FERNANDA CRISTINA NOGUEIRA RODRIGUES

Eficácia do uso de lasers ou clorexidina na redução microbiana em lesões de cárie produzidas artificialmente

São Paulo

2018

FERNANDA CRISTINA NOGUEIRA RODRIGUES

Eficácia do uso de lasers ou clorexidina na redução microbiana em lesões de cárie produzidas artificialmente

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Laser em Odontologia) para obter o título de Mestre em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas Costa e Silva

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rodrigues, Fernanda Cristina Nogueira.
Eficácia do uso de lasers ou clorexidina na redução microbiana em lesões de cárie produzidas artificialmente / Fernanda Cristina Nogueira Rodrigues ; orientador Patrícia Moreira de Freitas Costa e Silva. -- São Paulo, 2018.
85 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Laser em Odontologia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida

1. Dentina. 2. Streptococcus Mutans. 3. Lasers. 4. Clorexidina. 5. Cárie dentária - lesões. I. Silva, Patrícia Moreira de Freitas Costa e. II. Título.

Rodrigues FCN Eficácia do uso de lasers ou clorexidina na redução microbiana em lesões de cárie produzidas artificialmente. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 26 / 11 /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a) Andréa Dias Neves Lago

Instituição: Universidade Federal do Maranhão

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Maria Regina Lorenzetti Simionato

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Karem Muller Ramalho

Instituição: Universidade Ibirapuera

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho à Deus, por sempre me guiar em meus passos e estar comigo em todos os momentos!

Aos meus pais, George Fernando Rodrigues e Izoldiléa Nogueira Rodrigues, que nunca mediram esforços para que eu conseguisse realizar meus sonhos. Agradeço por cada palavra de incentivo, por me apoiar em todas as minhas decisões! Junto com eles, à minha irmãzinha, que esteve e está comigo em todos os momentos da minha vida, por cada puxão de orelha e palavra de amor! Vocês são os maiores tesouros que alguém poderia ter, a razão da minha vida e meu alicerce!

À minha vozinha amada, Maria do Socorro Rodrigues, como tenho sorte de ter você na minha vida! Sou eternamente grata por tanto amor e cuidado com a nossa família e com as suas netas! Aos meus avós maternos, Maria José e Alfredo Faustino (*in memorian*), que nunca deixaram de acreditar em mim! Meu muito obrigada!

Às minhas amigas e irmãs, Erika e Júlia, obrigada por estarem junto comigo nessa caminhada e jornada, por cada aventura e por cada crise de riso! Obrigada também por me estenderem a mão nos meus momentos de desespero. Nossa amizade é para o resto da vida!

Ao meu amor, parceiro e amigo, Hilton Lopes. Obrigada pelo apoio sempre! Obrigada por sempre querer o meu melhor! Não poderia ter melhor companheiro de vida!

À minha eterna professora e amiga, Andréa Lago, por todos os conhecimentos repassados, e por nossa amizade! Muito obrigada por tudo! Sei que teremos muitos caminhos juntas ainda pela frente!

À toda minha família e amigos que contribuíram direta e indiretamente para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a minha orientadora Patrícia Moreira de Freitas Costa e Silva por ter me acolhido e acreditado no meu potencial. Você é uma fonte de inspiração para mim. Obrigada por cada gesto e palavra de conforto. Obrigada por todos os momentos que compartilharmos e que possamos dividir muitos outros pela frente!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, em nome do Diretor, Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha.

À Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino, Chefe do Departamento de Dentística da FOUSP.

Ao Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Dentística da FOUSP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento desse trabalho (Processo n. 2017/13451-1).

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e o Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP), pelo apoio ao desenvolvimento desse trabalho.

À Universidade de Guarulhos (UNG) e ao Instituto Brugnera e Zanin pelos equipamentos de laser de alta potência utilizados no estudo.

À Prof. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato por disponibilizar o uso de seu laboratório para a execução desse trabalho.

À todos os professores do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por todos os conhecimentos e experiência repassados durante todo o período do Mestrado e por contribuírem na minha formação profissional. Em especial à Profa. Dra. Adriana Bona Matos que contribuiu para o desenvolvimento da pesquisa e sempre esteve de prontidão para ajudar no que fosse necessário.

À Profa. Dra. Luciana Kfouri Siriani, pela contribuição nesse trabalho, pelos ensinamentos e por me introduzir nesse mundo da microbiologia. Por todos os momentos que compartilhamos, muito obrigada!

Ao Renan, que foi meu parceiro nesse projeto e tive a honra de o acompanhar em seu primeiro projeto de Iniciação Cientifica. Meu muito obrigada por ter acreditado no nosso trabalho e por toda ajuda em todos os momentos. Você tem um futuro brilhante pela frente.

Ao meu grupo de pesquisa por toda ajuda e apoio quando foi necessário. Em especial à Camila Vieira e à Taís Mantilla que me acolheram e sempre se disponibilizaram a ajudar durante a execução da pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Dentística: Aldo, David, Selma, Leandro e Silvana, obrigada por todo o apoio!

Aos colegas que ganhei na Pós-graduação e que tornaram a vinda à São Paulo e o Mestrado muito mais leves. Nossa turma ficará para sempre em meu coração. Agradeço por cada um que tive o prazer de conviver e vou levar um pedacinho de cada um comigo sempre!

À todos que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho: Muito obrigada!

“Nada é tão nosso, quanto nossos sonhos”.

Friedrich Nietzsche.

RESUMO

Rodrigues FCN. Eficácia do uso de lasers ou clorexidina na redução microbiana em lesões de cárie produzidas artificialmente [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

No intuito de preservar a estrutura dentária, remanescentes de dentina afetada por cárie podem ser deixados após remoção do tecido cariado. O uso de soluções antimicrobianas é uma alternativa para reduzir ou eliminar bactérias após o preparo cavitário. Além disso, métodos de remoção de cárie, menos invasivos que o tradicional uso de brocas, vêm sendo desenvolvidos, tais como os com lasers de alta potência. No contexto de redução microbiana, tanto os lasers de alta potência (efeito fototérmico), quanto os lasers de baixa potência associados a fotossensibilizadores (terapia fotodinâmica antimicrobiana) podem ser utilizados. O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o uso dos lasers ou clorexidina na redução microbiana em lesões de cárie artificialmente desenvolvidas. Sessenta discos de dentina humana foram analisados de acordo com o tratamento da superfície (n=10): G1 - sem tratamento; G2 – digluconato de clorexidina a 2%; G3 - laser de alta potência Er:YAG (2,94 µm) ; G4 – laser de alta potência Er,Cr:YSGG (2,78 µm); G5 - aPDT 1 (laser de baixa potência 660 nm + azul de metileno a 0,01%); G6 - aPDT 2 (laser de baixa potência 660 nm + azul de metileno a 0,005%). A dentina afetada por cárie foi induzida por um modelo artificial desenvolvido com *S. Mutans,* com profundidade de lesão de aproximadamente 260 µm. A dentina cariada foi coletada com auxílio de uma broca esférica *Carbide* estéril, antes e após os tratamentos propostos. Para padronização da coleta, foi feita a inserção de todo o diâmetro da ponta ativa broca (0,5 mm) no tecido dentinário. O desfecho primário foi a redução de bactérias, realizada pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Para comparar o desempenho dos tratamentos foi aplicado o teste de *Kruskal Wallis*, complementado pelo teste *dms*, para identificação das diferenças significativas, considerando nível de significância de 5%. De acordo com os resultados, houve redução microbiana para todos os grupos experimentais avaliados, porém, sem diferença estatística significativa entre eles (p=0,1133). Dessa forma, todos os tratamentos propostos foram eficazes na redução microbiana.

Palavras-chave: Dentina. *S. Mutans*. Lasers.

ABSTRACT

Rodrigues FCN. Efficacy of the use of lasers or chlorhexidine in microbial reduction in artificially produced caries lesions [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo,Faculdade de Odontologia; 2018.Versão Corrigida.

In order to preserve the dental structure, dentin remnants affected by caries may be left after removal of carious tissue. The use of disinfectant solutions is an alternative to reduce or eliminate bacteria after cavity preparation. In addition, caries removal methods, less invasive than the traditional use of drills, have been developed, such as high-power lasers. In the context of microbial reduction, both high (photothermal effect) and low power lasers combined with photosensitizers (antimicrobial photodynamic therapy) can be used. The objective of this *in vitro* study was to evaluate the use of lasers or chlorhexidine in microbial reduction in artificially developed caries lesions. Sixty human dentin discs were analyzed according to surface treatment (n = 10): G1 - no treatment; G2 - 2% chlorhexidine digluconate; G3 - high power Er:YAG Laser (2.94 µm); G4 - high power Er,Cr:YSGG Laser (2.78 µm); G5 - aPDT 1 (low power laser 660 nm + 0.01% methylene blue); G6 - aPDT 2 (low power laser 660 nm + 0.005% methylene blue). Caries affected dentin was induced by an artificial model developed with *S. mutans*, with lesion depth of approximately 260 µm. The carious dentin was collected using a sterile Carbide spherical drill before and after the proposed treatments. For standardization of the collection, the insertion of the entire diameter of the active tip into the dentin tissue was performed (0.5 mm). The primary outcome was the bacterial reduction, considering the colony forming units (CFU). To compare the performance of the treatments, the Kruskal Wallis test, complemented by the dms test, was used to identify the significant differences, considering a significance level of 5%. According to the results, there was a microbial reduction for all the experimental groups evaluated, but with no significant statistical difference among them ($p = 0.1133$). Thus, all proposed treatments were effective for microbial reduction.

Keywords: Dentin. *S. Mutans*. Lasers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Distribuição das amostras nos diferentes grupos experimentais 44

Figura 4.2 - Obtenção de amostras de dentina do terço médio com superfície oclusal plana e espessura de aproximadamente 2 mm.....45

Figura 4.3 - Superfície planificada de dentina oclusal protegida com verniz ácido resistente, exceto em área delimitada de 2 x 4 mm, região onde foi produzida artificialmente a dentina afetada por cárie.....46

Figura 4.4 - (A) Distribuição aleatória randomizada das amostras na lâmina de vidro (B) Tubo com a lâmina dentro pronto para esterilização 46

Figura 4.5 - Imagem obtida atravéss do testes de tomografia de coerência óptica (OCT). À esquerda da imagem encontra-se a área protegida pelo verniz cavitário e à direita corresponde a área de lesão de cárie induzida artificialmente, com profundidade de aproximadamente 216 µm.....50

Figura 4.6 - Imagem obtida através da tomografia óptica de coerência (OCT). À esquerda da imagem encontra-se a área protegida pelo verniz cavitário e à direita corresponde à área de lesão de cárie induzida artificialmente de aproximadamente 310 µm 51

Figura 4.7 - A) Com auxílio da broca *carbide*, a amostra foi colhida (B) e transferida para as placas de *Petri,* onde foram incubadas em microaerofilia durante 2 dias a 37°C (C) e feita a contagem de unidades formadoras de colônias.....52

Gráfico 5.1- Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G2 (Digluconato de Clorexidina a 2%)..... .61

Gráfico 5.2 - Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G3 (Laser Er:YAG).....
.....62

Gráfico 5.3- Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G4 (Laser Er:YSGG).....62

Gráfico 5.4- Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G5 (aPDT com azul de metileno a 0,01%)..... 63

Gráfico 5.5- Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G6 (aPDT com azul de metileno a 0,005%).....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Medidas descritivas : média, desvio padrão, mínimo e máximo para cada grupo experimental 57

Tabela 5.2- Comparação em unidade UFC/ml em dois tempos "Antes" X "Depois", para cada tratamento experimental 59

Tabela 5.3- Comparação em UFC/ml dos tratamentos (momento Antes) 60

Tabela 5.4- Comparativo dos tratamentos, considerando-se a diferença percentual na redução microbiana (Depois-Antes) 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
cm^2	centímetros ao quadrado
Er:YAG	érbio:ítrio-alumínio-gálio
Er,Cr:YSGG	érbio,cromo:ítrio-escândio-gálio-granada
Gbps	proteínas ligadoras de glucana
Hz	Hertz
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
J/cm^2	Joule por centímetro quadrado
kGy	kilogray
MMPs	metaloproteínases da matriz
MSB	*Agar Mitis Salivarius*
min	minuto
mm	milímetros
ml	mililitros
mJ	milijoule
mW	miliwatts
µm	micrometro
µl	microlitro
nm	nanometro
pH	potencial hidrogeniônico
TSA	*Tryptic Soy Agar*
TSB	*Tryptic Soy Broth*
RPM	rotações por minuto
UFC/ml	unidade formadora de colônia por mililitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	grau Celsius
J	Joules
H	hora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 27
2 REVISÃO DE LITERATURA 31
2.1 *S. mutans* e seu papel no contexto da cárie dentária 31
2.2 Lesões de cárie em dentina 32
2.3 Lesões de cárie em dentina produzidas artificialmente *in vitro* 33
2.4 Terapias Antimicorbianas 34
2.4.1 Clorexidina 35
2.4.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) 36
2.4.3 Laser de alta potência 37
3 PROPOSIÇÃO 41
4 MATERIAL E MÉTODOS 43
4.1 Aspectos Éticos 43
4.2 Delineamento experimental 43
4.3 Seleção dos dentes e obtenção dos espécimes 44
4.4 Montagem dos espécimes para o desafio cariogênico e produção de dentina afetada por cárie 45
4.5 Esterilização dos espécimes 47
4.6 Preparo e Armazenamento dos Meios de Cultura 47
4.7 Preparo do caldo inóculo e determinação da quantidade de bactérias/ml 47
4.8 Desafio cariogênico 48
4.9 Análise da profundidade das lesões de cárie 49
4.10 Tratamento da superfície dentinária 51
4.11 Análise Microbiológica 52
4.12 Análise dos Dados 54
5 RESULTADOS 55
6 DISCUSSÃO 65
7 CONCLUSÃO 71
REFERÊNCIAS 73
ANEXO 83

1 INTRODUÇÃO

Com o progresso do conhecimento sobre a cárie dentária, em especial da compreensão desta como uma doença e não meramente como a presença de lesões (manchas brancas e cavidades), surgiram propostas para controlá-la, seguindo a filosofia de Odontologia Minimamente Invasiva. O *International Caries Consensus Collaboration* (Schwendicke et al., 2016) empreendeu um processo de consenso e apresenta recomendações clínicas para remoção de tecido cariado e controle de lesões cavitadas, incluindo restauração, com base na textura e qualidade da dentina desmineralizada. Seguindo esse conceito, os clínicos devem gerenciar a doença cárie e controlar a atividade de lesões cavitadas existentes buscando a preservação dos tecidos duros e, consequentemente, mantendo os elementos dentais na cavidade oral o maior tempo possível. Quando uma restauração é indicada, as prioridades são a preservação do tecido saudável e passível de remineralização, e preservação da saúde pulpar, maximizando o índice de sucesso da restauração (Schwendicke et al., 2016).

Na condição ideal, estima-se que uma distância de cerca de 2,0 milímetros de dentina sadia, sem nenhum tipo de contaminação, entre a parte da superfície dentária em contato com a cárie e o tecido pulpar seja apropriada para manter a saúde da polpa (Schweikl et al., 2017). No entanto, em cavidades profundas, a preservação desse tecido não é possível. Porém, no intuito de preservar estrutura dentária, remanescentes de dentina contaminada (afetada por cárie) podem ser deixados após remoção do tecido cariado. Os debates em curso sobre as estratégias de remoção parcial ou total do tecido cariado são motivados pela necessidade clínica de proteger o complexo dentina-polpa de uma maior degradação, além de evitar a penetração subsequente de microrganismos ou seus metabólitos na cavidade pulpar, resultando em possível inflamação irreversível do órgão pulpar. Porém, a influência de microrganismos cariogênicos e os seus subprodutos nos tipos de células especializadas da polpa é muito mais vasto do que simplesmente induzir respostas inflamatórias pulpares diretas (Schwendicke et al., 2016).

Outro tipo de influência seria a formação de uma camada híbrida mais espessa na dentina cariada, porém com resistência de união imediata

significativamente inferior àquela encontrada para a dentina sadia (Schwendicke et al., 2016). As fibrilas de colagéno mal encapsuladas por resina podem ser lentamente hidrolisadas por metaloproteinases de matriz endógena (MMPs). Isto resulta na perda de adesão de compósitos de resina à dentina, que pode ser medida como uma diminuição significativa na resistência de união (Tekçe et al., 2016). No entanto, clinicamente, isto não parece ser um problema no que se refere a capacidade de vedação da restauração e consequentemente sua longevidade, se apenas quantidade limitada de dentina afetada por cárie for deixada sob uma restauração (Schwendicke et al., 2016).

No contexto dos subprodutos bacterianos, o uso de soluções antimicrobianas é uma alternativa para reduzir ou eliminar bactérias após o preparo cavitário em dentina, tais como a clorexidina, o hipoclorito de sódio e (Kimyai et al., 2017; Campos et al., 2009). Sendo assim, a clorexidina tem sido sugerido como um agente eficaz para a desinfecção da cavidade. Pelo fato de ser um material solúvel em água, ela consegue inibir as bactérias através da ligação dos sítios de cálcio das mesmas em níveis fisiológicos de pH (Kimyai et al., 2017).

Métodos de remoção de cárie com propostas menos invasivas que o tradicional uso de brocas vêm sendo desenvolvidos, tais como o ultrassom, o tratamento restaurador atraumático, a abrasão a ar, a remoção com agentes químicos e a irradiação com lasers de alta potência (Reddy MVC , 2015; Medione et al., 2016). Este último consiste no uso de uma tecnologia relativamente nova e com grande potencial a ser explorado.

O uso do laser de alta potência para remoção de tecido cariado consiste em uma alternativa aos métodos convencionais (Hasani Tabatabaei et al., 2015). Promove a ablação do tecido dental, fenômeno este caracterizado pela absorção de energia da fonte de luz pela água presente no tecido duro dental, levando a uma rápida vaporização e, consequente, remoção do mesmo (efeito fototérmico). Em geral, é visto como uma técnica segura (se usada com parâmetros adequados) e eficaz na remoção de lesões cariosas, além de propiciar mais conforto aos pacientes durante o procedimento, com redução de ruídos, sensibilidade pós-operatória, entre outros (Hasani Tabatabaei et al., 2015). A ablação por si só consegue, então, reduzir a carga microbiana em cavidades preparadas com essa metodologia, removendo seletivamente o tecido cariado juntamente com a microbiota presente, além de seus metabólitos (López Jimenéz et al., 2015). Além disso, existem outras

teorias de que o efeito térmico da radiação é transmitido em profundidade através da dentina com uma baixa interação com ela, permitindo um efeito foto-disruptivo sobre microrganismos presentes nas partes inacessíveis da rede tubular (López Jimenéz et al., 2015).

Além dos lasers de alta potência, existem ainda no mercado os lasers de baixa potência, mais acessíveis comercialmente e resultados positivos para redução bacteriana, quando associados a um fotossensibilizador. A técnica denominada Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) (Da Mota et al., 2016) baseia-se na aplicação de uma fonte de luz sobre um tecido alvo fotossensibilizado (uso de fotossensibilizadores) que, na presença de oxigênio, produz oxigênio singleto e radicais livres que danificam irreversivelmente os componentes celulares e modificam suas atividades metabólicas, levando à morte celular (Neves et al., 2016; Gugliemi et al., 2011).

As novas possibilidades de redução microbiana quando da necessidade de remoção de tecido cariado, a busca por técnicas que tem o intuito de melhorar os resultados do tratamento e beneficiar os pacientes no futuro - permitindo que os procedimentos realizados se tornem mais confiáveis em relação à saúde pulpar - estão em constante desenvolvimento e são de extrema importância para a prática clínica.

Sendo assim, este estudo *in vitro* se propõe a investigar, pela primeira vez, a descontaminação da superfície dentinária afetada por cárie, comparando o uso dos lasers de baixa potência (associado ao fotossensibilizador – terapia fotodinâmica antimicrobiana), o de alta potência e o tratamento convencional (clorexidina).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *S. mutans* e seu papel no contexto da cárie dentária

A cavidade oral fornece um *habitat* microbiano para muitos microrganismos, que vivem juntos em uma homeostase microbiana. Qualquer mudança prolongada das condições ambientais pode resultar na ocorrência de doenças dentárias, tais como a cárie dentária (Amend et al., 2018). Além disso, a estrutura microbiana das colônias presentes na cavidade oral variam com a maturação da colônia e sua localização na superfície dentária, o que dificulta qualquer planejamento preventivo em relação à microbiota local (Bourgeois et al., 2017).

A cárie dentária é uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo. Embora a participação de diversas bactérias na etiologia da cárie não possa ser negligenciada, estudos clínicos e laboratoriais revelam o patógeno oral *Streptococcus mutans* como o principal agente causador na iniciação e desenvolvimento desta doença (Galvão et al., 2017; Amend et al., 2018; Bourgeois et al., 2017; Zhou et al.; 2016; Sharma et al., 2018; Martins et al., 2018; Dias et al., 2018; Fumes et al., 2018a; Azizi et al., 2016).

O potencial cariogênico do *S. mutans* é atribuído principalmente à sua capacidade de formar biofilmes na superfície dos dentes, produzir ácidos fracos, (principalmente o ácido lático) e adaptar-se a condições de estresse ambiental, como as variações de pH, tensão de oxigênio e disponibilidade de nutrientes. Mais especificamente, *S. mutans* pode sustentar o crescimento do biofilme e realizar a glicólise em valores de pH abaixo do valor crítico para desmineralizar o esmalte dentário. Dessa forma, as vias metabólicas de *S. mutans* favorecem a redução do pH, a consequente desmineralização do substrato dentário, bem como a síntese de polissacarídeos extracelulares que atuam como estratégia adesiva e reserva energética (Bezerra et al., 2016; Zhou et al.; 2016; Martins et al., 2018).

Como mencionado acima, a sua ação está relacionada à fase de adesão, bem como a estrutura e acúmulo de microorganismos no biofilme durante o desenvolvimento da cárie dentária. A adesão bacteriana é um evento inicial importante na colonização bem-sucedida das estruturas dentárias e várias

moléculas de adesão foram caracterizadas para espécies bacterianas. Proteínas ligadoras de glucana (Gbps) são fatores de virulência diretamente associados à capacidade de S. mutans de se aderir e se acumular nas superfícies dentárias, formando biofilme dental, aumentando a ligação de S. mutans entre si e aos glicanos depositados na superfície dos dentes e contribuindo para a adesão dependente de sacarose aos dentes (Bordini et al., 2018).Portanto, é necessário aplicar procedimentos específicos para diminuir a população dessa bactéria e/ou inibir seu acúmulo no biofilme dental para prevenir o desenvolvimento/progressão da lesão de cárie dental (Azizi et al., 2016).

2.2 Lesões de cárie em dentina

A dentina é uma matriz de colágeno mineralizado que contém aproximadamente 30 a 50 % (volume) de material orgânico e 20 % (volume) de água. A composição da dentina pode variar em diferentes regiões do dente, dependendo de sua proximidade com o tecido pulpar, bem como se a matriz é desmineralizada ou se a lesão de cárie é um substrato afetado/infectado. Estas diferenças podem influenciar significativamente as propriedades mecânicas da dentina (Breschi et al., 2018).

A microestrutura da dentina e suas propriedades são os principais determinantes de quase todos os procedimentos na Odontologia Restauradora. A dentina é um complexo hidratado composto por quatro elementos: (1) túbulos dentinários cercados por (2) uma matriz peritubular altamente mineralizada embutida em uma matriz intertubular, a qual consisti amplamente de (3) colágeno tipo I com cristais de apatita e (4) fluído dentinário (Fuentes et al., 2003).

As lesões cariosas cavitadas em dentina são consideradas as últimas fases do estágio de evolução da cárie dentária. A dentina fornece um ambiente diferente para bactérias envolvidas na progressão da lesão de cárie, onde apenas bactérias especializadas são capazes de colonizar e explorar esse substrato. O perfil bacteriano em uma lesão em esmalte e na lesão em dentina são significativamente diferentes, uma vez que a microbiota da dentina é constantemente submetida a mudanças, como a disponibilidade de nutrientes, concentração de oxigênio e pH.

Além disso, este tecido contém maior proporção de matriz orgânica e menor componente inorgânico do que o esmalte. Assim, o pH crítico para dissolução da dentina é maior quando comparado ao esmalte, e permite a colonização de bactérias que podem não ser tão acidogênicas e acidúricas como as necessárias para a desmineralização inicial do esmalte (Neves et al., 2017).

A odontologia minimamente invasiva tem enfatizado a preservação máxima do tecido durante manejo de lesões profundas de cárie dentinária. A remoção seletiva da dentina é recomendada com o intuito de preservar ao máximo a estrutura dentária e evitar uma possível exposição pulpar (Kabil et al., 2017; Ornellas et al., 2018). Nesse sentindo, a completa vedação da cavidade é capaz de promover a redução bacteriana após um determinado período de tempo e viabilizar a remineralização na dentina afetada dependendo do material utilizado, desempenhando, assim, um papel relevante no sucesso do tratamento (Melo et al., 2015; Pinheiro et al., 2018; Ornellas et al., 2018).

A selagem ideal da cavidade aumenta a longevidade das restaurações dentárias ao cortar o suprimento de nutrientes bacterianos, impedindo assim a progressão da lesão cariosa. Entretanto, recorrência de cárie e sensibilidade pós-operatória podem ocorrer devido à presença de microrganismos viáveis após o preparo cavitário (Pinheiro et al., 2018; Kabil et al., 2017; Melo et al., 2015).

Infelizmente, se não houver o controle dos fatores etiológicos relacionados à doença cárie, o tratamento de lesões nas paredes adjacentes à restauração - comumente chamadas de lesões de cárie secundárias - leva a perdas maiores de tecido duro dentário - um cenário que é referido como ciclo restaurador repetitivo - que pode, no final, levar à necessidade de tratamento endodôntico e/ou perda dentária prematura. Por estas razões, pesquisas no contexto de cárie dental, seja ela primária ou ao redor de restaurações pré-existentes, são de grande valia (Amend et al., 2018).

2.3 Lesões de cárie em dentina produzidas artificialmente *in vitro*

As lesões artificiais de cárie apresentam vantagens na confecção de superfícies planas e na padronização do grau de desmineralização da dentina (Choi

et al., 2006). A utilização de modelos de biofilme em monocultura como, por exemplo, de *Streptococcus mutans* tem sido útil no estudo de variáveis específicas dentro da complexidade da doença cárie dentária. Além disso, modelos desse tipo permitem respostas rápidas para avaliação de tratamentos e medicamentos. Nesse contexto, a padronização de modelos simplificados ou complexos que desenvolvam lesões de cárie em laboratório parece ser útil para modelos de estudos (Carvalho et al., 2018).

No modelo de biofilme de *S. mutans*, a exposição à sacarose simula uma dieta rica em carboidratos. As bactérias hidrolisam esse açúcar para produzir polissacarídeos extra e intracelulares. Neste contexto, os modelos de biofilme *in vitro* representam sistemas atrativos para investigar a eficácia de terapias antimicrobianas, visto que a viabilidade bacteriana e os fatores de virulência podem ser facilmente quantificados (Nemezio et al., 2017).

Considerando que um modelo experimental não consegue reproduzir todas as condições da doença, possui vantagens e limitações que devem ser consideradas para discutir os achados. A implementação de estudos em modelos de boca artificial garante vigilância experimental e podem avaliar as interações microbianas em placas dentais simuladas e biofilmes similares e monitorar suas características físicas, químicas, biológicas e moleculares com um alto grau de precisão (Amend et al., 2018; Tang et al., 2003). No entanto, tem havido uma variedade de modelos de boca artificial publicados que diferem entre si em sua configuração, princípio funcional e parâmetro a ser examinado (Amend et al., 2018).

O uso de uma espécie bacteriana para inoculação é uma enorme simplificação da diversidade microbiana existente dentro da cavidade bucal humana e deve-se considerar que as respostas frente ao uso de diferentes cepas de bactérias cariogênicas pode ser diferente no substrato dental (Elgamíly et al., 2018). Um aspecto positivo é que cada um possui sua patogenicidade bem conhecida na cárie dentária. No que diz respeito aos conflitos éticos, os modelos *in vitro* são adequados para examinar materiais e tratamentos quanto á prevenção/controle da doença (Amend et al., 2018).

2.4 Terapias Antimicrobianas

2.4.1 Clorexidina

O digluconato de clorexidina é o antimicrobiano mais utilizado na Odontologia e auxilia no controle mecânico do biofilme dental/cariogênico. Em altas concentrações, a clorexidina é bactericida e age como um detergente, pois causa danos à membrana celular (Fumes et al., 2018b). Além disso, é o anti-séptico usado contra microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e algumas leveduras (Dias et al., 2018).

O seu pontecial antimicrobiano ainda é o método mais testado *in vitro* e *in vivo* para estabilizar a interface adesiva com aplicabilidade clínica devido à sua grande disponibilidade em consultórios odontológicos e ao tempo reduzido de aplicação clínica (30 segundos se mostrou eficaz na inibição da atividade enzimática em dentina) (Breschi et al., 2018).

Hipóteses sugerem que a clorexidina age por meio de dois mecanismos. O primeiro seria a adesão à estrutura da membrana bacteriana, destruição da barreira bacteriana osmótica e aumento da permeabilidade celular, o que leva ao vazamento dos íons intracelulares, como o potássio, para o exterior da membrana celular danificada. O segundo mecanismo envolve o aspecto intracelular de coagulação, o qual é responsável pelo impacto bactericida e depende da concentração de clorexidina (Azizi et al., 2016). Portanto, trata-se de um agente catiônico, que possui o mecanismo de ação centrado principalmente na ruptura da parede celular bacteriana, com subsequente precipitação do conteúdo citoplasmático (Sharma et al., 2018; Dias et al., 2018).

Em relação ao *Streptococcus mutans*, a clorexidina se mostra capaz de interferir em sua atividade metabólica e reduzir efetivamente sua viabilidade, confirmando, assim, as suas propriedades antimicrobianas, uma vez que essa molécula é rapidamente atraída pela superfície bacteriana carregada negativamente, promovendo a ruptura da membrana e morte celular (Nemezio et al., 2017). A principal vantagem da clorexidina deve-se ao fato dela se ligar aos tecidos moles e duros da boca, permitindo que sua ação seja por um longo período após o uso de uma formulação que a contém na sua composição (Sharma et al., 2018). Um estudo recente (Li et al., 2018), avaliou o efeito da clorexidina no biofilme de *S. mutans e*

relataram que o biofilme foi suscetível à ação da clorexidina 0,12%, apresentando uma redução de biomassa de mais de 80% .

Embora seja usada como um padrão ouro em comparação a outros agentes antimicrobianos, a clorexidina possui algumas limitações quando do seu uso prolongado como enxaguatório. (Sharma et al., 2018; Cieplik et al., 2018; Nemezio et al., 2017; Fumes et al., 2018b). Porém, a clorexidina tem boa eficácia antibacteriana, efeito bacteriostático e efeito bactericida, devido à precipitação e / ou coagulação do citoplasma (Goud S, et al 2018).

2.4.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) baseia-se no princípio de que um corante fotoativo, também chamado de agente fotossensibilizador, se liga à célula-alvo e é ativado por uma luz de comprimento de onda específica. Nesse processo, espécies de oxigênio, como oxigênio singleto e radicais livres, são formadas, produzindo toxicidade para a célula e são capazes de danificar componentes essenciais das células ou mesmo modificar o seu metabolismo de uma forma irreversível, resultando na morte bacteriana (Melo et al., 2015; Tokubo et al., 2018; Fumes et al., 2018a).

A eficácia da aPDT é dependente, principalmente, de três fatores: capacidade do agente fotossensibilizador de se ligar à célula, penetrar e agir dentro da mesma e formar oxigênio singleto (Tokubo et al., 2018). Além disso, sua aplicação é indolor, não promove resistência bacteriana e é desprovido de efeitos sistêmicos (Pinheiro et al., 2018).

A aPDT é uma abordagem eficaz e moderna de intervenção mínima para a redução microbiana pós tratamento conservador de lesões profundas de cárie. O tratamento conservador em si preserva dentina afetada e viabiliza, se bem selada a cavidade, a remineralização do substrato remanescente. Como benefício adicional, a aPDT pode reduzir a carga de microrganismos presentes nesta dentina remanescente (Ornellas et al., 2018). Sendo assim, tem sido proposta como etapa adjuvante no manejo de lesões de cárie em dentina profunda, embora não existam protocolos bem definidos para sua aplicação clínica (Méndez et al., 2018).

No entanto, a fotossensibilização letal ocorre nas camadas mais superficiais do biofilme. Assim, o tempo de pré-irradiação é um fator fundamental para a difusão do fotossensibilizador através do biofilme cariogênico. No contexto de uso do azul de metileno em lesões de dentina afetada por cárie, um maior tempo de exposição ao fotossensibilizador permitiria maior penetração do mesmo em camadas mais profundas do substrato. Sendo assim, o tempo de pré-irradiação ou tempo de incubação da droga consiste no tempo em que o corante encontra o biofilme antes da aplicação da luz e é um fator importante para a difusão do fotossensibilizador através do biofilme cariogênico (Fumes et al., 2018b). Dessa forma, devido à resistência bacteriana produzida por alguns antimicrobianos, a aPDT tornou-se uma alternativa viável para tratamentos de doenças relacionadas a biofilmes (Leal et al., 2017).

Considerando que a eficácia da aPDT depende também do tipo e parâmetros da luz, o uso de um modelo reprodutível com biofilme de *S. mutans* oferece uma oportunidade para estudar o efeito de alguns parâmetros da terapia com laser de baixa potência em um modelo validado. (de Sousa Farias et al., 2016) Segundo Soria-Lozano et al.(2015), a eficácia desta terapia (aPDT) depende da dose, tipo de luz e fotossensibilizador utilizado, sendo que para o azul de metileno são encontrados resultados de 73% à 93% de redução microbiana em colônias *S. mutans*, *S. sanguis* e *C.albicans* para estudos *in vitro*.

2.4.3 Laser de alta potência

Introduzidos no mercado Odontológico brasileiro nas ultimas duas décadas, lasers alta potência com grande afinidade por água e hidroxipatatita, como os lasers de érbio (Er:YAG e Er,Cr:YSGG), são indicados para a remoção de lesões de cárie e a preparação da cavidade. Vários estudos mostraram a eficácia dos lasers de érbio na remoção de tecido cariado, juntamente com maior aceitação do paciente em comparação com a instrumentação rotatória convencional (Dommisch et al., 2008; Sancakli et al., 2018).

Os lasers de érbio mostram-se eficazes para a ablação de tecidos mineralizados, uma vez que seus comprimentos de onda (Er:YAG 2,94 µm) e

Er,Cr:YSGG 2,78 µm) coincidem com o pico de absorção de água e radicais OH presentes nos tecidos dentários (3,0 µm). Isso leva à vaporização de água, seguido por microexplosões resultantes do aumento da pressão interna das moléculas, que, por sua vez, levam à ejeção do substrato sob a forma de partículas microscópicas de modo seguro e eficaz quando seu uso está sob parâmetros apropriados (Valério et al., 2016).

O potencial de descontaminação dos lasers tem sido explorado in vitro e investigações usando os regimes de irradiação com laser ilustram a enorme heterogeneidade dos estudos. As densidades de energia aplicadas variaram em uma ampla faixa de 0,04 a 63,69 J/cm^2 nos diferentes estudos. Além disso as bactérias utilizadas podem ser de diferentes segmentos da microbiota oral (Gram positiva ou negativa, aeróbica, microaerófila ou anaeróbia) e até bactérias da mesma espécie porém de diferentes cepas (Hauser-Gerspach et al., 2014)..

Outro ponto importante é a avaliação das medidas documentadas sobre a eficácia antimicrobiana desse laser. Em relação à eficácia, é difícil comparar os resultados entre os estudos publicados, pois são dependentes de interações complexas entre o comprimento de onda, a duração do pulso, a freqüência e a energia e a dureza do substrato dentário (Valério et al., 2016). A redução das contagens bacterianas por irradiação do Er: YAG encontradas na literatura ficam na ordem de 90 a 99% (1 a 2 logs) e são consideradas estatisticamente significantes (Hauser-Gerspach et al., 2014). Além disso, a literatura mostra que um efeito antibacteriano pode ser obtido com um laser Er: YAG mesmo em baixas densidades de energia (Tosun et al., 2012).

Em relação ao Er Cr: YSGG, existem na literatura relatos de seu uso como método conservador e indolor para remoção de lesão cariosa, preparo cavitário e condicionamento do esmalte para minimizar a microinfiltração marginal e melhorar a força de adesão. Além disso, a superfície do esmalte quando aplicada com Er Cr: YSGG faz uma camada com características de microrretenção, melhorando a resistência de união com materiais de resina (Alkhudhairy et al., 2018).

A literatura mostra que a irradiação com os lasers de érbio com ajustes razoáveis tem o potencial de redução microbiana. Assim, acredita-se que quando os lasers de érbio quando são usados com parâmetros apropriados e resfriamento de água/ar, eles podem fornecer uma superfície mais favorável à ligação de compósitos

e também à redução microbiana, sem comprometer a vitalidade da polpa (Ramos et al., 2015).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a redução microbiana em superfície dentinária afetada por cárie, artificialmente produzida *in vitro*, comparando o uso dos lasers de baixa potência (associado ao fotossensibilizador – terapia fotodinâmica antimicrobiana), o de alta potência e o tratamento convencional (digluconato de clorexidina a 2%).

A hipótese nula testada foi de que os tratamentos propostos não apresentam diferenças no potencial de redução microbiana se comparados ao tratamento convencional (digluconato de clorexidina a 2%).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O protocolo desta pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP) (CAAE n. 76778117.9.0000.0075), tendo sido aprovado (Anexo A).

4.2 Delineamento experimental

Neste estudo, as unidades experimentais consistiram em 60 discos de dentina hígida obtidos a partir de terceiros molares humanos recém-extraídos. O fator em estudo considerado foi o *tratamento da superfície* de dentina cariada, em 6 níveis: G1 - sem tratamento; G2 – digluconato de clorexidina a 2%; G3 - laser de alta potência Er:YAG (2,94 µm) ; G4 – laser de alta potência Er,Cr:YSGG (2,78 µm); G5 - aPDT 1 (laser de baixa potência 660 nm + azul de metileno a 0,01%); G6 - aPDT 2 (laser de baixa potência 660 nm + azul de metileno a 0,005%). O modelo de lesão cárie artificial desenvolvido com *S. mutans* foi avaliado em profundidade de lesão de aproximadamente 300 µm. O desfecho primário foi a redução de bactérias, avaliada quantitativamente por meio do teste de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Os grupos experimentais do estudo estão ilustrados na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Distribuição das amostras nos diferentes grupos experimentais

Fonte: a autora.

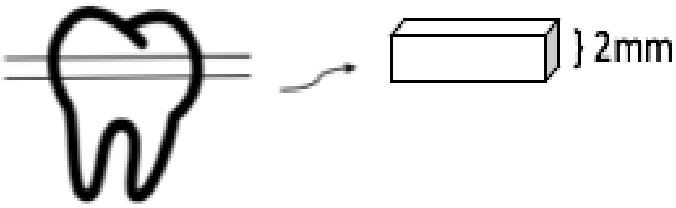
4.3 Seleção dos dentes e obtenção dos espécimes

Terceiro molares hígidos humanos, recém extraídos, foram coletados e limpos com curetas periodontais e taça de borracha com pasta de pedra pomes-água. Após a limpeza, foram examinados com lupa estereoscópica (aumento de 40x) para detectar defeitos de esmalte e/ou lesões de cárie, sendo que a presença destes determinou a exclusão do elemento da amostra. Os dentes selecionados foram estocados em solução supersaturada de timol a 0,1% (Gilmour et al., 1990), à temperatura de 4 ºC até o momento do uso (máximo de 3 meses).

Em seguida, a porção radicular dos elementos dentais foi removida com auxílio da máquina de corte (Labicut 1010, Extec, Enfield, USA).Para obtenção de discos de dentina com superfície oclusal plana e espessura de aproximadamente 2 mm (aferidas com paquímetro digital) (Figura 4.2), cada coroa foi desgastada com lixas de carbeto de silício (Buehler Ltd., Lake Buff, IL, EUA) de granulação decrescente #180, #320 e #400, com refrigeração abundante à água em Politriz (Ecomet 3 machine, Buehler Ltd., Lake Bluff, EUA), acionada em baixa velocidade (100 rpm). Para impedir que os grãos das primeiras lixas interferissem na qualidade do desgaste, entre cada lixa os espécimes foram levados a um aparelho de

ultrassom, com água destilada (5 minutos), para lavagem e remoção de *debris*. Por fim, uma camada de esfregaço padronizada foi criada utilizando-se lixa de granulação #600 por 60 segundos.

Figura 4.2 - Obtenção de amostras de dentina do terço médio com superfície oclusal plana e espessura de aproximadamente 2 mm

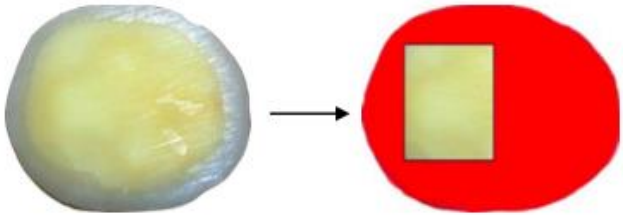


Fonte: a autora.

4.4 Montagem dos espécimes para o desafio cariogênico e produção de dentina afetada por cárie

Os espécimes de dentina foram protegidos com verniz ácido-resistente (superfície oclusal e faces axiais), exceto em área oclusal delimitada de 2 x 5 mm (determinada com auxílio de paquímetro digital), região em que foi produzida a lesão de cárie artificial (Figura 4.3). A face interna da amostra (correspondente à parede pulpar) permaneceu sem proteção com verniz, pois foi adaptada a uma lâmina de vidro (usada em microscopia óptica), com auxílio de cola Super Bonder (© 2018 Henkel Ltda., São Paulo).

Figura 4.3 - Superfície planificada de dentina oclusal protegida com verniz ácido resistente exceto em área delimitada de 2x 4 mm, região onde foi produzida artificialmente a dentina afetada por cárie



Fonte: a autora.

Em cada lâmina de vidro foram adaptados 12 espécimes, 2 de cada grupo experimental (Figura 4.4) e 2 para posterior análise de profundidade da lesão, realizada em equipamento de Tomografia por Coerência Óptica (OCT). A lâmina de vidro foi, então, inserida em um tubo plástico de 50 ml (Falcon, Corning, EUA) (Figura 4.5) e levados para a esterilização.

Figura 4.4 – (A) Distribuição aleatória randomizada das amostras na lâmina de vidro. (B) Tubo com a lâmina dentro pronto para esterilização

Fonte: a autora.

4.5 Esterilização dos espécimes

No modelo experimental bacteriano, para a formação de lesões de cárie *in vitro*, é necessário que todas as amostras estejam livres de contaminação (Krista et al., 2015). Tubos plásticos do tipo *Falcon* contendo os espécimes em água destilada foram embalados em envelopes para autoclave e todo este conjunto foi submetido à radiação gama (dose de 25 kGy), capaz de esterilizar os espécimes sem prejudicar as propriedades físico-químicas dos tecidos dentais mineralizados e/ou desidratá-los (Rodrigues et al., 2004). A esterilização foi realizada no Centro de Tecnologia das radiações – CTR IPEN/CNEN –SP coordenado pelo Dr. Pablo Vásquez.

4.5 Preparo e Armazenamento dos Meios de Cultura

O TSB (*Tryptic Soy Broth*), meio de cultura líquido, foi preparado segundo as instruções do fabricante e enriquecido com 1 % de sacarose. Esse meio é utilizado para monitoramento da esterilidade durante o experimento e para ativação das cepas após retiradas do ultrafreezer, onde permanecem estocadas. Além do TSB, também foi utilizado o TSA (*Tryptic Soy Agar*), meio sólido, no qual foram inoculados a cepa bacteriana para observação do crescimento de colônias (Azevedo et al., 2011).

4.6 Preparo do caldo inóculo e determinação da quantidade de bactérias/ml

Com o auxílio de uma alça calibrada estéril, uma amostra da cultura de estoque mantida em glicerol da cepa de *S. mutans* com cariogenicidade previamente conhecida (UA159), foi inoculada pela técnica de estriamento na placa de *Petri* contendo TSA. As placas foram incubadas durante 16 horas em estufa de atmosfera de 10% de CO_2 a 37 ^{o}C, onde foi verificado o crescimento das colônias. O caldo

inóculo foi, então, composto pelas colônias diluídas em 20 ml de TSB, enriquecido com 1% de sacarose, incubado nas mesmas condições ambientais anteriores, durante 3 horas, até atingir o crescimento de aproximadamente 1,0 quando lido em espectrofotômetro (Beckman DU 640, Michigan, EUA) calibrado para absorbância em 600 nm (Azevedo et al., 2011; Espejo et al., 2010; Gama-Teixeira et al., 2007).

4.8 Desafio cariogênico

O modelo adotado pelo estudo foi o de *Batch Biofilm Model*, no qual o biofilme é formado em um determinado período de tempo, dentro de um recipiente fechado, livre de contaminação e com temperatura e atmosfera controlados (Krista et al., 2015). Após a esterilização, as amostras foram retiradas da lâmina de vidro e distribuídas na placa de cultura celular com 24 poços, para facilitar a indução das lesões. Cada poço acomodou um espécime com 0,5 ml de TSB e 0,5 ml do caldo inóculo. A cada 24h, o meio de cultura foi trocado para evitar o esgotamento de nutrientes para as bactérias presentes. Ressalta-se que as amostras não foram induzidas no mesmo tempo, para que permitisse maior segurança no preparo das lesões. Sendo assim, as lesões eram induzidas em 12 amostras por vez (sendo 2 amostras de cada grupo em distribuição aleatória).

No modelo experimental em lesões de profundidade de aproximadamente 300 µm, os espécimes foram inoculados e mantidos em estufa bacteriológica a 37 ºC por 15 dias (Gama-Teixeira et al., 2007; Azevedo et al., 2014). As trocas foram realizadas periodicamente para um novo meio de cultura, transferindo-se também uma alíquota do caldo crescido. Este procedimento foi realizado em fluxo laminar. Durante esse período, o caldo foi semeado utilizando-se a técnica de esgotamento em uma placa contendo TSA, que permaneceu incubada a 37 °C por 48 h para verificar a ausência de contaminação. Finalizado o período de desafio cariogênico, o biofilme aderido à superfície foi removido cuidadosamente com gaze e os espécimes foram lavados com água deionizada.

4.9 Análise da profundidade das lesões de cárie

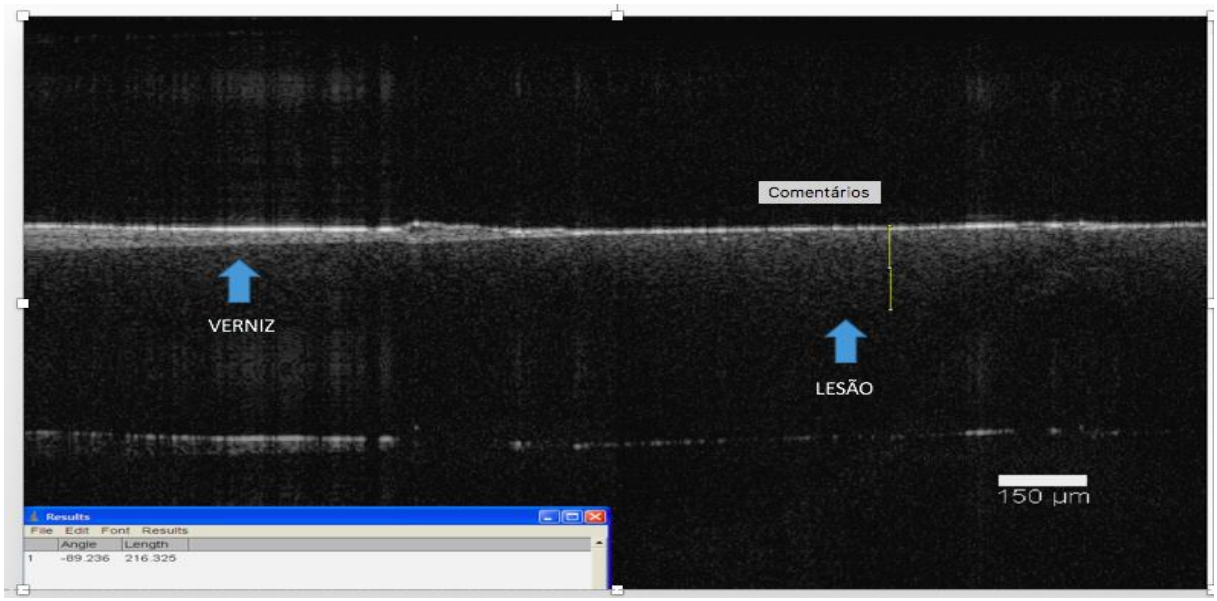
A profundidade das lesões de cárie desenvolvidas *in vitro* foi avaliada e validada por meio do teste de Tomografia por Coerência Óptica (*Optical Coherence Tomography* - OCT). O OCT consiste em uma técnica que gera imagens de secções transversais do espécime baseado no espalhamento da luz pelo tecido e através de um interferômetro de Michelson (Min et al., 2015). O equipamento de OCT possui uma ponta em fibra óptica que conduz a luz e a divide em dois feixes, sendo um direcionado para um espelho de referência e o outro para o espécime, permitindo a formação de imagens em tempo real. Além disso, a ponta permite o alcance da amostra sem haver contato ou necessidade de destruição.

A ponta do equipamento foi direcionada para o centro da face do espécime exposta ao desafio cariogênico, de modo que foi possível a obtenção de uma imagem que compreendeu tanto a porção protegida pelo verniz ácido-resistente (controle - dentina hígida) quanto a região submetida à contaminação, permitindo comparações qualitativas e quantitativas entre tecido sadio e lesionado em uma mesma imagem.

No sistema OCT (SR930 Thorlabs Inc., Newton, NJ, EUA), um díodo emissor de luz super luminescente (λ = 930 nm) fornece A e B *scans* com resolução de 4,0 e 6,0 μm, respectivamente. O sistema é capaz de produzir até quatro quadros por segundo, proporcionando imagens em tempo real (2000 × 512 pixels, equivalente a uma largura × área de altura de 6000 × 1581 μm2) (Azevedo et al., 2014).

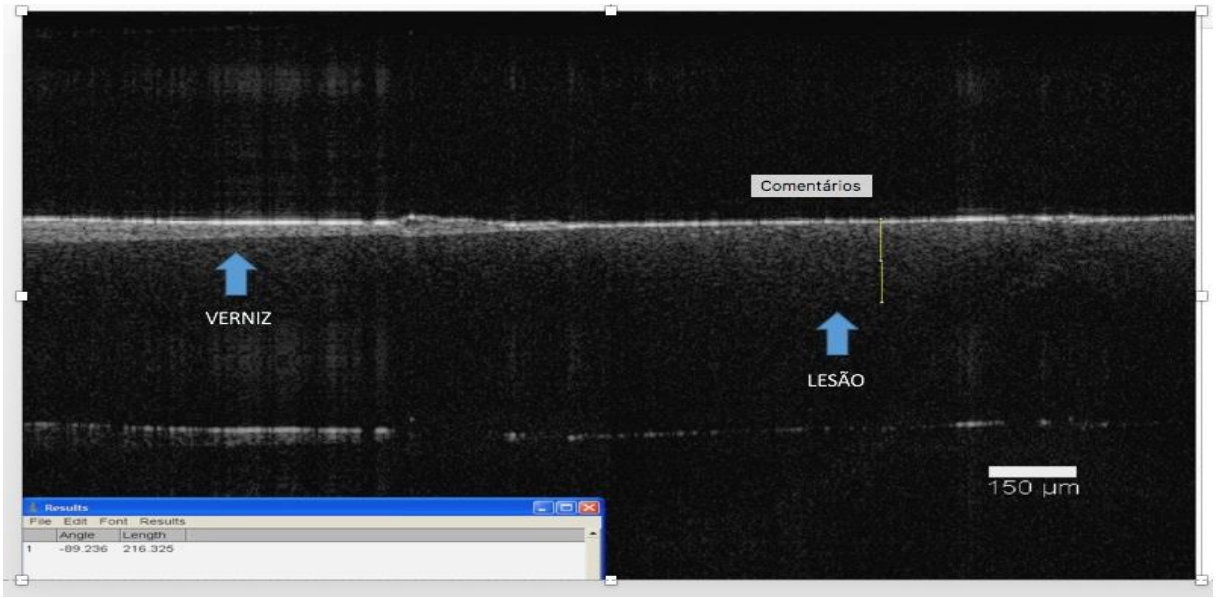
Os tamanhos das lesões encontradas ficaram na faixa dos 260 micrometros, conforme demonstrado nas Figuras 4.5 e 4.6, informações obtidas através do programa Image J.

Figura 4.5 - Imagem obtida através da tomografia óptica de coerência (OCT). Á esquerda da imagem encontra-se a área protegida pelo verniz cavitário e a direita corresponde a área de lesão induzida por cárie artificialmente de aproximadamente 216 µm



Fonte: a autora.

Figura 4.6 - Imagem obtida através da tomografia óptica de coerência (OCT). Á esquerda da imagem encontra-se a área protegida pelo verniz cavitário e a direita corresponde a área de lesão induzida por cárie artificialmente de aproximadamente 310 µm



Fonte: a autora.

4.10 Tratamento da superfície dentinária

Após o desenvolvimento das lesões de cárie artificiais, os tratamentos descritos abaixo foram realizados na superfícies contaminadas de cada espécime.

- Grupo 1: sem tratamento.
- Grupo 2: Digluconato de Clorexidina a 2% – 1 gota de solução foi aplicado de forma ativa na superfície da dentina contaminada, utilizado um pincel descartável (*Microbrush*, KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil), durante 20 segundos, seguindo de um jato de ar leve durante 15 segundos com uma seringa de ar (Kimyai et al., 2017).
- Grupo 3 - Laser de Er:YAG – as amostras foram irradiadas com o laser de Er:YAG (LiteTouchTM, Light Instruments Ltd, Israel) emitindo no comprimento de onda de 2,94 µm, com a ponta AS7065 (diâmetro do feixe 1,3 mm) refrigeração 4 ml/min, tempo de irradiação de 1 minuto (em movimentos horizontais e verticais, de varredura), distância focal de 1 mm da

superfície dental, emissão do feixe perpendicular à superfície dentinária, energia de 50 mJ, taxa de repetição de 15 Hz e densidade de energia 3,46 J/cm^2.

- Grupo G4 – Laser de Er,Cr:YSGG – as amostras foram irradiadas com o Laser de Er,Cr:YSGG (Waterlase iPlus, BIOLASE©, San Clemente, CA, EUA), emitindo no comprimento de onda de 2,78 µm, com a ponta MZ8 (diâmetro do feixe de 880 µm). Foi utilizada refrigeração (água) de 4 ml/min, tempo de irradiação de 1 minuto (em movimentos horizontais e verticais, de varredura), distância focal de 1 mm da superfície dental, emissão do feixe perpendicular à superfície dentinária, energia de 37,5 mJ, taxa de repetião de 15 Hz e densidade de energia de 7,5 J/cm^2.
- Grupo G5 - aPDT 1: foi utilizado um laser de baixa potencia (660 nm, Therapy XT, DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil) com área do spot de 0,028 cm^2 e potência fixa de 100 mW associado ao azul de metileno a 0,01% (Chimiolux 10, DMC, São Carlos, SP, Brasil). A terapia consistiu na aplicação de 1,0 ml de corante na superfície dentinária. O tecido cariado ficou mantido em contato com o corante durante um tempo de pré-irradiação de 5 minutos. O laser foi, então, posicionado perpendicularmente à superfície oclusal de cada espécime e as irradiações prosseguiram em um único ponto no centro de cada superfície durante 90 segundos (9J) (Guglielmi et al., 2011).
- Grupo G6 - aPDT: nesse grupo foi realizado o mesmo tratamento do que o descrito para o grupo G5, porém utilizando o fotossensibilizador em menor concentração, o azul de metileno a 0,005% (Chimiolux 5, DMC, São Carlos, SP, Brasil).

4.11 Análise Microbiológica

Para a coleta de amostra dentinária e análise microbiológica, utilizou-se a broca *carbide* esférica (CA1 2800 (1/4), KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) diretamente na superfície envolvendo a lesão, onde foram coletadas as amostras antes e após o tratamento proposto para cada grupo) de dentina afetada por cárie formadas artificialmente *in vitro.* Ressalta-se que no grupo 1 (G1 - controle) foram

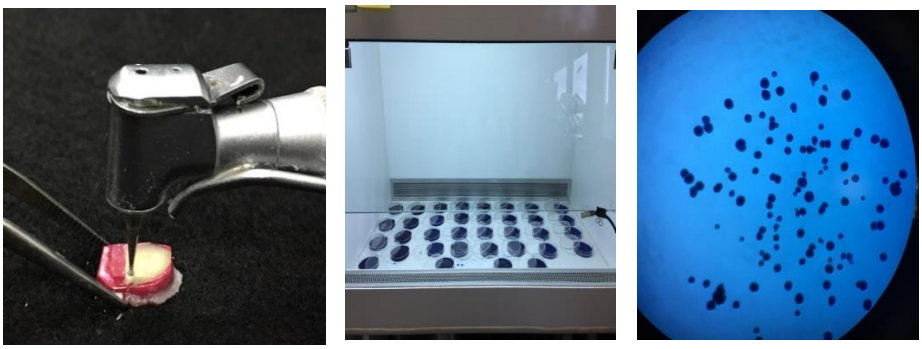
feitas coletas apenas em um único tempo experimental, visto que não houve tratamento de superfície.

A coleta se deu até que todo o diâmetro da broca *carbide* (0,5 mm) estivesse inserido na lesão de cárie formada artificialmente.

As amostras de dentina foram colhidas em frascos de tampa de rosca contendo meio de congelamento (10 % de glicerol), para evitar perda e morte bacteriana e foram levadas em até no máximo 1 hora ao laboratório para cultura microbiana e avaliação (Figura 4.7).

As brocas contendo as amostras de dentina foram introduzidas em um tubo de vidro e foram sonicadas, por aproximadamente 1 minuto, para que o máximo de conteúdo da broca fosse transferido para a solução salina. As amostras colhidas foram, então, submetidas a uma diluição seriada em água pipetonada até o fator de diluição 10^1 (definida nos testes preliminares, visto que não foi possível observar crescimento em mais diluições). Cada placa de ágar MSB (*Agar Mitis Salivarius*) recebeu 3 gotas de 25 µL (tanto no período “antes” quanto no “após” o tratamento proposto) e foram incubadas em atmosfera de 10% CO_2 durante 2 dias a 37 °C. Em seguida, o número de colônias foi determinado e expresso em UFC (unidades formadoras de colônias) por amostra (Aswathi et al., 2017).

Figura 4.7 - (A) Com auxílio da broca *carbide*, a amostra foi colhida (B) transferida para as placas de *Petri* dentro do fluxo laminar, onde depois foram incubadas em microaerofilia durante 2 dias a 37°C (C) contagem de unidades formadoras de colônias



(A) (**B**) **(C)**

Fonte: a autora.

4.12 Análise dos Dados

O software utilizado foi o Statistica (versão 7.0). Inicialmente, para resumo e descrição dos dados coletados, foram calculadas algumas medidas descritivas: média, desvio padrão, mínimo e máximo. A suposição de normalidade foi testada através do teste de *Shapiro Wilk*. Como esta suposição não foi atendida, foram aplicados métodos estatísticos não paramétricos para testar as hipóteses do pesquisador. Para avaliar cada tratamento, antes e depois da aplicação, foi utilizado o teste de *Wilcoxon*. Para comparar o desempenho dos tratamentos foi aplicado o teste de *Kruskal Wallis*, complementado pelo teste *dms*, para identificação das diferenças significativas ($p<0,05$).

5 RESULTADOS

Inicialmente, para resumo e descrição dos dados coletados, foram calculadas algumas medidas descritivas: média, desvio padrão, mínimo e máximo (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Medidas descritivas: média, desvio padrão, mínimo e máximo para cada grupo experimental

	Diferenças absolutas (ufc/ml)					Diferenças percentuais (%)				
Tratamento	Médias	n	DP	Mínimo	Máximo	Médias	n	DP	Mínimo	Máximo
G1* Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 Clorexidina	-21004.00	10	32417.09	-90586.67	-93.33	-81.98	10	30.26	-100.00	-4.55
G3 Er:YAG	-6284.00	10	16582.93	-53373.33	13.33	-73.48	10	34.23	-100.00	3.23
G4 Er: YSGG	-577.33	10	450.98	-1653.33	-93.33	-52.19	10	25.87	-100.00	-27.91
G5 (aPDT-0,01%)	-17353.33	10	49750.76	-158906.67	-346.67	-75.21	10	27.08	-100.00	-13.28
G6 (aPDT-0,005%)	-577.33	10	450.98	-1653.33	-93.33	-52.19	10	25.87	-100.00	-27.91
Total	-9694.13	50	28827.98	-158906.67	32000.00	-42.28	50	164.35	-100.00	1052.63
***não foi realizado tratamento.**										

Fonte: a autora.

A tabela abaixo (Tabela 5.2) resume os resultados da aplicação do Teste de Wilcoxon comparando os momentos “Antes” e “Depois”, em cada tratamento. Para todos os tratamentos, com exceção do aPDT (G6) (*p*=0,203), existe uma redução microbiana estatisticamente significativa. Este tratamento, apesar de apresentar redução na maioria das repetições, em 30% delas apresentou aumento microbiano.

Tabela 5.2 - Comparação em unidade UFC/ ml em dois tempos "Antes” X “Depois”, para cada tratamento experimental

TRATAMENTO	*p*
G2 (Clorexidina)	0.005
G3 (Er:YAG)	0.007
G4 (Er:YSGG)	0.005
G5 (aPDT-0,01%)	0.005
G6 (aPDT-0,005%)	0.203

Fonte: a autora.

Aplicando o Teste de *Kruskal Wallis* para comparar os tratamentos no momento Antes (Tabela 5.3), observou-se diferença estatística (p=0,04). Ou seja, a princípio existe diferença significativa entre os tratamentos no momento antes do tratamento.

Tabela 5.3 - Comparação em UFC/ml dos tratamentos (momento Antes)

Tratamento	n	Soma de postos	Posto médio
G1 (Controle)	10	263.0	26.3
G2 (Clorexidina)	10	384.5	38.45
G3 (Er:YAG)	10	229.0	22.9
G4 (Er: YSGG)	10	203.0	20.3
G5 (aPDT- 0,01%)	10	349.5	34.95
G6 (aPDT-0,005%)	10	401.0	40.1

Fonte: a autora.

Aplicando o Teste de *Kruskal Wallis* para comparar o efeito dos tratamentos (tempo “após”) observou-se que não houve diferença estatística significativa entre eles (p=0,1133) (Tabela 5.4). Este resultado ocorreu mesmo com amostras bastante atípicas observadas no grupo G6 (aPDT com azul de metileno a 0,005%).

Tabela 5.4 - Comparativo dos tratamentos, considerando-se a diferença percentual na redução microbiana (Depois-Antes)

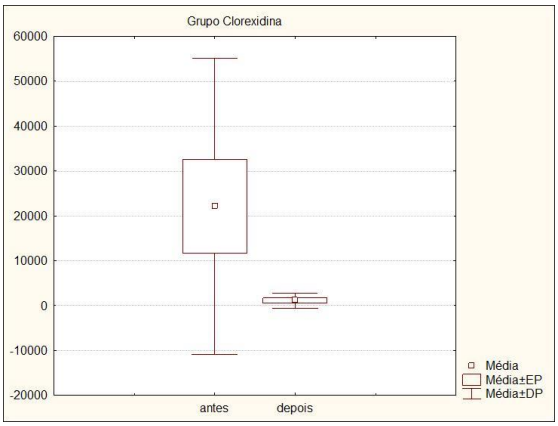
TRATAMENTO	n	Soma de postos	Posto médio
G2 (Clorexidina)	10	184.5	18.45
G3 (Er: YAG)	10	214.5	21.45
G4 (Er,Cr: YSGG)	10	320.5	32.05
G5 (aPDT-0,01%)	10	233.5	23.35
G6 (aPDT-0,005%)	10	322.0	32.2

Fonte: a autora.

Obs: O grupo G1 (Controle) não foi levado em consideração, pois não houve tratamento.

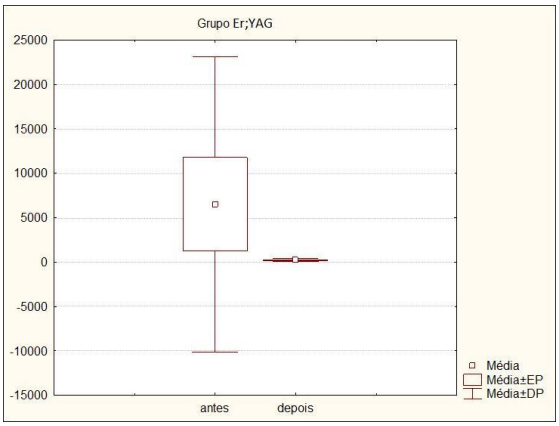
Gráficos do tipo *box-plots* foram construídos para facilitar a interpretação dos resultados (Gráficos 5.1 a 5.6).

Gráfico 5.1 - Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G2 (Digluconato de Clorexidina a 2%)



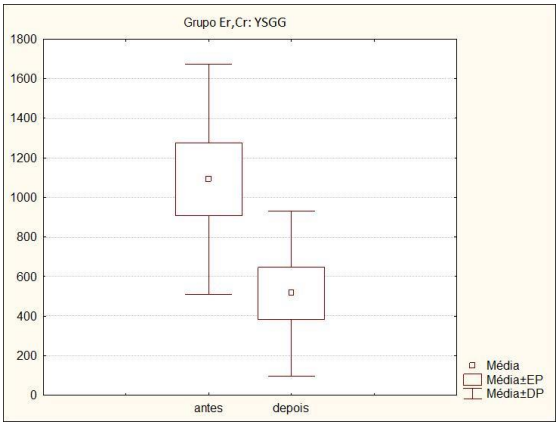
Fonte: a autora.

Gráfico 5.2- Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G3 (Laser Er:YAG)



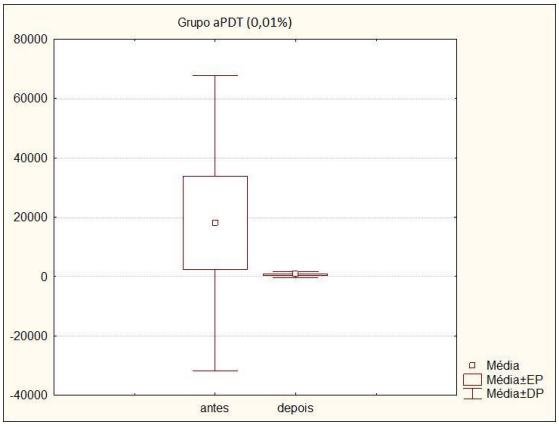
Fonte: a autora.

Gráfico 5.3 - Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G4 (Laser Er:YSGG)



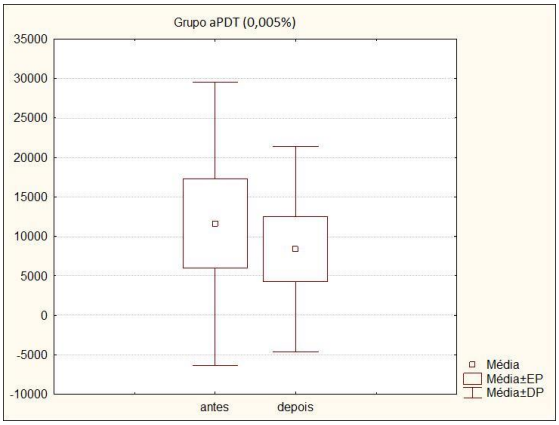
Fonte: a autora.

Gráfico 5.4- Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G5 (aPDT com azul de metileno a 0,01%)



Fonte: a autora.

Gráfico 5.5- Gráfico que ilustra a redução microbiana para o grupo G6 (aPDT com azul de metileno a 0,005%)



Fonte: a autora.

6 DISCUSSÃO

Através da tendência de mínima intervenção, a superfície de dentina contaminada, remanescente pós-remoção parcial de tecido cariado, pode ser pré-tratada com o objetivo de evitar novas lesões de cárie em paredes circundantes à restauração, além de manter um substrato minimamente contaminado para um selamento adequado da cavidade com maior segurança.

Dentro desse contexto, o objetivo desse estudo *in vitro* foi avaliar a redução microbiana da superfície dentinária afetada por cárie, artificialmente produzida, comparando o uso dos lasers de baixa potência (associado ao fotossensibilizador – terapia fotodinâmica antimicrobiana), o de alta potência e o tratamento convencional (digluconato de clorexidina a 2%). A hipótese nula do estudo foi confirmada.

Diferentes modelos de biofilme bacteriano são usados para estudar métodos de prevenção e tratamentos de lesões de cárie (Saafan et al., 2018; Krista et al., 2015; Hetrodt et al., 2018). Para o presente estudo, optou-se pelo uso de apenas um microorganismo (*Streptococcus mutans*), pela facilidade de manuseio e baixa complexidade da técnica. Além disso, culturas em lote de monoespécies são preferidas em modelos *in vitro* e passíveis de serem reproduzidas (Saafan et al., 2018; Carvalho et al., 2018). Dessa forma, oferecem meios de comparar vários tratamentos ou condições simultaneamente, exigindo apenas pequenas quantidades de reagentes, além de serem econômicas de usar (Krista et al., 2015). De acordo com os autores (Saafan et al., 2018), as lesões formadas em biofilme por cepas de *Streptococcus mutans* (S. mutans) são consideradas um modelo de estudo que cumpre todos as principais características histológicas da lesão de cárie natural e tem sido usada como um modelo pré-clínico para avaliação de prevenção de lesões de cárie.

Diferente das outras bactérias, os *S. mutans* podem crescer em um ambiente com alta concentração de sacarose e são resistentes a um antibiótico específico, a bacitracina, o meio seletivo mais comumente usado que é o MSB. Assim, no presente estudo, foi utilizado meio seletivo de MSB para incubação de S. mutans salivares, garantido eficácia da análise. Esta técnica já foi adotada e comprovada em estudos anteriores (Shah et al., 2018).

Em contra-partida, outros autores sugerem que esse tipo de estudo possui como limitação não possuir a capacidade de mimetizar todos os aspectos da cavidade bucal e do processo da doença cárie, como ocorre em modelos complexos (Carvalho et al., 2018). Uma vez que a utilização de uma espécie bacteriana para inoculação é uma enorme simplificação da diversidade microbiana existente na cavidade bucal humana, o estabelecimento de outras estirpes bacterianas parece ser razoável para se obter uma melhor estimulação *in vitro* das condições orais (Amend et al., 2018; Saafan et al., 2018).

De acordo com testes preliminares realizados, optou-se pelo tempo de indução de lesão de cárie *in vitro* de 15 dias, visto que a indução por um período maior de tempo, não levou ao aumento da profundidade das lesões e ainda aumentou o risco de contaminação das amostras. Essa condição foi confirmada em outros estudo, que justificam a não obtenção de lesões maiores, ainda que com maior tempo de indução, pelo esgotamento de nutrientes, acumulação metabólitos e produtos finais (Azevedo al., 2014). Ainda que no presente estudo o esgotamento de nutrientes não entraria como justificativa - pelo fato das amostras serem alimentadas com uma nova alíquota contendo sacarose a cada 24 horas - outros fatores citados acima podem ter contribuído para a não obtenção de lesões maiores que 260 micrometros (aproximadamente).

A média das lesões referidas acima, foi feita a partir das medidas da profundidade das lesões através do teste de Tomografia por Coerência Óptica (*Optical Coherence Tomography* - OCT). O ideal seria ter lesões em maiores profundidades para que fosse possível analisar o potencial de ação dos tratamentos propostos. Porém, como mencionando acima, optou-se pela integridade das amostras e que nenhuma contaminação bacteriana indesejável afetasse o comprometimento da pesquisa. Dessa forma, isto seria uma limitação deste estudo, visto que até 2 mm de dentina podem ser deixados sob a parede pulpar (Schweikl et al., 2017).

De acordo com alguns autores (Elgamíly et al., 2018) as bactérias podem sobreviver sob as restaurações até 139 dias, produzindo toxinas e outros produtos destrutivos de seu metabolismo. Assim, o sucesso do tratamento restaurador depende, entre outros fatores, de uma superfície livre de bactérias, da vedação adequada (eliminação da microinfiltração) e, possivelmente, das propriedades antibacterianas dos materiais restauradores. Dessa forma, existe uma constate

busca por materiais e tratamentos que possam diminuir o risco de formação de novas lesões de cárie, entre eles as abordagens com produtos/tratamentos antimicrobianos.

Dentre um dos produtos antimicrobianos mais utilizados, está a clorexidina. Ela possui efeitos antibacterianos já comprovados na literatura, principalmente em relação às espécies de *Streptococcus*, e sua eficácia está intimamente relacionada a sua absorção pelos polissacarídeos extracelulares das bactérias (Hegde et al., 2017; Eskandarian et al., 2017). Além disso, é o que possui melhor custo-benefício e facilidade da técnica. Comparado aos demais tratamentos propostos, além do menor custo envolvido na técnica, o tempo de aplicação foi menor do que os demais tratamentos que fizeram uso dos lasers de baixa (aproximadamente 16 vezes menor) e alta potência (aproximadamente 3 vezes menor), além de exigir menor treinamento por parte do profissional que a aplica.

Estudos usando clorexidina como desinfetante cavitário mostram ser eficazes na redução dos níveis de *S. mutans*. O estudo de (Sinha et al., 2018) cita que uso de clorexidina como desinfetante cavitário após a preparação do dente e antes da aplicação do agente adesivo pode ajudar a reduzir a microbiota local (efeito antibacteriano). No entanto, no mesmo artigo, os autores citam que isso poderia dificultar a interação do agente de união com a dentina. Além disso, embora eficaz, tem sido recomendado limitar o seu uso a fim de reduzir o risco de induzir resistência adquirida pela mesma ou mesmo resistências cruzadas a antibióticos (Cieplik et al., 2018).

Em busca de tratamentos alternativos, temos a abordagem antimicrobiana realizada através da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), uma técnica minimamente invasiva, com eficácia comprovada na inativação de microrganismos em infecções bacterianas ou fúngicas. Além disso, tem eficácia no tratamento *in vitro* de S. mutans (Tokubo et al., 2018).

Para esse estudo optamos por usar o corante azul de metileno. Trata-de de um corante fenotiazínico catiônico com baixo peso molecular e pico de absorção de luz no espectro de emissão do vermelho (660 nm), efetivo contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Dessa forma, o azul de metileno exibe propriedades satisfatórias, tais como baixa toxicidade para as células humanas, alta taxa de absorção no comprimento de onda do vermelho e geração de espécies reativas de oxigênio que são citotóxicas para as bactérias (Méndez et al., 2018).

Neste estudo foi possível verificar que, independente da concentração do corante, houve uma redução microbiana. A formação de autoagregados na solução fotossensibilizadora pode influenciar a capacidade do fotossensibilizador de reduzir as bactérias cariogênicas, podendo alterar suas propriedades fotoquímicas. De acordo com a literatura, o efeito antimicrobiano do fotossensibilizador pode diminuir devido a uma redução na geração de oxigênio singleto e auto resfriamento. Assim como qualquer tratamento, a aPDT também possui algumas considerações que precisam ser levadas em conta, tais como tornar os procedimentos restauradores mais complexos e dispendiosos, introduzindo etapas de tratamento, com a exigência de investimentos em novas tecnologias e treinamento (Cusicanqui Méndez et al., 2018; de Oliveira et al., 2018).

Apesar desse estudo demonstrar que em ambas as concentrações foi possível promover a redução microbiana, um estudo realizado por (Nagai et al., 2018) mostra que a concentração do fotossensibilizador pode afetar a eficácia da sua ação em bactérias cariogênicas. Portanto, estudos futuros devem examinar a interferência no comprimento de onda de excitação do fotossensibilizador causada por uma mudança em sua concentração.

Outro dado importante que deve-se considerar em nossos resultados, se deve ao fato de 30% das amostras da terapia fotodinâmica com o corante na concentração de 0,005% não apresentaram redução microbiana. Um estudo realizado (Cusicanqui Méndez et al., 2018; de Oliveira et al., 2018) mostrou que a virulência e patogenicidade dos biofilmes podem ser alteradas de acordo com a disponibilidade de carboidratos e ainda pela seleção de microorganismos resistentes. No nosso estudo, como as amostras foram induzidas em tempos diferentes, é possível que alguma alteração acima tenha ocorrido durante a execução do experimento. Porém, são necessários outras estudos que possam justificar o ocorrido.

Uma das limitações deste estudo, referente à aPDT e à metodologia proposta de indução de lesão com apenas o *S. mutans*, pode estar relacionada ao fato de que existem milhares de bactérias na microbiota oral e que juntas são capazes de se agregar e formar um biofilme complexo. Sendo assim, é possível encontrar na literatura que as bactérias são mais resistentes à aPDT quando estão organizadas em biofilmes (Terra Garcia et al., 2018). Ainda nesse sentido, estudos futuros que façam o uso de abordagens alternativas, como um fotossensibilizador que possua

maior capacidade de penetração, podem ser necessários (de Freitas et al., 2017). Porém, como a patogenicidade de *S. mutans* está intimamente relacionado à sua capacidade de formar biofilmes em superfícies dentárias, estudos de aPDT com essa cepa isolada em condições *in vitro* ainda são de grande valia (Terra Garcia et al., 2018).

Ainda em busca de tratamentos alternativos, estudos sugerem que irradiação com lasers de alta potência, como os lasers de érbio, podem penetrar de 46.57 µm á 178.2 µm em dentina infectada (Nahas et al., 2018), tornando-se assim um grande aliado na redução microbiana. Valores estes que podem variar dependendo dos parâmetros utilizados e do tipo de tecido que será irradiado (Nahas et al., 2018). Dessa forma, o uso dos lasers surgem como alternativas de desinfecção da dentina residual.

Optou-se por avaliar o comportamento de dois lasers de érbio (Er:YAG e Er:YSGG) frente à redução microbiana. Sabe-se que a redução de bactérias são decorrentes dos efeitos térmicos e fotodisruptivos (Sancakli et al., 2018) apresentados pelos lasers de érbio e, portanto, seria esperado que ambos comprimentos de onda apresentassem resultados similares e positivos se comparados à clorexidina.

Durante a execução da coleta, esses sistemas de laser só podem ser usados em conjunto com o resfriamento a água (ou seja, irrigação), não sendo possível descartar completamente que pelo menos algumas bactérias foram lixiviadas e não foram diretamente expostas ao feixe de laser (Eick et al., 2017). Além disso, na confecção do preparo cavitário, com os parâmetros adequados de irradiação, já ocorre a redução microbiana, eliminando a necessidade de um passo extra de aplicação de um desinfetante cavitário (Türkün et al., 2006).

A literatura mostra que esse efeito térmico causado por esse sistema, resulta em uma superfície com uma morfologia significativamente diferente da obtida pela broca. Esta morfologia é capaz de influenciar a resistência ácida das margens das cavidades preparadas com os lasers de érbio no esmalte e prevenir lesões em parede de restauração, as camadas de lesões de cárie secundárias, em modelos *in vitro* (Eick et al., 2017, Malekafzali et al., 2017). Considerando os benefícios mencionados acima, apesar de ainda representar uma tecnologia que exige um

investimento alto e necessidade de um conhecimento especializado para seu uso, esse tipo de sistema promove vantagens clínicas relevantes.

Os resultados deste estudo *in vitro* revelam que os tratamentos propostos usados são capazes de promover uma redução microbiana em cepa de *S. mutans*. O método tradicional de desinfecção de superfícies dentais contaminadas, a clorexidina, ainda parece ser o de melhor custo-benefício quando comparados ao uso das novas tecnologias testadas. Sugere-se a realização de estudos *in vitro* com modelos de multiespécies para posterior desenvolvimento de estudos *in situ*, que confirmem os achados deste estudo.

Sugere-se também estudos sobre protocolos para o uso do lasers, tanto em alta potência como em baixa potência associado a um fotossensibilizador (aPDT), para que possam ser utilizados na prática clínica com segurança e eficácia, usufruindo de vantagens como possibilidade de melhorar adesão ao substrato irradiado e ter ação fotobiomoduladora em células presentes na dentina, contribuindo de forma positiva para a prática clínica.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo *in vitro*, foi possível concluir que todos os tratamentos propostos com lasers de baixa (aPDT) e alta potência são eficazes na redução microbiana, comparando-se ao tratamento convencional com digluconato de clorexidina a 2 %.

REFERÊNCIAS[1]

Alkhudhairy F, Naseem M, Bin-Shuwaish M, Vohra F. Efficacy of Er Cr: YSGG laser therapy at different frequency and power levels on bond integrity of composite to bleached enamel. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018 Jun;22:34-8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.02.019.

Amend S, Frankenberger R, Lücker S, Domann E, Krämer N. Secondary caries formation with a two-species biofilm artificial mouth. Dent Mater. 2018 May;34(5):786-96. doi: 10.1016/j.dental.2018.02.002.

Aswathi KK, Rani SP, Athimuthu A, Prasanna P, Patil P, Deepali KJ. Comparison of efficacy of caries removal using polymer bur and chemomechanical caries removal agent: A clinical and microbiological assessment - An in vivo study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2017 Jan-Mar;35(1):6-13. doi: 10.4103/0970-4388.199232.

Azevedo CS, Garbui BU, Martins e Silva C, Simionato Lorenzetti MR, de Freitas AZ, Matos AB. Obtaining artificially caries-affected dentin for in vitro studies. J Contemp Dent Pract. 2014 Jan 1;15(1):12-9.

Azevedo CS, Trung LC, Simionato MR, Freitas AZ, Matos AB. Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. Braz Oral Res. 2011 Sep-Oct;25(5):407-13. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242011000500006

Azizi A, Shademan S, Rezai M, Rahimi A, Lawaf S. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on Streptococcus mutants: In vitro study. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2016 Dec;16:66-71. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.08.002.

Bezerra DS, Stipp RN, Neves BG, Guedes SF, Nascimento MM, Rodrigues LK. Insights into the Virulence Traits of Streptococcus mutans in Dentine Carious Lesions of Children with Early Childhood Caries. Caries Res. 2016;50(3):279-87. doi: 10.1159/000445256.

Bourgeois D, David A, Inquimbert C, Tramini P, Molinari N, Carrouel F. Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults. PLoS One. 2017 Oct 10;12(10):e0185804. doi: 10.1371/journal.pone.0185804. eCollection 2017.

[1] De acordo com estilo Vancouver.

Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjäderhane L, et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. Dent Mater. 2018 Jan;34(1):78-96. doi: 10.1016/j.dental.2017.11.005.

Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Pizzatto E, Morais EC. Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. Braz Oral Res. 2009 Jul-Sep;23(3):340-5.

Carvalho TC, Maske TT, Signori C, Brauner KV, Oliveira EF, Cenci MS. Desenvolvimento de lesões de cárie em dentina em um modelo de biofilme simplificado in vitro: um estudo piloto. Rev Odontol UNESP. 2018;47(1):40-4. doi: http://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.06017.

Choi K, Oshida Y, Platt JA, Cochran MA, Matis BA, Yi K. Microtensile bond strength of glass ionomer cements to artificially created carious dentin. Oper Dent. 2006 Sep-Oct;31(5):590-7. doi: https://doi.org/10.2341/05-108

Cieplik F, Kara E, Muehler D, Enax J, Hiller KA, Maisch T, Buchalla W. Antimicrobial efficacy of alternative compounds for use in oral care toward biofilms from caries-associated bacteria in vitro. Microbiologyopen. 2018 Jul 26:e00695. doi: 10.1002/mbo3.695.

Cusicanqui Méndez DA, Gutierres E, Dionisio EJ, Rabelo Buzalaf MA, Oliveira RC, Andrade Moreira Machado MA, et al.. Curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018 Sep 18. pii: S1572-1000(18)30207-2. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.09.007.

da Mota AC, Leal CR, Olivan S, Leal Gonçalves ML, de Oliveira VA, Pinto MM, et al. Case report of photodynamic therapy in the treatment of dental caries on primary teeth. J Lasers Med Sci. 2016 Spring;7(2):131-3. doi: 10.15171/jlms.2016.22.

de Freitas MTM, Soares TT, Aragão MGB, Lima RA, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on mono- and multi-Species cariogenic biofilms: A Literature Review. Photomed Laser Surg. 2017 May;35(5):239-45. doi: 10.1089/pho.2016.4108.

de Oliveira FS, Cruvinel T, Cusicanqui Méndez DA, Dionísio EJ, Rios D, Machado MAAM. The in vitro effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy on dental microcosm biofilms from partially erupted permanent molars: A pilot study. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018 Mar;21:163-167. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.005.

de Sousa Farias SS, Nemezio MA, Corona SA, Aires CP, Borsatto MC. Effects of low-level laser therapy combined with toluidine blue on polysaccharides and biofilm of Streptococcus mutans. Lasers Med Sci. 2016 Jul;31(5):1011-6. doi: 10.1007/s10103-016-1944-5.

Dias AP, Paschoal MAB, Diniz RS, Lage LM, Gonçalves LM. Antimicrobial action of chlorhexidine digluconate in self-ligating and conventional metal brackets infected with Streptococcus mutans biofilm. Clin Cosmet Investig Dent. 2018 Apr 19;10:69-74. doi: 10.2147/CCIDE.S148700. eCollection 2018.

Dommisch H, Peus K, Kneist S, Krause F, Braun A, Hedderich J, Jepsen S, Eberhard J. Fluorescence-controlled Er:YAG laser for caries removal in permanent teeth: a randomized clinical trial. Eur J Oral Sci. 2008 Apr;116(2):170-6. doi: 10.1111/j.1600-0722.2008.00521.x.

Eick S, Meier I, Spoerlé F, Bender P, Aoki A, Izumi Y, Salvi GE, et al. A. In vitro-activity of Er:YAG laser in comparison with other treatment modalities on biofilm ablation from implant and Tooth Surfaces. PLoS One. 2017 Jan 26;12(1):e0171086. doi: 10.1371/journal.pone.0171086. eCollection 2017.

Elgamily HM, El-Sayed HS, Abdelnabi A. The antibacterial effect of two cavity disinfectants against one of cariogenic pathogen: An in vitro comparative study. Contemp Clin Dent. 2018 Jul-Sep;9(3):457-62. doi: 10.4103/ccd.ccd_308_18.

Eskandarian T, Motamedifar M, Arasteh P, Eghbali SS, Adib A, Abdoli Z. Comparison of antimicrobial effects of titanium tetrafluoride, chlorhexidine, xylitol and sodium fluoride on streptococcus mutans: An in-vitro study. Electron Physician. 2017 Mar 25;9(3):4042-4047. doi: 10.19082/4042. eCollection 2017 Mar.

Espejo LC1, Simionato MR, Barroso LP, Netto NG, Luz MA. Evaluation of three different adhesive systems using a bacterial method to develop secondary caries in vitro. Am J Dent. 2010 Apr;23(2):93-7.

Fuentes V, Toledano M, Osorio R, Carvalho RM. Microhardness of superficial and deep sound human dentin. J Biomed Mater Res A. 2003 Sep 15;66(4):850-3. doi: https://doi.org/10.1002/jbm.a.10064.

Fumes AC, da Silva Telles PD, Corona SAM, Borsatto MC. Effect of aPDT on Streptococcus mutans and Candida albicans present in the dental biofilm: Systematic review. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018a Mar;21:363-6. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.013.

Fumes AC, Romualdo PC, Monteiro RM, Watanabe E, Corona SAM, Borsatto MC. Influence of pre-irradiation time employed in antimicrobial photodynamic therapy with diode laser. Lasers Med Sci. 2018b Jan;33(1):67-73. doi: 10.1007/s10103-017-2336-1.

Galvão LC, Rosalen PL, Rivera-Ramos I, Franco GC, Kajfasz JK, Abranches J, et al. Inactivation of the spxA1 or spxA2 gene of Streptococcus mutans decreases virulence in the rat caries model. Mol Oral Microbiol. 2017 Apr;32(2):142-153. doi: 10.1111/omi.12160.

Gama-Teixeira A, Simionato MR, Elian SN, Sobral MA, Luz MA. Streptococcus mutans-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro. Braz Oral Res. 2007 Oct-Dec;21(4):368-74. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242007000400015.

Gilmour SM, Edmunds DH, Dummer PM. The production of secondary caries-like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using an in vitro microbial caries system. J Oral Rehabil. 1990 Nov;17(6):573-8. doi: https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1990.tb01428.x.

Goud S, Aravelli S, Dronamraju S, et al.Comparative Evaluation of the AntibacterialEfficacy of Aloe Vera, 3% Sodium Hypochlorite, and 2% Chlorhexidine Gluconate Against Enterococcus faecalis: An In Vitro Study. Cureus 10(10): e3480. October 22, 2018 doi 10.7759/cureus.3480

Guglielmi C de A, Simionato MR, Ramalho KM, Imparato JC, Pinheiro SL, Luz MA. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. J Biomed Opt. 2011 Aug;16(8):088003. doi: 10.1117/1.3611009.

Hasani Tabatabaei M, Shirmohammadi S, Yasini E, Mirzaei M, Arami S, Kermanshah H, et al. Comparison of dentin permeability after tooth cavity preparation with diamond bur and Er:YAG laser. J Dent (Tehran). 2015 Sep;12(9):630-5.

Hauser-Gerspach I, Mauth C, Waltimo T, Meyer J, Stübinger S. Effects of Er:YAG laser on bacteria associated with titanium surfaces and cellular response in vitro. Lasers Med Sci. 2014 Jul;29(4):1329-37. doi: 10.1007/s10103-013-1303-8.

Hegde RJ, Kamath S. Comparison of the Streptococcus mutans and Lactobacillus colony count changes in saliva following chlorhexidine (0.12%) mouth rinse, combination mouth rinse, and green tea extract (0.5%) mouth rinse in children. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2017 Apr-Jun;35(2):150-5. doi: 10.4103/JISPPD.JISPPD_13_17.
Hetrodt F, Lausch J, Meyer-Lueckel H, Apel C, Conrads G. Natural saliva as an adjuvant in a secondary caries model based on Streptococcus mutans. Arch Oral Biol. 2018 Jun;90:138-43. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.03.013.

Kabil NS, Badran AS, Wassel MO.Effect of the addition of chlorhexidine and miswak extract on the clinical performance and antibacterial properties of conventional glass ionomer: an in vivo study. Int J Paediatr Dent. 2017 Sep;27(5):380-7. doi: 10.1111/ipd.12273.

Kimyai S, Pournaghi-Azar F, Naser-Alavi F, Salari A. Effect of disinfecting the cavity with chlorhexidine on the marginal gaps of Cl V giomer restorations. J Clin Exp Dent. 2017 Feb 1;9(2):e202-e206. doi: 10.4317/jced.53193. eCollection 2017 Feb.

Krista M, Salli KM, Ouwehand AC. The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review. J Oral Microbiol. 2015 Mar 3;7:26149. doi: 10.3402/jom.v7.26149. eCollection 2015.

Leal CRL, Alvarenga LH, Oliveira-Silva T, Kato IT, Godoy-Miranda B, Bussadori SK, Ribeiro MS, Prates RA. Antimicrobial photodynamic therapy on Streptococcus mutans is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017 Sep;19:1-4. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.04.004.

López-Jiménez L, Arnabat-Domínguez J, Viñas M, Vinuesa T. Atomic force microscopy visualization of injuries in Enterococcus faecalis surface caused by Er,Cr:YSGG and diode lasers. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2015 Jan 1;20(1):e45-51. doi: doi:10.4317/medoral.19991.

Malekafzali B, Asnaashari M, Javadi F. Comparison of marginal microleakage of flowable composite restorations in primary canine teeth prepared with high-speed diamond bur, Er:YAG laser and Er,Cr:YSGG laser. Laser Ther. 2017 Sep 30;26(3):195-202. doi: 10.5978/islsm.17-OR-15.

Martins ML, Leite KLF, Pacheco-Filho EF, Pereira AFM, Romanos MTV, Maia LC, et al. Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling Streptococcus

mutans biofilm build-up and dental enamel demineralization. Arch Oral Biol. 2018 May 23;93:56-65. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.05.017.

Medioni E, Rocca JP, Fornaini C, Merigo E. Histological evaluation of three techniques for caries removal. J Oral Sci. 2016;58(4):583-9. doi: 10.2334/josnusd.16-0225.

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 Dec;12(4):581-6. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.09.005.

Méndez DAC, Gutierrez E, Dionísio EJ, Oliveira TM, Buzalaf MAR, Rios D, Machado MAAM, Cruvinel T.Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms.Lasers Med Sci. 2018 Apr;33(3):479-487. doi: 10.1007/s10103-017-2379

Min JH, Inaba D, Kwon HK, Chung JH, Kim BI. Evaluation of penetration effect of resin infiltrant using optical coherence tomography. J Dent. 2015 Jun;43(6):720-5. doi: 10.1016/j.jdent.2015.03.006.

Montedori A, Abraha I, Orso M, D'Errico PG, Pagano S, Lombardo G.Lasers for caries removal in deciduous and permanent teeth.Cochrane Database Syst Rev. 2016 Sep 26;9:CD010229. doi: 10.1002/14651858.CD010229

Nagai Y, Suzuki A, Katsuragi H, Shinkai K.Effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on the sterilization of infected dentin in vitro.Odontology. 2018 Apr;106(2):154-161. doi: 10.1007/s10266-017-0321-6

Nami T, Syozi N, Yasushi S, Junji T, Yasunori S.Effect of thermal cyclic stress on acid resistance of resin-in ltrated incipient enamel lesions in vitro.Dental Materials Journal 2016; 35(3): 425–431. doi: 10.4012/dmj.2015-341

Nahas, P ; Zeinoun, T ; Namour, M ; Ayach, T ; Nammour, S. Effect of Er:YAG laser energy densities on thermally affected dentin layer: Morphological study
Laser Ther, 2018;(2):90. doi: 10.5978/islsm.

Nemezio MA, de Souza Farias SS, Borsatto MC, Aires CP, Corona SAM.Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a Streptococcus mutans biofilm model.Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017 Dec;20:234-237. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.10.025.

Neves PA, Lima LA, Rodrigues FC, Leitão TJ, Ribeiro CC. Clinical effect of photodynamic therapy on primary carious dentin after partial caries removal. Braz Oral Res. 2016 May 20;30(1). pii: S1806-83242016000100246. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0047.

Neves BG, Stipp RN, da Silva Bezerra D, de Figueiredo Guedes SF, Rodrigues LKA. Molecular detection of bacteria associated to caries activity in dentinal lesions. Clin Oral Investig. 2017 Jul;21(6):2053-2061. doi: 10.1007/s00784-016-1995-9.

Ornellas PO, Antunes LS, Motta PC, Mendonça C, Póvoa H, Fontes K, et al. Antimicrobial Photodynamic therapy as an adjunct for clinical partial removal of deciduous carious tissue: A minimally invasive approach. Photochem Photobiol. 2018 Jun 20. doi: 10.1111/php.12966.

Pinheiro SL, Segatti B, Pucca DS, Dutra PT.Dental acid etchant as a sensitizing agent in photodynamic therapy to reduce S. mutans in dentinal carious lesions.Lasers Med Sci. 2018 Jul 19. doi: 10.1007/s10103-018-2590-x

Ramos TM, Ramos-Oliveira TM, de Freitas PM, Azambuja N Jr, Esteves-Oliveira M, Gutknecht N, de Paula Eduardo C.Effects of Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiation on the adhesion to eroded dentin.Lasers Med Sci. 2015 Jan;30(1):17-26. doi: 10.1007/s10103-013-1321-6.

Reddy MV, Shankar AJ, Pentakota VG, Kolli H, Ganta H, Katari PK. 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 May-Jun;5(3):183-9. doi: 10.4103/2231-0762.159955.

Rodrigues LK, Cury JA, M Nobre dos Santos. The effect of gamma radiation on enamel hardness and its resistance to demineralization in vitro. Oral Sci. 2004 Dec;46(4):215-20.

Saafan A, Zaazou MH, Sallam MK, Mosallam O, El Danaf HA. Assessment of photodynamic therapy and nanoparticles effects on caries models. Open Access Maced J Med Sci. 2018 Jul 12;6(7):1289-1295. doi: 10.3889/oamjms.2018.241.

Sancakli HS, Siso SH, Yildiz SO, Gökçe YB1.Antibacterial Effect of Surface Pretreatment Techniques against Streptococcus Mutans. Niger J Clin Pract. 2018 Feb;21(2):170-5.

Schneider H, Park KJ, Rueger C, Ziebolz D, Krause F, Haak R.Imaging resin infiltration into non-cavitated carious lesions by optical coherence tomography. J Dent. 2017 May;60:94-98. doi: 10.1016/j.jdent.2017.03.004.

Schweikl H, Buchalla W, Krifka S. Cell responses to cariogenic microorganisms and dental resin materials-Crosstalk at the dentin-pulp interface? Dent Mater. 2017 May;33(5):514-24. doi: 10.1016/j.dental.2017.02.006. Review.

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 May;28(2):58-67. doi: 10.1177/0022034516639271.

Shah S , Bargale S , Dave BH , Deshpande A , Kariya PB , Karri UM. Comparison of antimicrobial efficacy of (between) 0.2% chlorhexidine and herbal mouthwash on salivary Streptococcus mutans: A randomized controlled pilot study contemp Clin Dent. 2018 Jul-Sep;9(3):440-445. doi: 10.4103/ccd.ccd_264_18.

Sharma A, Agarwal N, Anand A, Jabin Z. To compare the effectiveness of different mouthrinses on Streptococcus mutans count in caries active children. J Oral Biol Craniofac Res. 2018 May-Aug;8(2):113-117. doi: 10.1016/j.jobcr.2018.05.002.

Sinha DJ, Jandial UA, Jaiswal N, Singh UP, Goel S, Singh O.Comparative evaluation of the effect of different disinfecting agents on bond strength of composite resin to dentin using two-step self-etch and etch and rinse bonding systems: An in-vitro study.J Conserv Dent. 2018 Jul-Aug;21(4):424-427. doi: 10.4103/JCD.JCD_66_17.

Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, Pérez-Laguna V, García-Luque I, Revillo MJ, Rezusta A. In vitro effect photodynamic therapy with differents photosensitizers on cariogenic microorganisms.BMC Microbiol. 2015 Sep 26;15:187. doi: 10.1186/s12866-015-0524-3.

Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP.Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review.J Dent. 2003 Mar;31(3):161-71.

Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LKA, Saxena D, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. Caries Res 2012;46:549–554. doi: 10.1159/000341190.

Tekçe N, Tuncer S, Demirci M, Balci S. Do matrix metalloproteinase inhibitors improve the bond durability of universal dental adhesives? Scanning. 2016 Nov;38(6):535-544. doi: 10.1002/sca.21293.

Terra Garcia M, Correia Pereira AH, Jorge AOC, Strixino JF, Junqueira JC, Photodynamic Therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against Streptococcus mutans biofilms. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018 Aug 26. pii: S1572-1000(18)30121-2. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.08.012.

Tokubo LM, Rosalen PL, de Cássia Orlandi Sardi J, Freires IA, Fujimaki M, Umeda JE, Barbosa PM, Tecchio GO, Hioka N, de Freitas CF, Suga Terada RS.Antimicrobial effect of photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on Streptococcus mutans biofilm. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018 Sep;23:94-98. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.05.004

Tosun E, Tasar F, Strauss R, Kıvanc DG, Ungor C. Comparative evaluation of antimicrobial effects of Er:YAG, diode, and CO_2 lasers on titanium discs: an experimental study. J Oral Maxillofac Surg. 2012 May;70(5):1064-9. doi: 10.1016/j.joms.2011.11.021..

Türkün M, Türkün LS, Celik EU, Ateş M. Bactericidal effect of Er,Cr:YSGG laser on Streptococcus mutans. Dent Mater J. 2006 Mar;25(1):81-6.

Valério RA, Borsatto MC, Serra MC, Polizeli SA, Nemezio MA, Galo R, Aires CP, Dos Santos AC, Corona SA. Caries removal in deciduous teeth using an Er:YAG laser: a randomized split-mouth clinical trial. Clin Oral Investig. 2016 Jan;20(1):65-73. doi: 10.1007/s00784-015-1470-z.

Zhou Y, Shimada Y, Matin K, Sadr A, Sumi Y, Tagami J. Assessment of bacterial demineralization around composite restorations using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT). Dent Mater. 2016 Sep;32(9):1177-88. doi: 10.1016/j.dental.2016.06.022.

ANEXO – Parecer do Comitê de Ética

FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFICÁCIA DO USO DE LASERS OU CLOREXIDINA NA REDUÇÃO MICROBIANA EM LESÕES DE CÁRIE PRODUZIDAS ARTIFICIALMENTE.
Pesquisador: Fernanda Cristina Nogueira Rodrigues
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 76778117.9.0000.0075
Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.375.422

Apresentação do Projeto:
Métodos de remoção de cárie, menos invasivos que o tradicional uso de brocas, vem sendo desenvolvidos, tais como os lasers de alta potência. No contexto de redução microbiana, tanto os lasers de alta potência quanto os lasers de baixa potência associados a fotossensibilizadores podem ser utilizados. O objetivo deste estudo in vitro será avaliar o uso dos lasers ou clorexidina na redução microbiana em lesões de cárie artificialmente desenvolvidas. Sessenta discos de dentina humana serão analisados de acordo com o tratamento da superfície (n=10): G1 - sem tratamento; G2 – digluconato de clorexidina a 2%; G3 - laser de alta potência Er:YAG 80 mJ, 2 Hz; G4 - laser de alta potência Er:YAG 60 mJ, 4 Hz; G5 – terapia fotodinâmica antimicrobiana 1 (laser de baixa potência 660 nm + azul de metileno a 0,01%); G6 - terapia fotodinâmica antimicrobiana 2 (laser de baixa potência 660 nm + azul de metileno a 0,005%). A dentina afetada por cárie será induzida por um modelo artificial desenvolvido com S. Mutans, com profundidade de lesão de 500 m. A dentina cariada será coletada por uma broca esférica carbide, estéril, posicionada na maior profundidade da lesão (500 m). O desfecho primário (avaliação quantitativa) será a redução de bactérias, realizada pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) seguida pela análise estatística comparando a redução bacteriana em cada um dos tratamentos propostos.

Objetivo da Pesquisa:
Objetivo primário é avaliar a redução microbiana da superfície dentinária afetada por cárie,

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

artificialmente produzida, comparando o uso dos lasers de baixa e alta potência e o tratamento convencional com digluconato de clorexidina a 2%. O objetivo específico é avaliar, pela contagem de unidades formadoras de colônia, o potencial de redução bacteriana quando da irradiação da dentina afeta por cárie com lasers, comparando-as com o tratamento convencional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O trabalho oferece riscos mínimos por se tratar de amostras de dentes extraídos, os quais ainda serão submetidos à limpeza e esterilização antes do seu uso na pesquisa.

Quanto ao benefício, se for comprovado que os lasers apresentam os mesmos ou melhores resultados para este objetivo, torna-se um grande aliado clínico em conjunto com a prática clínica tradicional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A metodologia do trabalho e a análise são consistentes, trazendo benefícios para área de conhecimento com o intuito de beneficiar os pacientes no futuro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados: Folha de rosto,Projeto detalhado, Informações Básicas do projeto, Autorização do Biobanco.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO

Continuação do Parecer: 2.375.422

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_964954.pdf	20/10/2017 15:18:52		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoplataforma.docx	20/10/2017 15:18:32	Fernanda Cristina Nogueira Rodrigues	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	banco2.pdf	22/09/2017 11:12:01	Fernanda Cristina Nogueira Rodrigues	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	banco1.pdf	22/09/2017 11:10:44	Fernanda Cristina Nogueira Rodrigues	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacao.doc	18/09/2017 13:27:28	Fernanda Cristina Nogueira Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	21/08/2017 14:26:10	Fernanda Cristina Nogueira Rodrigues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	manisfestacao.pdf	19/07/2017 17:15:25	Fernanda Cristina Nogueira Rodrigues	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 10 de Novembro de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br