



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



Iriana Carla Junqueira Zanin

Cirurgiã Dentista

**“ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA TERAPIA
FOTODINÂMICA SOBRE BIOFILMES ORAIS”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Doutor em
Odontologia, Área de Cariologia.

Piracicaba 2005



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



Iriana Carla Junqueira Zanin

Cirurgiã Dentista

**“ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA TERAPIA
FOTODINÂMICA SOBRE BIOFILMES ORAIS”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Cariologia.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Goncalves
Co-orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Banca examinadora:

Prof. Dr. Aldo Brugnera Junior
Profa. Dra. Izabel Yoko Ito
Prof. Dr. José Francisco Höfling
Profa. Dra. Renata Mattos-Graner

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

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

Z16e	Zanin, Iriana Carla Junqueira. Estudo da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais. / Iriana Carla Junqueira Zanin. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005. Orientadores: Reinaldo Bruno Gonçalves, Jaime Aparecido Cury. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Lasers. 2. Diodos emissores de luz. 3. Fotoquimioterapia. 4. Cloreto de tolônio. 5. <i>Streptococcus mutans</i>. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno. II. Cury, Jaime Aparecido. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título. (mg/fop)
------	--

Título em inglês: Antimicrobial effect of photodynamic therapy on oral biofilms
Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Lasers; Light emitting diodes; Photochemotherapy;
Tolonium chloride; *Streptococcus mutans*
Área de concentração: Cariologia
Titulação: Doutor em Odontologia
Banca examinadora: Jaime Aparecido Cury; Aldo Brugnera Junior; Izabel Yoko Ito; José
Francisco Höfling; Renata Mattos-Graner
Data da defesa: 01/03/2005

Dedicatória

À Deus,

Por estar presente, mesmo quando eu estou ausente...

Aos meus pais, Luiz e Vera

Pelo apoio para que eu nunca desista de sonhar,

Pelo exemplo constante para que meus sonhos valham à pena...

Aos meus irmãos, Luciana, Mauricio e Juraci

Por me lembrarem todos os dias que em nossa família,

nunca se está só...

Ao Vitor,

Fonte de um amor tão puro e profundo

Que nem mesmo o tempo e a distância são capazes de abalar...

Agradecimento especial

Ao meu orientador, Prof. Dr. **REGINALDO BRUNO GONÇALVES**,

Pelos anos de convívio e aprendizado;

Por sempre acreditar e confiar no meu trabalho e na minha pessoa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **JAIME APARECIDO CURY**,

Por sua contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal

sempre me incentivando e motivando;

Exemplo de seriedade, competência e dedicação.

Ao Prof. Dr. **JONATHAN PRATTEN**,

Por ter se revelado um pesquisador e ser humano notáveis,

E por ter me ensinado que deve sempre haver tempo para o trabalho e para todo o resto na
vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. **Carlos Henrique Brito**; à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. **Thales Rocha de Mattos Filho**, do Coordenador Geral da Pós-Graduação da FOP/UNICAMP Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen** e do Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Prof. Dr. **Francisco Carlos Groppo**, pela participação desta conceituada instituição no meu crescimento científico, profissional e pessoal.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro concedido durante o desenvolvimento deste e outros trabalhos, e a **CAPES**, por possibilitar a realização do estágio de doutorado sanduíche no exterior.

Ao Prof. Dr. **Michael Wilson**, da Divisão de Doenças Infecciosas do *Eastman Dental Institute, University College London*, pela amizade, oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelo exemplo de dedicação e seriedade.

À Profa. Dra. **Altair Antoninha Del Bel Cury** pelo incentivo e orientação para que eu buscasse novos desafios em Londres.

Aos queridos Prof. Dr. **Aldo Brugnera Junior** e Profa. Dra. **Fátima A. A. Zanin** pelo carinho, colaboração constante e pelas contribuições fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos amigos professores da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Prof. Dr. **José Francisco Höfling**, Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves** e Profa. Dra. **Renata de Oliveira Mattos-Graner** e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP.

Aos amigos funcionários da Microbiologia, **Anderson Teixeira, Wilma Ferraz e Flávia Pampoline** pelo incentivo e inestimável ajuda.

Aos Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen, Márcio Zafallon Casati**, Prof. Dr. **Francisco Carlos Groppo** e Profa. Dra. **Viviane Elizângela Gomes**, membros da banca de qualificação, pelas sugestões para a realização e finalização deste trabalho.

Aos Prof. Dr. **Aldo Brugnera Junior**, Profa. Dra. **Izabel Yoko Ito**, Prof. Dr. **José Francisco Höfling**, Profa. Dra. **Renata Mattos-Graner**, Profa. Dra. **Cínthia P. M. Tabchoury** e Profa. Dra. **Flávia M. Flório** membros da banca de defesa dessa tese de doutorado, pelas imensuráveis contribuições.

Às secretárias **Maria Elisa dos Santos, Eliane Melo Franco e Érica Pinho Sinhoretti**, pela amizade, incentivo e inestimável ajuda.

Aos amigos da Microbiologia **Alessandra C. Alves, Ana Cláudia A. Alves, Daniel Saito, Flávia Flório, Marcelle M. Nascimento, Marcelo Boriolo, Marcelo Napimoga, Maristela Lobo, Marlise Klein, Priscilla Mariano, Rafael Stipp, Regianne Umeko Kamiya, Rita Mardegan, Ruchele Nogueira, Vagner Bernardo** que ao longo desses anos trilharam comigo esses caminhos.

Aos amigos e companheiros de turma **Andréa Assaf, Adriana Paes Leme, Fábio Mialhe, Lidiany Rodrigues, Lívia M. A. Tenuta, Luciane Zanin, Marcelle M. Nascimento, Vanessa Pardi, e Viviane Gomes** pela amizade e riso compartilhados.

Aos meus queridos amigos que me acolheram durante a minha temporada em Londres **Valerie Decraene, Stefania Baldursdottir, Farah Dalwai, Emily Earsman, Gavin Gafan, Jon Mesher, Adam Roberts, Derren Ready, Elane Allan, Ramya Senarat, Hongmei Chang, Christopher Hope, Haitham Hussain, Samantha Parcher e Lorna Seville** pela compreensão, paciência e carinho.

As minhas amigas **Lidiany Rodrigues, Viviane Gomes, Simone Duarte** por serem tão especiais, por tantas vezes rirem meu riso e enxugarem meu pranto.

As primas **Sissi Zanin e Vanessa Zanin**, por estarem ao meu lado todos os dias da minha vida.

Ao Sr. **Paulo dos Santos** e Sra. **Eva Maria C. V. dos Santos** por terem me acolhido como a uma filha.

A todos os **funcionários** da FOP pela colaboração.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na concretização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

"O saber é saber que nada se sabe. Essa é a definição do verdadeiro conhecimento".

- Confúcio

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
I- INTRODUÇÃO GERAL.....	5
II – PROPOSIÇÃO.....	10
III – CAPÍTULOS	11
CAPÍTULO 1	12
Terapia fotodinâmica na odontologia	12
CAPÍTULO 2	27
Antimicrobial effect of photodynamic therapy on single-species biofilms formed <i>in vitro</i>	27
CAPÍTULO 3	46
Susceptibility of <i>streptococcus mutans</i> biofilms to photodynamic therapy: an <i>in</i> <i>vitro</i> study	46
IV – DISCUSSÃO GERAL	66
V – CONCLUSÃO GERAL	72
VI – REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	78

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento antibacteriano alternativo para as doenças causadas por biofilmes como a cárie dental. Esta tese, apresentada na forma de 3 artigos, teve por objetivos: (1) revisar a literatura enfocando o efeito da TFD em bactérias cariogênicas, (2) validar um modelo de formação de biofilme de mono-espécies de estreptococos e avaliar o efeito da associação do azul de orto-toluidina (AOT) e um diodo emissor de luz (LED) vermelho sobre biofilmes formados pela associação dessas bactérias e, (3) avaliar o efeito da TFD utilizando um laser de HeNe ou uma luz LED vermelha sobre biofilmes de *S. mutans* crescidos em fermentador de espessura e fluxo contínuos (FEFC). No artigo 2, biofilmes de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus sanguinis* foram formados *in vitro* sobre blocos de esmalte dental bovino. Nos biofilmes avaliou-se a contagem microbiológica e a concentração de polissacarídeo extracelular insolúvel, sendo que no esmalte foi determinada a perda de mineral. O potencial antimicrobiano da associação AOT a 100 µg/ml e um LED com densidade de energia de 85,7 J/cm² sobre estes biofilmes foi avaliado através de contagem das bactérias viáveis. No artigo 3, foi testado o efeito antimicrobiano da TFD utilizando densidades de energia de um laser de HeNe ou uma luz LED vermelha variando entre 49 e 294 Jcm⁻², sobre biofilmes de *S. mutans* crescidos em um FEFC. O efeito da TFD foi avaliado através da análise da viabilidade bacteriana e microscopia confocal a laser. A revisão da literatura demonstrou a relevância e a escassez de estudos utilizando a TFD sobre biofilmes cariogênicos. Os resultados do artigo 2 demonstraram que o modelo de formação de biofilme *in vitro* testado foi efetivo para simular situações de alto desafio cariogênico promovendo a desmineralização do esmalte, sendo que a aplicação da TFD foi eficaz para reduzir

significativamente a viabilidade bacteriana nos biofilmes ($p < 0,05$). No terceiro estudo, reduções significativas ($p < 0,05$) da viabilidade *S. mutans* foram observadas após a TFD tanto com utilização do laser de HeNe como pela luz LED, porém este efeito se limitou as camadas externas dos biofilmes. No conjunto, os resultados desses estudos indicam que tanto o laser HeNe quanto a luz LED na presença de AOT apresentam efeito antimicrobiano sobre biofilmes de estreptococos.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative antibacterial therapeutic to biofilm-related diseases such as dental caries. This thesis, comprised by 3 manuscripts was designed (1) to review the literature about the use of PDT on cariogenic bacteria, (2) to validate a streptococci biofilm model and to evaluate the effect of toluidine blue O (TBO) and a red Light Emission Diode (LED) association on viability of biofilmes formed with these bacteria and, (3) to evaluate the effect of PDT using either a HeNe laser or a red LED light on the viability of *S. mutans* biofilms grown in a constant depth film fermentor (CDFF). In the second manuscript, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus sanguinis* biofilms were grown on bovine enamel blocks. In the biofilms the microbiological counting and water-insoluble polysaccharide concentrations were analyzed; while mineral loss analysis were performed on enamel blocks. Also, the antimicrobial potential of TBO at 100 µg/ml associated with a LED at 85.7 Jcm⁻² on single-species biofilms were evaluated by microbiological counting. In the manuscript 3, the antimicrobial effect of PDT on *S. mutans* biofilmes growth on CDFF were verified either using a HeNe laser or a red LED with energy density ranging from 49 to 294 Jcm⁻². The effect of TFD was verified by analyzing bacterial viability and confocal scanner laser microscopy. The review of literature demonstrated the importance and shortage of studies about PDT on cariogenic biofilms. The results of manuscript 2 showed that the tested biofilm was effective to simulate high cariogenic challenger promoting enamel demineralization. Also, significant reductions ($p \leq 0.05$) in bacteria viability were founded after PDT. At the third study, significant reductions in *S. mutans* biofilms counting was observed after PDT using either a HeNe laser or a LED light the both light ($p \leq 0.05$),

however, the effect was restricted to external biofilm layers. In conclusion, the results of these studies showed that either a HeNe laser or a LED light in the presence of TBO showed antimicrobial effect on streptococci biofilms.

I- INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, cerca de 1000 diferentes espécies de microrganismos já foram detectadas na cavidade oral dos seres humanos e a grande parte delas encontra-se organizada na forma de biofilmes (Wilson, 2004). Enquanto a vasta maioria desses microrganismos é inofensiva, algumas espécies são identificadas como agentes causadores de uma variedade de doenças dentro e fora da cavidade oral (Meyer & Fives-Taylor, 1998). Os biofilmes bacterianos são formados quando microrganismos unicelulares se tornam irreversivelmente aderidos a uma superfície sólida e envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares, podendo haver a formação de biofilmes a partir de uma ou múltiplas espécies bacterianas (Mah & O'Toole, 2001, Spratt & Pratten, 2003). Tem sido observado que bactérias inseridas nos biofilmes passam a exibir características fenotípicas distintas que resultam no aumento de resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos (Evans & Holmes, 1987; Mah & O'Toole, 2001).

A diversidade anatômica existente na cavidade oral e a interdependência entre as suas estruturas tornam o desenvolvimento dos biofilmes particularmente interessante. Contrariamente ao que ocorre nas superfícies mucosas onde há uma constante descamação da parede epitelial e conseqüente renovação dos microrganismos aderidos; os dentes constituem superfícies duras favoráveis à formação e maturação do biofilme bacteriano tanto na região supragengival como na região subgengival (Thylstrup & Fejerskov, 1995; Marcotte & Lavoie, 1998). A placa dental é um biofilme bacteriano encontrado naturalmente na superfície dos dentes, apresentando composições bacteriana e bioquímica que podem variar em dependência de fatores intrínsecos e extrínsecos (Marsh, 1992; Kolenbrander, 2000; Watnick & Kolter, 2000).

Com relação ao desenvolvimento dos biofilmes dentais temos que após a limpeza profissional da superfície dental inicia-se a deposição de uma camada acelular sobre a superfície dos dentes denominada película adquirida (Nyvad, 1993). Os principais constituintes da película são componentes originários da saliva e do fluido gengival como proteínas, glicoproteínas e lipídios além de componentes bacterianos como as glucosiltransferases (Marcotte & Lavoie, 1998). A colonização bacteriana da película adquirida inicia-se poucas horas após a limpeza profissional (Bowden & Edwardsson, 1995).

Os microrganismos pioneiros na colonização da película adquirida são os estreptococos (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*) e em proporções menores *Neisseria* e *Actinomyces*. Neste momento, as bactérias com pouca ou nenhuma afinidade pela película são eliminadas pelo fluxo salivar, sendo que interações moleculares entre as proteínas da película adquirida e a superfície bacteriana são responsáveis pela especificidade da colonização bacteriana nos primeiros estágios de formação do biofilme dental (Gibbons & Hay, 1988). Após a colonização inicial, os microrganismos pioneiros crescem rapidamente formando micro colônias que ficam embebidas em uma matriz extracelular (Thylstrup & Fejerskov, 1995). A seguir, relações interbacterianas como coagregação, produção de bacteriocinas e interações nutricionais contribuem para o aumento da diversidade bacteriana até atingir uma comunidade clímax em 2 ou 3 semanas. O surgimento de doenças neste micro ambiente ocorre quando há um desequilíbrio no ecossistema do biofilme bacteriano formado.

A complexidade da comunidade bacteriana que coloniza o biofilme dental tem dificultado a determinação das bactérias que atuam no aparecimento das lesões de cárie. Entretanto, há evidências consideráveis de que os estreptococos grupo mutans

(particularmente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) e os lactobacilos estejam envolvidos no início e progressão da cárie (Loesche, 1986). A produção de ácidos pelas bactérias acidogênicas e acidúricas no biofilme dental é um pré-requisito essencial para o desenvolvimento das lesões de cárie (Bowden & Edwardsson, 1995). O freqüente consumo de carboidratos fermentáveis pode levar a constantes quedas de pH no biofilme gerando uma diminuição na proporção de bactérias ácido-sensíveis como *S. sanguinis*, *S. oralis*, e *S. mitis* e um aumento nas proporções de espécies sacarolíticas acidúricas e acidogênicas como os estreptococos grupo mutans e lactobacilos. (Challacombe, 1980; Marsh, 1994; Marcotte & Lavoie, 1998). O aumento na proporção dessas espécies leva a uma produção cada vez maior de ácido, promovendo a desmineralização do dente e deixando a superfície dental mais susceptível ao aparecimento de lesões de cárie (Thylstrup & Fejerskov, 1995).

Por estar intimamente relacionada à formação de biofilmes bacterianos, a prevenção da doença cárie baseia-se principalmente na remoção mecânica desses biofilmes (Marsh & Martin, 1992). No entanto, muitos indivíduos são incapazes ou desmotivados para realizar esse procedimento com a regularidade e eficiência necessária, de modo que nas últimas décadas tem aumentado o interesse na possibilidade de substituir ou complementar a terapia mecânica com o uso de agentes anti-sépticos ou antibióticos. Ocorre, no entanto, que o uso freqüente desses agentes no tratamento de doenças crônicas pode resultar na seleção de espécies resistentes (Wilson *et al.*, 1996).

Neste sentido, a terapia fotodinâmica surge como um tratamento alternativo ao uso de agentes antimicrobianos tradicionais (Wilson *et al.*, 1995). Durante esse processo, componentes celulares fotossensíveis passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. Neste estado excitado, o fotossensibilizador pode

interagir com o oxigênio molecular iniciando a formação de oxigênio singleto altamente reativo (fotoprocesso Tipo II) ou interagir com outras moléculas como aceptores de elétrons resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos (fotoprocesso do Tipo I) (MacRobert *et al.*, 1989). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem então danificar componentes essenciais das células ou alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível resultando na morte bacteriana (Malik *et al.*, 1990).

Como a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, a utilização de um fotossensibilizador que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é importante (Wilson *et al.*, 1992). Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se forem coradas com fotossensibilizadores ou agentes cromóforos exógenos como o azul de metileno, azul de toluidina, eosina e hematoporfirinas (Wilson, 1993). No entanto, a habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Para produzir efeito antimicrobiano, os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem apresentar danos tóxicos ao hospedeiro (Wilson *et al.*, 1992).

A grande maioria dos estudos utilizando a terapia fotodinâmica para obtenção de efeito antimicrobiano utiliza lasers de baixa potência com diversos meios ativos e comprimentos de onda. Recentemente, os diodos emissores de luz (LED) surgiram como luzes alternativas a essa terapia. Os LED são dispositivos semi-condutores que quando polarizados adequadamente emitem luz na faixa visível ou invisível. Embora tanto os lasers quanto os LED produzam luzes monocromáticas, os LED não apresentam boa colimação e

coerência, resultando em bandas de emissão mais largas que favorecem a obtenção de complementaridade com os fotossensibilizadores utilizados.

Entre as vantagens da terapia fotodinâmica em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais, temos primeiramente que a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo como ocorre com os agentes anti-sépticos e antibióticos. Além disso, a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos improvável. Finalmente, o uso do fotossensibilizador ou da luz sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias, de modo que a terapia pode ser confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra ótica (Wilson, 2004).

Muitos autores têm relatado a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre bactérias crescidas em caldo de cultura (Dobson & Wilson, 1992; Burns *et al.*, 1994; Griffiths *et al.*, 1997; Zanin *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2003), mas poucos são os estudos que avaliam a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilmes cariogênicos (Wood *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 2002).

II – PROPOSIÇÃO

Os objetivos desse estudo foram:

1. Revisar a literatura disponível enfocando o uso da terapia fotodinâmica na Odontologia no que diz respeito a sua ação antimicrobiana sobre bactérias causadoras da doença cárie.
2. Validar um modelo de formação de biofilmes de mono-espécies de estreptococos crescidos sobre blocos de esmalte dental bovino *in vitro* bem como avaliar o efeito antimicrobiano da associação do azul de orto-toluidina e luz LED (620 – 660 nm) sobre esses biofilmes.
3. Avaliar *in vitro* o efeito da terapia fotodinâmica utilizando um laser de HeNe (632.8 nm) ou uma luz LED (620–660 nm) sobre biofilmes de *S. mutans* crescidos em um fermentador de espessura e fluxo contínuos (FEFC).

III – CAPÍTULOS

Esta tese foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP parecer nº 100/2002 (anexo 1). Adicionalmente, ela está baseada na Informação CCPG/001/98/Unicamp (anexo 2) que regulamenta o formato alternativo para teses de Mestrado e Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria do candidato. Assim sendo, esta tese é composta de três capítulos contendo artigos publicados, submetidos para publicação ou em fase de submissão em revistas científicas, conforme descrito abaixo:

✓ Capítulo 1

“Terapia fotodinâmica na odontologia” Zanin, I.C.J.; Brugnera Junior, A.; Zanin, F.A.A.; Gonçalves, R.B. Esse artigo foi publicado na Revista Gaúcha de odontologia. **RGO**. 2003; 51(3):179-182.

✓ Capítulo 2

“Antimicrobial effect of photodynamic therapy on single-species biofilms formed *in vitro*”. Zanin, I.C.J.; Lobo, M.M.; Rodrigues, L.K.; Pimenta, L.A.F.; Brugnera Junior, A.; Höfling, J.F.; Gonçalves, R.B. Esse artigo está sendo submetido à publicação no periódico *European Journal of Oral Science*.

✓ Capítulo 3

“Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study” Zanin, I.C.J.; Gonçalves, R.B.; Brugnera Junior, A.; Hope, C.; Pratten, J. Esse artigo foi submetido à publicação no periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (anexo 3).

CAPÍTULO 1

TERAPIA FOTODINÂMICA NA ODONTOLOGIA PHOTODYNAMIC THERAPY IN DENTISTRY

Iriana Carla Junqueira ZANIN, MS¹; Aldo BRUGNERA JUNIOR, PhD²; Fátima A. A.
ZANIN³; Reginaldo Bruno GONÇALVES, PhD⁴.

Categoria: Revisão de Literatura

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cariologia de Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

² Professor Titular de Laser em Odontologia da Universidade Camilo Castelo Branco.

³ Doutora em Cariologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

⁴ Professor de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Auxílio Financeiro: FAEP (processo 0991/00) e FAPESP 00/04945-0

RESUMO

A redução de microrganismos patogênicos da superfície dental é um dos principais fatores envolvidos na prevenção e controle da doença cárie. Com esse propósito, a terapia fotodinâmica surge como um tratamento alternativo devido a sua habilidade em matar microrganismos. Nessa terapia, bactérias previamente sensibilizadas com um fotossensibilizador específico são irradiadas com um laser de baixa potência iniciando a formação de radicais orgânicos que podem culminar com a morte bacteriana. O objetivo dessa revisão foi dar ao leitor informações sobre o uso da terapia fotodinâmica na redução de bactérias bucais e as novas perspectivas para o uso dessa terapia na odontologia.

UNITERMOS: cárie dental, bactérias, terapia fotodinâmica, lasers.

SUMMARY

Elimination of pathogenic microorganisms from dental surface has been one of the most important factors related to dental caries control and prevention. In this way, photodynamic therapy became as an alternative treatment because of its ability to kill microorganisms. In this therapy, pre-sensitized bacteria irradiated with a low-power laser beginning the formation of free organic compounds that may kill bacteria. The aim of this review was to provide the reader with information about antimicrobial activity of photodynamic therapy and new perspectives for the use of this therapy in dentistry.

UNITERMS: dental caries, bacteria, photodynamic therapy, lasers

INTRODUÇÃO

Microrganismos no desenvolvimento da cárie dental

A microbiota bucal dos humanos é altamente complexa e diversa, sendo caracterizada pela presença de cerca de 400 espécies bacterianas além de protozoários, fungos, micoplasmas e vírus (KAZOR *et al.*, 2003). Nesse contexto, a cárie dental está intimamente associada com a microbiota residente no biofilme dental já que os dentes são estruturas sólidas que oferecem sítios de colonização para os microrganismos tanto na região supragengival como na região subgengival (MARSH & MARTIN, 1992). Em contraste, as superfícies mucosas são caracterizadas pela constante descamação promovendo rápida eliminação das bactérias aderidas (MARCOTTE & LAVOIE, 1998).

A formação do biofilme dental representa um bom exemplo das forças envolvidas na manutenção da homeostase dos ecossistemas orais. Imediatamente após a limpeza da superfície dental por um profissional inicia-se a deposição de uma camada acelular denominada película adquirida (NYVAD, 1993). Os microrganismos pioneiros na colonização da película adquirida são os *Streptococcus* (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*) e em proporções menores *Neisseria* e *Actinomyces* (GIBBONS & HAY, 1988). Após a colonização inicial, os microrganismos pioneiros crescem rapidamente formando colônias que ficam embebidas em uma matriz extracelular composta por componentes de origem salivar e bacteriano (BOWDEN & EDWARDSSON, 1995). A seguir, ocorre o aumento da diversidade bacteriana até atingir uma comunidade clímax em duas ou três semanas.

O surgimento de doenças neste ambiente só ocorre quando há um desequilíbrio no ecossistema do biofilme bacteriano. Assim, por exemplo, um aumento significativo na frequência e consumo de sacarose pode favorecer o desenvolvimento de espécies

sacarolíticas acidúricas e acidogênicas como estreptococos grupo mutans e lactobacilos (MARCOTTE & LAVOIE, 1998), favorecendo a desmineralização progressiva dos tecidos duros do dente (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995).

Após a desmineralização do esmalte, a lesão progride lentamente em direção à dentina sendo caracterizada por uma área de dentina desmineralizada sob uma zona desmineralizada e infectada com bactérias (BURNS *et al.*, 1994). Clinicamente, a diferenciação entre essas zonas e a remoção apenas da dentina contaminada é extremamente crítica, de maneira que grande quantidade de tecido sadio desmineralizado é removido durante o preparo cavitário (BURNS *et al.*, 1994). Assim, seria interessante o desenvolvimento de uma terapia capaz de matar as bactérias *in situ* reduzindo a quantidade de tecido dental removido e favorecendo o prognóstico do elemento dental restaurado (BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995).

Ação antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica

Nesse contexto, a utilização de lasers capazes de matar microrganismos patogênicos surge como uma terapia auxiliar ao tratamento odontológico preventivo e restaurador. O efeito dos lasers geradores de calor na destruição das bactérias é conhecido em diversas áreas da odontologia. De modo geral, esses lasers requerem elevadas dosagens de energia e atingem a superfície irradiada com altas temperaturas promovendo uma esterilização local por ação térmica (WALSH, 1997; KATO *et al.*, 1998). Por outro lado, os lasers de baixa potência têm como finalidade restabelecer o equilíbrio biológico celular melhorando as condições de vitalidade tecidual. Assim, esses lasers são reconhecidos por sua ação analgésica, biomoduladora e antiinflamatória sobre tecidos duros e moles produzido por efeitos fotoquímicos e fotoelétricos ao invés de efeitos térmicos (BRUGNERA JUNIOR & PINHEIRO, 1998).

A ação antimicrobiana dos lasers de baixa potência só começou a ser efetivamente estudada na última década quando a terapia fotodinâmica inicialmente idealizada para o tratamento do câncer foi trazida para a odontologia. Enquanto no tratamento do câncer o alvo da terapia fotodinâmica é promover a morte seletiva das células tumorais, no caso da odontologia surge uma nova perspectiva para a utilização da terapia fotodinâmica tendo como alvo as células bacterianas envolvidas no desenvolvimento das lesões de cárie e da doença periodontal.

Como à semelhança das células tumorais a maioria das bactérias orais não absorve a luz visível, a utilização de um cromóforo (nesse caso conhecido como fotossensibilizador) que se fixe à parede bacteriana atraindo para si a luz laser no momento da irradiação é essencial para que os lasers de baixa potência tenham ação antimicrobiana sobre bactérias orais (WILSON *et al.*, 1992; WILSON, 1993). Desse modo, quando as bactérias coradas com um fotossensibilizador específico são irradiadas por uma luz laser de comprimento de onda complementar, ocorre a absorção de fótons pelo corante, que é convertido para um estado excitado caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. A seguir, a energia transferida para as moléculas vizinhas pode 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 (SPIKES & JORI, 1987; MACROBERT *et al.*, 1989; MALIK *et al.*, 1990; DOBSON & WILSON, 1992; WILSON *et al.*, 1993; BRATTI *et al.*, 1997).

No entanto, a habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Outros requisitos importantes são que ele não apresente características tóxicas para as células do hospedeiro além de permanecer em estado excitado por tempo suficiente para permitir a sua

interação com as moléculas vizinhas e produzir espécies citotóxicas capazes de causar a morte bacteriana (MACROBERT *et al.*, 1989).

REVISÃO DA LITERATURA

Os primeiros trabalhos utilizando a terapia fotodinâmica sobre bactérias orais foram realizados por WILSON *et al.* (1992). Neste momento, o maior interesse dos autores era descobrir compostos químicos que pudessem ser efetivamente utilizados como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica. Nesse estudo foram testados 27 compostos e 16 deles tinham capacidade de matar *S. sanguinis* quando associados a um laser HeNe. Os mais efetivos foram o azul de orto-toluidina (TBO), azul de metileno, alumínio dissulfonado fitalocianino (AlPcS₂), o cristal de violeta e a dihematoporfirina éster (DHE). Neste mesmo estudo, TBO e azul de metileno mostraram-se eficazes na redução de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans in vitro*. Em todos os casos, o uso do corante na ausência da luz laser não apresentou efeito significativo sobre a viabilidade dos microrganismos testados.

No mesmo ano, DOBSON & WILSON (1992) estudaram a ação do laser HeNe associado ao azul de orto-toluidina ou azul de metileno sobre *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *S. sanguinis*. Neste trabalho, a redução no número de microrganismos, demonstrada pelo o aparecimento de zonas de inibição de crescimento, foram encontradas para os quatro microrganismos com ambos os corantes na concentração de 0,005% e densidade de energia de 16,5 J/cm².

Em 1993 a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica começou a ser estudada sobre bactérias cariogênicas (BURNS *et al.*, 1993). BURNS *et al.* (1994) observaram que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*

eram sensíveis à combinação de um laser de HeNe/TBO ou laser AsGaAl/AlPcS₂. No ano seguinte, estudos semelhantes mostraram reduções de aproximadamente 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC) para esses microrganismos.

BURNS *et al.* (1995) também estudaram o efeito da terapia fotodinâmica sobre suspensões de *S. mutans* presentes em dentina humana. Quando fatias de dentina com vários graus de desmineralização estavam interpostos entre a luz laser e a suspensão bacteriana, um efeito bactericida da ordem de 10⁷ UFC foi encontrado. Os resultados deste estudo sugeriram não haver relação entre a proporção de morte bacteriana e o grau de desmineralização da dentina ao passo que maiores doses de energia promoviam um aumento na proporção de mortes. Quando os microrganismos estavam embebidos em uma matriz de colágeno no momento da irradiação a redução no número de microrganismos (10⁸ até 10¹⁰ UFC) foi observada, sugerindo que a terapia fotodinâmica pode ser efetiva sobre *S. mutans* mesmo quando as bactérias estão embebidas em dentina desmineralizada.

Neste mesmo ano, WILSON *et al.* (1995) realizaram um estudo a fim de avaliar se bactérias presentes no biofilme dental de 10 voluntários podiam ser mortas pela terapia fotodinâmica. Neste estudo a combinação TBO/HeNe foi mais efetiva do que AlPcS₂/GaAs para reduzir as contagens de bactérias anaeróbicas, estreptococos e *Actinomyces*.

A fim de avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre biofilmes organizados, WILSON *et al.* (1996) avaliaram quantitativamente o efeito dessa terapia sobre *S. sanguinis* utilizando um aparelho que simulava as condições bucais e era constantemente alimentado por saliva artificial. Os autores observaram uma diminuição gradativa no número de microrganismos viáveis diretamente proporcional ao aumento da densidade de energia depositada.

HENRY *et al.* (1996) estudaram o efeito da terapia fotodinâmica sobre 18 microrganismos, sendo 6 bactérias produtoras de pigmento negro. A sensibilização das células bacterianas com um fotossensibilizador exógeno não foi realizada a fim de observar se o pigmento negro endógeno produzido por essas bactérias poderia realizar essa função. A análise dos resultados demonstrou que a irradiação do produziu efeitos fototóxicos sobre algumas espécies de *Prevotellas* e *Porphyromonas*.

Mais recentemente ZANIN *et al.* (2002a) demonstraram que *S. mutans* (Figura 1), *S. sobrinus*, *L. acidophilus* e *L. casei* podem ser mortos pela associação de um laser diodo e azul de orto-toluidina . A utilização da terapia fotodinâmica produziu efeito bactericida total na viabilidade dos microrganismos, com as contagens caindo de 10^7 a 10^{10} UFC mL⁻¹ para zero utilizando uma densidade de energia de 28,8 J/cm².

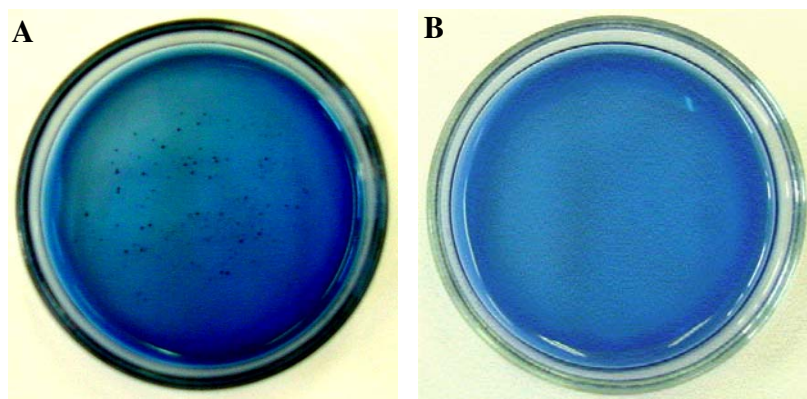


Figura 1: Crescimento de *Streptococcus mutans* (A) nos grupos tratados sem laser e sem corante, somente com laser ou somente com corante. Observar a ausência de unidades formadoras de colônia *Streptococcus mutans* quando esse microrganismo foi exposto à terapia fotodinâmica (B).

Nesse mesmo ano, ZANIN *et al.* (2002b) observaram que quando um pool de saliva humana era submetido a terapia fotodinâmica ocorria um efeito bactericida total sobre estreptococos grupo mutans e efeito bactericida parcial sobre estreptococos totais presentes na saliva humana. A relevância desse estudo está na eliminação das espécies mais patogênicas com a preservação de parte da microbiota residente, já que a atividade antimicrobiana sobre todos os microrganismos da cavidade oral não é recomendada por tornar o hospedeiro mais susceptível ao aparecimento de infecções oportunistas.

Finalmente, O'NEILL *et al.*, (2002) observaram que biofilmes orais formados por múltiplas espécies *in vitro* podem ser mortos pela terapia fotodinâmica utilizando um laser de HeNe associado ao corante azul de orto-toluidina . Nesse estudo, biofilmes com aproximadamente 9×10^9 células bacterianas tiveram uma redução de 97,4% dos microrganismos viáveis após a irradiação com 31,5 J na presença do azul de orto-toluidina na concentração de 25 µg/mL.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Assim, alguns trabalhos têm demonstrado a eficácia da terapia fotodinâmica em matar bactérias relacionadas ao desenvolvimento das lesões de cárie e doença periodontal em humanos. A revisão da literatura nos mostra que esse efeito antimicrobiano vem sendo atingido por sucessivos autores em maiores ou menores proporções.

WILSON (1993) descreve as vantagens dessa técnica em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo como ocorre com o uso de antibióticos. Outro aspecto

relevante é que o uso do fotossensibilizador ou da luz laser sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias, de modo que a terapia pode ser confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra ótica.

Além disso, o desenvolvimento de uma terapia eficiente para a obtenção de efeito bactericida sobre bactérias presentes em biofilmes orais e sobre a cárie dental utilizando lasers de baixa potência seria interessante principalmente no que diz respeito ao custo reduzido quando comparada a obtenção de efeito antimicrobiano utilizando os lasers de alta potência. Outro aspecto importante seria o caráter atraumático da terapia fotodinâmica que teria implicações lógicas principalmente no que diz respeito ao tratamento de pacientes especiais e pediátricos (ZANIN & GONÇALVES, 2003)

No entanto, embora esses dados sejam altamente promissores, outros estudos devem ser desenvolvidos a fim de tornar a utilização da terapia fotodinâmica aplicável na clínica odontológica. Uma das limitações dessa técnica é a ausência de parâmetros definidos para que a terapia fotodinâmica seja efetiva na eliminação das bactérias presentes em biofilmes e nas lesões de cárie onde as bactérias são mais resistentes do que aquelas crescidas em caldo de cultura (Figura 2).

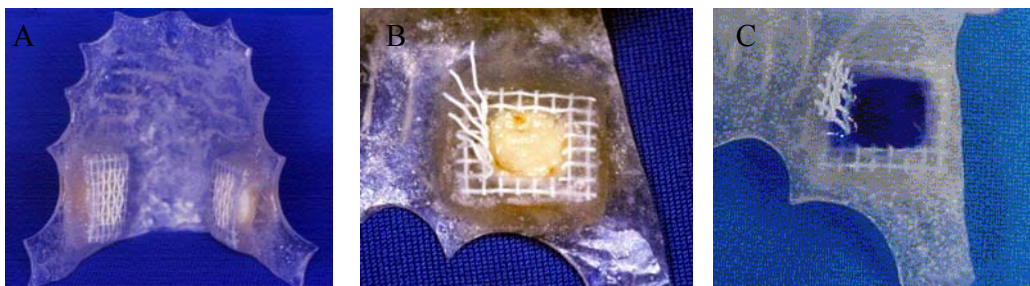


Figura 2: (A) Aparelho utilizado para formação de biofilme *in situ*. (B) Biofilme formado sobre bloco de esmalte dental humano. (C) Colocação do fotossensibilizador sobre o biofilme formado.

Os biofilmes bacterianos são formados quando microrganismos unicelulares se reúnem para formar uma comunidade aderida a uma superfície sólida e envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares. Tem sido observado que microrganismos inseridos nos biofilmes podem ser de 10 a 1000 vezes resistentes aos agentes antimicrobianos quando comparadas às mesmas bactérias crescidas em caldos de cultura. Além disso, estudos paralelos devem ser realizados avaliando a toxicidade dos fotossensibilizadores sobre os tecidos dentais e gengivais.

Atualmente, centros de pesquisa em vários países têm se esforçado no desenvolvimento de técnicas e parâmetros que tornem a terapia fotodinâmica eficaz para ser aplicada *in vivo*. No entanto, estudos laboratoriais mais precisos devem ser realizados antes que essa terapia possa ser aplicada clinicamente em humanos. Além disso, devemos nos lembrar que devido ao caráter multifatorial da doença cárie, as medidas de prevenção dessa doença devem abranger todos os seus fatores de risco, sejam eles aqueles relacionados à dieta, a susceptibilidade do hospedeiro bem como aqueles relacionados a microbiota cariogênica.

Endereço para correspondência:

Iriana Carla Junqueira Zanin

Laboratório de Microbiologia e Imunologia

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

Av. Limeira, 901 – Areião, Piracicaba – SP

CEP: 13414-018

Telefone: (19) 3412 5321

e-mail: reginald@fop.unicamp.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BHATTI, M. et al. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis in vitro*. *Photochem Photobiol*, Lawrence, v.65, n.6, p.1026-31, Mar. 1997.
2. BOWDEN, G.; EDWARDSSON, S. Ecologia oral e cárie dentária. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995. cap.3, p.45-9.
3. BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. *Lasers na odontologia moderna*. São Paulo: Pancast, 1998. 356p.
4. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *J Med Microbiol*, London, v.38, n.6, p. 401-5, June 1993.
5. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, Basel, v.29, n.3,

p.192-7, Oct. 1995.

6. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. J Dent, Oxford, v.22, n.5, p.273-8, Oct. 1994.
7. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. Arch Oral Biol, Oxford, v.37, n.11, p.883-7, Nov. 1992.
8. GIBBONS, R.J.; HAY, D.I. Human salivary acidic proline-rich-proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatite surfaces. Infect Immun, Washington, v.56, n.2, p.439-45, Feb. 1988.
9. HENRY, C.A. et al. Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilmes of Porphyromonas and Prevotella species. J Photochem Photobiol B, Lausanne v.34, n.2/3, p.123-8, July 1996.
10. KATO, T.; KUSAKARI H.; HOSHINO, E. Bactericidal efficacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implant and subsequent cellular adhesion to irradiated area. Lasers Surg Med, New York, v.23, n.5, p.299-309, 1998.
11. KAZOR, C.E.; MITCHELL, P.M.; LEE, A.M.; STOKES, L.N.; LOESCHE, W.J.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitoses and healthy patients. J Clin Microbiol, v.42, n.2, p.558-563, 2003.
12. MACROBERT, A.J.; BOWN, S.G.; PHILLIPS, D. What are the idea properties of a photosensitizer? In: PHOTSENSITIZING compounds: their chemistry, biology and clinical use. Chichester: Wiley, 1989. p.4-16.

13. MALIK, Z. et al. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B*, Lausanne, v.5, n.3-4, p.281-93, May 1990.
14. MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*, Washington, v.62, n.1, p.71-109, Mar. 1998.
15. MARSH, P.; MARTIN, M. Oral microbiology. 3rd ed. London: Chapman & Hall, 1992.
16. NYVAD, B. Microbial colonization of human tooth surfaces. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl*, Copenhagen, v.32, n.1, p.1-45, 1993.
17. O'NEILL JF, HOPE CK, WILSON M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med*, v. 31, n.2, p.86-90, 2002.
18. SPIKES, J.D.; JORI, G. Photodynamic therapy of tumours and other diseases using porphyrins. *Lasers Med Sci*, Sidcup Kent, v.2, p.3-15, 1987.
19. THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. O ambiente oral – uma introdução. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995. cap.1, p.13-16.
20. WALSH, L.J. The current status of low-level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Dent J*, St Leonards, v.42, n.5, p.302-6, Oct. 1997.
21. WILSON, M. et al. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol*, Oxford, v.78, n.5, p.569-74, May 1995.

22. WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol*, Oxford, v.75, n.4, p.299-306, Oct. 1993.
23. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilmes using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrobial Chemother*, London, v.37, n.2, p.377-81, Feb. 1996.
24. WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol*, New York, v.25, n.2, p.77-81, Ago. 1992.
25. WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of *Streptococcus sanguinis* to killing by low-power laser light. *Lasers Med Sci*, Sidcup Kent, v.8, p.69-73, 1993.
26. ZANIN I.C.J., BRUGNERA JUNIOR A., GONÇALVES R.B. Aplicação da Terapia Fotodinâmica na Descontaminação Bacteriana. *Revista da APCD*, v.56 SUPL., p. 7-11, junho 2002a.
27. ZANIN I.C.J., BRUGNERA JUNIOR A., HÖFLING J.F., ZANIN F.A.A., GONÇALVES R.B. Antimicrobial effect of low-level laser therapy in the presence of photosensitizer on human saliva bacteria. *Lasers in Dentistry III*, v.3, n.2, p.162-169, 2002b.
28. ZANIN I.C.J., GONÇALVES R.B. Novas Perspectivas para o uso do Laser Terapêutico. In: BRUGNERA JUNIOR, A.; SANTOS, A. E. C. G.; BOLOGNA, E. D.; LADALARDO, T. C. C. G. *Laserterapia Aplicada à Clínica Odontológica*. 1 ed. São Paulo: Santos, 2003. cap.6, p. 99-102.

CAPÍTULO 2

ANTIMICROBIAL EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY ON SINGLE-SPECIES BIOFILMS FORMED *IN VITRO*

Iriana Carla Junqueira Zanin *

Maristela Maia Lobo¹

Lidiany Karla Azevedo Rodrigues²

Luiz André Freire Pimenta¹

José Francisco Höfling¹

Reginaldo Bruno Gonçalves¹

¹Dental School of Piracicaba, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

²Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Running Title: Photodynamic therapy on oral biofilms

* Corresponding author: 901 Limeira Av., Piracicaba, SP, Brazil, Zip code: 13414-900. Telephone number: +55 19 3412-5379, Facsimile: +55 19 3412-5218, e-mail: reginald@fop.unicamp.br

ANTIMICROBIAL EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY ON SINGLE-SPECIES BIOFILMS FORMED *IN VITRO*

I.C.J. ZANIN*, M.M. LOBO, L.K.A. RODRIGUES, L.A.F. PIMENTA, J.F. HÖFLING ,
R.B. GONÇALVES

Journal Title: Eur J Oral Sci

ABSTRACT: The present study aimed firstly to validate single species biofilms formed *in vitro* and secondly, to evaluate the antimicrobial effect of toluidine blue O (TBO) associated with a red Light Emitting Diode (LED) on the viability of these biofilms. Single species biofilms of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus sanguinis* were grown on bovine enamel slabs during 3, 5 or 7 days. In the biofilms the microbiological counting and water-insoluble polysaccharide concentrations were analyzed; while mineral loss analysis was performed on enamel blocks. Also, the antimicrobial potential of TBO at 100 µg/ml associated with a LED at 85.7 Jcm⁻² on 5 days single-species biofilms were evaluated by microbiological counting. The results of this study showed that the extension of caries lesion and the number of microorganisms increased according to the age of biofilms using this model. Also, results showed a percentage of death $\geq 90\%$ for all biofilms tested after photodynamic therapy. In conclusion, biofilm model tested were effective to grow biofilms under high cariogenic challenger. Thus, photodynamic therapy was effective to kill oral biofilms formed under mentioned conditions.

Key words: photodynamic therapy, antimicrobial agents, cariogenic bacteria, biofilms.

* Corresponding author: 901 Limeira Av., Piracicaba, SP, Brazil, Zip code: 13414-900. Telephone number: +55 19 3412-5379, Facsimile: +55 19 3412-5218, e-mail: irianaz@fop.unicamp.br

INTRODUCTION

Microbial biofilm is a term used to denote a population of microorganisms growing on a surface, usually with a liquid interface (1). Dental plaque has the properties of a biofilm because it is formed on the tooth surface surrounded by saliva and is a community of numerous bacteria embedded in an extracellular polymer matrix (2). Clear evidence is now available indicating that cells in biofilms are in a physiological state different from their planktonic counterparts and tend to be far more resistant to antimicrobial agents (3, 4).

The complex bacterial biofilm accumulation on non-shedding tooth surfaces and tongue allows the resident bacteria to survive to removal forces and also contributes to their protection against host specific and non-specific defense mechanisms and harmful agents from external environments (5). The resistance mechanisms also include physical or chemical diffusion barriers to antimicrobial penetration into the biofilm, slow growth of the biofilm owing to nutrient limitation, activation of the general stress response and the emergence of a biofilm-specific phenotype (6).

It is well known that the accumulation of bacterial biofilms on tooth surfaces results in some of the most prevalent bacteria-induced diseases of man – caries and inflammatory periodontal diseases (7). Current treatment for plaque-related diseases involves the mechanical removal of the biofilm and the use of antiseptics and antibiotics. However, the emergence of antibiotic resistance by pathogenic bacteria had led to a major research effort to find out alternative antibacterial therapeutics which will not be easily able to develop resistance (8).

In this context, photodynamic therapy (PDT) may present a suitable process to combat both biofilm-related resistance and antimicrobial resistance. In this process a photoactive dye, called as photosensitizer, is taken up into cells and is irradiated with light

of an appropriate wavelength resulting in cell death through the production of active oxygen species (9). Light or drug alone are non-toxic (10 - 13), so only cells that both contain photosensitizer and receive light are affected by the treatment. Thus, using this treatment, there is an opportunity to achieve selectivity and target specific areas of the mouth/plaque (14).

Previous studies have shown that photodynamic therapy using diverse photosensitizers and lasers with different wavelengths are capable of killing gram positive oral bacteria (11, 13, 15-18). However, the antimicrobial effect of toluidine blue O (TBO) associated with a Light Emission Diode (LED) on the viability of single and multi-species biofilms of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus sanguinis* has not been previously studied. Hence, the present research aimed firstly, to develop and analyze the biochemical composition and the cariogenic potential of single species biofilm of supragingival plaque and secondly, to evaluate the antimicrobial effect of toluidine blue O (TBO) associated with a Light Emission Diode (LED) on the viability of single and multi-species biofilms formed *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Experiment 1: Biofilm model standardization

Enamel fragments preparation: Enamel slabs (4x4x2 mm) were prepared from bovine incisors stored in 0.1 % thymol solution at 4°C for 30 days (19). The enamel surface was polished for baseline surface microhardness determination (20, 21). The prepared tooth slabs were randomly assigned to twelve different groups according to microorganism and age of biofilms (n = 10) as follows: G1, G2 and G3 (controls with respectively 3, 5 and 7 days of

growth), G4, G5 and G6 (*S. mutans* biofilms with respectively 3, 5 and 7 days of growth), G7, G8 and G9 (*S. sobrinus* biofilms with respectively 3, 5 and 7 days of growth), and G10, G11 e G12 (*S. sanguinis* biofilms with respectively 3, 5 and 7 days of growth). Adhesive tape with a squared shape (4×4 mm) was attached to the center of the enamel slab. The remaining surfaces of the slab were painted with acid-resistant nail varnish (Colorama-CEIL, São Paulo, SP, Brazil), so that a 16 mm^2 surface area was exposed after removing the adhesive tape. The enamel slabs were fixed in lids of test recipients, kept suspended in sterile distilled water, and sterilized in a gamma irradiation chamber (GAMMACELL 220 EXCEL, GC-220E) (22 - 24).

Biofilms Growth: After sterilization, the dental slabs were removed from distilled water and immersed in sterile brain-heart infusion broth - BHI (Merck, Darnstadt, Germany) containing 5 % sucrose (w/v) (25 - 27). The BHI recipients were inoculated with $100 \mu\text{L}$ of $1-2 \times 10^8$ UFC/mL overnight cultures of *S. mutans* (ATCC 25175), *S. sobrinus* (ATCC 27607) or *S. sanguinis* (ATCC 10556) adjusted using a spectrophotometer. Inoculation of each test recipient was performed only once and the enamel specimens were transferred to a new fresh medium at each 24 hours (23). The controls groups were not inoculated. Contamination at test recipients was verified at each 24 hours by inoculation in BHI agar media (Merck, Darnstadt, Germany). The biofilms formed on the specimens were analyzed after 3, 5 or 7 days of growth. At the end of each experimental period, the biofilms were washed twice in sterile saline solution to remove loosely bound material (28) and were collected with sterile plastic curettes. The collected material was placed in two preweighed microcentrifuge tubes (one for water-insoluble polysaccharide analysis and the other for microbiological counting) and was analytically weighed.

Water-Insoluble Polysaccharide Analysis: 1.0 M NaOH was added to the biofilms (1.0 mL/ 10.0 mg), the samples were homogenized, kept under constant shaking for 3-hour period, were centrifuged for 5 minutes in 13.000g (29) and the concentration of water-insoluble glucans was determined in the supernatant using the phenol-sulfuric method (30).

Microbiological analysis: Biofilms reserved in the second microcentrifuge tube were weighted, placed into 0.9 % NaCl (10 mg/ml) and vortexed for 60 seconds in order to disperse the biofilms. Suspensions were serially diluted, plated onto BHI agar and were incubated at 37° C at partial pressure of 10 % CO₂ for 48 hours. After incubation, surviving microorganisms were enumerated through viable counting on nutrient agar and values were expressed as colony-forming units per milligram of biofilm (CFU mg⁻¹).

Microhardness Assessment: At the end of each experimental period, the tooth fragments were longitudinally sectioned through the center of the enamel area. One of its halves was embedded in epoxy resin, with the outer enamel surface perpendicular to the resin block surface. The slabs were serially polished with aluminum oxide disks of #400, #600 and #1200 grits, and a diamond paste of 1µm (Metadi® Buehler). In all samples, three lanes of eight indentations each were made at the depths: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 200 and 300 µm from the outer enamel surface in the central region of the dental slab, using a Knoop diamond under a 25 g load for 5 s (Future-Tech FM-ARS). The distance between the lanes was 100 µm. Indentation lengths were converted to volume % mineral (31). After calculating volume percentage mineral values for each depth evaluated, mineral profiles, integrated area of mineral content and mineral loss values (ΔZ) were obtained for all groups (32).

Experiment 2: Photodynamic therapy on oral biofilms

Photosensitizer and light sources: Toluidine blue O (TBO) was obtained from Sigma Chemicals (Poole, UK) and dissolved in deionized water to obtain a 100 µg/ml final concentration and was subsequently kept in the dark. The light source was a Light Emitting Diode (Laserbeam, Rio de Janeiro, Brazil) with a spectrum of emission ranging from 620 to 660 nm and a 638.8 nm predominant wavelength. The LED light source output power was 32 mW. Biofilms were exposed to a 85.7 J/cm² energy density.

Photodynamic therapy: In order to perform this experiment, biofilms were grown as previously described from 1-2 x 10⁸ UFC/mL overnight cultures of *S. mutans* (M), *S. sobrinus* (S) or *S. sanguinis* (Sa). On the fifth day, the biofilms were washed twice in sterile saline solution in order to remove loosely bound material. After sensitization with TBO 100 µg/ml for 5 minutes, biofilms were exposed to an 85.7 J/cm² energy density from a LED Light. The four set conditions tested were: biofilms nor exposed to sensitizer or LED light (S-L-); biofilms treated with TBO, but not exposed to LED (S+L-); biofilms exposed to LED, but not treated with TBO (S-L+) and biofilms sensitized with TBO and exposed to LED light (S+L+). The biofilms were then weighted, placed into 0.9 % NaCl (10 mg/ml) and vortexed for 60 seconds in order to disperse the biofilms. Ten-fold serial dilutions were carried out and aliquots plated out onto BHI agar plates which were then incubated at 37° C at partial pressure of 10 % CO₂ for 48 hours before the number of viable organisms had been determined.

Statistical Analysis: The experiment 1 dependent variables were mineral loss, water-insoluble polysaccharide and CFUmg⁻¹ according to the factors microorganisms and age of biofilmes. Two-way analysis of variance with interaction allowed us to determine the

significance of the factors under study and the interaction between these two factors relative to the 3 variables. The difference between treatments was assessed by Tukey test. The experiment 2 dependent variable was sensitizer and LED light. First, the data were evaluated to check the equality of variances and normal distribution of errors, and then they were transformed by the root square. To determine the significance of the irradiation, the sensitizer presence and the potential interaction between sensitizer and LED light was analyzed by a Variance Analysis (ANOVA) model for the factorial (2 X 2) design. Following, the Tukey test was chosen for evaluating the significance of all pair wise comparisons. For both experiments, the software SAS system (version 8.02, SAS Institute Inc., Cary: NC, 1999) was used and the significance limit was set at 5%.

RESULTS

The p-values for factors under study and their interaction are shown at Table 1. Table 2 shows the results of mineral loss (ΔZ), colony-forming units per milligram of biofilm (CFU mg⁻¹) and the concentration of water-insoluble polysaccharide produced by single species biofilms of *S. mutans*, *S. sobrinus* and *S. sanguinis* with 3, 5 and 7 days of growth. The extension of caries lesion and the number of microorganisms increased according to the age of biofilms for the three tested bacteria. *S. mutans* and *S. sobrinus* biofilms were more cariogenic at the initial stages of caries lesion formation although there was no difference between the extensions of caries lesion for all bacteria at the end of experimental period. The number of *S. sobrinus* was higher at the three cariogenic challengers being followed by *S. mutans* and *S. sanguinis*. Thus, there seems to be a trend towards a greater water-insoluble polysaccharide production for the older biofilms.

In addition, single-species biofilms were susceptible to photodynamic therapy on tested parameters. The association of LED light at energy density of 85.7 J/cm² and 100 µg/ml TBO resulted in a significant reduction on viability of all biofilms tested. The results of the number of bacteria surviving into biofilms after treatments were presented in Figure 1. The results of this study showed that neither irradiation of the biofilms in the absence of TBO (S-L+) nor incubation with TBO alone (S+L-) had a significant effect on the viability of single-species biofilms tested. The effectiveness of treatment was measured by calculating the reduction in bacteria concentration between S-L- and S+L+ treatment values. The results showed a significant reduction on viable counting after photodynamic therapy for all biofilms tested. Following, *S. sanguinis* single species biofilms were more susceptible to photodynamic therapy.

DISCUSSION

Knowledge of biofilms composition and metabolism may lead to improvement of preventive measures to prevent and/or control dental caries development. However, investigation of plaque *in vivo* is difficult due to the high degree of variability between individuals and since the site-specific microbial composition is reflecting the influences of a multitude of uncontrollable endogenous and exogenous dietary factors (33). In addition, working with humans always raises ethical questions. In this way, the aim of this investigation was to standardize a simple model to grow intact biofilms of supragingival plaque *in vitro*. The biofilms were formed at a solid/liquid interface using enamel slabs as substrate and having a periodic renovation of nutrient source. It is important to remember that this biofilm model presents some inadequacies such as inexistence of a continuous

irrigation of the enamel slab with saliva substitutes and also it failed to simulate the oral environment with regard to pH fluctuations. However, the nutrient media used could sustain the growth of a wide range of oral organisms and they could maintain their cariogenic potential since mineral loss and number of microorganisms as well as water-insoluble polysaccharide production increased according to the time.

Previous studies have shown that PDT is capable of killing oral bacteria in planktonic cultures (15, 17, 18) but clear evidence is now available that bacteria grown as biofilms are more resistant to antimicrobial agents. The majority of studies analyzing antimicrobial effect of PDT on oral biofilms refer to plaque scrapings (16) or biofilms using a wide variety of photosensitizers and lasers (11, 13, 14, 34).

WILSON *et al.* (1995) found that substantial kills of bacteria in supragingival plaque scrapings could be achieved by low doses of a Helium/Neon (HeNe) or gallium aluminium arsenide (GaAlAs) laser in the presence of an appropriate photosensitizer. WILSON *et al.* (1996) showed that the association of aluminium disulphonated phthalocyanine (AlPcS₂) and a 660nm GaAlAs diode laser was effective to reduce significantly viable count of *S. sanguinis* into intact biofilms formed *in vitro*. In 1999, WOOD *et al.* tested the association of a cationic Zn(II) phthalocyanine photosensitizer with a white light on the viability of oral biofilms formed *in situ*. The results showed evident damage to biofilms promoted by PDT treatment when analyzed by confocal and transmission electron microscopy. Recently, SOUKOS *et al.* (2003) studied the association of PDT and the use of photomechanical waves (PW) on viability of periodontal bacteria concluding that PW may be a potential powerful tool for killing periodontal bacteria when associated with photodynamic therapy.

It occurs that the antimicrobial effect of toluidine blue O (TBO) associated with a Light Emitting Diode (LED) on the viability of single and multi-species biofilms of *S. mutans*, *S. sobrinus* and *S. sanguinis* has not been previously studied. The results of this study are encouraging due to the significant reductions founded after PDT on single-species biofilms tested.

Although the increase of conservative methods to treatment of dental caries, current procedures involve the removal of sound tooth tissue to gain access to the caries lesion and the removal of infected demineralized dentine. The need of removing whole infected dentine could be avoided if the infecting organisms could be killed *in situ* (35). The significant reduction of *S. mutans* and *S. sobrinus* showed in this study is important once these species are the most related bacteria associated with caries in humans. Thus, dental caries may be a disease well suited to photodynamic therapy as it is a localized infection and the sensitizer could be applied to the lesion by means of a syringe and the light could then be delivered via an optical fiber (36). In addition, the option for a LED light instead of a laser light has obvious economic advantages when compared with photodynamic therapy using conventional lasers.

If bacteria in caries lesions could be eradicated by PDT *in vivo*, the consequences for dentistry would be enormous as it would mean that infected (and still not irreversibly demineralized) dentine would be preserved thereby making treatment easier for both dentist and patient, thus enabling restoration of lesions with minimal tissue removal, and improving the long-term prognosis for the repaired tooth (7).

In conclusion, the present study suggests that the biofilm model tested were effective to grow biofilms under high cariogenic challenger and that the association of toluidine blue and LED light at an energy density of 85.7 J/cm² was effective to kill oral

biofilms grown *in vitro*. Although the results of this study are encouraging, further studies are needed to determine whether photodynamic therapy of cariogenic biofilms is possible under conditions more closely resembling those encountered in the oral cavity such as biofilms formed under continuous supply of saliva substitutes and biofilms grown *in situ*.

REFERENCES

1. COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999 284: 1318-1322.
2. MARSH PD, BRADSHAW DJ. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res* 1997; 11:176-185.
3. FLETCHER M. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv Microbiol Physiol* 1991; 32:53-85.
4. DAVEY ME, O'TOOLE GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol* 2000; 64:847-867.
5. BOWDEN GHW. A controlled environment model for the accumulation of biofilms of oral bacteria. In: DOYLE RJ, ed. *Biofilms, Methods in Enzymology*. New York: Academic Press 1999, 216-224.
6. MAH TC, O'TOOLE GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology* 2001; 9:34-39.
7. WILSON M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol* 2004; 3:412-418.

8. HABLIN MR, HANSAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3:436-450.
9. MALIK Z, HANANIA J, NITZAN Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 1990; 5: 281-293.
10. MINNOCK A, VERNON DI, SCHOFIELD J, GRIFFITHS J, PARISH H, BROWN SB. Photoinactivation of bacteria. Use of cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol B* 1996; 32:159-164.
11. WILSON M, BURNS T, PRATTEN J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrobial Chemother* 1996; 37:377-381.
12. KOMERIK N, WILSON M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J Appl Microbiol* 2002; 92:618-623.
13. O NEILL F, HOPE CK, WILSON M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med* 2002; 31:86-90.
14. WOOD S, NATTRESS N, KIRKHAM J, SHORE R, BROOKES S, GRIFFITHS J, ROBINSON C. An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J Photochem Photobiol B* 1999; 50:1-7.

15. BURNS T, WILSON M, PEARSON GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. J Dent 1994; 22:273-278.
16. WILSON M, BURNS T, PRATTEN J, PEARSON GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. J Appl Bacteriol 1995; 78:569-574.
17. ZANIN IC J, BRUGNERA JUNIOR A, GONCALVES RB. *In vitro* study of bactericidal effect of low level laser therapy in the presence of photosensitizer on cariogenic bacteria. Lasers in Dentistry III 2002; 2:154-161.
18. WILLIAMS JA, PEARSON GJ, COLLES MJ, WILSON M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. Caries Res 2003; 37:190-193.
19. AMAECHI BT, HIGHAM SM, EDGAR WM. Factors affecting the development of carious lesions in bovine teeth *in vitro*. Archs Oral Biol 1998a; 43:619-628.
20. MELBERG JR. Hard-tissues substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. J Dent Res 1992; 71: 913-919.
21. TEN CATE JM, BUIJS MJ, DAMEN JJM. The effects of GIC restorations on enamel and dentin demineralization and remineralization. Adv Dent Res 1995; 9: 384-388.
22. PARSELL DE, STEWART BM, BARKER JR, NICK TG, KARNS L, JOHNSON RB. The effect of steam sterilization on the physical properties and perceived cutting characteristics of extracted teeth. J Dent Educ 1998; 62: 260-263.

23. EDMUNDS DH, WHITTAKER DK, GREEN RM. Suitability of human, bovine, equine and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res* 1988; 22: 327-336.
24. AMAECHI BT, HIGHAM SM, EDGAR WM. Efficacy of sterilization methods and their effect on enamel demineralization. *Caries Res* 1998b; 32: 441-446.
25. GILMOUR ASM, EDMUNDS DH, DUMMER MH. The production of secondary caries-like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using an *in vitro* microbial caries system. *J Oral Rehab* 1990; 17: 573-578.
26. GILMOUR ASM, EDMUNDS DH, NEWCOMBE RG. Prevalence and depth of artificial caries-like lesions adjacent to cavities prepared in roots and restored with a glass ionomer or a dentin-bonded composite material. *J Dent Res* 1997; 76:1854-1861.
27. GILMOUR ASM, EDMUNDS DH. The polarized light microscope appearance of caries-like lesions adjacent to restored cavities in the crowns and roots of extracted human teeth. *J Oral Rehab* 1998; 25: 929-939.
28. HAYACIBARA, M.F. et al. Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. *J Dent Res*, v.82, n.4, p.267-71, Apr. 2003
29. CURY JA, FRANCISCO SB, DEL BEL CURY AA, TABCHOURY CP. In situ study of sucrose exposure, mutans *Streptococci* in dental plaque and dental caries. *Braz Dent J* 2001; 12: 101-104.
30. DUBOIS M, GRILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28:350-356.

31. FEATHERSTONE JDB, O'REILLY MM, SHARIATI M, BRUGLER S (1986). Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In: LEACH SA, ed. Factors Relating to De- and Remineralization of the Teeth, Proceedings of a Workshop 1985, Oxford; IRL Press, 23-34.
32. ARENDS J, TEN BOSCH JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. J Dent Res 1992; 71, 924-928
33. THURNHEER T, GMU R, GUGGENHEIM B. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. J Microbiol Methods 2004;56:37-47
34. SOUKOS NS, MULHOLLAND SE, SOCRANSKY SS, DOUKAS AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. Lasers Surg Med 2003; 33:161-168.
35. BURNS T, WILSON M, PEARSON G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. Caries Res 1995; 29:192-197.
36. WILSON M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. J Appl Bacteriol 1993; 75: 299-306.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Benedita Inês Franco Possignolo Rodrigues and Mr. Paulo Cassieri Neto from CENA (Centro de Estudos Nucleares da Agricultura), for the gamma irradiation procedures. This research was supported by FAPESP # 02/00393-8.

Table 1: p values obtained for each response variable tested according to the factors under study.

Factors	Variables		
	ΔZ	CFUmg ⁻¹	WIP
Microorganism	0.0007	<0.0001	0.0311
Time	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Microorganism * Time	0.1271	<0.0001	0.0731

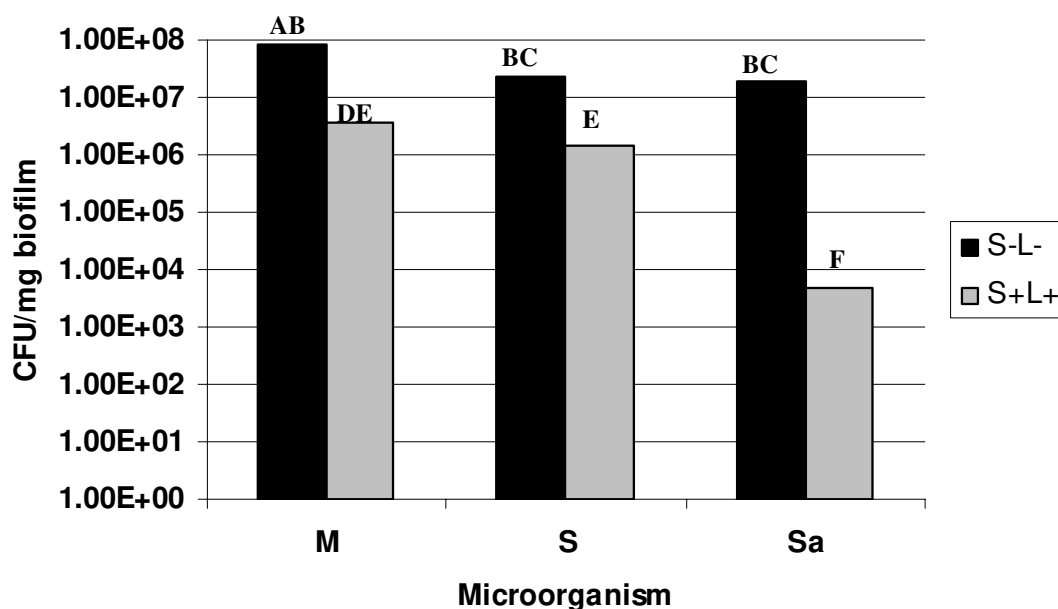
p values to dependent variables mineral loss (ΔZ), microbiological counting (CFU mg⁻¹) and water-insoluble polysaccharide (WIP) according to the factors microorganisms and age of biofilmes. Significance level adopted 0.05 at Tukey test.

Table 2: Mean and standard deviation of colony-forming units per milligram of biofilm (CFU mg⁻¹), mineral loss (ΔZ) and water-insoluble polysaccharide concentration (WIP) produced by single species biofilms of *S. mutans*, *S. sobrinus* and *S. sanguinis* with 3, 5 and 7 days of growth.

Variables	Age of biofilms	10 ⁶ CFU mg ⁻¹	ΔZ (vol % min.µm)	WIP (mg g ⁻¹)
<i>S. mutans</i>	3 days	1.31 ± 0.51 ^{CD}	3399.3 ± 611.9 ^{CD}	328.6 ± 73.4 ^{AC}
	5 days	1.88 ± 1.55 ^{CD}	4939.9 ± 461.7 ^A	446.7 ± 157.1 ^A
	7 days	32.7 ± 25.4 ^A	5686.6 ± 1173.6 ^A	398.2 ± 195.6 ^A
<i>S. sobrinus</i>	3 days	3.00 ± 0.94 ^{BC}	2714.3 ± 657.4 ^{DE}	211.9 ± 22.7 ^{BC}
	5 days	27.3 ± 20.0 ^A	4728.9 ± 409.5 ^{AB}	324.9 ± 143.3 ^{AC}
	7 days	54.6 ± 11.8 ^{AB}	5677.6 ± 681.7 ^A	398.1 ± 160.8 ^A
<i>S. sanguinis</i>	3 days	0.18 ± 0.17 ^E	2566.9 ± 709.3 ^E	194.6 ± 54.4 ^{BC}
	5 days	1.63 ± 0.60 ^D	3917.7 ± 791.0 ^{BC}	279.4 ± 92.6 ^{AB}
	7 days	3.75 ± 3.57 ^{CD}	5451.8 ± 555.2 ^A	459.9 ± 166.4 ^A

Means followed by different letters vertically differ statistically using Tukey test (p<0.05).

FIGURE 1: Number of colony-forming units per milligram (CFU mg⁻¹) of single-species biofilm submitted to the treatments.



Sensitized bacterial suspensions of *S. mutans* (M), *S. sobrinus* (S), *S. sanguinis* (Sa) nor exposed to sensitizer or LED light (S-L-); and bacterial suspensions sensitized and exposed to LED light (S+L+). Means followed by different letters differ statistically using Tukey test ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 3

SUSCEPTIBILITY OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* BIOFILMS TO PHOTODYNAMIC THERAPY: AN *IN VITRO* STUDY

Iriana Carla Junqueira Zanin¹, Reginaldo Bruno Gonçalves¹, Aldo Brugnera Junior²,
Christopher Keith Hope³ and Jonathan Pratten³⁵

¹Department of Microbiology and Immunology, Dental School of Piracicaba, State University of Campinas, 901 Limeira Av., Piracicaba, 13414 903, Brazil.

²Laser Center Department, Dental School of Camilo Castelo Branco University, 584 Carolina Fonseca Street, Sao Paulo, 08230-030, Brazil.

³Division of Microbial Diseases, Eastman Dental Institute, UCL, 256 Gray's Inn Road, London, WC1X 8LD, United Kingdom.

⁵Corresponding author: Division of Microbial Diseases, Eastman Dental Institute, UCL, 256 Gray's Inn Road, London, WC1X 8LD, UK. Phone: +44 (0)20 7915 1050. Fax : +44 (0)20 7915 1127 Email: J.Pratten@eastman.ucl.ac.uk

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial effect of toluidine blue O, in combination with either a Helium/Neon (HeNe) laser or a red Light-Emitting Diode (LED), on the viability and architecture of *Streptococcus mutans* biofilms.

Methods: Biofilms were grown on hydroxyapatite discs in a constant depth film fermentor fed with artificial saliva which was supplemented with 2% sucrose 4 times a day thus producing a typical 'Stephan pH curve'. Photodynamic therapy was subsequently carried out on biofilms of various ages with light from either the HeNe laser or LED using energy densities of between 49 Jcm⁻² and 294 Jcm⁻².

Results: Significant decreases in the viability of *S. mutans* biofilms were only observed when biofilms were exposed to both TBO and light when reductions in viability of up to 99.99% were observed with both light sources. Overall, the results showed that the bactericidal effect was light dose-dependent and that older biofilms were less susceptible to photodynamic therapy. CLSM images suggested that lethal photosensitization occurred predominantly in the outer-most layers of the biofilms.

Conclusions: Photodynamic therapy may be a useful approach in the treatment of dental plaque-related diseases.

Key words: Photodynamic therapy, biofilms, *Streptococcus mutans*, Light-Emitting Diode, CLSM.

INTRODUCTION

Dental plaque is the term commonly used for the biofilm which is formed on the tooth surface and consists of a complex microbial community embedded in a matrix of polymers of bacterial and salivary origin.¹ The formation of acid end-products through the metabolism of carbohydrates by acidogenic microorganisms within these biofilms is an important factor in the development of dental caries.² The essential process involves demineralization of the tooth structure by high concentrations of organic acids.³ *Streptococcus mutans* has been implicated as the primary etiological agent because of its relatively high numbers in plaque prior to the appearance of carious lesions, its ability to degrade carbohydrates rapidly with the formation of abundant acid, and its ability to induce a tolerance to low pH environments.⁴

When a community of microorganisms become irreversibly attached to a surface as biofilms the organisms exhibit distinctive phenotypic properties and tend to be far more resistant to antimicrobial agents.⁵ Additionally, in view of the growing problem of bacterial resistance to conventional antimicrobials, the use of an alternative approach to which bacteria are unable to gain resistance would be valuable.⁶ The current treatment for plaque-related diseases involves the use of traditional antimicrobials in conjunction with the mechanical removal of the biofilm. In the case of caries, a more attractive proposition would be to kill the causative organisms *in situ*.⁷

Photodynamic therapy (PDT) may emerge as a suitable process to combat both biofilm and antimicrobial-related resistance. Using this technique, a photosensitizer, such as hematoporphyrin, phthalocyanine and toluidine blue O, is activated by irradiation with light of a specific wavelength (the maximum absorption of the sensitizer) resulting in the generation of cytotoxic species, including singlet oxygen and free radicals, which are able

to exert a bactericidal effect.⁸ Previous studies have shown that PDT is capable of killing oral bacteria in planktonic cultures,^{9,10} plaque scrapings¹¹ as well as biofilms.^{12,13} However, the antimicrobial effect of toluidine blue O (TBO) associated with either a HeNe laser or a Light-Emitting Diode (LED) on the viability of *S. mutans* biofilms has not been previously studied. Hence, the purpose of this investigation was to evaluate the antimicrobial effect of PDT, using two different light sources, on the viability and architecture of *S. mutans* biofilms under similar conditions to those found *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Photosensitizer and light sources

Toluidine blue O (TBO; Sigma, Poole, UK) was dissolved in dH₂O to obtain a final concentration of 100 µg ml⁻¹ and was subsequently kept in the dark. The light sources used were a Helium/Neon gas laser (Spectra Physics, CA, USA) which produces light with a wavelength of 632.8 nm and a Light-Emitting Diode (Laserbeam, Rio de Janeiro, Brazil) with a spectrum of emission ranging from 620 to 660 nm and a 638.8 nm predominant wavelength.

Inoculum and media

The microorganism used in this study was *Streptococcus mutans* NCTC 10449. To prepare the inoculum, *S. mutans* was first grown anaerobically on brain heart infusion (BHI; Oxoid, Basingstoke, UK) agar plates for 3 days. Subsequently, single colonies were inoculated into 10 ml of BHI broths and incubated anaerobically at 37°C overnight. The nutrient source in all experiments was mucin-containing artificial saliva, the composition of which has been previously described.¹⁴

Production of biofilms

A Constant Depth Film Fermentor (CDFF; University of Wales, Cardiff, UK) *in vitro* model was used for the production of biofilms.¹⁵ The CDFF consists of a rotating turntable which holds 15 polytetrafluoroethylene (PTFE) pans, which rotates beneath two PTFE scraper blades, spreading the incoming media over the pans and maintain the biofilms at a constant depth. Each pan contains 5 cylindrical holes (5.0 mm in diameter) containing PTFE plugs. Hydroxyapatite (HA) discs of the same diameter were placed on top of the PTFE plugs and recessed to a depth of 300 μm . Artificial saliva (100 ml) was pumped into the CDFF for 3.5 h to simulate the formation of a salivary pellicle. Subsequently, 10 ml of an overnight culture of *S. mutans* was added to 750 ml of artificial saliva, mixed and pumped into the CDFF for 24 h. After this period, the inoculum flask was disconnected and the CDFF fed from a medium reservoir of sterile artificial saliva.¹⁶ The artificial saliva was delivered by a peristaltic pump (Watson-Marlow, Falmouth, UK) at a rate of 0.5 ml min^{-1} , similar to the unstimulated salivary flow rate in healthy individuals.¹⁴ Additionally, an aqueous solution of 2% (w/v) sucrose was also pumped over the biofilms for periods of 30 min at the same speed via a second peristaltic pump.¹⁷ The sucrose pulsing was carried out four times a day and during this period the artificial saliva supply was maintained. On days 3, 7 and 10 intact biofilms were removed aseptically for testing.

pH measurements

On days 7 and 9 the pH of the biofilm effluent was determined using a pH meter (pH-boy, Camlab, Cambridge, UK). The instrument was recalibrated before each sample and its accuracy was ± 0.1 pH units. The pH measurements were taken at 15, 30, 45 min, 4.5 h and 5.5 h after sucrose pulsing.¹⁷

Photodynamic therapy

HA discs containing the biofilms, were removed from the CDFF on days 3, 7 and 10 and 25 μl of TBO ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) was placed onto each biofilm and subsequently left in the dark for 5 min (pre-irradiation time). Following this time, the biofilms were exposed for 5, 15 or 30 min to HeNe laser or LED light. The power output of both light sources was 32 mW. The energy density for the different irradiation times were 49 Jcm^{-2} , 147 Jcm^{-2} and 294 Jcm^{-2} respectively. The biofilms were then placed into 1 ml of phosphate-buffered saline (Oxoid) and vortexed for 60 seconds in order to disperse the biofilms. Ten-fold serial dilutions were carried out and aliquots plated onto BHI agar which were then incubated anaerobically at 37°C for 3 days before the number of viable organisms were enumerated. In order to determine the effect of the light alone on bacterial viability, biofilms were processed in the same way excluding treatment with TBO (S-L+). Additional controls consisted of biofilms treated with TBO, but not exposed to light sources (S+L-) and biofilms which were neither sensitized with TBO nor exposed to light (S-L-).

Confocal Laser Scanning Microscopy

The HA discs were placed into a petri dish (5 cm in diameter), biofilms upwards and 10 ml of saline solution containing 2 μl of Live/Dead stain (Molecular Probes, Oregon, USA) carefully added without disturbing the samples.¹⁸ After incubation in the dark for 15 min, the biofilms were examined with a Radiance 3000 confocal laser-scan head at wavelength of 488nm and 543nm (Biorad GmbH, Jena, Germany) in conjunction with a BX51 stereomicroscope (Olympus UK Ltd, Southall, UK) equipped with a $40 \times$ HCX water immersion dipping lens. The laser power settings used for the scan was 2 – 9% for 488nm and 10 – 25% for 543nm. The resulting collections of confocal optical sections were

collected by BioRad Lasersharp software as stacks of images. The images were subsequently analyzed using ImageJ (National Institute of Health, USA) to produce *xy* projections (the sum total of pixel brightness in the *z*-axis) and partial sagittal projections (~6 μm thick projections at a point along the *x* axis).

Statistical analysis

The dependent variables were sensitizer and light source (LED or HeNe). First, the data were evaluated to check the equality of variances and normal distribution of errors. To determine the significance of the irradiation alone, the presence of sensitizer alone and the combination of sensitizer and light, the data were analyzed by a Variance Analysis (ANOVA) model using the factorial (2×2) design. The Tukey test was chosen for evaluating the significance of all pair wise comparisons with a significance limit of 5%.

RESULTS

Figure 1 illustrates the pH curve measured from the biofilm effluent under sucrose supplementation conditions. At both days there was a drop in the pH of the effluent from near neutral to around pH 4.2 after 75 min post-pulsing. After this time the pH recovered to the same values as those seen prior to pulsing. The number of microorganisms increased according to the age of biofilms reaching 2.49×10^8 CFU in 3 days, 5.07×10^8 CFU in 7 days and 1.44×10^9 after 10 days of growth. Significant differences between CFU from biofilms of different ages was observed only after 10 days of growth ($p=0.01$).

Controls were carried out for all exposure times and all ages of biofilm. Neither irradiation of the biofilms in the absence of TBO (S-L+) nor incubation with TBO alone (S+L-) had a significant effect on the viability of *S. mutans* biofilms at any stage. Indeed, the 95%

confidence intervals for all the controls at the three time points were 2.49×10^8 - 4.62×10^8 (3 days), 5.07×10^8 – 5.07×10^8 (7 days) and 1.06×10^9 – 2.11×10^9 (10 days).

Significant decreases in the viability of *S. mutans* biofilms were only observed when biofilms were exposed to both TBO and light. There was a significant relationship between the dye, light source and irradiation time ($p < 0.001$). The antimicrobial effect of photodynamic therapy using different energy doses on the viability of *S. mutans* biofilms after 3, 7 and 10 days growth is shown in Figures 2 and 3. The biofilms were sensitized with $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ TBO and irradiated either with a HeNe laser or a LED light with an energy density of 49 Jcm^{-2} (5 min), 147 Jcm^{-2} (15min) or 294 Jcm^{-2} (30 min). When 3 day biofilms were submitted to photodynamic therapy there was a considerable reduction in the median viable counts from 2.45×10^8 (control) to 3.06×10^5 , 3.13×10^4 and 2.41×10^3 after 5, 15 and 30 min irradiation with a LED light and 2.29×10^5 , 1.73×10^5 , 1.06×10^5 with HeNe laser light respectively. These values correspond to percentage reductions ranging from 99.87% to 99.99%. Similar results were obtained with 7 day old biofilms with bacterial counting reduced from 5.07×10^8 at control group to 3.88×10^5 , 1.73×10^5 and 2.59×10^4 after respectively 5, 15 and 30 min irradiation with a LED light and 4.04×10^6 , 6.19×10^5 , 3.94×10^5 with HeNe laser light. These values correspond to reductions percentage ranging from 99.20% to 99.99%. Again, after 10 days growth percentage reductions ranging from 99.61% to 99.98% were observed. Overall, the results showed that bactericidal effect was light dose-dependent and that older biofilms were less susceptible to photodynamic therapy.

Comparing the two light sources used, the association of TBO and LED was more effective than TBO and HeNe treatment when three days biofilms were exposed to 147 Jcm^{-2}

($p=0.0103$) or 294 Jcm^{-2} ($p<0.001$) energy densities. Also, TBO and LED killing was higher when 7 day old biofilms were exposed to an energy density of 49 Jcm^{-2} ($p<0.001$) or 294 Jcm^{-2} ($p<0.001$). There was no significant difference between HeNe laser and LED light when photodynamic therapy was used to kill 10 day old biofilms using 15 or 30 min of irradiation.

In addition to viability studies confocal microscopy was also carried out. Representative CLSM images of biofilms prior and after photodynamic therapy are shown in Figure 4. The arrows indicate the position of the sagittal section ($6\mu\text{m}$ thick) and the total area of the images was $300 \times 300 \mu\text{m}$. Figures 1A and 1B refer to biofilms neither sensitized with TBO nor exposed to light with 3 and 10 days of growth, respectively. Dead stained areas (in blue) can be observed in older biofilms even when not submitted to photodynamic therapy, especially in deeper regions. Biofilms exposed to both $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ TBO and 49 Jcm^{-2} energy density can be observed in Figure 1C (HeNe laser) and 1E (LED light). Although one cannot quantitatively compare the efficacy of the two treatments by CLSM images, dead stained areas can be observed to both light sources also at external surface of biofilms. Biofilms submitted to photodynamic therapy using a 294 Jcm^{-2} energy density are illustrated at Figures 1D (HeNe laser) and 1F (LED light). Large kill proportions can be observed after 30 min of irradiation characterized by a shift from live (green) to dead (blue) stained cells.

DISCUSSION

A number of studies have shown that oral bacteria are susceptible to photodynamic therapy when they are grown as planktonic cultures.^{9,10,19} However, the causative agents of caries

and other oral diseases are present as organized biofilms. It has been known that biofilm-grown cells differ from their planktonic counterparts in a number of respects including the presence of a polymeric matrix, cell wall composition, growth rate, metabolic activity and gene expression.²⁰ When considering the use of photodynamic therapy on intact biofilms, it is also important to remember that bacteria in such a state are so far less susceptible to antimicrobial agents. Although some studies have concentrated on lethal photosensitization of oral biofilms, none of them evaluated the antimicrobial effect of PDT, using different light sources, on the viability and architecture of *S. mutans* biofilms under conditions similar to those found *in vivo*.

The results of this study showed that photodynamic therapy was effective in significantly reducing the viable counting of *S. mutans* biofilms grown under conditions closely similar to those found *in vivo*. The CDFF model is particularly suited to cariogenic bacteria biofilms studies because it provides an environment similar to the oral cavity, in which, biofilms are grown on a solid substratum with a continuous replacement of nutrient source.¹⁴ In addition, the thickness of biofilms can be controlled and after the initial period of formation the properties of the biofilm are relatively constant over the time.²¹ Also, the removal of superficial layers of the biofilm by a scraper blade simulates conditions in the mouth where chewing and tongue movement continuously remove the outermost layers of supragingival plaque.¹ Thus, unlike other systems, large number biofilms are generated (up to 75 replicates) in the CDFF which aids in statistical analysis.

In the present study, the addition of 2% sucrose into the CDFF resulted in an acidic system with a pH drop to 4.3 after sucrose pulsing before returning to 6.8 before the beginning of the next cycle, typical of the Stephen curve.²² Similar results have been shown in previous studies using the CDFF to grow oral biofilms supplemented with sucrose.^{16, 23} Additionally,

pH levels as low as 4.3 are similar to the pH of approximal plaque following a sucrose rinse *in vivo*.²⁴ The results of this study indicate that low plaque pH levels *in vivo* are able to return to normal within 2 hours. However, the inner regions of plaque biofilms can become inaccessible to saliva exchanges due to their thickness and can remain at low pH for long periods, thereby allowing enamel demineralization to take place.²⁵ In the biofilm model used, the 300µm thick biofilms would be similar to approximal areas thus allowing a low pH to exist within the biofilm.¹⁶

In a study analyzing bacteria in supragingival plaque scrapings, Wilson *et al.*¹¹ found that substantial kills could be achieved by laser light in the presence of an appropriate photosensitizer. It has also been shown previously that the viability of single-species *Streptococcus sanguis* biofilms can be reduced by PDT.¹² In a study involving multi-species biofilms, Wood *et al.*¹³ reported that widespread killing occurred when oral biofilms formed *in situ* were treated with a cationic Zn (II) phthalocyanine photosensitizer and exposed for 30 min to a 400W tungsten filament lamp (although this was determined by confocal and transmission electron microscopy and the extent of killing was not quantified). Recently, Soukos *et al.*²⁶ studied the association of PDT and the use of photomechanical waves (PW) on the viability of periodontal bacteria and concluded that PW may be a potential tool for killing such bacteria when associated with PDT as it may improve the penetration of the sensitizer within biofilms.

The results of the present study have shown that a large number of bacteria present in *S. mutans* biofilms can be killed when treated with TBO and irradiated with either a HeNe laser or a Light Emission Diode. Interestingly, similar results were obtained for the two light sources. This represents an advantage when one considers that the best results

described in the scientific literature have been obtained using conventional lasers to perform therapy. This would mean by using LED as a light source the technology could be simplified and a lower cost of treatment carried out in comparison to the complex laser systems.

CLSM images of biofilms after exposure to HeNe laser or LED light in the presence of TBO suggest that lethal photosensitization occurred predominantly in the outer layers of the biofilms leaving some of inner most bacteria alive which may be due to the inability of the photosensitizer to diffuse through into these inner regions.²⁷ This illustrates one potential problem associated with photodynamic therapy biofilm-related diseases. However, this could be overcome by selecting a photosensitizer able to penetrate through the biofilm matrix, and by using alternative tools to improve photosensitizer penetration such as photomechanical waves, as well as by irradiating biofilm internally via an optical fiber instead of from the biofilm surface.²⁷

Due to the emergence of antibiotic resistance, photodynamic therapy has become a viable alternative antibacterial therapeutic to biofilm-related diseases such as dental caries. The advantages of photodynamic therapy over conventional antimicrobial agents are firstly, rapid killing of target organism depending mainly on the light energy dose delivered and, therefore, the power output of the light source used. Hence, resistance development would be unlikely as killing is mediated by singlet oxygen and free radicals and high concentrations of photosensitizer do not need to be maintained in the disease for more than few minutes in contrast with hours or even days necessary in the case of conventional antimicrobial agents. Finally, antimicrobial effects can be confined to the site of the lesion by careful topical application of photosensitizer and restrict irradiation of area by using an optical fiber.⁷

In conclusion, the results of this study showed that *S. mutans* biofilms grown in an environment closely similar to that found *in vivo* were susceptible to either HeNe laser or LED light in the presence of TBO suggesting that this approach may be useful in the treatment of dental plaque-related diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CAPES Foundation (Foundation for the Coordination of Higher Education and Graduate Training), Brazilian Government, process BEX2800/03-9.

REFERENCES

1. Spratt, D. A. & Pratten, J. (2003). Biofilms and the oral cavity. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology* **2**, 109-20.
2. Svensater, G., Borgstrom, M., Bowden, G. H. W. *et al.* (2003). The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Research* **37**, 395-405.
3. van Houte, J. (1994). Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of Dental Research* **73**, 672-82.
4. Svensater, G., Welin, J. Wilkins, J. *et al.* (2001). Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 139-46.
5. Hoyle, B. D., Williams, L. J. & Costerton, J. W. (1993). Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Infection and Immunity* **61**, 777-80.
6. Wilson, M. (1993). Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 299-306.

7. Wilson, M. (2004). Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **3**, 412-8.
8. Malik, Z., Hanania, J. & Nitzan, Y. (1990). Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **5**, 281-93.
9. Burns, T., Wilson, M. & Pearson, G. J. (1994). Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. *Journal of Dentistry* **22**, 273-8.
10. Zanin, I. C. J., Brugnera Junior, A. & Goncalves, R. B. (2002). *In vitro* study of bactericidal effect of low level laser therapy in the presence of photosensitizer on cariogenic bacteria. *Lasers in Dentistry* **2**, 154-61.
11. Wilson, M., Burns, T., Pratten, J. *et al.* (1995). Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 569-74.
12. Wilson, M., Burns, T. & Pratten, J. (1996). Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **37**, 377-81.
13. Wood, S., Nattress, B., Kirkham, J. *et al.* (1999). An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **50**, 1-7.
14. Pratten, J., Wills, K., Barnett, P. *et al.* (1998). *In vitro* studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 1149-55.

15. Wilson, M. (1999). Use of constant depth film fermentor in studies of biofilms of oral bacteria. In *Methods in Enzimology*, (Doyle, R. J. Ed.), pp. 264-79. Academic Press, San Diego, CA.
16. Pratten, J. & Wilson, M. (1999). Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1595-9.
17. Deng, D. M. & ten Cate, J. M. (2004). Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. *Caries Research* **38**, 54-61.
18. Hope, C. K., Clements, D. & Wilson, M. (2002). Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 448-55.
19. Williams, J. A., Pearson, G. J., Colles, M. J. *et al.* (2003). The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries Research* **37**, 190-3.
20. Costerton J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-22.
21. Peters, A. C. & Wimpenny, J. W. T. (1988). A constant depth laboratory model film fermenter. *Biotechnology and Bioengineering* **32**, 263-70.
22. Stephan, R. M. (1944). Intra-oral hydrogen-ion concentration associated with dental caries activity. *Journal of Dental Research* **23**, 257-66.
23. Deng, D. M., Buijs, M. J. & ten Cate, J. M. (2004). The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *European Journal of Oral Sciences* **112**, 42-7.

- 24.** Kleinberg, I. & Jenkins, G. N. (1964). The pH of dental plaques in the different areas of the mouth before and after meals and their relationship to the pH and rate flow of resting saliva. *Archives of Oral Biology* **9**, 493-516.
- 25.** Hudson, D. E., Donoghue, H. D. & Perrons, C. J. (1986). A laboratory microcosm (artificial mouth) for the culture and continuous pH measurement of oral bacteria on surfaces. *Journal of Applied Bacteriology* **60**, 301-10.
- 26.** Soukos, N. S., Mulholland, S. E., Socransky, S. S. *et al.* (2003). Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers in Surgery and Medicine* **33**, 161-8.
- 27.** O'Neill, J. F., Hope, C. & Wilson, M. (2002). Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers in Surgery and Medicine* **31**, 86-90.

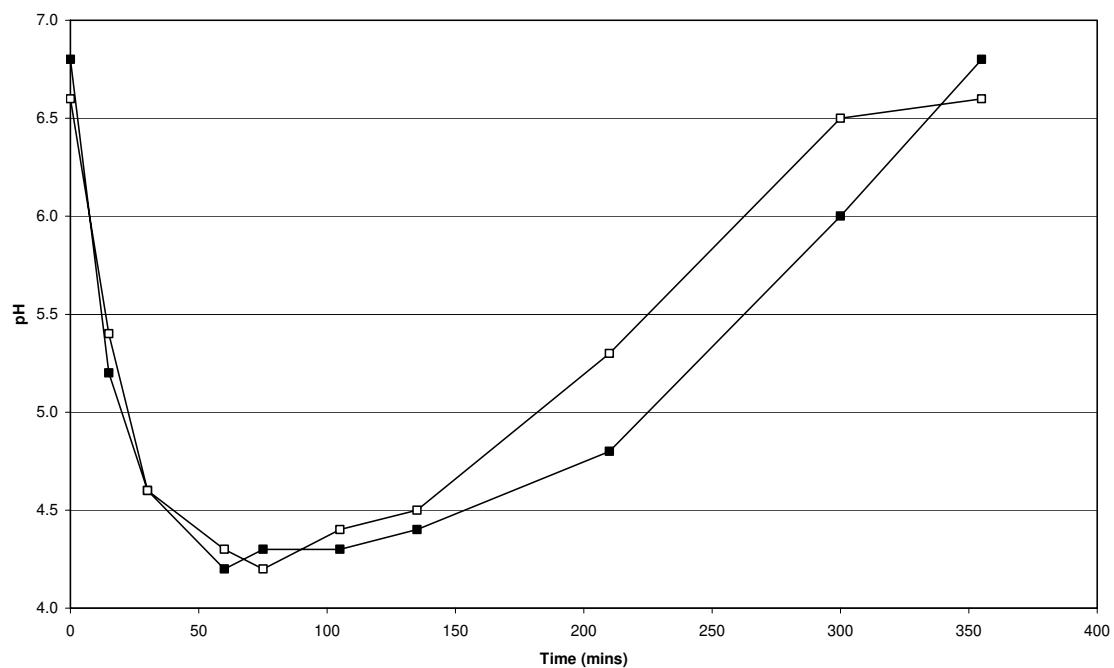


FIGURE 1: pH of biofilm effluent after the addition of sucrose to the system (time = 0) after 7 (filled squares) and 9 days (open squares) growth (n=2).

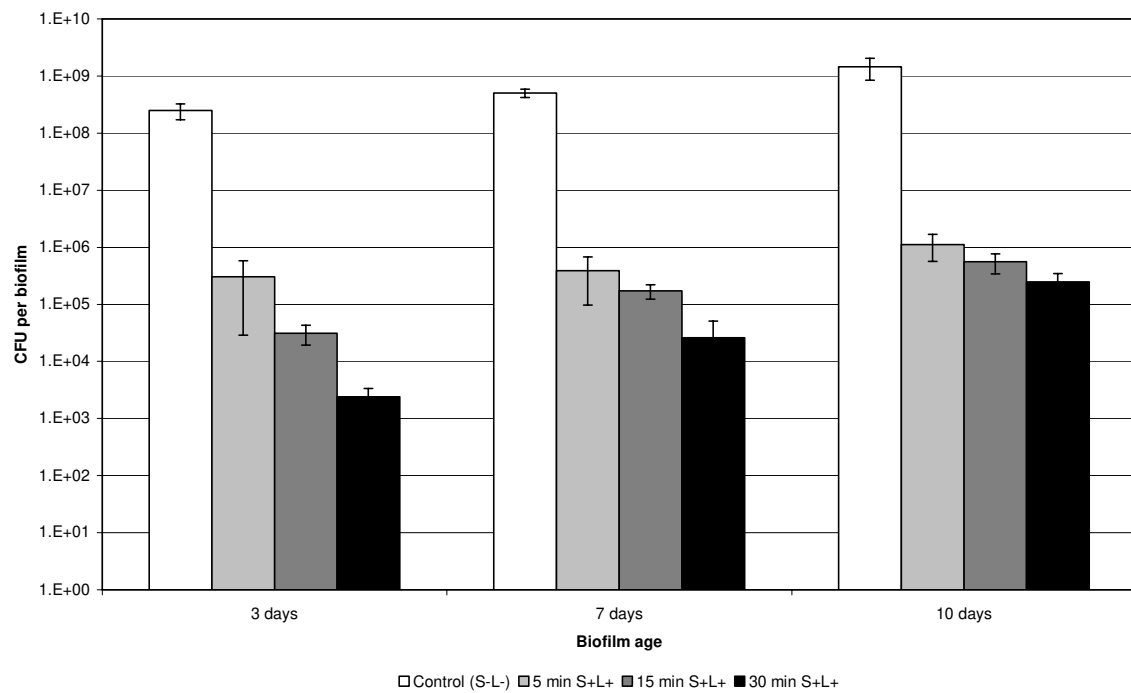


FIGURE 2: Effect of negative control (S-L-) and the association of TBO and LED light (S+L+) at different biofilm ages. Data represents mean values (n=4) and error bars represent standard deviations.

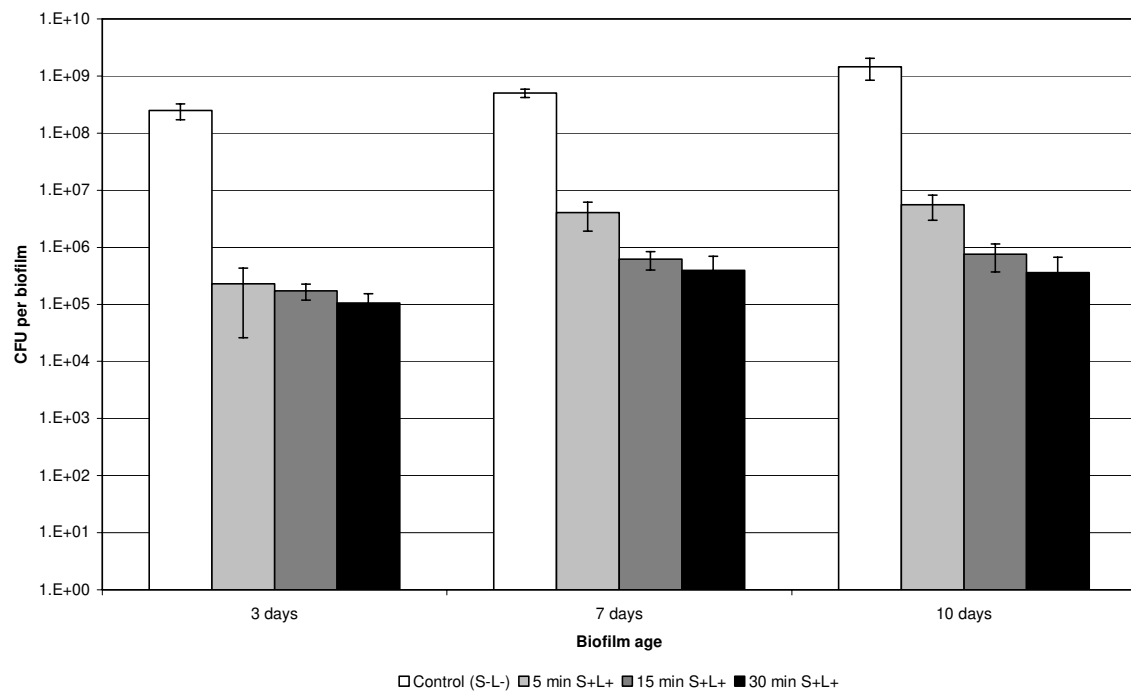


FIGURE 3: Effect of negative control (S-L-) and the association of TBO and HeNe laser (S+L+) at different ages. Data represents mean values (n=4) and error bars represent standard deviations.

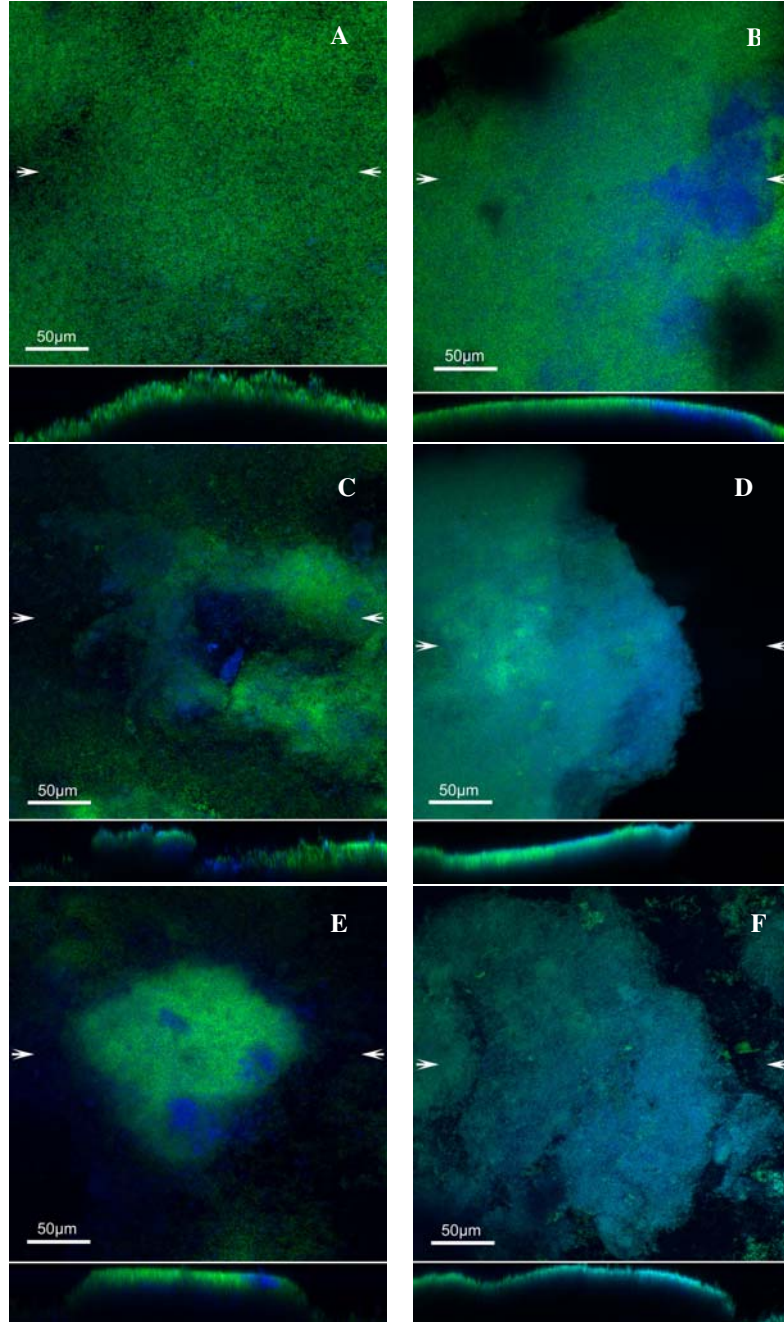


FIGURE 4: Three dimensional CSLM reconstruction of control and PDT-treated biofilms based on a series of xy projections. The arrows indicate the position of the sagittal section ($6\mu\text{m}$ thick). Images A and B refer to S-L- treatment while images C to F refers to S+L+ treatment.

IV – DISCUSSAO GERAL

Um grande número de estudos - **Capítulo 1** - tem demonstrado que a terapia fotodinâmica é efetiva para reduzir as contagens de bactérias presentes em caldos de cultura (Dobson & Wilson, 1992; Burns *et al.*, 1994, Burns *et al.*, 1995; Zanin *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2003) e biofilmes desorganizados (Wilson *et al.*, 1995; Zanin, 2002). Entretanto, as bactérias causadoras da cárie dental são encontradas na cavidade bucal organizadas na forma de biofilmes sobre a superfície dos dentes e tecidos adjacentes. Atualmente, existe um consenso de que a obtenção de efeito antimicrobiano de um determinado agente sobre bactérias crescidas em caldos de cultura é apenas um dado indicativo, pois as bactérias organizadas na forma de biofilmes apresentam um aumento expressivo de resistência aos agentes antimicrobianos (Mah & O'Toole, 2001). Esta resistência parece estar relacionada à presença da matriz de polissacarídeos, a alterações na composição da parede celular, a uma taxa de crescimento celular mais lento bem como pela expressão de genes de resistência aos agentes antimicrobianos (Coterton *et al.*, 1999).

Assim, quando estudamos o uso da terapia fotodinâmica sobre biofilmes devemos considerar que essas bactérias encontram-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos. Atualmente, poucos são os estudos que avaliam o potencial antimicrobiano da terapia fotodinâmica sobre biofilmes organizados. Wilson *et al.* (1996) mostraram que a associação do alumínio dissulfonado fitalocianino e um laser diodo de 660 nm foi efetiva para reduzir significativamente as contagens de *S. sanguinis* em biofilmes formados no CDFF. Em um estudo envolvendo biofilmes de multiespécies, Wood *et al.* (1999) demonstraram alta taxa de mortalidade bacteriana quando biofilmes formados *in situ* foram tratados com um fotossensibilizador catiônico e expostos a uma luz branca de 400 W por 30 min; embora os

resultados tenham sido obtidos através de microscopia de transmissão e microscopia confocal a laser e nenhuma análise quantitativa tenha sido realizada. Em 2002, O'Neill *et al.* demonstraram que um significativo efeito antimicrobiano foi obtido em biofilmes orais crescidos sobre discos de nitrocelulose quando estes eram sensibilizados com o azul de orto-toluidina e a seguir irradiados com uma luz vermelha com densidade de energia de 81,9 J/cm². Recentemente, Soukos *et al.* (2003) observaram significativas reduções nas contagens de bactérias presentes em biofilmes periodontais quando a terapia fotodinâmica era associada ao uso de ondas fotomecânicas.

Ocorre que a grande variedade de modelos laboratoriais, luzes, fotossensibilizadores e parâmetros utilizados para se estudar a terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais, torna a comparação dos resultados bastante complexa. Além disso, a utilização de luzes LED ao invés de lasers para a realização da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais ainda não foi descrita na literatura. Embora tanto os lasers quanto os LED produzam luzes monocromáticas, os LED não apresentam boa colimação e coerência, resultando em vantagens econômicas e em bandas de emissão mais largas que favorecem a obtenção de complementaridade com os fotossensibilizadores utilizados.

Atualmente, acredita-se que o conhecimento da composição e metabolismo dos biofilmes orais pode favorecer o desenvolvimento de medidas de controle da doença cárie. Entretanto, o estudo dos biofilmes orais *in vivo* apresenta alguns inconvenientes como o alto grau de variabilidade entre os indivíduos, assim como o fato de a microbiota presente em um sítio específico ser altamente influenciada por uma série de fatores endógenos e exógenos.

Nesse sentido, o objetivo do **Capítulo 2** dessa tese foi primeiramente validar um modelo de formação de biofilme de mono-espécies de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sanguinis*

formados sobre uma interface sólido/líquido tendo como substrato blocos de esmalte dental bovino e tendo uma periódica renovação do meio de cultura. Nesse estudo, o meio nutriente utilizado foi capaz de manter o potencial cariogênico desse modelo laboratorial uma vez que o número de microrganismos, a perda mineral e a produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis aumentaram com o tempo de formação dos biofilmes. A única bactéria que não apresentou diferença na quantidade de polissacarídeos extracelulares insolúveis com o decorrer do tempo foi o *S. mutans*. Isso pode ser explicado pelo fato de se tratar de uma espécie altamente produtora de polissacarídeos extracelulares. Como o BHI é um meio de cultura extremamente rico, talvez o aumento gradativo da produção de polissacarídeos tenha ocorrido nos estágios iniciais da formação dos biofilmes anteriores ao início das análises aos 3 dias de crescimento. No entanto, esse modelo de formação de biofilme apresentou algumas limitações tais como a ausência de formação da película adquirida, a inexistência de uma irrigação constante dos biofilmes com substitutos salivares e a ausência das forças que simulassem a ação mecânica da língua e outros movimentos bucais. Além disso, a formação dos biofilmes imersos em um meio de cultura não promoveu a simulação das flutuações de pH encontradas na cavidade bucal dos humanos.

A segunda parte do **Capítulo 2** dessa tese, envolveu a realização de um estudo para avaliar o potencial antimicrobiano da terapia fotodinâmica sobre biofilmes formados no modelo previamente validado. Os resultados desse estudo revelaram que a associação do azul de orto-toluidina e uma luz LED foi efetiva para reduzir significativamente a contagens de bactérias presentes em todos os biofilmes testados. Resultados semelhantes após a realização da terapia fotodinâmica são encontrados na literatura apenas com a utilização de lasers convencionais (O'Neill *et al.*, 2002).

Assim, devidos as limitações do modelo de formação de biofilmes descrito anteriormente, o estudo do **Capítulo 3** foi realizado. Esse estudo teve por objetivo avaliar o efeito da associação do azul de orto-toluidina a uma luz LED vermelha ou um laser de HeNe sobre biofilmes de *S. mutans* crescidos em um fermentador de espessura e fluxo contínuos. Nesse estudo, o *constant-depth film fermentor- CDFF* foi o modelo laboratorial de escolha para o crescimento dos biofilmes orais. A utilização do CDFF possibilitou a simulação da formação da película adquirida, o crescimento dos biofilmes a partir de culturas simples de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita em um ambiente continuamente banhado por saliva artificial. Além disso, a escolha desse modelo possibilitou o controle preciso da frequência de distribuição de sacarose, da temperatura, da espessura dos biofilmes e da distribuição de gases no interior do aparelho simulando uma atmosfera de aerobiose. Isso faz com que o CDFF seja atualmente o modelo de formação de biofilmes orais *in vitro* que melhor reproduz os biofilmes formados na cavidade bucal de humanos (Wilson & Pratten, 1999).

No terceiro artigo, os biofilmes foram crescidos sob suplementação de 2% de sacarose o que resultou em uma queda do pH para 4.3 cerca de 30 min após a adição da sacarose com o pH retornando a 6.8 em aproximadamente 6 horas caracterizando uma típica curva de Stephen. Resultados semelhantes foram observados por outros autores estudando biofilmes orais com suplementação de sacarose 4 vezes ao dia (Deng & ten Cate, 2004; Deng *et al.*, 2004). Quedas de pH para aproximadamente 4.3 foram observadas *in vivo* por Kleinberg & Jenkins (1964) após a realização de bochechos com soluções de sacarose. No entanto, nesse estudo o pH retornava a normalidade 2 h após a realização do bochecho. O tempo de até 6 h necessário para o retorno do pH para os níveis de normalidade observados no nosso estudo podem ser explicados pelo fato da espessura de

300 µm ser semelhante àquela encontrada nos biofilmes formados nas regiões interproximais. Nesses casos, há uma dificuldade de contato entre a saliva e o biofilme o que pode retardar a ação da capacidade tampão promovendo, dessa forma, a manutenção do pH baixo por períodos de tempo mais longos (Hudson *et al.*, 1986; Pratten & Wilson, 1999).

Além disso, os resultados do **Capítulo 3** demonstraram uma significativa redução nas contagens das bactérias presentes em biofilmes de *S. mutans* após a realização da terapia fotodinâmica. Não foram observadas diferenças significativas no efeito antimicrobiano promovido quando um laser de HeNe ou uma luz LED eram utilizados. Em ambos os casos, o fotossensibilizador utilizado foi o azul de orto-toluidina na concentração de 100 µgml⁻¹ e tanto a sensibilização dos biofilmes na ausência da luz como a irradiação dos biofilmes na ausência do corante, não demonstraram efeito antimicrobiano sobre os biofilmes testados. Além disso, a microscopia confocal a laser demonstrou que a morte das bactérias promovida pela terapia fotodinâmica ocorreu predominantemente nas camadas externas dos biofilmes e que os biofilmes mais velhos foram menos susceptíveis à terapia fotodinâmica. Isso pode ter sido causado pela dificuldade do fotossensibilizador em penetrar nas regiões mais profundas bem como pela habilidade das bactérias inseridas em biofilmes mais organizados em expressar fatores de resistência (Mah & O'Toole, 2001; Coterton *et al.*, 1999). Esses problemas poderiam ser superados pela escolha de fotossensibilizadores com maior habilidade de penetração nos biofilmes como os catiônicos bem como pela irradiação do biofilmes internamente por meio da utilização de uma fibra ótica ao invés de irradiar a superfície dos biofilmes como foi realizado nesses estudos.

Assim, considerando o surgimento crescente de bactérias resistentes aos antibióticos, a terapia fotodinâmica surge como uma terapia antimicrobiana alternativa para o tratamento e/ou prevenção das doenças causadas por biofilmes como cárie dental. Nessa terapia, a morte das bactérias é mediada pela produção de oxigênio singlete e radicais livres e tanto o fotossensibilizador quanto a luz não precisam ser mantidas na área da lesão por mais do que alguns minutos (em contraste com as horas ou até mesmo dias necessários no caso do uso de agentes antimicrobianos tradicionais), o que torna bastante improvável o surgimento de cepas resistentes (Wilson, 2004).

Outro ponto relevante a se enfatizar é que a luz LED vermelha apresentou efeito antimicrobiano semelhante ao obtido pelo laser de HeNe o que representa uma vantagem uma vez que os melhores resultados encontrados na literatura realizam a terapia fotodinâmica utilizando lasers convencionais. Além de uma simplificação da técnica, a utilização de LED representa uma redução significativa no custo para a realização da terapia fotodinâmica caso ela venha a ser aplicada clinicamente.

V – CONCLUSÃO GERAL

1. A revisão da literatura demonstrou a relevância e a escassez de estudos utilizando a terapia fotodinâmica sobre biofilmes cariogênicos. Embora a revisão da literatura sugira que a terapia fotodinâmica possui um alto potencial caso venha a ser aplicada na clínica odontológica, outros estudos mostram-se necessários a fim de determinar o efeito antimicrobiano da terapia em condições mais similares as encontradas na cavidade bucal de humanos.
2. O modelo de formação de biofilme de estreptococos testado foi efetivo para simular situações de alto desafio cariogênico promovendo a desmineralização do esmalte, sendo que a aplicação da TFD associando o azul de orto-toluidina a 100 µg/ml e luz LED vermelha com uma densidade de energia de 85.7 Jcm⁻² foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade bacteriana nos biofilmes ($p < 0,05$).
3. Reduções significativas ($p < 0,05$) na viabilidade dos biofilmes de *S. mutans* ocorreram após a TFD utilizando o azul de orto-toluidina associado tanto com o laser de HeNe (632.8 nm) como com a luz LED vermelha. A ação antimicrobiana foi dose-dependente e o efeito da TFD se limitou às camadas externas dos biofilmes.

VI – REFERÊNCIAS*

1. Bowden G, Edwardsson S. Ecologia Oral E Cárie Dentária. In: Thylstrup A, Fejerskov O. **Cariologia clínica**. São Paulo: Santos; 1995. p.45-9.
2. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res**. 1995; 29(3): 192-7.
3. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. **J Dent**. 1994; 22(5): 273-8.
4. Challacombe SJ. Serum and salivary antibodies to *Streptococcus mutans* in relation to the development and treatment of human dental caries. **Arch Oral Biol**. 1980; 25(7): 495-502.
5. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. 1999; 284: 1318-1322.
6. Deng DM, and ten Cate JM. Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. **Caries Res**. 2004; 38:54-61.
7. Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. **Eur. J. Oral Sci**. 2004; 112:42-47.
8. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch Oral Biol**. 1992; 37(11): 883-7.

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

9. Evans RC, Holmes CJ Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. **Antimicrob Agents Chemother.** 1987; 31: 889-94.
10. Gibbons RJ, Hay DI. Human salivary acidic proline-rich-proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatite surfaces. **Infect Immun.** 1988; 56(2): 439-45.
11. Griffiths MA, Wren BW, Wilson M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro* using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. **J Antimicrobial Chemother.** 1997; 40: 873-6.
12. Hudson DE, Donoghue HD, Perrons CJ. A laboratory microcosm (artificial mouth) for the culture and continuous pH measurement of oral bacteria on surfaces. **J. Appl. Bacteriol.** 1986; 60:301-310.
13. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu Rev Microbiol.** 2000; 54: 413-37.
14. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human decay. **Microbiol Res.** 1986; 50(4): 353-80.
15. Macrobert AJ, Bown SG, Phillips D. What are the ideal properties of a photosensitizer? In: Photosensitizing Compounds: **Their Chemistry, Biology and Clinical Use.** Chichester: Wiley, 1989, p. 4-16.
16. Mah, TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.** 2001; 9(1): 34-9.

17. Malik Z, Hanania J, Nitzan Z. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. **J Photochem Photobiol B**. 1990; 5(3-4): 281-93.
18. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol Mol Biol Rev**. 1998; 62(1): 71-109.
19. Marsh P, Martin M. **Oral microbiology** 3rd ed. London, United Kingdom: Chapman & Hall, 1992.
20. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res**. 1994; 8(2): 263-71.
21. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J Dent Res**. 1992; 71: 1431-8.
22. Meyer DH, Fives-Taylor PM. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. **Curr Opin Microbiol**. 1998; 1: 88-95.
23. Nyvad B. Microbial colonization of human tooth surfaces. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl**. 32(1): 1-45.
24. O'Neill JF, Hope C, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. **Lasers Surg Med**. 2002; 3: 86-90.
25. Pratten J, Wilson M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. **Antimicrob Agents Chemother**. 1999; 43:1595-1599.
26. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Lasers Surg. Med**. 2003; 33:161-168.

27. Spratt DA, Pratten J. Biofilms and the oral cavity. **Re/Views Environ Sci Bio Technol.** 2003; 2: 109-120.
28. Thylstrup A, Fejerskov O. O ambiente oral – uma introdução. In: Thylstrup A, Fejerskov O. **Cariologia clínica.** São Paulo: Santos, 1995. p.13-16.
29. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. **J Bacteriol.** 200; 182(10): 2675-9.
30. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries Res.** 2003; 37: 190-3.
31. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J Appl Bacteriol.** 1995; 78(5): 569-74.
32. Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilmes using a light-activated antimicrobial agent. **J Antimicrobial Chemother.** 1996; 37(2): 377-81.
33. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol.** 1992; 25(2): 77-81.
34. Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem. Photobiol.** 2004; 3: 412-8.
35. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J Appl Bacteriol.** 1993; 75(4): 299-306.
36. Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J *et al.* An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilmes formed *in vivo*. **J Photochem Photobiol B.** 1999; 50(1):1-7.

37. Zanin ICJ, Brugnera Jr A, Gonçalves RB. *In vitro* study of bactericidal effect of low level laser therapy in the presence of photosensitizer on cariogenic bacteria. **Lasers in Dentistry VIII**. 2002; 3(2): 154-161.
38. Zanin ICJ. **Estudo *in vitro* e *in situ* da ação antimicrobiana do laser diodo associado a fotossensibilizadores sobre microrganismos bucais** [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2002.



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Estudo *in vitro* e *in situ* da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais e cárie dental", sob o protocolo nº **100/2002**, da Pesquisadora **Iriana Carla Junqueira Zanin**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

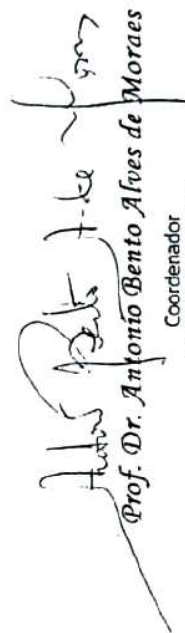
Piracicaba, 29 de novembro de 2002

We certify that the research project with title "*In vitro* and *in situ* study of antimicrobial activity of photodynamic therapy on oral biofilms and dental decay", protocol nº **100/2002**, by Researcher **Iriana Carla Junqueira Zanin**, responsibility by Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, November 29 2002


Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes

Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

ANEXO 2

DELIBERAÇÃO CCPG – 001/98

Dispõe a respeito do formato das teses de Mestrado e de Doutorado aprovadas pela UNICAMP

Tendo em vista a possibilidade, segundo parecer PG Nº 1985/96, das teses de Mestrado e Doutorado terem um formato alternativo àquele já bem estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º - Todas as teses de mestrado e de doutorado da UNICAMP terão o seguinte formato padrão:

- I) Capa com formato único, dando visibilidade ao nível (mestrado e doutorado), e à Universidade.
- II) Primeira folha interna dando visibilidade ao nível (mestrado ou doutorado), à Universidade, à Unidade em foi defendida e à banca examinadora, ressaltando o nome do orientador e co-orientadores. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III) Segunda folha interna onde conste o resumo em português e o Abstract em inglês.
- IV) Introdução Geral.
- V) Capítulo.
- VI) Conclusão geral.
- VII) Referências Bibliográficas.
- VIII) Apêndices (se necessários).

Artigo 2º - A critério do orientador, os Capítulos e os Apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

Parágrafo único – Os veículos de divulgação deverão ser expressamente indicados.

Artigo 3º - A PRPG providenciará o projeto gráfico das capas bem como a impressão de um número de exemplares, da versão final da tese a ser homologada.

Artigo 4º - Fica revogada a resolução CCPG 17/97.

ANEXO 3

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

08-Feb-2005

Dear Dr. Zanin,

A manuscript entitled "**Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study.**" on which you are a co-author, has just been submitted by Dr. Jonathan Pratten to the Journal of Antimicrobial Chemotherapy. The reference number for the paper is: JAC-2005-0117.

The URL and your login details for the Journal of Antimicrobial Chemotherapy's online submission and review system (through which authors and co-authors can monitor the progress of their manuscripts) are as follows:

Site URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/jac>

User ID: irianaz@yahoo.com.br

Password: gwsmtgTt

Please log in and click on 'Edit My Account' to make sure that all of your details are correct and so that you can enter some keywords that describe your areas of expertise.

Please keep a note of your login details. For further information about the Journal of Antimicrobial Chemotherapy please visit our website: <http://jac.oupjournals.org/>.

Yours sincerely

Chris Burley

Journal Administrator

JAC Editorial Office