRoM} = 1$) indicates no association between the compared interventions and the investigated outcome. We created a panel of forest plots on the within-trial estimated log RoRoMs for each observed pairwise comparison in the investigated outcomes. We used different line colors, line types and point shapes to depict the trial design (RCT versus NRCT), method of bacterial counting (CFU versus q-PCR), and the risk of bias (some concerns versus high risk), respectively. In the S1 file under Statistical methods (p. 19), we provide detailed information on the initial analysis plan and the analysis actually performed. We used descriptive statistics to summarize frequencies of collected study characteristics using the SPSS software version 25 (SPSS, Inc). We used the R-package ggplot2 to obtain all figures [12] and the R-package pnetmeta [13] to create the network plots.

Certainty of Evidence

For each comparison, we assessed the certainty of the evidence through the Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) approach. The certainty of evidence starts with high for RCTs and NRCTs when using ROBINS-I [14]. We assessed the risk of bias, inconsistency, indirectness, imprecision, and publication bias for all comparisons; and large effect, dose-response, and magnitude of the effects also for NRCT [15].

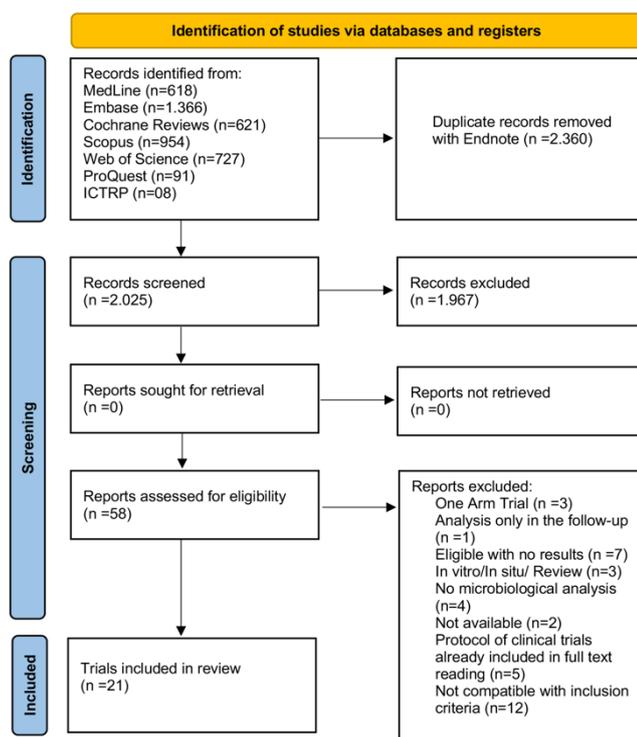
Results

Studies Included in the Systematic Review

Thirteen RCTs and 8 NRCTs were included (Figure 1; Table B in S1 file shows reasons for exclusion of studies). All studies were published in English (100%), conducted in Europe (28.6%), Asia (38.1%), and South America (33.3%). The majority of trials were published between 2011-2020 (85.7%) (Table C in S1 file shows study characteristics).

RCTs lacked blinding for the outcome assessor, and 87.5% of NRCTs had a serious risk of bias, presenting potential confounding (S1 and S2 Figures in S1 File).

Figure 1. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) flowchart of study screening selection.



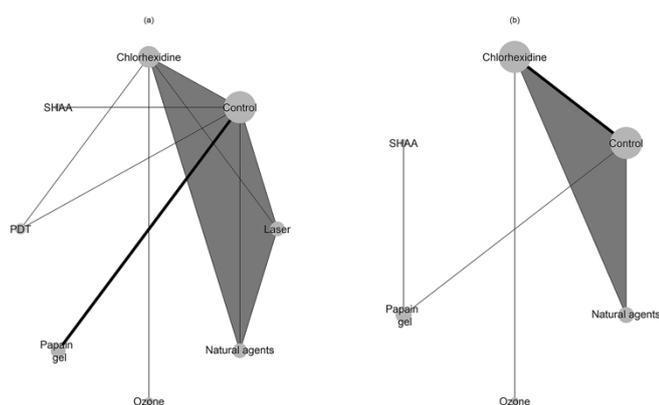
Primary outcome: total bacterial across the interventions

Network plot

There were eight RCTs in the (connected) network: seven two-arm, and one four-arm RCT (Figure 2a). Out of 11 pairwise comparisons, three RCTs informed papain gel versus control. All other observed pairwise comparisons included only one RCT. Control was the most prevalent treatment in the network (6 RCTs), followed by papain gel and CHX (3 RCTs each), and PDT (2 RCTs). The remaining interventions (Laser, Natural Agents, SHAA and Ozone) have been investigated in one RCT each.

There were five NRCTs in the (connected) network (Figure 2b): four two-arm and one three-arm NRCT. Out of six pairwise comparisons, two NRCTs informed CHX versus control. All other pairwise comparisons included only one NRCT. Control and CHX were the most prevalent treatments in the network (3 NRCTs), followed by papain gel (2 trials). The remaining interventions have been investigated in one NRCT each (Natural Agents, SHAA and Ozone). The network data for secondary outcomes are presented in the S1 File (p. 25-28).

Figure 2. Network plot for the primary outcome. The size of the nodes is proportional to the number of observed treatment comparisons that included that node. The thickness of the edge is proportional to the number of trials that investigated that comparison.



Distribution of the outcome

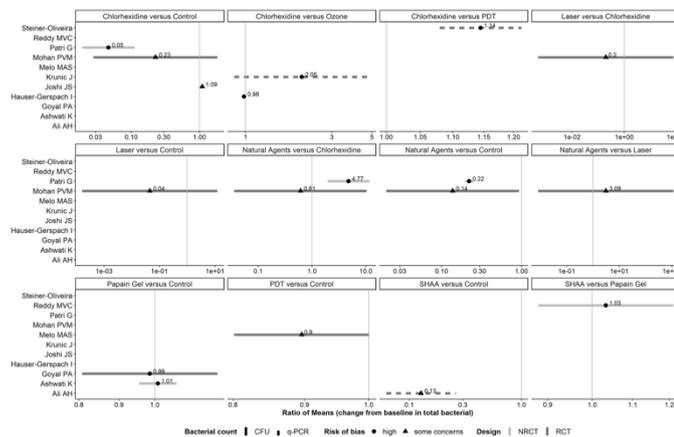
The average number of total bacterial (before and after intervention) was considerably variable, particularly across the NRCTs (range: $3.10 - 7.82 \times 10^7$ in NRCTs, and $1.20 \times 10^3 -$

5.86×10^8 in RCTs). Even for the same intervention, the average number of total bacterial was substantially variable across the corresponding trials (S5 Figure in S1 text). Overall, the average number of total bacterial at baseline was similar or exceeded that after receiving the intervention. The difference in the average number of total bacterial before and after the intervention was profound in the NRCTs. Similar observations were made concerning the SD of total bacterial (range: $1.20 - 4.10 \times 10^6$ in NRCTs, and $7.00 \times 10^2 - 6.70 \times 10^7$ in RCTs) (S6 Figure in S1 text). The coefficient of variation was consistently below one in all NRCTs, indicating a lower variability of the total bacterial relative to the mean. However, it exceeded one in three RCTs investigating the control, ozone and SHAA at baseline, and one RCT investigating CHX before and after the intervention (S7 Figure in S1 text).

Panel of forest plots

Two RCTs [16,17] did not report the SD in either arm and were excluded from the analysis. Comparisons investigated in both trial designs were associated with inconsistent evidence in magnitude and conclusiveness (Figure 3). Overall, RoRoMs were estimated with greater precision in NRCTs than RCTs, as indicated by the range of values on the x-axis.

Figure 3. Forest plots showing RoRoMs for total bacterial.



Of the 11 observed comparisons investigated in RCTs, only three provided conclusive evidence about the average reduction in the total bacterial: CHX versus PDT (1.14, 95% CI: 1.08 – 1.21), SHAA versus control (0.13, 95% CI: 0.06 – 0.26) and natural agents versus control (0.14, 95% CI: 0.02 – 0.93). Hence, compared to SHAA and natural agents, the control resulted

on average in eight (i.e., 1/0.13) and seven (i.e., 1/0.14) times more total bacterial, respectively, while CHX yielded slightly more total bacterial than PDT (Table 1).

Table 1. Clinical interpretation for each comparison considering three outcomes (total bacterial, *Lactobacillus*, and *Streptococcus mutans*).

Study	Clinical interpretation		
	Total bacterial	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Patri et al. 2017 ¹ [38]	Control presents an average of 20 x more bacteria than CHX *		
	Control presents an average of 4.5 x more bacteria than Natural Agents*		
	Natural Agents presents an average of 4.77 x more bacteria than CHX*		
Mohan et al. 2017 ² [19]	Control presents an average of 4 x more bacteria than CHX *	Control presents an average of 14e-02 x more <i>Lactobacillus</i> than CHX*	Control presents an average of 12.5 x more <i>Streptococcus mutans</i> than CHX*
	CHX presents an average of 5e+00 x more bacteria than Laser*	CHX presents an average of 2.9e-03 x more <i>Lactobacillus</i> than Laser*	CHX presents an average of 4 x more <i>Streptococcus mutans</i> than Laser*
	CHX presents an average of 1.6 x more bacteria than Natural Agents*	CHX presents an average of 1.7e-02 x more <i>Lactobacillus</i> than Natural Agents*	CHX presents an average of 2.8 x more <i>Streptococcus mutans</i> than Natural Agents*
	Control presents an average of 7.1 x	Control presents an average of 25e-02 x	Control presents an average of 33.3 x more

	more bacteria than Natural Agents*	more <i>Lactobacillus</i> than Natural Agents*	<i>Streptococcus mutans</i> than Natural Agents*
	Laser presents an average of 3.09e+01 x more bacteria than Natural Agents*	Laser presents an average of 1.68e+05 x more <i>Lactobacillus</i> than Natural Agents*	Laser presents an average of 1.39 x more <i>Streptococcus mutans</i> than Natural Agents*
Joshi et al. 2017 ¹ [39]	CHX presents an average of 1 x more bacteria than control*	Control presents an average of 1 x more <i>Lactobacillus</i> than CHX*	Control presents an average of 1.12 x more <i>Streptococcus mutans</i> than CHX*
Kronic et al. 2019 ² [40]	Ozone presents an average of 2.05 x more bacteria than CHX*	Ozone presents an average of 2.04 x more <i>Lactobacillus</i> than CHX*	
Hauser-Gerspach 2009 ¹ [18]	CHX presents an average of 1x more bacteria than Ozone*		
Steiner-Oliveira et al. 2015 ² [41]	PDT presents an average of 1.14 x more bacteria than CHX*		PDT presents an average of 1.19 x more <i>Streptococcus mutans</i> than CHX*
Moimaz et al. 2019 ¹ [32]		Control presents an average of 1,61e-01 x more <i>Lactobacillus</i> than papain gel*	Control presents an average of 1.39 x more <i>Streptococcus mutans</i> than papain gel*
		Papain Gel presents an average of 1.08 more <i>Lactobacillus</i> than SHAA*	SHAA presents 2.26 more <i>Streptococcus mutans</i> than papain gel*
		Control presents an average of 1.72 x	Control presents an average of 1.61 x more

		more <i>Lactobacillus</i> than SHAA*	<i>Streptococcus mutans</i> than SHAA*
Goyal et al. 2015 ² [20]	Control presents an average of 1.01 x more bacteria than Papain Gel*	Papain Gel presents an average of 1.36 x more <i>Lactobacillus</i> than control*	
Ashwati et al. 2017 ¹ [42]	Papain Gel presents an average of 1.01 x more bacteria than control*		
Modimi et al. 2016 ¹ [33]		Control presents an average of 1.1 x more <i>Lactobacillus</i> than Papain Gel*	Control presents an average of 1.6 x more <i>Streptococcus mutans</i> than Papain Gel*
Melo et al. 2015 ² [43]	Control presents an average of 1.1 x more bacteria than PDT*	Control presents an average of 1.20 x more <i>Lactobacillus</i> than PDT*	Control presents an average of 1.51 x more <i>Streptococcus mutans</i> than PDT*
Ali et al. 2018 ² [44]	SHHA presents 7.6 x more bacteria than control*		
Reddy et al. 2015 ¹ [34]	Papain Gel presents an average of 1.03 x more bacteria than SHAA group*	Papain Gel presents an average of 1.03 x more <i>Lactobacillus</i> than SHAA*	

Full Summary of Findings (SoF) for certainty of evidence is presented at supplementary material; (*) All comparisons had very low certainty of evidence; (1) NRCT; (2) RCT. Light gray cells indicate conclusive results according to the analysis for NRCTs. Dark gray cells indicate conclusive results for RCTs. White cells indicate inconclusive results with the 95%CI crossing the line of null effect.

Three in five comparisons investigated in NRCTs yielded conclusive results, with CHX versus control having the most significant treatment effect (0.05, 95% CI: 0.02 – 0.11), followed

by CHX versus natural agents (0.21, 95% CI: 0.09 – 0.51) – both comparisons favored CHX. The control and natural agents resulted on average in 20 (i.e., 1/0.05) and five (i.e., 1/0.21) times more total bacterial than CHX (Table D in S1 file). Reducing the correlation to 0.6 increased the SE of log RoRoM, as expected, and led to inconclusive results only for CHX versus ozone [18] (S8 Figure in S1 file).

Secondary outcomes: Lactobacillus and Streptococcus mutans

The average number of total *Lactobacillus* (before and after intervention) was considerably variable within and across interventions but to a lesser extent than in the primary outcome (S9 Figure in S1 file). Like the primary outcome, NRCTs exerted greater variability in the number of *Lactobacillus* (range: 29.6 – 1.92x10⁵ in NRCTs, and 2.0x10² – 6.94x10⁴ in RCTs). Overall, the average number of total *Lactobacillus* at baseline was similar or exceeded that after receiving the intervention, and the difference between baseline and post-intervention average number of total *Lactobacillus* was more profound in the NRCTs. Similar observations were made concerning the SD of total *Lactobacillus* (range: 52.0 – 4.72x10⁴ in NRCTs, and 3.00x10² – 1.50x10⁵ in RCTs) (S10 Figure in S1 file). Opposing the primary outcome, the coefficient of variation was below one in 67% of the trial-arms in NRCTs both at baseline and post-intervention, indicating a lower variability of the total *Lactobacillus* relative to the mean. A similar percentage of trial-arms in RCTs yielded a coefficient of variation below one. Specifically, this was the case for two trials investigating the control and the unique trial comparing natural agents (at baseline). Also, for PDT, papain gel and the trial investigating the control at both time-points (S11 Figure in S1 file).

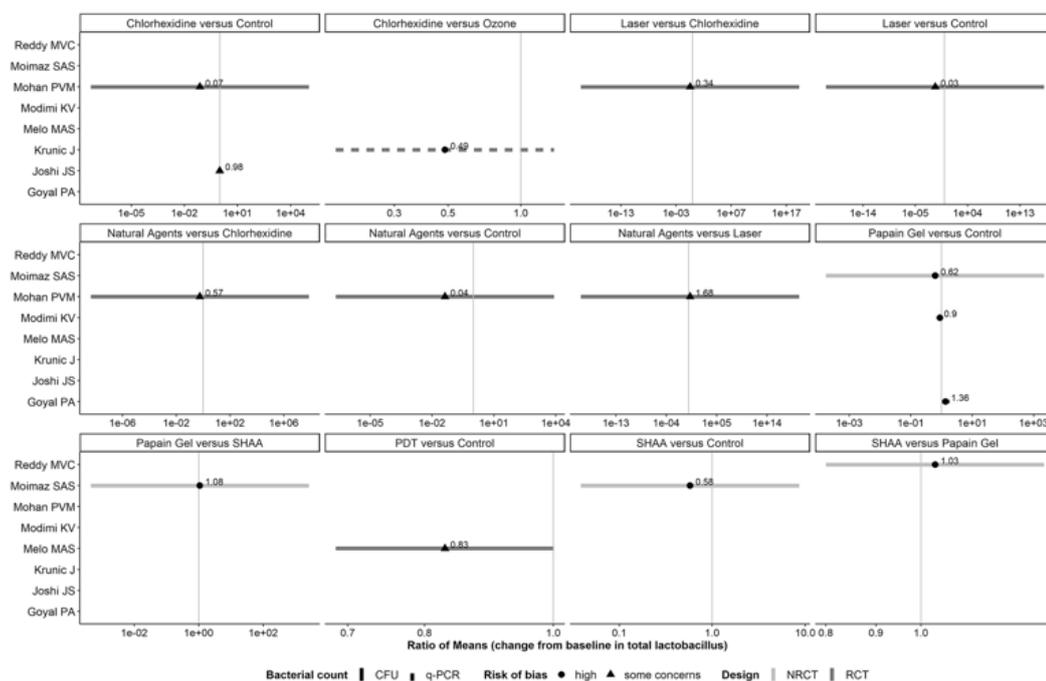
Overall, data on the distribution of the average and SD of *S. mutans* were in line with that of the *Lactobacillus* (range of average: 1.04x10² – 1.67x10⁵ in NRCTs, and 2.0x10² – 2.37x10⁸ in RCTs; range of standard deviation: 8.76x10 – 4.80x10⁴ in NRCTs, and 5.00x10² – 5.00x10⁷ in RCTs) (S12-14 Figures in S1 file).

Panel of forest plots

For *Lactobacillus*, one RCT [16] did not report the SD in either arm and was excluded from the analysis. Comparisons investigated in both trial designs (CHX and papain gel vs. control) were associated with inconsistent evidence in magnitude and conclusiveness (Figure 4). Overall, RoRoMs were estimated with more precision in NRCTs than RCTs (range of standard error of log RoRoM: 0.04 – 4.19 in NRCTs, and 0.10 – 23.32 in RCTs), as indicated by the range of values on the x-axis. One RCT [19] was responsible for this wide range of SE

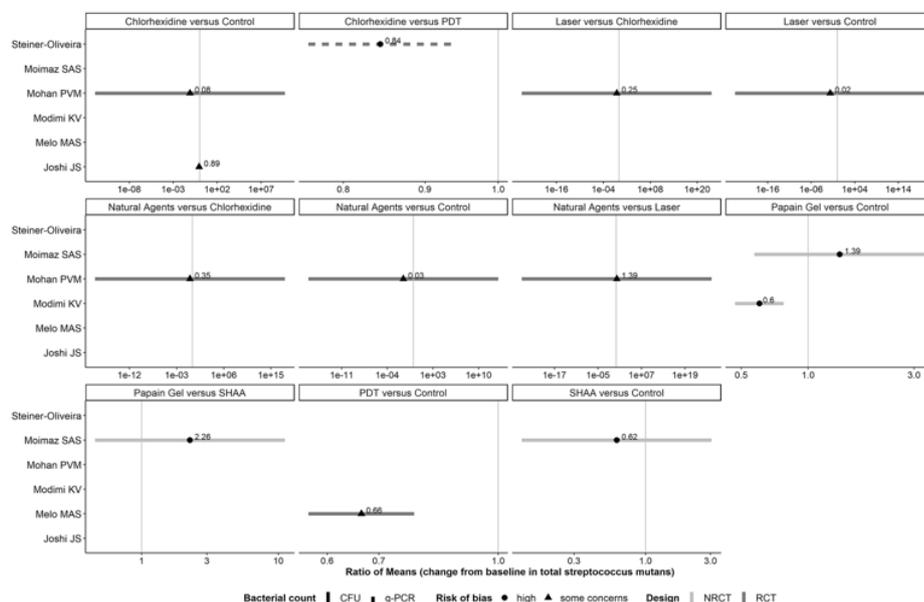
(range: 6.24 – 23.32) that lowered our confidence in the credibility of the corresponding 95 %CIs. This trial had substantial SD in either arm at post-treatment, which exceeded the overall average count. None of the observed comparisons provided conclusive evidence, as all 95% CIs crossed the vertical line of no difference (Table E in S1 file). Reducing the correlation to 0.6 increased slightly the SE of log RoRoM, as expected (range of SE of log RoRoM: 0.05 – 4.31 in NRCTs, and 0.12 – 23.39 in RCTs) (S15 Figure in S1 file).

Figure 4. Forest plots showing RoRoMs for *Lactobacillus*



For *S. mutans*, one RCT by Mohan PVM [19] yielded the particularly large SE of log RoRoM for all comparisons (range: 12.74 – 30.92) that lower our confidence in the credibility of the corresponding 95% CIs. This trial had substantial SD in either arm at post-treatment that exceeded the overall average count at baseline that greatly exceed the baseline SD in all arms. (Figure 5). Overall, RoRoMs were estimated with more precision in RCTs than NRCTs (range of SE of log RoRoM: 0.06 – 1.00 in NRCTs, and 0.07 – 0.11 in RCTs, excluding Mohan PVM), as indicated by the range of values on the x-axis. PDT and papain gel versus control, as well as CHX versus PDT and control yielded conclusive results in favor of the former intervention in each comparison (0.66, 95% CI: 0.56 – 0.78; 0.84, 95% CI: 0.76 – 0.93; 0.60, 95% CI: 0.47 – 0.78; and 0.89, 95% CI: 0.81 – 0.98 respectively) (Table F in S1 file). Reducing the correlation to 0.6 increased the SE of log RoRoM, as expected (S16 Figure in S1 file).

Figure 5. Forest plots showing RoRoMs for *Streptococcus mutans*



Pain

One study [20] measured pain and mean pulse rate/minute during the treatments. The control resulted in less pain compared to papain gel during and after procedures (S17-18 Figure in S1 file, Table G in S1 file). No study reported side effects of treatments.

Grade Approach and clinical interpretation

Summary of findings (SoF) table shows the reasons for a rating down the certainty of the evidence, that was very low for all outcomes (Total bacterial, *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*, and pain (Tables H-K in S1 file). The certainty was rated down due to risk of bias, indirectness, imprecision, and publication bias. Table 1 shows the clinical interpretation for total bacterial, *Lactobacillus*, and *Streptococcus mutans*.

Discussion

Summary of Results

The present systematic review of multiple agents did not include an NMA. Therefore, we cannot offer a hierarchy of interventions from the best to the worst for each outcome. Furthermore, the evidence supporting direct comparisons was very low. Most of the time, the

disinfectant treatments or even the non-disinfectant control reduced the count of bacterial in accordance with other studies [2–5].

Comparison with literature

The non-disinfectant group consisted only in removing carious tissue, and our analysis demonstrated that this treatment alone could reduce the bacterial load. Even if it relies on subjective parameters, the selective removal of carious tissue is recommended for managing deep lesions. This procedure is based on removing infected dentin, which presents heavy bacterial contamination [21,22]. This procedure aims to remove only tissue not capable of remineralization, thus allowing the recovery of pulp tissue and the survival of fillings [22].

Disinfectants can be used to help overcome the indistinct affect/infect dentin limits during selective removal [22]. CHX is the most common disinfectant used for cavity cleansing and is considered a golden standard [23]. At low concentrations, CHX is bacteriostatic and destroys the cell's walls and cytoplasmic membrane. In high concentrations, CHX causes coagulation of intracellular components, resulting in bactericidal activity [24]. Ozone is a potential microbicide agent can oxidase cell walls or cytoplasmic membranes of microorganisms [25,26]. However, heretofore, there is controversial evidence regarding its use as an antimicrobial agent [6,27].

Concerning NRCTs, our data favored CHX as the most effective treatment compared to the non-disinfected control and natural agents. Nevertheless, we obtained inconclusive results comparing CHX vs. ozone. In this regard, previous reports also showed some discrepancies when comparing CHX and ozone treatment, where conflicting results were narratively synthesized from the analyzed literature. Altogether, the results of two studies in a meta-analysis showed that CHX was significantly better than ozone in reducing bacterial load in the dentin tissue, although no comparison was made concerning a non-disinfected group [6].

The antimicrobial effect of PDT results from the association between a photosensitizer and a light source with a proper wavelength. Different reactions can occur from this association, resulting in Reactive Oxygen Species (ROS), singlet oxygen, or even causing cytotoxicity by the lack of oxygen inside the cells [28,29].

Regarding the analysis of RCTs, our data showed that PDT presented a slight reduction of total bacterial in carious lesions compared to CHX. Results of this comparison is similar to the narrative synthesis presented by Cieplik et al. 2017 [5], where the reduction of PDT occurred for total bacterial, *Streptococcus* and *Lactobacillus* compared with 2% CHX. In

previous reports, PDT presented controversial results about the total viable bacteria compared to the conventional drilling control group [4,5]. Accordingly, a meta-analysis of four studies – where two were in vitro – showed the efficacy of PDT in reducing microorganisms' numbers [4]. Otherwise, another descriptive systematic review found five studies where PDT associated with mechanical caries removal reduced cariogenic bacteria in dentin lesions, whereas one study pointed to PDT as an ineffective agent [5].

SHAA and papain gel are capable of breaking the collagen present in infected dentin, softening the carious tissue. They aim to overcome the limit between infected and affected dentin, facilitating removing the first [22,30]. Bacterial load was greater in the SHAA/natural agents when compared to a non-disinfected control. Different results were found comparing the SHAA and papain gel with the control group with a rotatory instrument. No differences were found between any treatment regarding the non-disinfected group [31]. In our review, concerning *Lactobacillus*, two studies found that the control presented more bacteria than the papain gel or SHAA, according to other studies [32,33]. However, all comparisons for *Lactobacillus* were inconclusive when comparing both active treatments, SHAA, and papain gel. The efficacy of these treatments was similar in reducing the dentin bacterial load. For *S. mutans*, our results were conclusive and pointed to a reduction of *S. mutans* in the papain gel group versus the non-disinfectant control. These results align with previous studies [32,34]. Systematic data from the comparison of the Papacarie – a brand of Papain Gel – and a non-disinfected control using conventional drilling method concluded that the gel successfully reduced the bacterial load in deciduous teeth. However, the meta-analysis was restricted to two studies [3].

Certainty of Evidence

There were serious and very serious problems due to risk of bias. Several RCTs did not present information about the randomization process or blinding of the outcome assessor; the last is critical for the CFU analysis, for example. Eighty seven percent of NRCTs had serious risk of bias and potential confounding factors. There were very serious problems due to indirectness in all comparisons. Most of the trials included only permanent or deciduous teeth. There was great heterogeneity concerning the methods of carious tissue removal, being either rotatory or manual instruments. Some studies used relative isolation or rubber dam or analyzed only teeth with occlusal cavities. Hence, the applicability is limited to the general dental practice. The inclusion of a single trial in each comparison did not achieve the *Optimal*

Information Size (OIS) of at least 400 participants, inputting imprecision [35,36]. Finally, 9.5% of comparisons were rated down due to possible publication bias considering industry-sponsored studies.

Strengths and limitations

Ranking the treatments according to their efficacy was impossible due to the unfeasibility of an NMA, as already mentioned. We could not perform any moderator analysis, as initially aimed in the protocol, as we had one trial per comparison. Notwithstanding, the collected data stemmed from immediate cleansing of the cavities and not a long-term analysis on how these treatments would affect the adjacent dentin or the survival of dental fillings. This review is strong as we interpret it based on the certainty of evidence and the average bacterial count for the clinical practice.

Implications for clinical practice and research

Due to very low certainty, we cannot affirm that there is one better treatment than the other [37]. The disinfectant treatments majorly reduced the bacterial load in dentin carious lesions but with similar results for the non-disinfected control. So far, the removal of infected carious dentin would be enough to reduce bacterial count. Further studies should focus on how the disinfectant treatments chemically affect the dentin or pulp tissues regarding deep cavities and their proximity with the pulpal tissue. A complete description of the methodology is required to indicate how the antimicrobial treatments should be performed operatively. Follow-up trials could bring new data on long-term survival of restorations and occurrence of secondary caries.

Acknowledgments

We thank Mila Fernandes Moreira Madeira from the Institute of Biological Sciences (Universidade Federal de Minas Gerais) for the help with the division of bacterial species, during data extraction.

References

1. Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al.

- Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Adv Dent Res.* 2016;28: 58–67. doi:10.1177/0022034516639271
2. Bin-Shuwaish MS. Effects and effectiveness of cavity disinfectants in operative dentistry: A literature review. *J Contemp Dent Pract.* 2016;17: 867–879. doi:10.5005/jp-journals-10024-1946
 3. Deng Y, Feng G, Hu B, Kuang Y, Song J. Effects of Papacarie on children with dental caries in primary teeth: a systematic review and meta-analysis. *Int J Paediatr Dent.* 2018;28: 361–372.
 4. de Oliveira AB, Ferrisse TM, Marques RS, de Annunzio SR, Brighenti FL, Fontana CR. Effect of photodynamic therapy on microorganisms responsible for dental caries: A systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 2019;20. doi:10.3390/ijms20143585
 5. Cieplik F, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Hiller KA, Maisch T, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions—A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;18: 54–62. doi:10.1016/j.pdpdt.2017.01.005
 6. Santos GM, Pacheco RL, Bussadori SK, Santos EM, Riera R, de Oliveira Cruz Latorraca C, et al. Effectiveness and Safety of Ozone Therapy in Dental Caries Treatment: Systematic Review and Meta-analysis. *J Evid Based Dent Pract.* 2020;20: 101472. doi:10.1016/j.jebdp.2020.101472
 7. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372. doi:10.1136/bmj.n71
 8. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev.* 2016;5: 1–11. doi:10.1186/s13643-016-0384-4
 9. Black GV. *A work on operative dentistry.* 1st ed. Chicago: Medico-Dental Publishing Company; 1908.
 10. Rice K, Higgins JP, Lumley T. A re-evaluation of fixed effect(s) meta-analysis. *J R Stat Soc Ser A (Statistics Soc.* 2017;181: 205–227. doi:https://doi.org/10.1111/rssa.12275
 11. Daly C, Anwer S, Welton NJ, Dias S, Ades AE. NICE Guidelines Technical Support Unit Meta-Analysis of Event Outcomes Guideline Methodology Document 3. 2021;1: 1–38.
 12. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* 1st ed. Springer; 2009.
 13. Lin L, Zhang J, Hodges JS, Chu H. Performing arm-based network meta-analysis in R with the pnetmeta package. *J Stat Softw.* 2017;80. doi:10.18637/jss.v080.i05

14. Schünemann HJ, Cuello C, Akl EA, Mustafa RA, Meerpohl JJ, Thayer K, et al. GRADE guidelines: 18. How ROBINS-I and other tools to assess risk of bias in nonrandomized studies should be used to rate the certainty of a body of evidence. *J Clin Epidemiol.* 2019;111: 105–114. doi:10.1016/j.jclinepi.2018.01.012
15. Zhang Y, Akl EA, Schünemann HJ. Using systematic reviews in guideline development: The GRADE approach. *Res Synth Methods.* 2019;10: 312–329. doi:10.1002/jrsm.1313
16. Motta LJ, Bussadori SK, Campanelli AP, Silva AL, Alfaya TA, Godoy CH, et al. Randomized controlled clinical trial of long-term chemo-mechanical caries removal using Papacarie™ gel. *J Appl Oral Sci.* 2014;22: 307-313. doi:10.1590/1678-775720130488
17. Ismail MMM, Al Haidar A. Evaluation of the efficacy of caries removal using papain gel (Brix 3000) and smart preparation bur(in vivo comparative study). *J Pharm Sci Res.* 2019;11: 444-449.
18. Hauser-gerspach I, Pfäffli-savtchenko V, Dähnhardt JE, Meyer J, Lussi A. Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children in vivo. 2009; 287–291. doi:10.1007/s00784-008-0234-4
19. Uday Mohan PVM, Uloopi KS, Vinay C, Rao RC. In vivo comparison of cavity disinfection efficacy with APF gel, Propolis, Diode Laser, and 2% chlorhexidine in primary teeth. *Contemp Clin Dent.* 2016;7: 45–50. doi:10.4103/0976-237X.177110
20. Goyal PA, Kumari R, Kannan VP, Madhu S. Efficacy and tolerance of papain gel with conventional drilling method: a clinico-microbiological study. *J Clin Pediatr Dent.* 2015;39: 109-112.
21. Kuboki Y, Liu C, Fusayama T. Mechanism of Differential Staining in Carious Dentin I ., 1983; 713–714.
22. Banerjee A. Selective Removal of Carious Tissue. 1st ed. In: Schwendicke F, editor. *Selective Removal of Carious Dentin.* 1st ed. New York: Springer; 2018. pp. 55–70. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-61370-3_5
23. Coelho A, Amaro I, Rascão B, Marcelino I, Paula A, Saraiva J, et al. Effect of cavity disinfectants on dentin bond strength and clinical success of composite restorations-a systematic review of in vitro, in situ and clinical studies. *Int J Mol Sci.* 2021;22: 1–27. doi:10.3390/ijms22010353
24. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12: 147–179. doi:10.1128/cmr.12.1.147
25. Yamayoshi T, Tatsumi N. Microbicidal effects of ozone solution on methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus. *Drugs Exp Clin Res.* 1993;19: 59–64.
26. Baysan A, Lynch E, Grootveld M, Street T. The use of ozone for the management of primary root caries. : 1–35.
 27. Brazzelli M, McKenzie L, Fielding S, Fraser C, Clarkson J, Kilonzo M, et al. Systematic review of the effectiveness and cost-effectiveness of HealOzone for the treatment of occlusal pit/fissure caries and root caries. *Health Technol Assess (Rockv).* 2006;10: iii–50.
 28. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. *Lasers Surg Med.* 2011;43: 755–767. doi:10.1002/lsm.21080
 29. Scherer KM, Bisby RH, Botchway SW, Parker AW. New approaches to photodynamic therapy from types I, II and III to type IV using one or more photons. *Anticancer Agents Med Chem.* 2017;17: 171-189. doi:10.2174/1871520616666160513131723
 30. Hamama HH, Yiu CK, Burrow MF, King NM. Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials on Chemomechanical Caries Removal. *Oper Dent.* 2015;40: E167–E178.
 31. Cardoso M, Coelho A, Lima R, Amaro I, Paula A, Marto CM, et al. Efficacy and Patient's Acceptance of Alternative Methods for Caries Removal—A Systematic Review. *J Clin Med.* 2020;9: 3407. doi:10.3390/jcm9113407
 32. Moimaz SAS, Okamura AQC, Lima DC, Saliba TA, Saliba NA. Clinical and Microbiological Analysis of Mechanical and Chemomechanical Methods of Caries Removal in Deciduous Teeth. *Oral Health Prev Dent.* 2019;17: 283-288. doi:10.3290/j.ohpd.a42659
 33. Modimi KV, Siddaiah SB, Chikkanarasaiah N, Rucha V, Abubakar SB, Dinraj K, et al. Microbiological Assessment of Carious Dentine using Chemomechanical Caries Removal and Conventional Hand Excavation in Primary and Permanent Teeth: A Clinical Study. *J Int Oral Heal.* 2016;8: 760–766. doi:10.2047/jioh-08-07-04
 34. Reddy MV, Sai Shankar A, Pentakota V, Kolli H, Ganta H, Katari P. Efficacy of antimicrobial property of two commercially available chemomechanical caries removal agents (Carisolv and Papacarie): An ex vivo study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5: 183. doi:10.4103/2231-0762.159955
 35. Guyatt GH, Oxman AD, Kunz R, Brozek J, Alonso-Coello P, Rind D, et al. GRADE guidelines 6. Rating the quality of evidence - Imprecision. *J Clin Epidemiol.* 2011;64: 1283–1293. doi:10.1016/j.jclinepi.2011.01.012

36. Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, Kunz R, Falck-Ytter Y, Alonso-Coello P, et al. GRADE: An emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *Chinese J Evidence-Based Med.* 2009;9: 8–11.
37. Santesso N, Glenton C, Dahm P, Garner P, Akl EA, Alper B, et al. GRADE guidelines 26: informative statements to communicate the findings of systematic reviews of interventions. *J Clin Epidemiol.* 2020;119: 126–135. doi:10.1016/j.jclinepi.2019.10.014
38. Patri G, Sahu A. Role of herbal agents - Tea tree oil and aloe vera as cavity disinfectant adjuncts in minimally invasive dentistry-an in vivo comparative study. *J Clin Diagnostic Res.* 2017;11: DC05–DC09.
39. Joshi JS, Roshan NM, Sakeenabi B, Poornima P, Nagaveni NB, Subbareddy V V. Inhibition of Residual Cariogenic Bacteria in Atraumatic Restorative Treatment by Chlorhexidine: Disinfection or Incorporation. *Pediatr Dent.* 2017;39: 308–312.
40. Krunic J, Stojanovic N, Dukic L, Roganovic J, Popovic B, Simic I, et al. Clinical antibacterial effectiveness and biocompatibility of gaseous ozone after incomplete caries removal. *Clin Oral Investig.* 2019;23: 785–792.
41. Steiner-Oliveira C, Aranha ACC, Ribeiro AC, Mayer MP, Eduardo CP. In vivo randomized antimicrobial effect of the photodynamic therapy on deciduous carious dentin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012;17: S220. doi:10.4317/medoral.17643720
42. Savitha A, SriRekha A, Vijay R, Ashwija, Champa C, Jaykumar T. An in vivo comparative evaluation of antimicrobial efficacy of chitosan, chlorhexidine gluconate gel and their combination as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis* in failed endodontic cases using real time polymerase chain reaction (qPCR). *Saudi Dent J.* 2019. doi:10.1016/j.sdentj.2019.03.003
43. Melo MA, Rolim JP, Passos VF, Lima RA, Zanin IC, Codes BM, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal linked for management of deep caries lesions. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12: 581-586. doi:10.1016/j.pdpdt.2015.09.005
44. Ali AH, Koller G, Foschi F, Andiappan M, Bruce KD, Banerjee A, et al. Self-Limiting versus Conventional Caries Removal: A Randomized Clinical Trial. *J Dent Res.* 2018;97: 1207–1213.