UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

THIAGO CRUVINEL DA SILVA

Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica sobre
Streptococcus mutans

BAURU
2010

THIAGO CRUVINEL DA SILVA

**Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica sobre
*Streptococcus mutans***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Odontopediatria

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

BAURU
2010

Cruvinel da Silva, Thiago
Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica
sobre *Streptococcus mutans*/Thiago Cruvinel da
Silva. – Bauru, 2010.
95 p. : il. ; 31cm.

Tese Doutorado – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de
Andrade Moreira Machado

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº:
Data:

THIAGO CRUVINEL DA SILVA

Dados Curriculares

04 de março de 1979
São José do Rio Preto - SP

Nascimento

Filiação

Antonio Carlos Pereira da Silva
Maria Isabel R. Cruvinel F. Monteiro

1999 - 2003

Curso de Graduação em Odontologia –
Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo – USP

2005 – 2007

Curso de Pós-graduação em Odontologia,
área de Odontopediatria, nível Mestrado –
Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo – USP, com
bolsa CNPq

2007 – 2010

Curso de Pós-graduação em Ciências
Odontológicas Aplicadas, área de
Odontopediatria, nível Doutorado –
Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo – USP, com
bolsa FAPESP

Associações

- CROSP – Conselho Regional de Odontologia
- SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
- IADR – International Association of Dental Research

DEDICATÓRIA

A **Deus**, força motriz do universo, que em nós deposita uma pequena parte de sua energia para podermos caminhar em paz, em busca de nossa felicidade. Sua presença é notada nas mínimas coisas. Agradeço pela vida maravilhosa que possuo. Graças a Ti nunca estarei sozinho no mundo. Enquanto eu crer na Tua existência nada me faltará. Obrigado Senhor.

À minha querida mãe, **Maria Isabel** e meu padrasto, **João Monteiro**, pelo apoio e incentivo incondicionais. Vocês são meu porto seguro, pessoas com que posso contar em todos os momentos difíceis e desanimadores. Agradeço a Deus todos os dias por poder desfrutar de suas companhias e experiências.

Ao meu pai, **Antonio Carlos**, Cirurgião Dentista, que mesmo distante me mostrou como é importante acreditar e lutar para que barreiras até então intransponíveis sejam superadas de forma aparentemente simples.

Ao meu irmão, **Diogo** e à minha cunhada **Giuliana**. Vocês nos deram nosso primeiro sobrinho, **Lucas**, quem ainda não tivemos a honra de conhecer pessoalmente. Vocês formam uma família extraordinária, lutadora, unida e com muita personalidade.

Ao meu grande amor, **Agnes**, exemplo constante de dedicação e companheirismo. Agradeço por todos os momentos que você esteve ao meu lado, compartilhando desejos, frustrações e realizações. Minha caminhada teria sido muito mais árdua sem sua presença. Você representa uma grande razão para que eu continue buscando meus objetivos. Obrigado.

Aos meus avós, **Edson e Neuza**, pela vitalidade, amor, perseverança e exemplos de uma vida digna. Seus ensinamentos ecoam e transgridem épocas ou costumes. A voz de suas experiências me acompanhará eternamente.

A vocês, com todo amor, carinho e admiração, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Mais que um trabalho realizado, esta pesquisa representa o ponto de chegada do curso de Doutorado em Odontopediatria. Sinto-me feliz em ter partilhado momentos de aprendizado tão intenso, seja ele profissional ou pessoal. Os contatos pessoais enriqueceram minhas experiências, possibilitando vencer desafios com mais coragem e determinação. Graças a vocês, hoje posso me considerar um profissional mais completo e preparado. Agradeço profundamente:

- À **Profª Drª Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, minha orientadora desde a graduação, verdadeira mestre, condutora dos meus princípios didáticos e científicos. Nossa convivência proporcionou a mim crescimento profissional e o mais importante, pessoal. Sou verdadeiramente grato por sua determinação, exigência e motivação. Sei como foi difícil conseguir concretizar a viabilidade deste estudo, o que me incentivou ainda mais para continuar. Sinto-me, aqui, responsável por representar seu nome e sua reputação profissional. Espero ter correspondido a suas expectativas.
- A **Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf**, co-autora deste trabalho. Seremos eternamente agradecidos pela oportunidade de estudar no exterior que nos foi dada. Professora de raciocínio rápido e vasto conhecimento em Odontologia, a senhora propiciou a mim inúmeros momentos de aprendizado. Sinto-me honrado em ter participado de sua equipe de trabalho na disciplina de Bioquímica.
- Ao **Prof Dr. Wim Crielaard** e **Prof. Dr. Jacob Martien ten Cate**, meus supervisores diretos e conselheiros sobre pesquisas no Academish Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA-Holanda). Tenho muito que agradecer por todas as experiências vividas nos corredores e no laboratório de Cariologia dessa tão respeitada instituição de ensino e

pesquisa. Todo o conhecimento lá adquirido servirá como grande alicerce para vôos maiores e conquistas mais importantes.

- Aos técnicos-pesquisadores, e porque não amigos, **Michel Hoogenkamp, Mark Buijs e Rob Exterkate**, pelo companheirismo e por todos os ensinamentos. É fácil entender como uma equipe de trabalho pode ser tão bem sucedida quando conhecemos pessoas tão determinadas e que realizam seu trabalho com tamanha dedicação e respeito.
- A pós-doutoranda **DongMei Deng**, crucial para o melhor entendimento de toda nossa caminhada científica em Amsterdam.
- À **Faculdade de Odontologia de Bauru – USP**, na pessoa do senhor diretor, Prof. Dr. José Carlos Pereira, e da senhora coordenadora de pós-graduação, Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.
- À **Prof^a Dr^a Salete Moura Bonifácio da Silva**, coordenadora do curso de mestrado em Odontopediatria, professora que eu constantemente recorri para solucionar questões clínico-didáticas. Sua contribuição para minha formação como mestre foi fundamental. Apesar de sua sólida formação acadêmica e científica, sempre esteve atenta às questões didáticas que interferiam na qualidade de aprendizagem dos alunos de graduação. Com isso, transmitiu a mim a essência e importância de um professor universitário da área de saúde: promover o bem social através da formação de recursos humanos mais qualificados para o exercício profissional.
- Ao **Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo e Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima**, incentivadores constantes da busca pelo aperfeiçoamento clínico, a essência da Odontologia de qualidade. Filósofos, seus pensamentos simples, adquiridos depois de anos de experiência, traduzem ao aluno sua maior necessidade, segurança para enfrentar o que lhes espera pela frente.

- Às professoras doutoras **Thaís Marchini de Oliveira** e **Daniela Rios**, que antes mesmo de professoras contratadas brindaram-me com sua convivência durante o período da pós-graduação. Saibam que admiro imensamente o trabalho de vocês e tenho certeza sobre desenvolvimento de duas carreiras sólidas e de sucesso.
- À **Fátima, D. Lia, Estela e Lilian**, funcionários da Odontopediatria, pelo respeito, carinho, compreensão e profissionalismo. Vocês foram essenciais para o bom andamento de nossas atividades. Conseguimos integrar uma equipe de trabalho saudável, alternando momentos de muita seriedade e descontração.
- À **D. Ondina** e **Hermes**, pela simplicidade e hospitalidade em que sempre me receberam em sua casa. Espero logo ser admitido na família. Prometo tentar fazê-la crescer mais ainda, dentro em breve. Muito obrigado por todos os cuidados que vocês tiveram comigo esses anos. Sinto-me honrado em ter tido a oportunidade de tê-los conhecido.
- Aos meus amigos **Bruno Vidoti, Carlos Eduardo** (Baiacu), **Danilo Pineli Valarelli, Danilo Costa Marques Neves, Eduardo Figueira, Fábio Shiratori, Fernando** (Ozzy), **Humberto Gomes de Oliveira Neto, Juliano Pessan, Léo, Marcelo Costa Marques Neves, Marcelo Hamata, Marcos Massaharu, Miguel, Otávio Pagin, Renato Yaedú, Renato Salina, Ricardo Henrique, Ricardo Chaguri, Prof. Dr. Rodrigo, Tati Sales, William Zerbinatti**, que compartilharam sonhos, desejos, alegrias, tristezas, comemorações e desabafos. Tenho certeza que durante esses anos de doutorado fui muitas vezes chato, impertinente e ranzinza. Isso faz com que eu respeite ainda mais cada um de vocês, afinal de contas sempre foram muito tolerantes. Espero sempre poder continuar contando com vocês.

- Aos amigos que conheci em Amsterdam, **Jeroen, Saskia, Derya, Ricardo Macedo, Ana Paula, Eliana Takeshita, Lei-Meng, Gláuber Vale, Chi Pham, Tomiyama, Rugero, Denise, Edílson, Elizângela, João Vítor, Carol, Juliana, Clarissa, David e Joelly**, por tornarem meus dias mais alegres e emocionantes na Europa. Realmente foram momentos inesquecíveis e talvez uma das melhores experiências da minha vida. Muito obrigado.
- Aos **Pacientes**, crianças que despertaram em mim o interesse em ajudá-las, desbravando o tão interessante e complexo universo infantil. A vocês dedico meus estudos e aspirações pessoais e profissionais.
- À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)**, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo.

**“Não morre aquele que deixou na terra a melodia
de seu cântico na música de seus versos.”**

Cora Coralina

RESUMO

Este estudo teve por objetivos (1) estudar os efeitos de diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica sobre a viabilidade de células planctônicas e biofilme de *S. mutans* UA159, (2) verificar a viabilidade de uso de um modelo para crescimento de biofilme bacteriano no estudo do processo de desmineralização, (3) avaliar a capacidade da terapia fotodinâmica em controlar o processo de desmineralização mediado por biofilme de *S. mutans* crescidos sobre discos de dentina bovina e (4) mensurar a capacidade da terapia fotodinâmica em promover estresse celular a *S. mutans* UA159 com deleção do gene *VicK*. Os procedimentos de terapia fotodinâmica foram realizados pela associação do fotossensibilizador Photogem[®] e de um LED vermelho visível (Biotable[®], 630 nm, 50 mW/cm²) como fonte de luz. A viabilidade de células bacterianas foi determinada por dois métodos distintos: teste de atividade metabólica pelo uso da resazurina (etapa 1) e contagem de UFC (etapas 1,2 e 3). Microrradiografia transversal e análise da concentração de cálcio por espectrometria de absorção atômica foram os métodos de escolha para a determinação do perfil do conteúdo mineral (%vol), perda mineral integrada (PMI, %vol x μm), profundidade de lesão (PL, μm) e concentração de cálcio liberado em meio de cultura (mg/dL). A intensidade de fluorescência emitida pela modulação da proteína GFP após ensaio de estresse celular foi determinada por citometria de fluxo. Os diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica foram capazes de reduzir a viabilidade de células planctônicas de *S. mutans*, bem como das células organizadas em biofilme (ANOVA a um critério, Games-Howell, $p < 0,05$), sendo o resultado dose-dependente. Quando Photogem[®] a 0,25 mg/mL foi associado ao LED a 150 J/cm², uma redução de aproximadamente 3,9 log10 na contagem de células viáveis provenientes de biofilme foi observada. O modelo para crescimento de biofilme permitiu a progressão do processo de desmineralização (24 h – PMI: 1905 $\pm$ 391 vol% x μm , PL: 69,9 $\pm$ 12,2 μm ; 48 h - PMI: 3529 $\pm$ 886 vol% x μm , PL: 114,2 $\pm$ 24,6 μm ; 72 h - PMI: 4186 $\pm$ 1099 vol% x μm , PL: 146,1 $\pm$ 20,1 μm) em função do tempo. As associações de Photogem[®] 0,25 mg/mL + LED 75 J/cm² e Photogem[®] 0,25 mg/mL + LED 150 J/cm² foram capazes de controlar por 24 h a perda mineral integrada, a profundidade de

lesão e a concentração de cálcio liberada em relação ao grupo controle (ANOVA a um critério, Games-Howell, $p < 0,05$). Os diferentes tipos de tratamento utilizados no ensaio de estresse celular (H_2O_2 a 0,0025%, H_2O_2 a 0,005%, Photogem® a 0,00625%, Photogem® a 0,0125%, LED 4,5 J/cm², Photogem® a 0,00625% + LED 4,5 J/cm² e Photogem® a 0,0125% + LED 4,5 J/cm²) produziram aumento significativo da fluorescência captada pela citometria de fluxo em relação ao grupo controle (água deionizada) (ANOVA a um critério, Games-Howell, $p < 0,05$). Entretanto, diferenças significativas não foram notadas entre os grupos de tratamento. Portanto, a terapia fotodinâmica foi capaz de reduzir a viabilidade de células planctônicas e células organizadas em biofilme (*S. mutans* UA159), bem como controlar o processo de desmineralização mediado por bactéria durante 24 h. Além disso, pelo modelo utilizado, a terapia fotodinâmica pode ser capaz de modular estresse celular comparável àquele obtido com a utilização do peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Cárie dentária. *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Study of effects of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on *Streptococcus mutans*

The present study aimed (1) to assess the effects of different parameters of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) on the viability of planktonic cells and biofilm of *S. mutans* UA159, (2) to test the effectiveness of a biofilm model in evaluating the demineralization process, (3) to assess the influence of PACT on the control of demineralization process mediated by *S. mutans* biofilm growth on dentin discs, and (4) to measure the ability of PACT in promoting cellular stress on *S. mutans* UA159 knockout vickK gene. PACT procedures were performed by association between a photosensitizer (Photogem[®]) and a visible red LED (Biotable[®], 630 nm, 50 mW/cm²) as light source. Viability of bacterial cells was determined by two distinct methods: resazurin assay (phase 1) and Colony Forming Unit (CFU) counts (phases 1, 2, and 3). Transversal microradiography and calcium release analysis by atomic absorption spectrometry were chosen to analyze mineral content profile (%vol), integrated mineral loss (IML, %vol x μm), lesion depth (LD, μm), and concentration of calcium release in culture media (mg/dL). Fluorescence intensity levels, which were modulated by expression of Green Fluorescent Protein-reporter (GFP) after cellular stress, were measured by flow cytometer. A dose-dependent effect on the reduction of viability of planktonic cells and biofilm of *S. mutans* was observed after application of different parameters of PACT (one-way ANOVA, Games-Howell, $p < 0.05$). 0.25 mg/mL Photogem[®] plus 150 J/cm² LED decreased in nearly 3.9 log₁₀ the viability of *S. mutans* biofilm. Progression of demineralization process was correlated with the time (24 h – IML: 1905 $\pm$ 391 vol% x μm , LD: 69.9 $\pm$ 12,2 μm ; 48 h - IML: 3529 $\pm$ 886 vol% x μm , LD: 114.2 $\pm$ 24.6 μm ; 72 h - IML: 4186 $\pm$ 1099 vol% x μm , LD: 146.1 $\pm$ 20.1 μm). Integrated mineral loss, lesion depth and concentration of calcium release were controlled for 24 h by the following associations: 0.25 mg/mL Photogem[®] plus 75 J/cm² LED, and 0.25 mg/mL Photogem[®] plus 150 J/cm² LED, in comparison to control group (one-way ANOVA, Games-Howell,

p<0.05). Different treatments (0.0025% H₂O₂, 0.005% H₂O₂, 0.00625% Photogem[®], 0.0125% Photogem[®], 4.5 J/cm² LED, 0.00625% Photogem[®] plus 4.5 J/cm² LED, and 0.0125% Photogem[®] plus 4.5 J/cm² LED) increased significantly the fluorescence levels emitted by *S. mutans*, when compared with levels of the control group (demi water) (one-way ANOVA, Games-Howell, p<0.05). However, significant statistical differences were not observed among treatment groups. Therefore, PACT was able to decrease the viability of planktonic cells and biofilm of *S. mutans* UA159, as well as controlling the demineralization process mediated by bacteria for 24 h. Moreover, according to present methods, PACT may modulate cellular stress similar to hydrogen peroxide.

Keywords: Photodynamic antimicrobial chemotherapy. Dental caries. *Streptococcus mutans*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	19
2	PROPOSIÇÃO	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	PRIMEIRA ETAPA	35
3.1.1	Divisão dos grupos experimentais	35
3.1.2	Preparação do estoque de culturas iniciais de <i>S. mutans</i>	36
3.1.3	Preparação dos meios e reagentes químicos utilizados durante os testes de viabilidade envolvendo células bacterianas planctônicas	36
3.1.4	Terapia Fotodinâmica (TFD)	37
3.1.5	Teste de viabilidade pela utilização de resazurina e contagem das unidades formadoras de colônia de <i>Streptococcus mutans</i>	39
3.2	SEGUNDA ETAPA	40
3.2.1	Obtenção dos espécimes dentinários bovinos e preparo dos modelos para crescimento do biofilme (“Active Attachment Model ACTA – Amsterdam”)	40
3.2.2	Crescimento do biofilme de <i>S. mutans</i> sobre os blocos de dentina bovina	41
3.2.3	Contagem das Unidades Formadoras de Colônia de <i>S. mutans</i>	42
3.2.4	Avaliação dos graus de desmineralização dos discos de dentina	43
3.3	TERCEIRA ETAPA	43
3.3.1	Divisão dos grupos experimentais	43
3.3.2	Crescimento do biofilme de <i>S. mutans</i> sobre os blocos de dentina bovina	44
3.3.3	Terapia Fotodinâmica (TFD)	45
3.3.4	Determinação das Unidades Formadoras de Colônia de logo após a terapia fotodinâmica	47
3.3.5	Estudo da influência da terapia fotodinâmica sobre o controle do processo de desmineralização	47
3.3.6	Análise de cálcio liberado em meio de cultura pelo uso de espectrometria de absorção atômica	48
3.4	QUARTA ETAPA	49
3.4.1	Atividade do gene promotor	49
3.5	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	53

5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	90

1 Introdução e Revisão de *Literatura*

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O microbioma oral pode ser definido como um conjunto de diferentes ecossistemas microbiológicos localizados na cavidade bucal que se inter-relacionam em condições fisiológicas e/ou patológicas. A diversidade e complexidade do microbioma oral são extremamente variáveis entre diferentes indivíduos. Através de técnicas de piro-sequenciamento, tais características puderam ser justificadas por recentes evidências que demonstraram a presença de mais de 19.000 tipos filogenéticos de microrganismos orais. O desequilíbrio do relacionamento harmônico entre os agentes componentes de um ou diversos microbiomas podem conduzir ao processo de doença (KEIJSER, ZAURA *et al.*, 2008).

Competição por nutrientes, sítios de adesão bacteriana, produção de agentes antimicrobianos como peróxido de hidrogênio e as bacteriocinas podem ser fatores determinantes para o estabelecimento de relações comensais dos microrganismos com o hospedeiro (BOWDEN e LI, 1997; PANGSOMBOON, KAEWNOPPARAT *et al.*, 2006; VAN HOOGLMOED, GEERTSEMA-DOORNBUSCH *et al.*, 2008; HOJO, NAGAOKA *et al.*, 2009). O acúmulo do biofilme dentário pode ser considerado um promotor da alteração da composição microbiológica local, e conseqüentemente, conduz ao estabelecimento de doenças como cárie dentária, gengivite e periodontite (Baehni e Takeuchi, 2003).

Nyvad e Kilian (1987) demonstraram que as bactérias colonizadoras primárias de superfícies dentárias recém higienizadas constituem-se principalmente por *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis*. Nessa fase de colonização, apenas 2% de todos os microrganismos podem ser classificados como estreptococos do grupo mutans (EGM) (NYVAD e KILIAN, 1990a). Entretanto, quando amostras de biofilme dentário são coletadas de cavidades em dentina, aproximadamente 30% do total da microflora são constituídos por EGM (BOUE, ARMAU *et al.*, 1987; TAKAHASHI e NYVAD, 2008). A modificação da composição bacteriana do biofilme pode ser explicada pela baixa adesividade de EGM à película adquirida. Ao contrário, tais bactérias formam glucanos insolúveis em água mais eficientemente, corroborando para um acelerado acúmulo de bactérias no biofilme dentário (NYVAD e KILIAN, 1990b; TAKAHASHI e NYVAD, 2008).

A cárie dentária é uma doença infecciosa multifatorial, dependente do aproveitamento de carboidratos fermentáveis por microrganismos acidogênicos e acidúricos, aderidos sobre as superfícies dentárias. Baseado nos valores finais de pH dos ácidos produzidos por EGM (aproximadamente pH 4,0), tal grupo de bactérias pode ser considerado mais nocivo à desmineralização de esmalte e dentina quando comparado às bactérias não estreptococos do grupo mutans (TAKAHASHI e NYVAD, 2008). Quanto maior a exposição dos tecidos dentários a condições críticas de pH, maiores serão as chances de evidenciar sinais clínicos advindos do processo de cárie dentária, como manchas brancas e cavidades em esmalte e dentina (SELWITZ, ISMAIL *et al.*, 2007). O processo da cárie dentária é dinâmico, inevitável, ocorrendo durante toda a vida do indivíduo, porém pode ser controlado (FEJERSKOV e KIDD, 2005).

É evidente que se não houver acúmulo de bactérias orais sobre a superfície dentária, não haverá a progressão do processo de cárie dentária. Portanto, o verdadeiro tratamento da doença consiste em medidas que visam a influenciar a formação e o desenvolvimento do biofilme ou modificar os padrões de desmineralização do esmalte, dentina e cemento. Qualquer lesão, em qualquer estágio de destruição tecidual, não-cavitada ou cavitada, pode se tornar inativa, independentemente de ser restaurada ou não (LO, SCHWARZ *et al.*, 1998).

A ação de agentes químicos e mecânicos sobre o biofilme dentário encontrado no interior de lesões cavitadas em dentina é limitada pela dificuldade de acesso ao local da doença. Nestes casos, a intervenção clínica odontológica é recomendada. Para que o sucesso do controle da progressão da doença seja alcançado localmente, a contagem de microrganismos deve ser equilibrada pela diminuição e modificação ambiental em favor de bactérias não-acidúricas. Limitar o acesso da bactéria ao alimento e ao oxigênio, disponíveis no ambiente bucal, pela interposição de uma barreira mecânica, como o material restaurador, é uma alternativa para o controle bacteriano.

Procedimentos restauradores minimamente invasivos são capazes de restabelecer as funções do órgão dentário sem aumentar o comprometimento da longevidade do dente, já que se preocupam em preservar tecidos passíveis de remineralização, como a dentina afetada. Mertz-Fairhurst, Curtis *et al.* (1998) foram além e realizaram restaurações oclusais sem a completa remoção da dentina

infectada. O único desgaste produzido na estrutura dentária foi um bisel divergente realizado no esmalte, com pelo menos 1 mm de largura. O esmalte solapado e a dentina desmineralizada abaixo do bisel não foram removidos. A cavidade foi lavada e seca, o condicionamento ácido realizado e o sistema adesivo aplicado. As cavidades foram restauradas com resina composta. Após 10 anos de acompanhamento, a maioria das restaurações avaliadas foi considerada satisfatória, o que permitiu concluir que a remoção mecânica de toda a dentina infectada não é condição fundamental para que a progressão das lesões de cárie dentária seja controlada satisfatoriamente.

Porém, o resultado de estudos como o de Mertz-Fairhurst, Curtis *et al.* (1998) depende muito da qualidade do selamento da cavidade pelo material restaurador, responsável pela impossibilidade de acesso das bactérias remanescentes no interior da cavidade ao substrato presente no ambiente bucal. Hipoteticamente, o uso de agentes antimicrobianos no interior de lesões cavitadas pode contribuir para a maior longevidade e segurança de procedimentos restauradores minimamente invasivos, já que são capazes de reduzir o número de microrganismos patogênicos viáveis.

O uso da terapia fotodinâmica (TFD) está emergindo como uma nova opção de modalidade terapêutica para o tratamento de infecções microbianas localizadas. Este procedimento pode ser entendido pela associação de uma fonte de energia luminosa que pode ser absorvida por um agente químico fotossensibilizante previamente incorporado às células teciduais ou microbianas. Desse modo, quando as células bacterianas absorvem moléculas de um agente fotossensibilizante específico e são irradiadas por uma fonte de luz de comprimento de onda complementar, fótons são absorvidos pela molécula do fotossensibilizador que posteriormente poderão excitar elétrons. A energia absorvida é transferida para as moléculas vizinhas, podendo resultar na formação de moléculas reativas como o oxigênio singlete, íons superóxidos, hidroxilas e outros radicais livres que podem danificar e, em último caso, matar as células bacterianas (MACROBERT, BOWN *et al.*, 1989; MALIK, LADAN *et al.*, 1990; WILSON e DOBSON, 1993; BHATTI, MACROBERT *et al.*, 1997).

Substâncias fotossensibilizantes devem possuir propriedades específicas para serem usadas efetivamente em terapia fotodinâmica: (1) ser solúvel e

permanecer em solução ao longo do tempo; (2) apresentar máxima seletividade para células patogênicas; (3) permitir seu transporte ativo ou passivo entre as células, possuindo alvo intracelular conhecido; (4) possuir facilidade para emitir ou absorver fótons nos estados singleto e tripleto; (5) apresentar baixa toxicidade em níveis terapêuticos; (6) ser metabolizado rapidamente, evitando efeitos colaterais (GEORGAKOUDI, NICHOLS *et al.*, 1997). Um fotossensibilizador bastante utilizado durante procedimentos de TFD em tratamentos oncológicos é o Photogem[®] (Tim Tec Corp., Newark, E.U.A.), uma mistura de monômeros e oligômeros de derivados da hematoporfirina, com uso aprovado por diversos órgãos internacionais. A agência norte-americana Food and Drug Administration reconhece apenas substâncias derivadas da hematoporfirina como fotossensibilizadores destinados aos procedimentos de TFD. Porém, trata-se de uma droga que ainda não é comumente utilizada em procedimentos odontológicos. O Photogem[®] apresenta estrutura monomérica representada pela fórmula $[C_{34}H_{38}N_4O_6]_n$ e peso molecular variando entre 598 e 2920. Nos radicais R1 e R2 ligam-se CH (OH)CH₃, CH=CH₂ ou a própria estrutura monomérica da porfirina e nos ligantes R3 e R4 ligam H ou a própria estrutura monomérica da porfirina podendo formar dímeros, trímeros e oligômeros (MIRONOV, NIZHNIK *et al.*, 1990).

Há mais de cem anos, Raab (1900) já havia reportado o efeito letal da acridina em associação à luz visível ao *Paramecium caudatum*. O envolvimento essencial da luz e do oxigênio neste processo foi demonstrado mais tarde por von Tappeiner (1904), culminando no termo “fotodinâmico”. Entretanto, o potencial da TFD sobre as doenças de origem microbiana não foi muito explorado por décadas, principalmente por duas razões: (a) alguns patógenos bem conhecidos, especialmente bactérias Gram-negativas e protozoários em idade cística, não respondem bem à ação da terapia fotodinâmica, quando agentes fotossensibilizadores mais tradicionais, como a acridina e as porfirinas, são utilizados; (b) a descoberta de antibióticos criou expectativas em relação à redução do impacto de doenças causadas por microrganismos. Porém, a reconhecida resistência bacteriana gerada pelos antibióticos trouxe à tona a necessidade pela busca de agentes antimicrobianos incapazes de selecionar microrganismos mais resistentes (TÜNGER, DINÇ *et al.*, 2000).

Respostas específicas são essenciais para a adaptação e sobrevivência bacteriana frente a estímulos agressores. *Streptococos* do grupo mutans possuem sistemas reguladores capazes de permitir a sua sobrevivência em ambientes inóspitos, com baixo pH e escassez de nutrientes. O sistema VicRK é um dos treze sistemas TCRS (sistema regulador de dois componentes) identificados em EGM. Ele é composto por proteínas sensíveis, codificadas pelo gene VicK, e por proteínas receptoras, codificadas pelo gene VicR, e está diretamente relacionado à regulação de genes envolvidos com o potencial cariogênico do microrganismo. A super-expressão dos genes VicRK está ligada ao aumento da tolerância bacteriana ao estresse oxidativo, o que pode conferir resistência a este microrganismo ao longo do tempo (DENG, LIU *et al.*, 2007; SENADHEERA, LEE *et al.*, 2007). Ainda não existem evidências que demonstrem a capacidade da terapia fotodinâmica em produzir resistência bacteriana.

Wilson, Dobson *et al.* (1992) observaram o controle de *Streptococcus sanguinis* pela associação de 16 diferentes compostos químicos com a irradiação de um laser HeNe. Corantes já bastante comuns, como o azul de orto-toluidina (TBO) e azul de metileno apresentaram-se viáveis como agentes fotossensibilizantes, alcançando reduções significativas na contagem de células planctônicas de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Pela associação do laser He-Ne e TBO (25, 50 e 100 mg/L), o mesmo grupo de pesquisadores conseguiu diminuir consideravelmente a viabilidade de células bacterianas de *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* e *A. viscosus* cultivadas em placas de Petri (BURNS, WILSON e PEARSON, 1993), sendo os resultados observados dose-dependentes.

O estudo de Burns, Wilson *et al.* (1995) demonstrou que *Streptococcus mutans* embebidos em matriz colágena, equivalente à dentina desmineralizada, podem morrer após exposição à terapia fotodinâmica. Quando este microrganismo foi tratado com TBO associado à irradiação com 4,8 J de energia luminosa (632 nm), foi observada uma redução maior que 9 log₁₀ na contagem de bactérias viáveis.

Rovaldi, Pievsky *et al.* (2000) observaram significativa morte de células planctônicas de *P.gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *C. rectus*, *E.corrodens*, *F.nucleatum polymorphum*, *A.viscosus* e *estreptococos* pela ação de um derivado de porfirina (clorina ce6-5K) associado a um laser diodo (10mW,

662nm, 15J/cm²). Além disso, a eficácia antimicrobiana do método foi melhorada pelo aumento da concentração de fotossensibilizador utilizada.

Paulino, Ribeiro *et al.* (2005) associou a utilização do corante Rose Bengal com a fonte de luz proveniente de um aparelho fotopolimerizador odontológico (400 – 500nm, 350 – 500 mJ/cm²) para controlar a viabilidade de células planctônicas de *S. mutans*. Quando a densidade de energia de 325,1 mJ/cm² foi utilizada em conjunto com 0,5 µM do corante, qualquer Unidade Formadora de Colônia (UFC) não pôde ser identificada pelos métodos disponíveis de contagem.

Zanin, Goncalves *et al.* (2005) avaliaram os efeitos antimicrobianos do TBO em combinação com uma fonte de luz laser He-Ne ou LED sobre a viabilidade e arquitetura de biofilmes de *S. mutans*. Os efeitos bactericidas foram dose-dependentes em relação às fontes de luz, sendo que a eficiência do laser e do LED foram semelhantes no controle de até 99,99% da viabilidade bacteriana celular.

Zanin, Lobo *et al.* (2006) observaram os efeitos de controle da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sanguinis* organizados em biofilmes sobre blocos de dentina. Após 5 dias de crescimento dos biofilmes, TBO (0,1 mg/mL) foi associado a um LED vermelho (620-660 nm, 85,7 J/cm²) para tratar fotodinamicamente diferentes amostras dos três tipos de biofilme. Reduções de 95% da viabilidade de células bacterianas de *S. mutans* e *S. oralis* e de 99,9% de *S. sanguinis* foram observadas.

Giusti, Santos-Pinto *et al.* (2008) estudaram a eficiência do controle da viabilidade de células bacterianas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* organizadas em biofilme pela associação do azul de orto-toluidina (TBO) ou Photogem® a uma fonte de luz LED vermelha (630 nm, 400 mW/cm², 24 e 48 J/cm²). Baseados em uma significativa redução dose-dependente da contagem de UFC pelo uso de ambos agentes fotossensibilizantes, os autores propuseram um modelo matemático de controle da viabilidade bacteriana.

Fontana, Abernethy *et al.* (2009) compararam os efeitos da terapia fotodinâmica sobre células bacterianas planctônicas e células organizadas em biofilme. A TFD reduziu em aproximadamente 63% o número de células bacterianas viáveis em fase planctônica. Uma proporção de controle bem inferior (32%) foi obtida quando os mesmos tratamentos foram realizados sobre bactérias organizadas em biofilmes. Portanto, como qualquer agente antimicrobiano, os resultados da TFD são

mais limitados sobre o controle de biofilmes em relação às células planctônicas. Isso pode ser explicado por fatores inatos como a baixa difusão dos agentes pela matriz extracelular e condições de escassez de oxigênio e nutrientes que seriam responsáveis por diminuir a atividade metabólica das células bacterianas. Soma-se a esses fatores a resistência induzida por agentes quimioterápicos específicos, o que torna os biofilmes bacterianos ainda mais resistentes aos tratamentos convencionais (ANDERSON e O'TOOLE, 2008).

Lima, Sampaio De Melo *et al.* (2009) observaram os efeitos da associação do azul de orto-toluidina (100 µg/mL) e o LED vermelho (620-660 nm, 47 e 94 J/cm²) sobre um modelo de cárie de dentina produzida em modelo *in situ*. A contagem das UFC de microrganismos totais, estreptococos totais, lactobacilos e estreptococos do grupo mutans foram determinadas antes e após a realização do tratamento com uso da terapia fotodinâmica. Através dos resultados, pôde-se notar uma significativa redução da contagem de todos os tipos bacterianos estudados, variando entre 3.08 e 5.43 log10, sendo que o efeito alcançado foi dose-dependente.

Caso as bactérias encontradas no interior das lesões abertas de cárie dentária em dentina possam ser controladas ou erradicadas pelo uso da TFD *in vivo*, as conseqüências para a Odontologia serão enormes. Os procedimentos clínicos se tornarão menos traumáticos para o paciente e mais rápidos para o profissional, já que a dentina infectada, amolecida e desorganizada, poderá não ser removida pelo uso de brocas ou instrumentos cortantes. Além disso, o corte de tecidos dentários sadios será prevenido, diminuindo danos, melhorando o prognóstico do tratamento e aumentando o tempo de vida útil do elemento dentário (WILSON, 2004).

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Considerando-se que não há evidências científicas suficientes sobre: (a) a influência de diferentes parâmetros de crescimento de biofilmes dentários *in vitro* sobre os resultados da terapia fotodinâmica; (b) a capacidade da terapia fotodinâmica em controlar o processo de desmineralização dentinária mediada por bactérias; (c) a avaliação do estresse produzido pela terapia fotodinâmica sobre células bacterianas geneticamente modificadas, o presente estudo propôs-se investigar:

1ª etapa:

- O efeito de diferentes protocolos de terapia fotodinâmica sobre a viabilidade de *Streptococcus mutans* cultivados em caldo de cultura;

2ª etapa:

- A capacidade de um modelo de biofilme em produzir amostras viáveis para o estudo dos graus de desmineralização do tecido dentinário bovino promovidos pelo acúmulo de biofilme específico de *S. mutans* durante diferentes tempos;

3ª etapa:

- A contagem de *Streptococcus mutans* provenientes de biofilmes dentários específicos cultivados sobre espécimes dentinários bovinos, após a exposição a dois diferentes protocolos de terapia fotodinâmica;
- Os graus de desmineralização observada em espécimes dentinários bovinos após o crescimento de biofilme específico de *Streptococcus mutans*, expostos a dois diferentes protocolos de terapia fotodinâmica;

4ª etapa:

- A capacidade da terapia fotodinâmica em promover estresse oxidativo aos *Streptococcus mutans* UA159 com deleção do gene Vick.

3 Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Primeira etapa

Nesta etapa do estudo foi estudada a influência de diferentes densidades de energia, provenientes de um LED vermelho de baixa potência (630 nm), e diferentes concentrações de um fotossensibilizador (Photogem[®]) sobre a viabilidade de *Streptococcus mutans* cultivados *in vitro*.

3.1.1 Divisão dos grupos experimentais

Esta etapa foi constituída por 42 grupos, sendo um grupo controle e 41 grupos teste. O grupo controle foi constituído por culturas de *Streptococcus mutans* UA159 que não receberam nenhum tipo de tratamento. Os 41 grupos teste foram constituídos por: cinco grupos cujas culturas bacterianas foram sensibilizadas apenas pelo fotossensibilizador Photogem[®] (Tim Tec Corp, Newark, E.U.A.), seis grupos cujas culturas de *S. mutans* foram apenas irradiadas com o LED de baixa potência (Biotable[®], Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, Brasil) e 30 grupos cujas culturas de *S. mutans* foram tratadas pela associação da utilização do fotossensibilizador e da irradiação pelo LED. A divisão dos grupos pode ser observada na tabela 1. Cada grupo foi constituído por três amostras independentes.

Tabela 1 – Distribuição e nomeação dos grupos teste e controle durante a primeira etapa do estudo

Fonte de Luz	DE (J/cm ²)	Concentração de Photogem [®] (mg/mL)					
		0 (A)	0,0625 (B)	0,125 (C)	0,250 (D)	0,375	0,50 (F)
CONTROLE	0	C0	CA	CB	CC	CD	CE
LED	12 (1)	C1	PALD1	PBLD1	PCLD1	PDLD1	PELD1
	24 (2)	C2	PALD2	PBLD2	PCLD2	PDLD2	PELD2
	36 (3)	C3	PALD3	PBLD3	PCLD3	PDLD3	PELD3
	48 (4)	C4	PALD4	PBLD4	PCLD4	PDLD4	PELD4
	60 (5)	C5	PALD5	PBLD5	PCLD5	PDLD5	PELD5
	72 (6)	C6	PALD6	PBLD6	PCLD6	PDLD6	PELD6

3.1.2 Preparação do estoque de culturas iniciais de *S. mutans*

Culturas estoque de *Streptococcus mutans* UA159 foram preparadas através da inoculação de uma única colônia da bactéria em 10 mL de infusão estéril de cérebro-coração (BHI 3,7 g/100 mL, extrato de levedura 0,5 g/100 mL, glicose 1 g/100 mL, Becton, Dickinson & Co., Sparks, E.U.A.) suplementada com sacarose 0.2% (Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A.). O crescimento bacteriano foi observado até o dia seguinte em condições anaeróbicas (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C. Posteriormente, 10 mL de solução de glicerol 60% foram adicionados à cultura bacteriana e alíquotas de 1,5 mL foram estocadas em tubos de microcentrífuga estéreis e congeladas a -80°C até o momento da utilização.

3.1.3 Preparação dos meios e reagentes químicos utilizados durante os testes de viabilidade envolvendo células bacterianas planctônicas

O meio de cultura semi-definido modificado com adição de extrato de levedura (SDMY) foi utilizado para o crescimento bacteriano anteriormente aos testes envolvendo viabilidade celular. Esse meio é constituído por K₂HPO₄ 76 mM, KH₂PO₄ 15 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, NaCl 35 mM, MgSO₄ X 7H₂O 2 mM, 0,3% de extrato de levedura e glicose 18 mM (pH 7,0), suplementado com vitaminas (ácido nicotínico 0,04 mM, piridoxina HCl 0,1 mM, ácido pantotênico 0,01 mM, riboflavina 1 µM, tiamina HCl 0,3 µM e 0,05 µM D-biotina) e aminoácidos (4 mM ácido L-glutâmico, 1 mM L-arginina HCl, 1,3 mM L-cisteína HCl and 0,1 mM L-triptofano) esterilizados por filtração. No momento de utilização para crescimento bacteriano, uma solução de glicose (Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A.) foi adicionada ao meio para atingir uma concentração final de 0.36%.

Soluções estoque de resazurina 1,25% (Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A.) foram preparadas e estocadas em freezer a -20°C. Esse produto químico foi utilizado para determinar a viabilidade das células bacterianas provenientes das diferentes amostras estudadas. No momento de utilização, 62,5 µL da solução estoque de resazurina foram misturados a 20 mL do meio SDMY (concentração final 0,039%).

Aproximadamente 16h antes dos testes de viabilidade bacteriana, culturas de *Streptococcus mutans* UA159 foram preparadas pela utilização de SDMY. O crescimento foi observado até o dia seguinte em condições anaeróbicas (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C. Após o período de incubação pré-determinado, a densidade óptica (DO) da cultura bacteriana foi determinada em espectrofotômetro (600 nm, Spectramax M2, Molecular Devices, Silicon Valley, E.U.A.). Em seguida, os tubos de ensaio contendo as culturas bacterianas foram centrifugados durante 10 min a 4500 rpm e 4°C. O *pellet* bacteriano foi observado e o sobrenadante removido. Um volume “x” do meio *SDMY assay* (mesma composição do meio SDMY, exceto pela remoção dos agentes corantes, vitamina riboflavina e extrato de levedura) foi adicionado sobre o *pellet* bacteriano, efetuando a correção do valor da DO₆₀₀ para 1,0. Todo o processo foi repetido mais uma vez para assegurar a qualidade do procedimento. Volumes de 200 µL da suspensão bacteriana foram distribuídos nos diferentes poços de uma placa de 96 poços pouco antes dos procedimentos de tratamento fotodinâmico.

3.1.4 Terapia Fotodinâmica (TFD)

Anteriormente aos procedimentos da terapia fotodinâmica, o fotossensibilizador (Photogem[®]) foi diluído em diferentes volumes de água deionizada estéril para a obtenção das seguintes concentrações: 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL e 4 mg/mL, as quais foram estocadas sob a proteção de papel alumínio. Dois minutos antes da irradiação pelo LED, um volume igual a 25 µL de uma das concentrações do fotossensibilizador foi adicionado nos diferentes poços contendo suspensões bacterianas, de acordo com o grupo a que pertenciam.

Posteriormente, as suspensões bacterianas foram irradiadas uniformemente com uso de um diodo emissor de luz (LED) de baixa potência (Biotable[®], Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, Brasil). O equipamento Biotable[®] (Figura 1) possui os seguintes parâmetros técnicos: comprimento de onda com banda de emissão centrada em 630 nm e densidade de potência de saída igual a 50 mW/cm². As densidades de energia utilizadas variaram entre 0 e 72 J/cm², com intervalos de 12 J/cm², de acordo com o grupo a que pertenciam as suspensões bacterianas. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. A variação de

corrente e tensão elétrica foram controladas por um estabilizador (Power Supply HM7042-3, Hameg, Utrecht, Holanda). Um potenciômetro óptico (1916-C Optical Power Meter, Newport, Irvine, E.U.A.) foi utilizado para mensurar a potência óptica de saída da Biotable[®], sendo corrigida quando necessário, de acordo com a seguinte relação:

$$DE \text{ (J/cm}^2\text{)} = \frac{P \text{ (W)} \times t \text{ (s)}}{A \text{ (cm}^2\text{)}}$$

DE = densidade de energia

P = potência

t = tempo

A = área

Figura 1 - Biotable[®], protótipo desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos – IFSC – USP.

3.1.5 Teste de viabilidade pela utilização de resazurina e contagem das unidades formadoras de colônia de *Streptococcus mutans*

Durante um período de 15 horas, com intervalos de 10 minutos entre cada leitura, os valores de fluorescência emitidos por cada amostra foram determinados pela utilização de um leitor de microplaca com os seguintes parâmetros: excitação em 485 nm e emissão em 580 nm. As leituras realizadas após 10 min, 30 min, 1 h e 1h 30 min do início do procedimento foram selecionadas para expressarem quatro valores distintos representativos da porcentagem de redução do número de bactérias. Essa porcentagem foi determinada segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{redução} = 100 \times \frac{(\text{fluorescência grupo controle} - \text{fluorescência grupo teste})}{\text{fluorescência grupo controle}}$$

Baseado nos resultados do teste de viabilidade pelo uso da resazurina, quatro diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica foram escolhidos para a realização da determinação do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Para tanto, todos os procedimentos descritos anteriormente foram repetidos, exceto a determinação pela resazurina. Diluições seriadas das alíquotas (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) foram realizadas no meio CPW (Cysteine-Peptone Water, 5 g de extrato de levedura, 1 g de peptona, 8,5 g de NaCl, 0,5 g de hidrocloreto de L-cisteína /L, pH 7,3). Pelo auxílio de uma *spiral plater* (Eddy Jet, IUL Instruments, Königswinter, Alemanha), alíquotas de 50 μL de cada diluição foram inoculadas horizontalmente em placas de Petri contendo infusão de cérebro-coração ágar (BHI agar, pH 7,2, Becton, Dickinson & Co., Sparks, E.U.A.). Após o período de 48 h de incubação em condições de anaerobiose total a 37°C, UFC foram devidamente contadas e determinadas pela multiplicação do fator de correção 4. O controle de contaminação prévia foi realizado pela observação do centro da placa de Petri (livre de inoculação bacteriana), pela análise da morfologia de colônias em microscópio estereoscópico e pela coloração de Gram em casos duvidosos.

3.2 Segunda etapa

3.2.1 Obtenção dos espécimes dentinários bovinos e preparo dos modelos para crescimento do biofilme (“Active Attachment Model ACTA – Amsterdam”)

Dentes incisivos inferiores bovinos foram extraídos e imediatamente a porção radicular foi separada da porção coronária. Discos dentinários de 6 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura foram obtidos pela utilização de uma cortadeira Leica SP1600 Saw Microtome (Leica, Richmond, E.U.A.). Os discos dentinários foram estocados em água deionizada a 4°C até o momento de utilização. Os discos de dentina foram removidos da geladeira 48h antes de sua utilização em diferentes experimentos. Após o procedimento de secagem, adesivo dentinário (Scotch Bond, 3M, E.U.A.) foi utilizado para proteger uma área previamente definida dos discos de dentina contra o processo de desmineralização.

O modelo para crescimento do biofilme utilizado no presente estudo (Active Attachment Model ACTA – Amsterdam) constituiu-se de uma tampa de aço inoxidável com 24 perfurações destinadas a receber o ajuste de parafusos de poliestireno contendo o substrato a ser estudado, no caso em questão, disco de dentina bovina (Figura 2). Essa tampa se encaixa perfeitamente sobre uma placa de 24 poços, contribuindo para que amostras independentes de biofilme sejam obtidas ao mesmo tempo e nas mesmas condições. Os discos de dentina foram aderidos aos parafusos de poliestireno pela utilização de cola acrílica. Após 24 h da colagem do último disco, os modelos foram autoclavados a 121°C por 30 min e secados em estufa.

Figura 2 – “Active Attachment Model ACTA – Amsterdam” (AAMA – Amsterdam).

3.2.2 Crescimento do biofilme de *S. mutans* sobre os blocos de dentina bovina

Um volume de 200 μL da cultura estoque de *S. mutans* UA159 foi adicionado em 10 mL de meio BHI suplementado com 0,2% de sacarose. A cultura bacteriana foi mantida no interior de estufa microbiológica a 37°C em condições de anaerobiose total (80% N_2 , 10% H_2 , 10% CO_2) até o dia seguinte. Após o ajuste da DO600 para 1,0, 500 μL dessa cultura foram misturados a 25 mL do meio “metade” da infusão cérebro-coração ($\frac{1}{2}$ BHI 1,85 g/100 mL, extrato de levedura 0,25 g/100 mL, glicose 0,5 g/100 mL, pH 7,2, Becton, Dickinson & Co., Sparks, E.U.A.) sem adição de agente tamponador e com adição de sacarose 0,2%. Aliquotas de 1,5 mL da suspensão bacteriana foram uniformemente distribuídas no interior dos poços de uma placa de 24 poços. Logo depois, uma tampa de aço inoxidável contendo 24 discos de dentina foi posicionada sobre a placa de 24 poços contendo as

suspensões bacterianas. Os modelos de biofilme foram mantidos em condições de anaerobiose total (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C por 8 horas. Após esse período, o modelo de biofilme foi transferido para outra placa de 24 poços contendo meio fresco ½ BHI com adição de sacarose 0,2%, assim mantido por 16 h em anaerobiose total (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C. *S. mutans* UA159 foram inoculadas no meio de cultura apenas durante o primeiro ciclo de incubação (primeiras 8 h). A cada dia destinado ao crescimento do biofilme de *S. mutans*, os modelos foram transferidos duas vezes para placas de 24 poços contendo ½ BHI fresco com adição de sacarose 0,2%. A duração do primeiro ciclo diário de incubação foi igual a 8h, enquanto a duração do segundo ciclo foi igual a 16h.

3.2.3 Contagem das Unidades Formadoras de Colônia de *S. mutans*

Quatro discos de dentina foram coletados e transferidos para pequenos tubos de ensaio contendo 1 mL do meio CPW após os períodos de 24 h, 48 h, 72 h, 144 h, 168 h e 192 h do início do processo de crescimento do biofilme de *S. mutans* UA159. Logo após a coleta, o biofilme aderido aos discos de dentina foi disperso por sonicação em gelo (2 min, 40 mW, 1 pulso/segundo, Vibra CellTM, Sonics and Materials INC, Newtown, E.U.A.). Diluições seriadas (10⁰, 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶) foram realizadas pela utilização do meio CPW. Pelo auxílio de uma *spiral plater* (Eddy Jet, IUL Instruments, Königswinter, Alemanha), alíquotas de 50 µL de cada diluição foram inoculadas horizontalmente em placas de Petri contendo infusão de cérebro-coração ágar (BHI agar, pH 7,2, Becton, Dickinson & Co., Sparks, E.U.A.). Após o período de 48 h de incubação em condições de anaerobiose total (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C, UFC foram devidamente contadas e determinadas pela multiplicação do fator de correção 20. Logo após a realização das diluições seriadas, os discos de dentina foram inseridos em álcool 70% p/p por 10 min para evitar a progressão do processo de desmineralização. Em seguida, os discos de dentina foram umedecidos em água deionizada e estocados a 4°C até o momento da utilização.

3.2.4 Avaliação dos graus de desmineralização dos discos de dentina

Três secções perpendiculares, com espessura de 200 μm cada uma, foram realizadas adjacentes ao centro dos discos de dentina (3242 Well Diamond Wire Saw, Well Instrument, Suíça). Cada secção foi mantida em ambiente úmido até o momento de obtenção das imagens para análise microrradiográfica transversal. Então, duas secções de cada amostra foram dispostas sobre uma base acrílica contendo uma placa de alumínio. Água deionizada foi gotejada sobre todas as secções para manter o ambiente úmido. Posteriormente, o conjunto de secções foi coberto por uma lâmina de vidro associada a um filme radiográfico (Kodak High Resolution Plate tipo 1A, Eastman Kodak Company, Rochester, E.U.A.) e as secções foram expostas aos raios-X por 4 min e 6 min (PW1729 X-Ray Generator, Philips, Holanda). As imagens obtidas foram processadas e analisadas pelo uso do software TMR 2000 (Inspektor Research Systems, Amsterdam, Holanda). Foram fotografadas cinco áreas com extensão de 500 μm e separadas por intervalos de 1 mm. Três destas áreas correspondem à parte da secção dentinária exposta a desmineralização (parâmetros finais) enquanto as duas outras áreas correspondem a parte da secção coberta pelo adesivo dentinário e, portanto, protegida contra a desmineralização (parâmetros iniciais). O perfil de conteúdo mineral das lesões (%vol), a profundidade das lesões (μm) e a perda mineral integrada (%vol μm) foram determinados.

3.3 Terceira etapa

3.3.1 Divisão dos grupos experimentais

Esta etapa foi constituída por seis grupos, sendo um grupo controle e cinco grupos teste. O grupo controle foi constituído por amostras de biofilme de *Streptococcus mutans* UA159 que não receberam nenhum tipo de tratamento. Os cinco grupos teste foram constituídos por: um grupo cujas amostras de biofilme foram sensibilizadas apenas pelo fotossensibilizador Photogem[®] (Tim Tec Corp, Newark, E.U.A.), dois grupos cujas amostras de biofilme de *S. mutans* foram apenas irradiadas com o LED de baixa potência (Biotable[®], Instituto de Física de São Carlos,

São Carlos, Brasil) e dois grupos cujas amostras de biofilme de *S. mutans* foram tratadas pela associação da utilização do fotossensibilizador e da irradiação pelo LED. A divisão dos grupos pode ser observada na tabela 2. Todos os experimentos descritos nessa etapa foram realizados duas vezes, sendo que cada grupo foi constituído por um total de 12 amostras independentes, sendo seis delas destinadas à análise do efeito imediato da terapia fotodinâmica sobre a contagem de UFC provenientes do biofilme de *S. mutans* e as outras seis destinadas a avaliar a capacidade da retomada de crescimento do biofilme, bem como o controle do processo de desmineralização pela TFD.

Tabela 2 - Distribuição e nomeação dos grupos teste e controle durante a primeira etapa do estudo

Concentração do fotossensibilizador (Photogem®, mg/mL)	Densidade de energia (J/cm ²)		
	0	75	150
0	A	B	C
0,25	D	E	F

3.3.2 Crescimento do biofilme de *S. mutans* sobre os blocos de dentina bovina

Dois diferentes meios de cultura foram utilizados para o crescimento do biofilme de *S. mutans* UA 159 nesta etapa. Os meios “metade” infusão cérebro-coração (½ BHI 1,85 g/100 mL, extrato de levedura 0,25 g/100 mL, glicose 0,5 g/100 mL, pH 7,2, Becton, Dickinson & Co., Sparks, E.U.A.) com ou sem adição de agente tamponador (PIPES 50mM, pH 7,0, Sigma Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A.) foram preparados em consonância com os objetivos propostos. Após a obtenção dos discos de dentina como descrito na segunda etapa, seis modelos para crescimento do biofilme foram preparados, sendo que em três modelos foram inseridos 7 discos e em outros três modelos foram inseridos 6 discos, totalizando 39 discos de dentina. Em seguida, os modelos foram esterilizados a 121°C por 30 min e secados em estufa.

Um volume de 200 μ L da cultura estoque de *S. mutans* UA159 foi adicionado em 10 mL de meio BHI com adição de 0,2% de sacarose. A cultura bacteriana foi mantida no interior de estufa microbiológica a 37°C em condições de anaerobiose total (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) até o dia seguinte. Após o ajuste da DO600 para 1,0, 500 μ L dessa cultura foram misturados a 25 mL do meio “metade” da infusão cérebro-coração (½ BHI 1,85 g/100 mL, extrato de levedura 0,25 g/100 mL, glicose 0,5 g/100 mL, pH 7,2, Becton, Dickinson & Co., Sparks, E.U.A.) com adição de PIPES 50mM e sacarose 0,2%. Aliquotas de 1,5 mL da suspensão bacteriana foram uniformemente distribuídas no interior de 6 poços de seis placas de 24 poços. Com o intuito de observar o baseline da concentração de cálcio no meio de cultura utilizado nos experimentos, aliquotas do meio ½ BHI com adição de PIPES 50 mM sem inoculação prévia de bactéria foram adicionadas em mais um poço de três das seis placas de 24 poços. Posteriormente, tampas de aço inoxidável contendo seis ou sete discos de dentina foram posicionadas sobre as placa de 24 poços contendo as suspensões bacterianas. Os modelos de crescimento do biofilme foram mantidos em condições de anaerobiose total (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C por 8 horas. Após esse período, os modelos foram transferidos para outras seis placas de 24 poços contendo meio fresco ½ BHI com adição de sacarose 0,2% e PIPES 50 mM, assim mantido por 16 h em anaerobiose total (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C. *S. mutans* UA159 foram inoculadas no meio de cultura apenas durante o primeiro ciclo de incubação (primeiras 8 h). Após cada sessão de renovação dos meios de cultura, os meios previamente utilizados foram coletados para o interior de tubos de microcentrífuga e centrifugados (15000 rpm, 2 min). Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de microcentrífuga e estocados a -80°C até o momento de utilização. Todo o processo foi realizado para analisar as concentrações de cálcio liberado durante o período estudado.

3.3.3 Terapia Fotodinâmica (TFD)

Nesta etapa, apenas uma concentração do fotossensibilizador (Photogem[®]) e duas diferentes densidades de energia do LED vermelho de baixa intensidade (Biotable[®]) foram utilizadas para o tratamento do biofilme de *S. mutans* crescido sobre discos de dentina. Anteriormente aos procedimentos da

terapiafotodinâmica, uma concentração de fotossensibilizador igual a 0,25 mg/mL foi preparada pela diluição em água deionizada estéril com adição de agente tamponador (PIPES, pH 7,25, Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A.). Um volume de 1,5 mL da solução do fotossensibilizador foi aleatoriamente distribuído no interior de três poços de seis placas de 24 poços, totalizando 18 poços. Os outros três poços de cada placa de 24 poços foram utilizados para armazenar 1,5 mL de água deionizada estéril com adição de PIPES (Figura 3). Subseqüentemente, cada modelo de crescimento do biofilme foi removido de suas condições ideais de crescimento. Para a remoção de células não aderidas, os modelos foram posicionados sobre placas de 24 poços contendo 1,5 mL do meio CPW em cada poço e rapidamente transferidos para a placa de 24 poços contendo fotossensibilizador ou água deionizada por 2 min.

Figura 3 – Representação esquemática do posicionamento das amostras utilizadas em relação ao tratamento pelo fotossensibilizador.

Posteriormente, os modelos de crescimento do biofilme foram transferidos para o interior do equipamento Biotable[®] (Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, Brasil) e irradiados com densidade de energia igual a 75 J/cm² ou 150 J/cm², de acordo com o grupo a que as amostras pertenciam (Tabela 2). Ao final do

procedimento, os modelos foram rapidamente posicionados sobre uma nova placa de 24 poços contendo 1,5 mL do meio CPW em cada poço e removidos imediatamente. Os parâmetros técnicos do equipamento foram os mesmos descritos na primeira etapa do estudo.

3.3.4 Determinação das Unidades Formadoras de Colônia de logo após a terapia fotodinâmica

Metade das amostras (18 discos de dentina, sendo três discos/grupo) foram coletados e transferidos para pequenos tubos de ensaio contendo 2 mL do meio CPW. O biofilme aderido aos discos de dentina foi disperso por sonicação em gelo (2 min, 40 mW, 1 pulso/segundo, Vibra Cell™, Sonics and Materials INC, Newtown, E.U.A.). Diluições seriadas (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) foram realizadas pela utilização do meio CPW. Pelo auxílio de uma *spiral plater* (Eddy Jet, IUL Instruments, Königswinter, Alemanha), alíquotas de 50 µL de cada diluição foram inoculadas horizontalmente em placas de Petri contendo infusão de cérebro-coração ágar (BHI agar, pH 7,2, Becton, Dickinson & Co., Sparks, E.U.A.). Após o período de 48 h de incubação em condições de anaerobiose total (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C, UFC foram devidamente contadas e determinadas pela multiplicação do fator de correção 40.

3.3.5 Estudo da influência da terapia fotodinâmica sobre o controle do processo de desmineralização

A segunda metade das amostras (18) foi incubada em meio “metade” infusão cérebro-coração (½ BHI 1,85 g/100 mL, extrato de levedura 0,25 g/100 mL, glicose 0,5 g/100 mL, pH 7,2, Becton, Dickinson & Co., Sparks, E.U.A.) suplementado com sacarose 0,2% e sem adição de agente tamponador, logo após a realização dos procedimentos relacionados à terapia fotodinâmica. Os modelos de crescimento do biofilme foram mantidos em condições de anaerobiose total (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C por 8 horas. Após esse período, os modelos foram transferidos para outras três placas de 24 poços contendo o mesmo meio anteriormente utilizado, assim mantido por 16 h em anaerobiose total (80% N₂,

10% H_2 , 10% CO_2) a 37°C. Após cada sessão de renovação dos meios de cultura, os meios previamente utilizados foram coletados para o interior de tubos de microcentrífuga e centrifugados (15000 rpm, 2 min). Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de microcentrífuga e estocados a -80°C até o momento de utilização. Todo o processo foi realizado para analisar as concentrações de cálcio liberado durante o período estudado. Após o período estipulado, todos os discos de dentina foram coletados, sendo que a contagem de UFC e as características ligadas ao processo de desmineralização, como o perfil de conteúdo mineral das lesões (%vol), a profundidade das lesões (μm) e a perda mineral integrada (%vol μm), foram determinadas da mesma forma descrita nos itens 3.2.4 e 3.2.5.

3.3.6 Análise de cálcio liberado em meio de cultura pelo uso de espectrometria de absorção atômica

Solução fresca de lantânio (La_2O_3) foi preparada pela diluição de 78 g de $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ em 24 mL de HCl 32%. Água Milli-Q foi utilizada para completar o volume final de 5000 mL em balão volumétrico. Soluções padrão de $CaCO_3$ a 1mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM e 8 mM foram preparadas pela diluição de solução estoque de $CaCO_3$ a 200 mM em água Milli-Q. No mesmo período de análise, 30 mL da solução de lantânio foram estocadas em seis tubos Falcon. Em seguida, 3 mL da solução de lantânio foram armazenadas em tubos de ensaio. Amostras dos meios utilizados, previamente preparadas, foram descongeladas em temperatura ambiente. Um volume de 1 mL de cada solução padrão ou água Milli-Q foi misturada a uma das soluções de lantânio contidas dentro dos tubos Falcon. As diferentes diluições da solução de $CaCO_3$ foram utilizadas para a determinação de curva padrão. Dentro dos tubos de ensaio, 100 μL de cada amostra foram misturados ao lantânio. Cada amostra foi analisada em duplicata pela utilização de um espectrômetro de absorção atômica (AAAnalyst 100, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, E.U.A.). Para cada amostra analisada foram coletados quatro amostras de meios de cultura, sendo duas relacionadas ao primeiro período de crescimento do biofilme (meio ½ BHI com PIPES) e duas relacionadas ao segundo período de crescimento do biofilme (meio ½ BHI sem adição de PIPES). O valor total de cálcio liberado após a realização da

terapia fotodinâmica foi determinada pela seguinte equação: [Cálcio no 3º período de coleta] + [Cálcio no 4º período de coleta]. Além disso, a correlação entre a concentração de cálcio liberado antes e após a realização da terapia fotodinâmica foi analisada.

3.4 Quarta etapa

Nesta etapa, os procedimentos a serem realizados são similares aos descritos por Deng et al. (2007) e Deng et al. (2009). A atividade do sistema promotor VicRK foi determinada pela expressão da proteína-informante verde fluorescente (GFP), após à exposição de *S. mutans* a estímulos geradores de estresse. Portanto, a ocorrência de transdução de sinal foi observada pela variação da fluorescência captada durante a citometria de fluxo. Todos os procedimentos desta etapa foram realizados nos laboratórios do Departamento de Cariologia, Endodontia e Periodontia do Academicsh Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA, Holanda) e no laboratório de Biologia Oral da Vrije Universiteit, sob orientação dos Profs. Drs. Wim Crielaard e Jacob M. ten Cate. Por questões logísticas, as bactérias utilizadas foram as mesmas desenvolvidas no estudo de Deng et al. (2007).

3.4.1 Atividade do gene promotor

Colônias informantes de *S. mutans* foram utilizadas para testar a resposta do promotor *vic* aos estímulos de estresse. As colônias contendo pVA838 (sem GFP) foram usadas como controle negativo para excluir a autofluorescência. As colônias contendo pDM15 (com GFP constitutivamente expressa) foram usadas como controle positivo para indicar efeitos diretos, não biológicos, sobre a fluorescência. As colônias com pMJ9, denominadas pDM17 (GFP sob controle do *vic*) foram usadas como teste.

No dia anterior aos experimentos envolvendo estresse celular, uma colônia de cada um dos três tipos de cepas bacterianas (pVA838, pDM15 e pDM17) foi inoculada em 10 mL do meio infusão cérebro-coração (BHI, pH 7,2) com adição

de 10 µg/mL de eritromicina. A cultura bacteriana foi mantida a 37°C em condições aeróbicas até o dia seguinte.

Os procedimentos gerais para os testes de resposta ao estresse foram realizados como se segue: 1,25 mL de cada cultura bacteriana foi misturado a um volume de 23,75 mL de meio BHI fresco (pH 7,2) contendo eritromicina a 10 µg/mL. As colônias foram incubadas em condições aeróbicas a 37°C até que os valores de DO600 se aproximassem a 0,3. Um volume de 400 µL de PBS a 4°C foi estocado em cada um dos 42 tubos de microcentrífuga. No momento da DO600 $\approx$ 0,3, as culturas bacterianas foram estocadas em gelo para cessar a síntese de proteínas. Um volume de 50 µL de cada cepa de bactéria foi misturado ao PBS contido em 14 tubos de microcentrífuga. Em seguida, as suspensões bacterianas foram tratadas através da adição de 50 µL dos respectivos produtos: Photogem® a 0,125% e 0,0625% sem associação da fonte de luz LED, fonte de luz LED (4,5 J/cm²) associada à água deionizada, Photogem® a 0,125% e 0,0625% em associação com a fonte luz LED (4,5 J/cm²), H₂O₂ a 0,05%, H₂O₂ a 0,0025% e água deionizada. As concentrações dos agentes utilizados foram diluídas em mais 10 vezes quando misturadas às suspensões bacterianas. Tais concentrações foram estipuladas após estudo piloto. Para produção do estresse, fotossensibilizador, peróxido de hidrogênio e água deionizada foram incubados durante 2 min, para simulação do período de pré-irradiação observado em tratamentos envolvendo terapia fotodinâmica.

Antes e após 30, 60 e 90 min da aplicação dos estímulos de estresse, 50 µL das amostras bacterianas tratadas foram diluídas em 950 µL de PBS e posteriormente estocadas a 4°C até o momento de realização da citometria de fluxo. O pH e DO600 (Microplate spectrophotometer, Molecular Devices, Sunnyvale, E.U.A.) foram mensurados quando necessário. O LED utilizado nesta etapa foi o mesmo que o das etapas anteriores (Biotable®, 50 mW, 630 nm).

Durante a citometria de fluxo, a ser realizada no aparelho EPICS-XL-MCL (Beckman Coulter, Mijdrecht, Netherlands), sinais fluorescentes foram emitidos após excitação realizada pela irradiação de um laser de argônio 488 nm. Estes sinais foram detectados e mensurados após a passagem por um filtro de banda de 525/10 nm (FL1). O espalhamento frontal e lateral das células foi mensurado para avaliar a distribuição celular, através da coleta de 10.000 eventos em cada amostra. Todos os

dados foram adquiridos e analisados com o uso do software EXPO32-ADC (Beckman Coulter, Mijdrecht, Netherlands).

3.5 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o software Statistical Package for Social Science (versão 17.0; SPSS, Chicago, E.U.A.). As contagens de CFU foram transformadas em log antes da análise estatística. Análise de variância a um critério (ANOVA) foi utilizada para observar existência de diferença estatística entre os grupos em relação à contagem de bactérias, profundidade de lesão, perda mineral integrada, concentração de cálcio liberado e unidades aleatórias de fluorescência. O teste post-hoc de Gammes-Howell foi utilizado para determinar entre quais grupos as diferenças estatísticas puderam ser observadas. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para determinar relação entre as variáveis *concentração de cálcio liberado antes e após a terapia fotodinâmica*, bem como entre *concentração de cálcio liberado após a terapia fotodinâmica e profundidade de lesão*, além de *perda mineral integrada*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados representativos de diferença estatística significativa.

4 Resultados

4 RESULTADOS

Durante a primeira etapa do estudo foi observada a influência da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade das células planctônicas de *S. mutans* UA159. O teste de viabilidade foi realizado pela utilização de solução de resazurina a 0,039%. Pela expressão descrita no capítulo Material e Métodos, a porcentagem de redução do número de bactérias viáveis pôde ser calculada. Os resultados são expressos em porcentagem com seus respectivos valores de desvio-padrão (Tabela 3). Pela análise dos dados, uma relação de dose-dependência em relação ao tratamento fotodinâmico pode ser observada. Os valores mínimos de redução da viabilidade bacteriana foram obtidos apenas quando a fonte de luz LED foi utilizada isoladamente, sem a associação com o fotossensibilizador (4,5-12,7%). Os valores máximos de redução foram observados entre as amostras tratadas com Photogem® a 0,5 mg/mL, com aumento diretamente proporcional à densidade de energia luminosa utilizada (73,6-91,1%).

Tabela 3 – Porcentagem de redução de células bacterianas viáveis ($\pm$ desvio-padrão) após o tratamento de suspensões de *S. mutans* UA159 por diferentes parâmetros da terapia fotodinâmica. Valores determinados pela utilização de resazurina

Photogem® (mg/mL)	Densidade de energia (J/cm ²)						
	0	12	24	36	48	60	72
0	0 $\pm$ 0	6,7 $\pm$ 6,3	6,8 $\pm$ 6,4	6,0 $\pm$ 5,0	12,7 $\pm$ 8,8	4,5 $\pm$ 9,4	10,9 $\pm$ 8,6
0,0625	17,2 $\pm$ 9,1	11,6 $\pm$ 8,0	14,1 $\pm$ 10,7	9,8 $\pm$ 14,6	13,2 $\pm$ 15,5	20,7 $\pm$ 18,3	36,7 $\pm$ 18,4
0,125	26,5 $\pm$ 9,6	28,7 $\pm$ 12,7	30,2 $\pm$ 13,2	35,4 $\pm$ 15,1	42,9 $\pm$ 17,6	56,8 $\pm$ 13,3	68,8 $\pm$ 10,1
0,25	50,2 $\pm$ 9,3	46,6 $\pm$ 12,6	52,7 $\pm$ 13,4	57,3 $\pm$ 13,8	67,4 $\pm$ 10,7	78,8 $\pm$ 6,6	84,2 $\pm$ 3,9
0,375	60,4 $\pm$ 11,5	63,6 $\pm$ 12,4	61,5 $\pm$ 11,4	75,1 $\pm$ 10,2	83,1 $\pm$ 6,3	78,9 $\pm$ 7,3	88,5 $\pm$ 2,7
0,5	73,6 $\pm$ 8,1	73,6 $\pm$ 9,2	77,4 $\pm$ 10,2	83,5 $\pm$ 7,6	89,9 $\pm$ 3,7	91,1 $\pm$ 2,3	90,5 $\pm$ 2,3

Baseado nos resultados dos testes de viabilidade por fluorescência, duas concentrações de Photogem[®] (0,125 mg/mL e 0,375 mg/mL) e duas densidades de energia da Biotable[®] (48 e 72 J/cm²) foram escolhidas para serem combinadas entre si, com o intuito de observar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre a contagem de UFC de células planctônicas de *S. mutans* UA159. Pela análise dos resultados expressos na Figura 4, pode-se notar que as contagens do grupo controle ($5,68 \pm 4,56 \log_{10}$) e dos grupos submetidos apenas ao tratamento com o LED vermelho a 48 J/cm² ($5,7 \pm 4,67 \log_{10}$) e 72 J/cm² ($5,66 \pm 4,82 \log_{10}$) foram estatisticamente semelhantes (ANOVA a um critério e teste post-hoc Games-Howell, $p < 0,05$). Quando apenas o fotossensibilizador foi utilizado, sem a associação do LED, reduções significativas da contagem de CFU foram observadas ($4,9 \pm 4,15 \log_{10}$ para 0,125 mg/mL e $4,22 \pm 4,24 \log_{10}$ para 0,375 mg/mL) em relação aos grupos controle e sem utilização de fotossensibilizador. Entretanto, o aumento da concentração de Photogem[®] não diminuiu o número de bactérias de forma significativa. Quando a luz LED foi associada ao fotossensibilizador, a redução da viabilidade bacteriana foi dose-dependente, sendo tão maior quanto o aumento da concentração do fotossensibilizador e densidade de energia da fonte de luz LED. As reduções notadas foram: $3,57 \pm 3,2 \log_{10}$ para o grupo Photogem[®] a 0,125 mg/mL associado ao LED a 48 J/cm²; $2,59 \pm 2,65 \log_{10}$ para o grupo Photogem[®] a 0,125 mg/mL associado ao LED a 72 J/cm²; $0,97 \pm 0,65 \log_{10}$ para o grupo Photogem[®] a 0,375 mg/mL associado ao LED a 48 J/cm²; métodos utilizados não foram capazes de identificar UFC para o grupo Photogem[®] a 0,375 mg/mL associado ao LED a 72 J/cm². Foram notadas diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos de associação entre fotossensibilizador e LED (ANOVA a um critério e teste post-hoc Games-Howell, $p < 0,05$).

Figura 4 – Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *S. mutans* UA159 após o tratamento de células bacterianas planctônicas por quatro diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Terço cervical da superfície vestibular dos dentes das crianças pertencentes aos grupos G1 e G2 estão representados na tabela 23.

Figura 5 - Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *S. mutans* UA159 provenientes de biofilmes crescidos durante 24 h, 48 h, 72 h, 144 h, 168 h e 196 h. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$).

Na segunda etapa do estudo, biofilme de *S. mutans* UA159 cresceu sobre discos de dentina por diferentes períodos de tempo. Pela determinação das contagens de UFC de *S. mutans* (Figura 5), pode-se notar que a partir de 48 h de formação do biofilme ($9,42 \pm 9,16 \log_{10}$), as contagens da bactéria foram sempre significativamente maiores que aquela observada após 24 h de formação do biofilme ($8,6 \pm 8,25 \log_{10}$). Entretanto, os valores se mantiveram estáveis até 192 h de formação do biofilme ($9,42$ - $9,81 \log_{10}$) (ANOVA a um critério e teste post-hoc Games-Howell, $p < 0,05$).

Figura 6 – Imagens obtidas após o processamento microrradiográfico de discos de dentina submetidos ao processo de desmineralização mediado por *S. mutans* UA159 durante 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C), 144 h (D), 168 h (E) e 192 h (F) (ampliação 10X).

Figura 7 – Análise do conteúdo mineral (%vol) de amostras de discos de dentina submetidas ao processo de desmineralização mediado por *S. mutans* UA159 pelo período de 24 h, 48 h, 72 h, 144 h, 168 h e 196 h.

Logo depois das coletas de amostras do biofilme de *S. mutans* para a análise do número de UFC, os discos de dentina foram processados e analisados pela técnica de microrradiografia transversal. Pela análise das figuras 6 e 7, os valores de porcentagem de perda volumétrica do conteúdo mineral e da profundidade de lesão progrediram em função do tempo de formação do biofilme. A progressão da perda mineral integrada (PMI, vol% x μm) (Figura 9) e profundidade de lesão (PL, μm) (Figura 10) também foram dependentes do tempo de formação do biofilme. Entretanto, em ambas as análises, não foram notadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de 48 h (PMI: 3529±886 vol% x μm, PL: 114,2±24,6 μm) e 72 h (PMI: 4186±1099 vol% x μm, PL: 146,1±20,1 μm) de formação do biofilme, bem como entre os períodos de 144 h (PMI: 6476±754 vol% x μm, PL: 218,2±24,2 μm) e 168 h (PMI: 7408±2267 vol% x μm, PL: 254,3±38,5 μm) e

168 h e 192 h (PMI: 8634 ± 2328 vol% x μm , PL: $291,7 \pm 52$ μm) (ANOVA a um critério e teste post-hoc Games-Howell, $p > 0,05$). Além disso, pode-se notar uma tendência de aumento progressivo dos valores relativos de desvio-padrão ao longo do tempo.

Figura 8 – Análise comparativa da perda mineral integrada (vol% x μm) entre discos de dentina submetidos ao processo de desmineralização mediado pelo crescimento de biofilme de *S. mutans* UA159 durante 24 h, 48 h, 72 h, 144 h, 168 h e 196 h. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 9 – Resultados referentes a profundidade de lesão (μm) em discos de dentina submetidos ao processo de desmineralização mediado pelo crescimento de biofilme de *S. mutans* UA159 durante 24 h, 48 h, 72 h, 144 h, 168 h e 196 h. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Na terceira etapa do estudo, biofilme de *S. mutans* foi cultivado sobre discos de dentina em condições ideais de pH por 24 h. Logo em seguida, as amostras de biofilme foram tratadas por dois diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica e as amostras foram novamente incubadas, mas dessa vez em um meio sem adição de agente tamponador. A contagem de UFC em seguida e 24 h após a sessão de TFD, bem como a análises de conteúdo mineral, perda mineral integrada, profundidade de lesão e concentração de cálcio liberado foram realizadas. Logo após a realização da sessão de terapia fotodinâmica, a contagem das UFC entre os grupos controle ($7,91 \pm 0,25 \log_{10}$), grupo sensibilizado apenas pelo uso de fotossensibilizador sem associação com a fonte LED ($7,64 \pm 0,13 \log_{10}$) e grupos tratados apenas pela fonte de luz LED em duas diferentes densidades de energia ($75 \text{ J/cm}^2 - 7,9 \pm 0,18 \log_{10}$ e

150J/cm² – 7,39±0,17 log10) foram similares e não diferiram entre si estatisticamente ($p>0,05$). Porém, uma grande diferença foi observada entre as contagens de UFC dos grupos citados anteriormente e aqueles cujos tratamentos fotodinâmicos envolveram a associação do fotossensibilizador com uma das duas densidades de energia utilizadas (75 J/cm² – 4,8±0,49 log10 e 150 J/cm² – 4,1±0,48 log10) (Figura 10). Quando as contagens de UFC dos grupos A, B, C e D foram comparadas com aquelas dos grupos E e F, diferenças estatísticas foram observadas (ANOVA a um critério e teste post-hoc Games-Howell, $p>0,05$). Entretanto, quando os grupos E e F foram comparados entre si, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$).

Figura 10 – Contagem das UFC provenientes de biofilme de *S. mutans* UA159 após o tratamento com diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica. Os diferentes tratamentos foram realizados de acordo com o grupo que as amostras pertenciam: A (controle), B (0 mg/mL + 75 J/cm²), C (0 mg/mL + 150 J/cm²), D (0,25 mg/mL + 0 J/cm²), E (0,25 mg/mL + 75 J/cm²) e F (0,25 mg/mL + 150 J/cm²). Colunas brancas indicam contagem de CFU logo após o procedimento de TFD e colunas cinzas indicam contagem de CFU após 24 h do procedimento de TFD. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p<0,05$) podem ser observadas por letras maiúsculas diferentes (colunas brancas) e quantidades diferentes de asterisco (coluna cinza).

Após o período de 24 h da realização da sessão de terapia fotodinâmica, foi observada a continuação do crescimento bacteriano entre os grupos que não foram tratados pela associação de fotossensibilizador e fonte de luz, enquanto que nos grupos tratados pela referida associação, as bactérias voltaram a crescer, elevando a contagem das UFC para níveis ainda maiores que aqueles observados previamente ao tratamento (Figura 10). As contagens de UFC após 24 h da realização da sessão de TFD foram: A ($8,68 \pm 0,17$), B ($8,57 \pm 0,25$), C ($8,63 \pm 0,11$), D ($8,67 \pm 0,18$), E ($8,19 \pm 0,43$) e F ($7,80 \pm 0,44$). Quando as contagens de UFC dos grupos A, B, C e D foram comparadas àquelas dos grupos E e F, diferenças estatísticas foram observadas (ANOVA a um critério e teste post-hoc Games-Howell, $p > 0,05$). Entretanto, quando os grupos E e F foram comparados entre si, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Pela análise das figuras 11 e 12, os valores de porcentagem de perda volumétrica do conteúdo mineral e da profundidade de lesão variaram de acordo com o grupo de estudo. Pode-se notar um acentuado controle do processo de desmineralização nas imagens 12-F (Photogem[®] 0,25 mg/mL associado à LED 75 J/cm²) e 12-G (Photogem[®] 0,25 mg/mL associado à LED 150 J/cm²), em relação às outras imagens apresentadas. Os dados referentes à perda mineral integrada (PMI, vol% x μm) (Figura 13), profundidade de lesão (PL, μm) (Figura 14) e concentração de cálcio liberada (mg/dL) (Figura 15) também foram dependentes do tratamento ao qual o biofilme foi submetido. Quando os valores de PMI, PL e cálcio liberado dos grupos A, B, C e D foram comparados àquelas dos grupos E e F, diferenças estatísticas foram observadas (ANOVA a um critério e teste post-hoc Games-Howell, $p > 0,05$). Entretanto, quando os grupos E e F foram comparados entre si, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$), o que também foi observado quando os grupos A, B, C e D foram comparados.

Figura 11 – Conteúdo mineral (%vol) e respectivas imagens microrradiográficas de discos de dentina bovina submetidos ao processo de desmineralização mediado por biofilme de *S. mutans* UA159, após diferentes condições de tratamento pelo uso da TFD (A - controle, B – sem tratamento, C - 0 mg/mL + 75 J/cm² e D - 0 mg/mL + 150 J/cm²).

Figura 12 – Conteúdo mineral (%vol) e respectivas imagens microrradiográficas de discos de dentina bovina submetidos ao processo de desmineralização mediado por biofilme de *S. mutans* UA159, após diferentes condições de tratamento pelo uso da TFD (E – 0,25 mg/mL + 0 J/cm², F – 0,25 mg/mL + 75 J/cm², G - 0,25 mg/mL + 150 J/cm²).

Figura 13 – Análise comparativa da perda mineral integrada (vol% x μm) entre os diferentes grupos de estudo (A – sem tratamento, B - 0 mg/mL + 75 J/cm² e C - 0 mg/mL + 150 J/cm², D – 0,25 mg/mL + 0 J/cm², E – 0,25 mg/mL + 75 J/cm², F - 0,25 mg/mL + 150 J/cm²). Diferentes quantidades de asterisco indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$).

O teste de correlação de Pearson observou correlação estatística positiva muito forte entre os resultados de perda mineral integrada (Figura 13) e concentração de cálcio liberada em meio (Figura 15) ($P=0,849$), bem como entre profundidade de lesão (Figura 14) e concentração de cálcio liberada em meio (Figura 15) ($P=0,875$). Além disso, não foi observada correlação positiva entre as concentrações de cálcio liberadas em meio antes e após o tratamento fotodinâmico ($P=0,103$). As concentrações de cálcio liberadas nas primeiras 24 h dessa etapa do estudo foram desprezíveis em relação àquelas observadas após a sessão de TFD (dados não mostrados).

Figura 14 – Análise comparativa da profundidade de lesão (μm) entre os diferentes grupos de estudo (A – sem tratamento, B - 0 mg/mL + 75 J/cm² e C - 0 mg/mL + 150 J/cm², D – 0,25 mg/mL + 0 J/cm², E – 0,25 mg/mL + 75 J/cm², F - 0,25 mg/mL + 150 J/cm²). Diferentes quantidades de asterisco indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 15 – Análise comparativa da concentração de cálcio (mg/dL) em alíquotas de meio de cultura obtidas dos diferentes grupos de estudo (A – sem tratamento, B - 0 mg/mL + 75 J/cm² e C - 0 mg/mL + 150 J/cm², D – 0,25 mg/mL + 0 J/cm², E – 0,25 mg/mL + 75 J/cm², F - 0,25 mg/mL + 150 J/cm²). Diferentes quantidades de asterisco indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 16 – Alterações da intensidade de fluorescência após o tratamento de células planctônicas de *S. mutans* pDM15 com água deionizada e pVA838 com H_2O_2 a 0,005%.

Figura 17 – Alterações da intensidade de fluorescência após o tratamento de células planctônicas de *S. mutans* pDM17 com diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica e diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

Figura 18 – Valores médios da intensidade de fluorescência emitidos por células planctônicas de *S. mutans* pDM17 após o tratamento com diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica e concentrações de peróxido de hidrogênio. Diferenças estatisticamente significativas podem ser observadas entre letras minúsculas (após 30 min da realização dos tratamentos), letras maiúsculas (após 60 min da realização dos tratamentos) e números (após 90 min da realização dos tratamentos) diferentes.

A quarta etapa do estudo teve por objetivo avaliar a capacidade da terapia fotodinâmica em promover estresse às células planctônicas de *S. mutans* UA159 modificadas geneticamente (deleção do gene *VicK*). Para tanto, unidades aleatórias (UA) de fluorescência foram determinadas em citômetro de fluxo. A resposta de pVA838 frente a um estímulo de estresse (H₂O₂ a 0,005%) foi determinada para descartar a autofluorescência bacteriana. A bactéria pDM15 foi utilizada como controle positivo, portanto sendo submetida a um tratamento com baixa produção de estresse (água deionizada). Os resultados podem ser visualizados na Figura 16.

Após submeter suspensões bacterianas de *S. mutans* UA159 (pDM17) a diversos tipos de tratamentos (H₂O₂ a 0,0025%, H₂O₂ a 0,005%, Photogem® a 0,00625%, Photogem® a 0,0125%, Photogem® a 0,00625% associado à luz LED a 4,5 J/cm² e Photogem® a 0,0125% associado à luz LED a 4,5 J/cm²), a condição de

estresse celular foi observada em todas as condições quando comparadas ao tratamento com água deionizada (Figura 17). Apesar dos tratamentos envolvendo associação entre fonte de luz LED e fotossensibilizador terem se mostrado levemente capazes de produzir mais estresse celular, essa diferença não pôde ser constatada estatisticamente (ANOVA a um critério, $p > 0,05$). Porém, quando os valores de unidades aleatórias de fluorescência obtidas após cada tipo de tratamento foram subtraídos daqueles obtidos para a água deionizada, diferenças estatísticas puderam ser identificadas (ANOVA a um critério, post-hoc Games-Howell, $p < 0,05$) (Figura 18). Após 30 min da realização do tratamento, estímulos envolvendo a associação entre LED a $4,5 \text{ J/cm}^2$ e Photogem[®] a 0,0125% e o uso do LED sem associação de fotossensibilizador produziram significativamente maior fluorescência que os tratamentos com Photogem[®] a 0,00625% sem associação de LED e H_2O_2 a 0,0025%. Após 60 min da realização dos tratamentos, estímulos envolvendo a associação entre LED a $4,5 \text{ J/cm}^2$ e Photogem[®] a 0,00625%, LED a $4,5 \text{ J/cm}^2$ e Photogem[®] a 0,0125% e Photogem[®] a 0,0125% sem associação de LED produziram significativamente maior fluorescência que os tratamentos com Photogem[®] a 0,00625% sem associação de LED. Após 90 min da realização do tratamento, a associação entre LED a $4,5 \text{ J/cm}^2$ e Photogem[®] a 0,0125% produziu significativamente maior fluorescência que o uso do LED sem associação de fotossensibilizador.

5 Discussão

5. DISCUSSÃO

A terapia fotodinâmica consiste em mais uma modalidade de tratamento antimicrobiano que pode ser utilizada no controle de doenças bucais, como doença periodontal, candidíase e cárie dentária. O conjunto de vantagens oferecidas por esse método está relacionado à associação de um eficiente controle da contagem dos microrganismos viáveis com sua relativa ação inespecífica, o que teoricamente dificultaria a seleção de microrganismos resistentes (WILSON, 2004). A utilização de fonte de luz como componente técnico pode ser referido como vantagem, já que em regiões de difícil acesso, a luz poderia penetrar mais facilmente, produzindo aumento da qualidade do controle microbiológico. Além disso, a técnica é de fácil execução e baixo custo. Por mais caros que pareçam os agentes fotossensibilizantes, as concentrações e quantidades utilizadas são bastante pequenas, já que a técnica é destinada ao tratamento local de microcosmos específicos da cavidade bucal, como bolsas periodontais, lesões de cárie em dentina, canais radiculares ou superfícies de implantes dentários. Caso a concentração final da solução de Photogem[®] seja a mesma utilizada no presente estudo (0,25 mg/mL), aproximadamente 1000 aplicações com volume igual a 1 mL poderiam ser produzidas.

O presente estudo se propôs a estudar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre o controle de células planctônicas e biofilme de *S. mutans* cultivados *in vitro*. Quando células planctônicas foram estudadas, o meio de cultura foi diferente daquele utilizado durante o crescimento de biofilmes. O meio SDMY, ou meio semi-definido com adição de extrato de levedura e suplementação com aminoácidos e vitaminas, propicia condições de crescimento bacteriano adequadas devido a sua alta concentração de fosfatos, permitindo um controle facilitado de pH e, conseqüentemente, melhorando a padronização dos procedimentos. Além disso, o meio *SDMY assay*, incolor devido à ausência de riboflavina e extrato de levedura em sua composição, foi utilizado para a lavagem e re-suspensão dos *pellets* bacterianos antes da realização dos procedimentos de terapia fotodinâmica. Essa etapa é importante para que os corantes do meio de cultura não interfiram na passagem da luz durante a irradiação. Como o meio *SDMY assay* possui a mesma composição que o meio de cultura utilizado, prejuízos à viabilidade celular bacteriana foram

evitados, ao contrário do que seria observado pela utilização de solução salina e/ou PBS. O mesmo raciocínio deve ser levado em consideração nos momentos de dispersão do biofilme por sonicação e lavagem para a remoção de células bacterianas não aderidas. Os meios utilizados nas referidas fases não podem comprometer a viabilidade das células bacterianas, sob risco de mascaramento das diferenças do controle microbiológico produzido por diferentes agentes, ou supervalorização dos efeitos de substâncias isoladas. Ao mesmo tempo, o meio não pode ser enriquecido o suficiente para permitir um aumento no número celular em curto período de tempo. O meio CPW obedece perfeitamente todas as características descritas anteriormente e, por isso, foi utilizado para tais finalidades.

A dispersão das células bacterianas contidas no biofilme foi realizada pelo processo de sonicação. O método é bastante seguro, pois não exige a manipulação direta do biofilme. Além disso, por permitir a remoção das células aderidas em quase sua totalidade, os resultados são mais fidedignos em relação às contagens de Unidades Formadoras de Colônia. O mesmo não ocorre quando espátulas plásticas, brocas de aço ou swab são utilizados para a coleta do biofilme. Tais procedimentos facilitam a contaminação do biofilme e não possibilitam adequada colheita de células. Mesmo quando a massa de biofilme coletada (mg) é usada para determinar a contagem de CFU por miligrama de material coletado, o processo deveria ser considerado inadequado, já que não leva em consideração a tridimensionalidade do biofilme. O uso de espátulas plásticas, por exemplo, pode predispor apenas a remoção das células organizadas mais superficialmente no biofilme. Ainda, em estudos envolvendo a análise do processo de desmineralização, principalmente em casos envolvendo acentuada perda mineral, o contato mecânico de raspadores ou curetas com espécimes de esmalte ou dentina poderiam conduzir a perda das superfícies mais externas dos tecidos estudados.

O modelo para crescimento de biofilme denominado “Active Attachment Model ACTA – Amsterdam” foi utilizado para crescimento de biofilme de *S. mutans* UA159. Quando o presente modelo é comparado a outros apresentados previamente na literatura, algumas vantagens podem ser destacadas. A primeira delas é em relação à possibilidade de crescimento do biofilme sobre diferentes tipos de substratos. Por ser constituído por materiais passíveis de esterilização (aço inoxidável e grampos de poliestireno), portanto passíveis de reaproveitamento, o

AAMA-Amsterdam pode ser montado pela utilização de lâminas de vidro, discos de hidroxiapatita e titânio, discos ou blocos de dentina e esmalte. A tradução literal do nome do modelo (“modelo de adesão ativa”) reflete a sua principal característica, a formação ativa de biofilme. Em modelos como o desenvolvido por Guggenheim, Giertsen *et al.* (2001), o substrato não é posicionado no topo do modelo, mas sim ao seu fundo. Esse processo facilita a deposição passiva de células bacterianas. Teoricamente, o perfil metabólico de biofilmes formados ativamente seria completamente diferente daquele formado passivamente. Biofilmes formados pela simples deposição de bactérias não podem ser considerados representativos em relação aos processos de crescimento de biofilme que ocorrem dentro da cavidade bucal. O modelo caracterizado pela presença de estruturas cônicas de polietileno inseridas em uma tampa do mesmo material é também bastante prático do ponto de vista funcional, além de permitir formação ativa de diferentes tipos de biofilme bacteriano. Porém, seu uso se limita a um único substrato. Outra grande vantagem do AAMA-Amsterdam é permitir o crescimento e/ou tratamento simultâneos de biofilmes em diferentes condições, o que não é possível pela utilização do modelo de biofilme crescido em CDFF (*Constant Depth Film Fermentor*). A falta da exigência de manipulação direta dos espécimes em nenhuma fase do processo de crescimento, tratamento e coleta do biofilme previne a contaminação e perda de células viáveis.

Entretanto, desvantagens também podem ser observadas no presente modelo. A formação de bolhas de ar pode ocorrer no momento da inserção dos espécimes dentro do meio de cultura. Esse processo ocorre mais comumente dentre espécimes secos, devido a sua hidrofobicidade. Portanto, essa desvantagem pode ser contornada pelo umedecimento prévio dos espécimes em meio de cultura seguido pelo deslocamento e reposicionamento do modelo sobre a placa de 24 poços contendo os meios de cultura. Além disso, a agitação manual do modelo por alguns minutos auxilia na eliminação de bolhas de ar formadas após a inserção dos espécimes. É importante que bolhas de ar não sejam observadas durante o processo de crescimento de biofilmes, pois podem comprometer a relação biofilme/superfície estudada. O biofilme pode ser formado ao redor de espaços aéreos, não permitindo um processo uniforme de perda mineral em tecidos mineralizados. Outra desvantagem do modelo AAMA-Amsterdam é a impossibilidade

de simulação dos efeitos de fluxo salivar ou controle eficiente de pH. A circulação constante de meios de cultura fresco e agentes tamponadores facilita o controle das condições de crescimento do biofilme, além de atuarem mecanicamente sobre as células aderidas nas superfícies estudadas.

O equipamento-conceito Biotable[®], desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos-USP, foi extremamente importante na padronização dos procedimentos envolvendo a terapia fotodinâmica. A capacidade de desenvolvimento de diodos emissores de luz em diferentes formatos e áreas propiciou a adequação da fonte de luz aos modelos de estudo propostos. Todas as amostras de biofilme crescidas sobre discos de dentina inseridos no mesmo modelo AAMA-Amsterdam puderam ser irradiadas ao mesmo tempo. Essa característica possibilitou diminuir e padronizar o tempo que as amostras permaneceram fora dos seus respectivos meios de cultura, bem como evitar diferenças entre os períodos de pré-irradiação. Porém, as densidades de energia produzida em diferentes pontos do equipamento poderiam ser diferentes, o que comprometeria a análise dos resultados alcançados. Um estudo piloto foi realizado exclusivamente para a eliminação da possibilidade desse viés, sendo que não foi observada influência do equipamento sobre os resultados (dados não mostrados). Mesmo assim, as amostras pertencentes aos diferentes grupos de estudo foram aleatoriamente distribuídas no modelo de crescimento de biofilme e, conseqüentemente, os procedimentos de irradiação foram realizados em posições similares em todos os diferentes grupos de estudo.

O espectro de absorção eletrônica de derivados de hematoporfirina é composto por cinco bandas, uma mais intensa na região de 370 nm, denominada banda de Soret, e quatro bandas de menor intensidade em maiores comprimentos de onda, as bandas Q. O Photogem[®] absorve elétrons mais intensamente em 369 nm (banda de Soret), e bandas Q em 507, 540, 570 e 620 nm. O comprimento de onda utilizada no presente estudo variou entre 610 nm e 650 nm, na faixa de emissão do vermelho visível. Essa faixa de emissão está localizada na chamada “janela terapêutica” (600-800 nm), região espectral na qual a luz é menos absorvida por componentes bioquímicos dos organismos vivos, como água, proteínas e DNA (Menezes, 2006), teoricamente aumentando a capacidade de penetrabilidade da luz. A reação de fotodegradação do fotossensibilizador é essencial para a geração de

fotoprodutos, capazes de aumentar a produção de agentes oxidativos e citotóxicos celulares. Por ser dependente da mediação de concentrações mínimas de oxigênio reativo, a fotodegradação determina o balanço entre a eficiência citotóxica e citotoxicidade colateral (ROTOMSKIS, BAGDONAS *et al.*, 1996).

Para nosso conhecimento, além do presente estudo, apenas Giusti, Santos-Pinto *et al.* (2008) exploraram a influência da associação entre um fotossensibilizador (Photogem[®]) e uma fonte de luz complementar em banda Q (LED vermelho visível, com comprimento de onda centrado em 630 nm) sobre biofilmes dentários crescidos *in vitro*. Levando-se em consideração a proposta fundamental do presente estudo, enfocada na utilização da terapia fotodinâmica em tratamentos minimamente invasivos de lesões de cárie dentária, com o intuito de diminuição da carga bacteriana local com a menor remoção mecânica de tecidos dentários, a fotodegradação do Photogem[®] em banda Q pode contribuir na eliminação de microrganismos locais com a menor toxicidade para células adjacentes, como as células pulpares. Tal característica pode ser explicada pela menor eficiência de produção de fotoprodutos pela mesma reação de fotodegradação (MENEZES, 2006).

Na primeira fase do estudo, a viabilidade celular bacteriana foi determinada pela utilização da resazurina. O princípio dessa técnica é explicado pela redução do agente resazurina em resofurina pela transferência de elétrons provenientes da enzima mitocondrial NADPH desidrogenase, portanto dependente do metabolismo de células viáveis. O produto da redução pode ser captado em comprimentos de onda específicos em espectrofotometria. (PETTIT, WEBER *et al.*, 2009) observaram forte correlação entre os valores expressos pelos testes de viabilidade celular por resazurina e a contagem de UFC de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Trata-se de um mecanismo bastante eficiente, prático e de baixo custo para estudo dos efeitos de agentes antimicrobianos sobre células planctônicas e biofilmes. Pela análise dos presentes resultados, torna-se clara a relação entre a contagem de UFC de células planctônicas de *S. mutans* UA159 e os valores de fluorescência captados em espectrofotometria após utilização de resazurina.

Pelos resultados observados na segunda fase do estudo, pode-se notar uma relação entre os valores de desvio-padrão de ambos os parâmetros avaliados, profundidade de lesão e perda mineral integrada, e o tempo de crescimento do

biofilme. Além disso, PL e PMI dos discos de dentina submetidos ao processo de desmineralização por 24 h foram estatisticamente menores que após 48 h. A evolução do processo, entretanto, não se mostrou significativo após 72 h. Baseado nestes achados, quanto menor o tempo de análise dos parâmetros de perda mineral, mais precisos e eficientes poderiam ser os resultados. Somada a essa observação, na terceira etapa do estudo, o potencial de recrescimento do biofilme em 24 h após tratamento com diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica influenciou consideravelmente na determinação do tempo de estudo. Para que diferenças estatísticas em relação ao controle do processo de desmineralização pudessem ser notadas, as diferentes amostras de biofilme foram tratadas e acompanhadas por 24 h em meio de cultura sem agente tamponador. Acima desse período, a perda mineral dos grupos tratamento poderia ser acentuada, dificultando a observação de padrões específicos de controle da perda mineral. Além disso, o crescimento do biofilme em meio de cultura tamponado, anteriormente ao tratamento fotodinâmico, permitiu maior padronização do número de células bacterianas e impediu discrepâncias iniciais em relação aos padrões de mineralização das diferentes amostras.

Inicialmente, a proposta do presente estudo contemplaria a análise do efeito de repetidas sessões de terapia fotodinâmica sobre a progressão do processo de desmineralização. Porém, pelo presente modelo de estudo e baseado nos resultados de contagem de UFC e controle da perda mineral observados na segunda e terceira etapas, sessões repetidas de TFD apenas seriam capazes de diminuir a contagem das células bacterianas viáveis por um determinado período de tempo (≈ 24 h), dificilmente demonstrando um efeito somatório dos múltiplos tratamentos. Obviamente, o padrão de perda mineral seria controlado, porém fruto do resultado de controle individual observado em cada sessão. Tal constatação, entretanto, não pode significar que repetidas aplicações de TFD em situações clínicas não sejam eficientes para a melhoria do controle microbiológico, principalmente porque o acesso das bactérias aos nutrientes e ao oxigênio estaria comprometido pela interposição de um material restaurador.

Quando resultados do controle microbiológico promovido pela TFD sobre células planctônicas (primeira etapa) são comparados com aqueles obtidos pelo tratamento de biofilme de *S. mutans* UA159 (terceira etapa), pontos importantes

podem ser destacados. Primeiramente, uma redução de aproximadamente 50% na viabilidade de células planctônicas pôde ser observada quando uma concentração de 0,25 mg/mL de Photogem® foi utilizada isoladamente, sem associação com qualquer fonte de luz. Resultado completamente diferente foi observado sobre o biofilme de *S. mutans* UA159, onde a ação isolada do fotossensibilizador foi praticamente nula. Além disso, o efeito de dose-dependência da TFD foi mais pronunciado sobre células planctônicas. O aumento da densidade de energia de 75 J/cm² para 150 J/cm² não foi capaz de produzir redução significativa na contagem de bactérias viáveis provenientes de diferentes amostras de biofilme de *S. mutans*. Os resultados de redução da viabilidade de células bacterianas foram similares àqueles obtidos pelos estudos de (FONTANA, ABERNETHY *et al.*, 2009; LIMA, SAMPAIO DE MELO *et al.*, 2009), guardando-se as diferenças metodológicas, especialmente referentes aos tipos de biofilmes estudados.

Os mecanismos de ação da terapia fotodinâmica podem explicar sua relativa ação inespecífica. A produção de radicais livres pela transferência de elétrons às moléculas locais vizinhas, ou a cessão de energia às moléculas de oxigênio podem ocorrer nos ambientes intra ou extracelulares. Porém, a habilidade de determinados tipos bacterianos em formar biofilmes mais complexos ou a afinidade celular por tipos específicos de agentes fotossensibilizantes poderiam explicar os diferentes resultados obtidos após a utilização da técnica. O estudo da TFD sobre diferentes cepas da mesma bactéria provavelmente devem produzir resultados de controle microbiológico diferentes. Por exemplo, quando diferentes cepas bacterianas são isoladas clinicamente, características específicas como capacidade de formação de biofilme e produção de polissacarídeos extracelulares podem comprometer a adequada comparação dos resultados de diferentes estudos. (DUGGAN e SEDGLEY, 2007) observaram que a capacidade de *Enterococcus faecalis* ER5/1 em produzir biofilme é muito maior que a de *E. faecalis* OS16, o que influenciaria nos resultados de agentes antimicrobianos contra as duas cepas específicas. *S. mutans* C180-2 são capazes de produzir maior quantidade de polissacarídeos extracelulares que *S. mutans* UA159 durante o mesmo período de crescimento do biofilme. A maior espessura do biofilme altera a ação de agentes antimicrobianos, devido à menor penetrabilidade das substâncias pela matriz extracelular e alteração do perfil metabólico das células presentes em camadas mais

profundas, com maior privação de nutrientes e oxigênio (ANDERSON e O'TOOLE, 2008).

O presente estudo destaca-se pela associação do controle do processo de desmineralização *in vitro* pela utilização da TFD. Pela análise dos dados referentes à profundidade de lesão e perda mineral integrada, faz-se notar a nítida correlação entre a realização dos procedimentos fototerapêuticos, associados à utilização de um fotossensibilizador, e uma menor perda mineral. Mesmo que o aumento da densidade de energia não tenha refletido em aumento significativo do controle da desmineralização, observa-se uma tendência nesse sentido. A associação com o controle microbiológico é expressiva, o que denota validação do modelo estudado para tal finalidade. Além disso, uma importante correlação foi obtida pela metodologia proposta. O estudo da concentração de cálcio liberado em meio de cultura durante o processo de desmineralização obedeceu a um padrão similar àquele observado pela análise microrradiográfica transversal (TMR). Sabe-se que a análise da concentração de cálcio em meio é mais sensível na detecção da perda mineral que a técnica microrradiográfica. Além disso, a concentração de cálcio reflete a totalidade do processo de desmineralização, enquanto a TMR tece suas análises baseada em imagens obtidas de pontos específicos da superfície mineral. Ambas as técnicas são complementares para a exclusão de qualquer chance de viés durante a análise dos resultados.

Recentes estudos têm buscado compreender a habilidade do *Streptococcus mutans* em se adaptar a ambientes inóspitos ao seu crescimento e metabolismo (SENADHEERA, LEE *et al.*, 2007). O sistema VicRK tem sido alvo destas investigações, pois ele compõe um dos 13 sistemas TCRS (sistema regulador de dois componentes) (SENADHEERA, GUGGENHEIM *et al.*, 2005). Este sistema está envolvido na regulação da expressão de genes ligados a maior virulência bacteriana, como *gtfBCD*, *gbpB* e *ftf*, interferindo na formação do biofilme, produção de polissacarídeos extracelulares e no desenvolvimento da competência genética bacteriana (SENADHEERA, GUGGENHEIM *et al.*, 2005). Deng, Liu *et al.* (2007) observaram a modulação da expressão da proteína-informante verde fluorescente em função da produção de estresse oxidativo no interior de *S. mutans* com deleção do gene VicK. O mecanismo de ação da terapia fotodinâmica constitui-se na promoção de estresse oxidativo celular pela produção de óxidos reativos (FEUERSTEIN,

GINSBURG *et al.*; KONOPKA e GOSLINSKI, 2007). O presente estudo observou a modulação da expressão da proteína GFP por diferentes parâmetros de TFD e diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Os valores das unidades aleatórias de fluorescência foram discretamente mais elevados após a associação entre fonte de luz e fotossensibilizador, mesmo que diferenças estatísticas não tenham sido observadas. Além disso, comparada ao nível de estresse produzido pelo peróxido de hidrogênio, a TFD mostrou-se similar, o que corrobora com a grande capacidade dessa técnica em produzir óxidos reativos.

Resultados obtidos pela utilização da TFD sobre o controle de bactérias orais são bastante promissores. Entretanto, a carência do número de estudos bem delineados e a grande variabilidade de parâmetros técnicos encontrados, como diferentes associações de tipos de fotossensibilizadores e fontes de luz, interferem no nível de evidência acumulada até os dias atuais. O estudo sobre a influência da TFD em bactérias que ainda permanecem viáveis, pelas análises metabólicas e proteômicas, poderia constituir campo profícuo para futuras discussões sobre a técnica. Além disso, a avaliação mais aprofundada dos processos citotóxicos e possíveis efeitos colaterais envolvendo a TFD poderiam aumentar a segurança de sua utilização clínica.

6 Conclusões

6. CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A terapia fotodinâmica foi eficiente na redução da contagem de células planctônicas viáveis de *S. mutans* UA159, bem como na redução da viabilidade de células organizadas em biofilme;
- O modelo “*Active Attachment Model ACTA – Amsterdam*” demonstrou ser viável para o estudo dos processos de desmineralização *in vitro* mediados por bactérias;
- Dois diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica, Photogem® a 0,25 mg/mL associado ao LED 75 J/cm² e Photogem® a 0,25 mg/mL associado ao LED 150 J/cm², foram capazes de controlar o conteúdo mineral, a perda mineral integrada, a profundidade de lesão e a concentração de cálcio liberada em meio de cultura por amostras de dentina bovina em relação aos grupos controle. O efeito de dose-dependência foi discreto, não sendo observadas diferenças estatisticamente significantes;
- Em relação ao grupo controle, diferentes parâmetros de terapia fotodinâmica, além dos usos isolados da fonte de luz e fotossensibilizador foram eficientes em produzir estresse oxidativo às células planctônicas de *S. mutans* UA159 com deleção do gene *VicK*, processo observado pela expressão da proteína GFP. Além disso, o estresse produzido pela TFD e peróxido de hidrogênio foram similares.

Referências

REFERÊNCIAS

ANDERSON, G.; O'TOOLE, G. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* [S.l.], v. 322, p. 85-105, 2008.

BAEHNI, P.; TAKEUCHI, Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis* [S.l.], v. 9 Suppl 1, p. 23-9, 2003.

BHATTI, M. *et al.* Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochemistry and Photobiology* [S.l.], v. 65, n. 6, p. 1026-1031, 1997.

BOUE, D. *et al.* A bacteriological study of rampant caries in children. *J Dent Res* [S.l.], v. 66, n. 1, p. 23-8, Jan 1987.

BOWDEN, G.; LI, Y. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* [S.l.], v. 11, n. 1, p. 81-99, Apr 1997.

BURNS, T. *et al.* Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* [S.l.], v. 29, n. 3, p. 192-7, 1995.

DENG, D. *et al.* The VicRK system of *Streptococcus mutans* responds to oxidative stress. *J Dent Res* [S.l.], v. 86, n. 7, p. 606-10, Jul 2007.

DUGGAN, J.; SEDGLEY, C. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* [S.l.], v. 33, n. 7, p. 815-8, Jul 2007.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. Cariologia clínica e a dentística operatória no século XXI. In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. (Ed.). *Cárie dentária: a doença e seu tratamento*. São Paulo: Editora Santos, 2005. p. 3-6.

FEUERSTEIN, O. *et al.* Mechanism of visible light phototoxicity on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Photochem Photobiol* [S.l.], v. 81, n. 5, p. 1186-9.

FONTANA, C. *et al.* The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res* [S.l.], Jul 2009.

-
- GEORGAKOUDI, I. *et al.* The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. *Photochem Photobiol* [S.l.], v. 65, n. 1, p. 135-44, Jan 1997.
- GIUSTI, J. *et al.* Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg* [S.l.], v. 26, n. 4, p. 281-7, Aug 2008.
- GUGGENHEIM, B. *et al.* Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* [S.l.], v. 80, n. 1, p. 363-70, Jan 2001.
- HOJO, K. *et al.* Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* [S.l.], v. 88, n. 11, p. 982-90, Nov 2009.
- KEIJSER, B. *et al.* Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* [S.l.], v. 87, n. 11, p. 1016-20, Nov 2008.
- KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* [S.l.], v. 86, n. 8, p. 694-707, Aug 2007.
- LIMA, J. *et al.* Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci* [S.l.], v. 117, n. 5, p. 568-74, Oct 2009.
- LO, E. *et al.* Arresting dentine caries in Chinese preschool children. *Int J Paediatr Dent* [S.l.], v. 8, n. 4, p. 253-60, Dec 1998.
- MACROBERT, A. *et al.* What are the ideal photoproperties for a sensitizer? *Ciba Found Symp* [S.l.], v. 146, p. 4-12; discussion 12-16, 1989.
- MALIK, Z. *et al.* The bactericidal activity of a deuteroporphyrin-hemin mixture on gram-positive bacteria. A microbiological and spectroscopic study. *J Photochem Photobiol B* [S.l.], v. 6, n. 4, p. 419-30, Aug 1990.
- MENEZES, P. F. C. *Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser.* (2006). 157 f. (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

MERTZ-FAIRHURST, E. *et al.* Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Am Dent Assoc* [S.l.], v. 129, n. 1, p. 55-66, Jan 1998.

MIRONOV, A. *et al.* Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. *J Photochem Photobiol B* [S.l.], v. 4, n. 3, p. 297-306, Jan 1990.

NYVAD, B.; KILIAN, M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* [S.l.], v. 95, n. 5, p. 369-80, Oct 1987.

_____. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* [S.l.], v. 24, n. 4, p. 267-72, 1990a.

_____. Microflora associated with experimental root surface caries in humans. *Infect Immun* [S.l.], v. 58, n. 6, p. 1628-33, Jun 1990b.

PANGSOMBOON, K. *et al.* Antibacterial activity of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* HL32 against *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol* [S.l.], v. 51, n. 9, p. 784-93, Sep 2006.

PAULINO, T. *et al.* Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* [S.l.], v. 50, n. 3, p. 353-9, Mar 2005.

PETTIT, R. *et al.* Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [S.l.], v. 8, p. 28, 2009.

RAAB, O. Uber die wirkung fluorizierender stoffe auf infusorien. *Zeit Biol* [S.l.], v. 39, p. 23, 1900.

ROTOMSKIS, R. *et al.* Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. *J Photochem Photobiol B* [S.l.], v. 33, n. 1, p. 61-7, Mar 1996.

ROVALDI, C. *et al.* Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens In vitro. *Antimicrob Agents Chemother* [S.l.], v. 44, n. 12, p. 3364-7, Dec 2000.

- SELWITZ, R. *et al.* Dental caries. *Lancet* [S.l.], v. 369, n. 9555, p. 51-9, Jan 2007.
- SENADHEERA, M. *et al.* A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects gtfBCD, gbpB, and ftf expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol* [S.l.], v. 187, n. 12, p. 4064-76, Jun 2005.
- _____. The *Streptococcus mutans* vicX gene product modulates gtfB/C expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J Bacteriol* [S.l.], v. 189, n. 4, p. 1451-8, Feb 2007.
- TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* [S.l.], v. 42, n. 6, p. 409-18, 2008.
- TÜNGER, O. *et al.* Evaluation of rational antibiotic use. *Int J Antimicrob Agents* [S.l.], v. 15, n. 2, p. 131-5, Jul 2000.
- VAN HOOGLMOED, C. *et al.* Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. *Oral Microbiol Immunol* [S.l.], v. 23, n. 1, p. 43-8, Feb 2008.
- VON TAPPEINER, H. Zur kenntis der lichtwirkenden (fluoreszierenden) stoffe. *Dtsch Med Wochen* [S.l.], v. 1, p. 2, 1904.
- WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* [S.l.], v. 3, n. 5, p. 412-8, May 2004.
- WILSON, M.; DOBSON, J. Lethal photosensitization of oral anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* [S.l.], v. 16 Suppl 4, p. S414-5, Jun 1993.
- WILSON, M. *et al.* Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol* [S.l.], v. 25, n. 2, p. 77-81, Aug 1992.
- ZANIN, I. *et al.* Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY* [S.l.], v. 56, n. 2, p. 324-330, AUG 2005 2005.
- _____. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *EUROPEAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES* [S.l.], v. 114, n. 1, p. 64-69, FEB 2006 2006