

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA SOBRE LESÕES DE CÁRIE
EM DENTINA INDUZIDAS EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

MARIA EUGENIA ZANATA MILLEO

São Paulo

2019

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA SOBRE LESÕES DE CÁRIE
EM DENTINA INDUZIDAS EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, sob orientação da Prof.^a Dra. Cintia Helena Coury Saraceni

MARIA EUGENIA ZANATA MILLEO

**São Paulo
2019**

Milleo, Maria Eugenia Zanata.

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre lesões de cárie em dentina induzida em modelo animal / Maria Eugenia Zanata Milleo. - 2019.

13 f. : il. color + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Dentística.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cintia Helena Coury Saraceni.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Cárie. 3. Dentina. 4. Modelo Animal.
- I. Saraceni, Cintia Helena Coury (orientadora). II. Título.

MARIA EUGENIA ZANATA MILLEO

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA SOBRE LESÕES DE CÁRIE
EM DENTINA INDUZIDAS EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

/ /
Prof.^a Dra. Cintia Helena Coury Saraceni
Universidade Paulista – UNIP

/ /
Prof.^a Dra. Vanessa Arias Pecorari
Universidade Paulista – UNIP

/ /
Prof. Dr. Sergio Luiz Pinheiro
Pontifícia Universidade Católica de Campinas – PUC CAMP

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de Mestrado é uma longa viagem. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, às quais estou profundamente grata. Correndo o risco de injustamente não mencionar algum dos contributos, quero deixar expresso os meus agradecimentos:

Em primeiro lugar, aos meus pais, Marco e Heloisa, meu infinito agradecimento, pois fizeram de tudo para tornar os momentos difíceis mais brandos. Obrigada por serem tão companheiros e por serem meu maior exemplo de luta e determinação nessa vida. Obrigada por sempre acreditarem em minha capacidade. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, e mais do que isso, dar o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional, pois sem vocês, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Victor e João Marcos, pela força e pelo carinho que sempre me prestaram ao longo de toda a minha vida acadêmica. Eu não poderia ter irmãos mais compreensivos que vocês.

Também não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Cintia Helena Coury Saraceni, por toda paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou. Por ter acreditado em meu potencial, estar sempre disponível e disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do Mestrado para absorver conhecimento. Obrigada por estar ao meu lado nessa jornada.

Às minhas amigas e amigos, por entenderem os momentos de ausência durante essa etapa. Vocês nunca negaram uma palavra de apoio, força e cumplicidade ao longo da minha vida. Obrigada, Beatriz Novoletto, Bruna Doca, Carolina Toschi, Catharina Dantas, Fernanda Santini, Fernando Henrique de Souza, Giovanna Spigolon, Giovanna Zago, Julia Miglio, Maria Stella Zanata, Marina Gesdermayer, Natalia Rodrigues, Paola Segura, Renata Gil, Victor Porcelli e Yuli Alves.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial, Renata Leone e Thais Tonon, que me acompanharam durante toda essa caminhada, fazendo as minhas manhãs serem muito mais divertidas.

A todos os técnicos do laboratório, técnicos do biotério e professores(as) envolvidos neste trabalho, Wilton, Michelle, Fernanda Kabadayán, Ivana Suffredini, Martha Bernardi, Mônica Grazieli, Vanessa Pecorari, Sergio Luiz Pinheiro, entre outros que foram extremamente importantes para o andamento e finalização desta pesquisa.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força que prestaram em todos os momentos.

Gostaria de agradecer à Faculdade de Odontologia da Universidade Paulista por abrir as portas para que eu pudesse cumprir mais uma etapa em minha vida.

E para finalizar, agradeço a Deus, por ter me concedido saúde, força e disposição para fazer o Mestrado e essa pesquisa.

EPÍGRAFE

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da PDT (Terapia Fotodinâmica, do inglês *Photodynamic Therapy*) na redução microbiana de lesões de cárie em dentina, induzidas em modelo animal. Foram utilizados 2 ratos Wistar (*Rattus novergicus*) adultos (1 fêmea e 1 macho), de 6 a 9 semanas de idade foram preparados para reprodução, o que resultou em 12 (doze) filhotes. Após desmame ($n_{total} = 12$), procedeu-se o processo de indução de cárie nos filhotes, iniciando-se pela inoculação de *Streptococcus mutans* por meio de SWAB na cavidade oral dos animais por 3 dias consecutivos e, 5 dias após esse período, novas coletas da cavidade oral foram realizadas a fim de se constatar a presença da bactéria por meio de RT-PCR. Após a comprovação da inoculação, iniciou-se dieta cariogênica com adição de 56% de sacarose na ração e 10% na água, por 4 semanas, quando foi realizada a atribuição dos escores de cárie nos molares inferiores, segundo ICDAS, por dois examinadores devidamente calibrados ($Kappa=0,85$). Constatado o comprometimento de dentina, foi realizada cavitação de 1 mm de profundidade, com ponta diamantada 1011 em alta rotação, a fim de servir de nicho para a aplicação do corante e da PDT. Os animais foram, então, divididos aleatoriamente em dois grupos ($n=6$) conforme tratamento realizado: grupo corante: azul de metileno gel em concentração 100 mg/L, por cinco minutos; grupo PDT: azul de metileno, 100 mg/L, por 5 minutos, seguido de irradiação com laser de baixa intensidade, 660 nm – 40 mw – 60 J/cm² - 1 min – 0,04 cm². Coletas de tecido dentinário foram realizadas pré e pós-tratamentos por meio de swabs, para análise em RT-PCR. Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados e suas mandíbulas foram extraídas para análise em MEV dos molares. Utilizou-se o modelo estatístico de equações estimadas generalizadas (GEE). Os resultados demonstraram que independente do tratamento houve uma redução significativa de *Streptococcus mutans* ao longo do tempo, com redução duas vezes maior para o grupo PDT em relação ao corante ($p<0,05$). A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que a terapia fotodinâmica foi eficaz na redução microbiana das lesões de cárie em dentina produzidas em modelo animal e, ainda, que o modelo animal proposto foi capaz de promover de forma precisa e replicável as lesões de cárie em dentina.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica. Cárie. Dentina. Modelo Animal.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of PDT on the microbial reduction of caries lesions in dentin, induced in animal models. Two adult Wistar rats (*Rattus novergicus*), (1 female and 1 male), 6 to 9 weeks old, were prepared for breeding, resulting in twelve cubs. After their weaning period ($n_{total} = 12$) the caries induction process was initiated by the inoculation of *Streptococcus mutans* with swabs in the oral cavity of the animals for 3 consecutive days and 5 days after that period, new samples of the oral cavity were collected with the objective of verifying the presence of the bacterium by means of RT-PCR. Once confirmed, a cariogenic diet was started with 56% sucrose feed and 10% sucrose *ad libitum* water for 4 weeks, moment when the caries score attribution was carried out to the lower molars, according to ICDAS, by two duly calibrated examiners (Kappa=0.85). From the finding of dentin impairment, cavitation of 1 mm depth with a 1011 diamond-tip bur was performed in high rotation, in order to serve as niches for the dye and the PDT application. The animals were randomly divided into two groups ($n=6$) according to the treatment: dye group: methylene blue gel at 100 mg/L concentration for five minutes; PDT group: methylene blue gel at 100 mg/L concentration for five minutes, followed by low intensity laser irradiation, 660 nm – 40 mw - 60 J/cm² - 1 min - 0.04 cm². Dental tissue samples were collected pre- and after-treatment with swabs for RT-PCR analysis. Upon treatment conclusion, the animals were euthanized, their jaws were extracted for SEM analysis of the molars. Use of the statistical model of generalized estimated equations (GEE). The results demonstrated that, regardless of the treatment, there was a significant reduction of *Streptococcus mutans* over time, with a two-fold reduction for the PDT group ($p<0.05$). From the obtained results it can be concluded that the photodynamic therapy was effective in the microbial reduction of lesions produced in animal models and also that such model was able to accurately and replicate the lesions of caries in dentin.

Keywords: Photodynamic Therapy. Caries. Dentin Animal Model.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2 CONCLUSÃO GERAL | 11 |
| REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO | 12 |

1 INTRODUÇÃO

Apesar da diminuição de sua incidência, a cárie dentária ainda é considerada uma das doenças de maior prevalência mundial e que afeta 60-90% das crianças e uma grande quantidade de adultos (9, 12).

A doença tem caráter multifatorial e é resultado da formação de biofilme sobre a superfície dental. Está bem estabelecido na literatura que os *Streptococcus mutans* são as bactérias mais comumente associadas ao processo inicial da cárie (6). Essas bactérias são capazes de causar a diminuição do pH, seguida da produção de ácidos que levam ao processo de desmineralização da estrutura dental (7).

A presença e a quantidade de *S. mutans* têm influência direta na instalação e progressão do processo carioso; por isso, a redução dos níveis bacterianos pode ser uma alternativa eficaz e adjuvante que pode levar ao controle da doença e ainda, proporcionar abordagens menos invasivas.

Nesse sentido, a terapia fotodinâmica antibacteriana (*PDT – Photodynamic Therapy*) apresenta-se como uma possível opção terapêutica (2, 7, 8). Esta técnica consiste na combinação da aplicação de uma fonte de luz laser com comprimento de onda específico para determinado fotossensibilizador. Este, ao absorver a luz, gera a produção de oxigênio singuleto e radicais livres que, por sua vez, geram danos às bactérias em seu DNA, à membrana plasmática ou, ainda, podem gerar modificações das atividades metabólicas, danificando de forma irreversível os componentes celulares e ocasionando a morte celular (7, 10).

Os fotossensibilizadores mais frequentemente utilizados são os fenotiazínicos, como o azul de metileno e o azul de toluidina, que absorvem o comprimento de onda do laser de baixa intensidade no espectro de luz vermelho visível (8). Variações na concentração do fotossensibilizador, bem como nos parâmetros de irradiação, podem produzir diferentes resultados, o que justifica estudos que testem as diversas possibilidades de associação irradiação-corante.

A vantagem da utilização da PDT sobre a terapia convencional é a morte rápida do microrganismo-alvo, dependendo da dose utilizada. Além disso, os efeitos antimicrobianos ficam confinados ao sítio da lesão por meio do fotossensibilizador e da zona restrita de irradiação (1, 4, 5, 15, 16).

A PDT tem mostrado resultados significativos na redução bacteriana em doenças periodontais e peri-implantites (3, 11, 13, 18). Porém, no que diz respeito à cárie, os estudos baseiam-se em resultados obtidos sobre culturas bacterianas, especialmente *S. mutans*, cultivadas em meio ágar ou em biofilmes cultivados sobre amostras de resinas e/ou discos de dentina (3, 17, 19). Apesar de apresentarem resultados promissores, sua eficácia pode não ser comprovada em condições clínicas, já que as condições *in vivo* podem influenciar sua ação.

A utilização de modelos animais que reproduzam as condições biológicas tem dado uma importante contribuição para elucidação da etiologia da cárie e torna possível a realização de testes de novas abordagens para controle e tratamento da doença, como a PDT (14).

Os modelos animais propostos para o estudo da cárie nem sempre são reproduzíveis ou nem sempre preveem análises fidedignas da quantidade de bactérias presentes, bem como do estágio da lesão de cárie obtida. Nesse sentido, as análises quantitativas por meio de RT-PCR (PCR quantitativo em tempo real) proporcionam variáveis de desfecho quantitativos mais sensíveis, poderosos e robustos. Por isso, faz-se necessária a padronização de um modelo animal replicável e que resulte em respostas precisas aos questionamentos sobre a doença cárie.

Considerando-se os aspectos acima citados, a proposta desse estudo foi a de avaliar o efeito da PDT na redução microbiana em cavidades de cárie com envolvimento em dentina induzidas em modelo animal.

2 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

1. A PDT foi eficaz na redução de *S. mutans* em cáries com exposição de dentina obtidas a partir de modelo animal, podendo consistir em método adjuvante ao tratamento e prevenção da doença cárie.
2. O modelo animal proposto foi capaz de reproduzir com precisão lesões de cárie em dentina, podendo ser replicado para futuros estudos.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

1. Antonenko M, Palamarchuk S, Zelinska N, Znachkova O, Pariy A. The photodynamic therapy in the treatment of dental caries: new opportunities in the conditions of genetic determination of the carious disease. International Journal of Medical Dentistry. 2016 Oct 1;6(4):276.
2. Araújo PV, de Fátima Correia-Silva J, Gomez RS, de Andrade Massara MD, Cortes ME, de Abreu Poletto LT. Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions *in vivo*, using culture and real-time PCR methods. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2015 Sep 1;12(3):401-7.
3. Araújo PV, Teixeira KI, Lanza LD, Cortes ME, Poletto LT. In vitro lethal photosensitization of *S. mutans* using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers. Acta odontologica latinoamericana. 2009 Sep;22(2):93-7.
4. Azizi A, Shademan S, Rezai M, Rahimi A, Lawaf S. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Streptococcus* mutants: in vitro study. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2016 Dec 1;16:66-71.
5. Bargiran M, Fekrazad R, Goudarzi N, Goudarzi N. Effects of antibacterial photodynamic therapy on salivary mutans streptococci in 5-to 6-year-olds with severe early childhood caries. Lasers in medical science. 2018 Oct 11:1-8.
6. Belstrøm D, Holmstrup P, Fiehn NE, Kirkby N, Kokaras A, Paster BJ, Bardow A. Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. Journal of oral microbiology. 2017 Jan 1;9(1):1270614.
7. Binks C, Duane B. Mother-to-child transmission of *Streptococcus mutans*. Evidence-based dentistry. 2015 Jun;16(2):39.
8. Braga MM, Oliveira LB, Bonini GA, Bönecker M, Mendes FM. Feasibility of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS-II) in epidemiological surveys and comparability with standard World Health Organization criteria. Caries research. 2009;43(4):245-9.
9. Cieplik F, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Hiller KA, Maisch T, Karygianni L. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions—a systematic review. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2017 Jun 1;18:54-62.
10. Culp DJ, Quivey RQ, Bowen WH, Fallon MA, Pearson SK, Faustoferri R. A mouse caries model and evaluation of Aqp5^{-/-}knockout mice. Caries research. 2005;39(6):448-54.

11. de Oliveira PG, e Souza AM, Novaes AB, Taba M, Messora MR, Paliotto DB, Grisi MF, Tedesco AC, de Souza SL. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy in induced periodontal disease. Animal study with histomorphometrical, immunohistochemical, and cytokine evaluation. Lasers in medical science. 2016 Sep 1;31(7):1275-83.
12. Diniz IM, Horta ID, Azevedo CS, Elmadjian TR, Matos AB, Simionato MR, Marques MM. Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2015 Sep 1;12(3):511-8.
13. Fraga RS, Antunes LA, Fontes KB, Küchler EC, Iorio NL, Antunes LS. Is Antimicrobial Photodynamic Therapy Effective for Microbial Load Reduction in Peri-implantitis Treatment? A Systematic Review and Meta-Analysis. Photochemistry and photobiology. 2018 Jul;94(4):752-9.
14. Ghazal TS, Levy SM, Childers NK, Carter KD, Caplan DJ, Warren JJ, Cavanaugh JE, Kolker J. Mutans Streptococci and Dental Caries: A New Statistical Modeling Approach. Caries research. 2018;52(3):246-52.
15. Misba L, Zaidi S, Khan AU. Efficacy of photodynamic therapy against Streptococcus mutans biofilm: Role of singlet oxygen. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2018 Jun 1;183:16-21.
16. Pereira CA, Costa AC, Carreira CM, Junqueira JC, Jorge AO. Photodynamic inactivation of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis biofilms in vitro. Lasers in medical science. 2013 May 1;28(3):859-64.
17. Terra Garcia M, Pereira AH, Figueiredo-Godoi LM, Jorge AO, Strixino JF, Junqueira JC. Photodynamic therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against Streptococcus mutans biofilms. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2018 Dec 1;24:256-61.
18. Vieira DL, Leite AF, de Souza Figueiredo PT, Vianna LM, Moreira-Mesquita CR, de Melo NS. A Conservative Approach for Localized Spongiotic Gingivitis Hyperplasia Using Photodynamic Therapy: A Case Report and Review of the Literature. Photomedicine and laser surgery. 2018 Oct 18:1-5.
19. Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. European journal of oral sciences. 2006 Feb;114(1):64-9.