



CLAUDIA LEAL SAMPAIO SUZUKI

“AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO
TIPO I POR ODONTOBLASTOS MDPC-23 E
FIBROBLASTOS 3T3 APÓS CONTATO DIRETO E
INDIRETO COM BACTÉRIAS RELACIONADAS À CÁRIE
DENTAL E INFECÇÕES ENDODÔNTICAS”

PIRACICABA

2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CLAUDIA LEAL SAMPAIO SUZUKI

“AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO TIPO I POR
ODONTOBLASTOS MDPC-23 E FIBROBLASTOS 3T3 APÓS CONTATO
DIRETO E INDIRETO COM BACTÉRIAS RELACIONADAS À CÁRIE DENTAL E
INFECÇÕES ENDODÔNTICAS”

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA À FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA
EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA NA ÁREA DE
ENDODONTIA

Este exemplar corresponde à versão final
da Dissertação defendida pela aluna Claudia Leal Sampaio Suzuki,
e orientada pelo Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia.

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2013

Su99a Suzuki, Claudia Leal Sampaio, 1985-
Avaliação in vitro da produção de colágeno tipo i por odontoblastos MDPC-23 e fibroblastos 3T3 após contato direto e indireto com bactérias relacionadas à cárie dental e infecções endodônticas / Claudia Leal Sampaio Suzuki. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Alexandre Augusto Zaia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Birrefringência. 2. Streptococcus mutans. 3. Enterococcus faecalis. 4. Porphyromonas gingivalis. I. Zaia, Alexandre Augusto, 1968- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Título em Inglês: Evaluation in vitro of collagen type i production in mdpc-23 odontoblast-like cells and 3t3 fibroblasts after direct and indirect contact with bacteria involved in caries and endodontic infections

Palavras-chave em Inglês:

Birefringence

Streptococcus mutans

Enterococcus faecalis

Porphyromonas gingivalis

Área de concentração: Endodontia

Títuloção: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Alexandre Augusto Zaia [Orientador]

Thais Accorsi Mendonça

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Data da defesa: 18-01-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de Março de 2013, considerou a candidata CLAUDIA LEAL SAMPAIO SUZUKI aprovada.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Alexandre Augusto Zaia".

Prof. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Thais Accorsi Mendonça".

Profa. Dra. THAIS ACCORSI MENDONÇA

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes".

Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Dedico esse trabalho à minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pelo amor sempre presente e que me fez superar a distância e a saudade de cada um. Em especial, aos meus pais, Claudio Suzuki e Maria das Graças Suzuki, que nunca mediram esforços e sempre acreditaram em mim, e aos meus irmãos Carla e Paulo. Dedico esse trabalho à minha família ... que é tudo o que eu tenho de mais importante e valioso na minha vida. Pai, mãe e irmãos, amo eternamente cada um de vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, pela orientação, dedicação e incentivo nessa etapa da minha vida profissional.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Jacks Jorge Junior, pela oportunidade de crescimento científico e profissional.

Aos docentes da Endodontia Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, Prof^a. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida e Prof^a. Dra. Adriana de Jesus Soares, por contribuírem significativamente no meu aprendizado.

Aos professores, alunos da pós-graduação e funcionários da Área de Histologia, Farmacologia e Microbiologia pelo apoio durante o desenvolvimento do meu experimento e por nos permitir usar os respectivos laboratórios para o desenvolvimento da parte experimental.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro a mim concedido através da bolsa de mestrado (nº 2011/02719-0) e do auxílio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa (nº 2011/10675-0).

Aos colegas do laboratório, pelo agradável e enriquecedor convívio nestes dois anos, em especial, Ana Pimentel e Carol pela amizade e pelos difíceis momentos compartilhados e vencidos, uma com o apoio da outra.

À todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização desse trabalho, meu agradecimento.

"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos."

Charles Chaplin

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar se as bactérias *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* alteram a secreção de colágeno tipo I por fibroblastos 3T3 e odontoblastos MDPC-23 em cultura celular; e, havendo alteração, se é dependente do contato célula/bactéria ou apenas dos subprodutos bacterianos. Fibroblastos 3T3 e odontoblastos MDPC-23 foram cultivados e incubados com as bactérias *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* (MOI 1:1) nos períodos de 2, 4 e 8 horas. As bactérias ficaram em contato direto com as células, e em contato indireto através do uso de *inserts* de 0.4µm. A produção de colágeno tipo I secretado pelas células foi quantificada pelo Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), e sua organização estrutural (birrefringência) foi visualizada em microscopia de polarização após coloração com *picrosirus*. Assim, pode-se concluir que a infecção com *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. gingivalis* estimularam um aumento nos níveis de colágeno tipo I nos períodos de 2 e 4 horas em cultura de odontoblastos MDPC-23, e um aumento progressivo nos níveis de colágeno tipo I entre 2 e 8 horas em cultura de fibroblastos 3T3. Também observou-se que o estímulo para o aumento na produção de colágeno se deve a ação dos subprodutos liberados pelas bactérias e não pelo contato célula/bactéria.

Palavras-chaves: colágeno, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, fibroblastos 3T3, odontoblastos MDPC-23.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate whether the bacteria *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis* alter the secretion of type I collagen by 3T3 fibroblasts and MDPC-23 odontoblast-like cells in cell culture, and, with change, if it is dependent on the contact cell/bacteria or only bacterial by-products. 3T3 fibroblasts and MDPC-23 odontoblast-like cells were cultured and incubated with the bacteria *S. mutans*, *E. faecalis* and *P. gingivalis* (MOI 1:1) for the periods of 2, 4 and 8 hours. The bacteria were in direct contact with the cells, and indirect contact through the use of inserts 0.4 μm . The production of type I collagen secreted by cells was quantified by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and its structural organization (birefringence) was visualized in polarized light microscopy after staining with *picrosirus*. Thus, it can be concluded that infection with *S. mutans*, *E. faecalis* and *P. gingivalis* stimulated an increase in the levels of type I collagen in periods 2 and 4 hours in cultured MDPC-23 odontoblast-like cells, and a progressive increase in the levels of type I collagen between 2 and 8 hours in cultured 3T3 fibroblasts. It was noted that the stimulus for the increase in collagen production is due to the action of the by-products released by bacteria and not by contact cell/bacteria.

Keywords: collagen, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, 3T3 fibroblasts, MDPC-23 odontoblast-like cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Complexo dentina-polpa.....	4
2.2. Túbulos dentinários.....	5
2.3. Colágeno.....	7
2.4. Células pulpares.....	9
2.5. <i>Streptococcus mutans</i>	11
2.6. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	12
2.7. <i>Enterococcus faecalis</i>	13
3. PROPOSIÇÃO.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Cultura de células.....	16
4.2. Cultura bacteriana.....	16
4.3. Contato direto e indireto entre células e bactérias.....	16
4.4. Processamento histológico para microscopia de polarização.....	18
4.5. Microscopia de polarização.....	18
4.6. Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima (ELISA).....	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Resultado da produção de colágeno pelos fibroblastos através do ELISA.....	20
5.2. Resultado da avaliação do colágeno dos fibroblastos através da microscopia de polarização.....	22
5.3. Resultado da produção de colágeno pelos odontoblastos através do ELISA.....	31
5.4. Resultado da avaliação do colágeno dos odontoblastos através da microscopia de polarização.....	32
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

O dente humano é alvo substancial de bactérias que podem iniciar o desenvolvimento de lesões cariosas quando colocado em condições susceptíveis, por exemplo, dieta rica em açúcares. Essas bactérias convertem açúcares em ácidos favorecendo a desmineralização da estrutura dentária, inicialmente o esmalte, que se constitui numa barreira impermeável com a função de proteger a dentina subjacente e o tecido pulpar (Nisengard & Newman, 1997). Após a ruptura do esmalte, a dentina exposta ao ambiente bucal torna-se degradada por bactérias Gram-positivas, incluindo estreptococos, lactobacilos e actinomicetes, que dominam largamente a microflora da lesão de cárie. Bactérias cariogênicas desencadeiam eventos inflamatórios e imunológicos na polpa dental por meio da difusão de seus subprodutos através dos túbulos dentinários. Estes eventos podem eliminar a invasão bacteriana e bloquear a via de infecção quando acompanhada pela formação de dentina na interface dentina-polpa. Quando a invasão não é controlada resulta em pulpíte irreversível, necrose pulpar, infecção do sistema de canais radiculares e lesão periapical (Love & Jenkinson, 2002).

A capacidade das células pulpares de resistir e reparar injúrias são fundamentais na manutenção da integridade e homeostasia do órgão dental. A mais comum e conhecida característica do reparo pulpar é a formação da dentina terciária (Tziafas *et al.*, 2000), e está localizada na interface dentina-polpa na área correspondente ao sitio afetado. É secretada em reação a vários estímulos, tais como atrição, cáries ou um procedimento restaurador do dente, aumentando, portanto, a barreira entre a injúria e as células da polpa. Assim, a polpa responde ao processo carioso através da completa obliteração do lúmen dos túbulos dentinários, ou pela diminuição do diâmetro do túbulo para reduzir a permeabilidade das bactérias e seus produtos tóxicos para a polpa (Perdigão, 2010).

Os fibroblastos são as células mais numerosas na polpa, particularmente na porção coronária, onde formam a zona rica em células, cuja função é formar e

manter a matriz pulpar. Enquanto que os odontoblastos são os responsáveis pela produção da matriz de colágeno da dentina (Ten Cate, 2008). Ambos participam ativamente durante o processo inflamatório provocado pela invasão bacteriana. Fibroblastos possuem um papel importante na patogênese da inflamação pulpar produzindo citocinas pró-inflamatórias (Coil *et al.*, 2004). E os odontoblastos, com seus processos celulares se estendendo dentro dos túbulos dentinários, são os primeiros a encontrar as bactérias e/ou seus subprodutos (Hahn & Liewehr, 2007) e representam a primeira linha de defesa do hospedeiro (Farges *et al.*, 2009).

O colágeno tipo I corresponde a 90% das proteínas extracelulares da matriz dentinária (Sasaki & Garant, 1996) e pulpar (Ten Cate, 2008). Dessa forma, a análise da sua birrefringência, através do uso da microscopia de polarização, permite uma mensuração acurada, interpretação e validação da ordem de organização de tal estrutura (Komatsu *et al.*, 2002; Vidal, 2003). Ou seja, a análise da birrefringência do colágeno está relacionada com a sua organização estrutural, e sua mensuração é realizada através do retardo óptico (Vidal & Mello, 1987).

Uma forma de analisar as fibrilas de colágeno é fazendo-se uso de corantes, neste caso, a coloração por *picrosirius* aumenta a birrefringência das fibras colágenas quando estudadas sob a microscopia de polarização (Constantine & Mowry, 1968). Uma modificação em sua birrefringência sugere uma alteração das fibrilas de colágeno frente a uma agressão externa (Ten Cate, 2008). A quantificação da produção de colágeno tipo I também pode ser realizada através de um ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

A avaliação da secreção de colágeno pelos odontoblastos e fibroblastos se justifica para compreender o processo de alteração causado na dentina a fim de manter a integridade estrutural e funcional do tecido pulpar através da produção da matriz dentinária, precursora da dentina terciária. A dentina terciária e intratubular podem evitar a difusão dos microorganismos e/ou seus subprodutos na interface dentina-polpa, e conseqüentemente, os eventos inflamatórios e imunológicos na polpa dental (Love & Jenkinson, 2002).

Poucas informações são discutidas na literatura endodôntica a respeito de fatores que podem atuar sobre odontoblastos e fibroblastos, em relação à secreção de colágeno. Diante do exposto, este estudo visa verificar, por microscopia de polarização e ensaio de ELISA, se as bactérias *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* em contato direto e indireto por 2, 4 e 8 horas, promovem uma alteração na secreção de colágeno tipo I por odontoblastos MDPC-23 e fibroblastos 3T3 em cultura celular.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. COMPLEXO DENTINA-POLPA

A dentina é a porção de tecido duro do complexo dentina-polpa e representa a maior parte do volume do dente. É uma matriz semelhante ao osso que se caracteriza pela presença de múltiplos túbulos dentinários dispostos muito próximos que atravessam toda a sua espessura e contém as extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, os quais formaram a dentina e, agora, a mantêm. Os corpos celulares dos odontoblastos alinham-se ao longo da face interna da dentina, em contato com uma camada da pré-dentina, formando, também, o limite periférico da polpa dentária. Esta é o tecido conjuntivo mole que ocupa a porção central do dente (Ten Cate, 2008).

Pashley (1996) descreve a dentina como um composto biológico constituído de partículas de cristais de apatita numa matriz de colágeno. Outros autores afirmam ser um complexo de estrutura biológica que forma um composto reforçado por fibras contínuas; a matriz, formada pela dentina intertubular; e os lúmens tubulares associados à dentina intratubular, formando a fibra cilíndrica reforçada (Kinney *et al.*, 2003).

A dentina é composta quimicamente, em peso, aproximadamente de 70% de material inorgânico, 20% de material orgânico e 10% de água (adsorvida na superfície do mineral ou nos interstícios entre os cristais), e 45%, 33% e 22%, respectivamente, por volume (Goldberg *et al.*, 1995; Ten Cate, 2008).

Existem três tipos de dentina, a primária, secundária e a terciária. A dentina primária é secretada durante o desenvolvimento do dente humano até a completa formação da raiz, e engloba a dentina circumpulpar. A dentina primária apresenta uma estrutura tubular regular, e é secretada numa taxa diária de 4 $\mu\text{m}/\text{dia}$. A dentina secundária é secretada após a completa formação da raiz, e se apresenta menos tubular, mas com características morfológicas semelhantes à dentina primária (Smith *et al.*, 1995).

A formação da dentina terciária está localizada na interface dentina-polpa na área correspondente ao sitio afetado. É secretada em reação a vários estímulos, tais como atrição, cáries ou um procedimento restaurador do dente, aumentando, portanto, a barreira entre a injúria e as células da polpa. A alteração patológica mais comum da dentina é a cárie dental, e pode ocorrer tanto dentro da estrutura dentinária quanto no seu aspecto pulpar. A polpa responde ao processo cariioso através da completa obliteração do lúmen dos túbulos dentinários, ou pela diminuição do diâmetro do túbulo para reduzir a permeabilidade das bactérias e seus produtos tóxicos para a polpa (Perdigão, 2010).

As células formadoras da dentina terciária podem estar alinhadas na sua superfície ou incluídas na dentina. A dentina terciária é subclassificada em reacional ou reparativa: a primeira, depositada por odontoblastos preexistentes que sobreviveram a uma injúria branda, e geralmente apresentam continuidade tubular com a dentina secundária; e a última, por células recém-diferenciadas semelhantes à odontoblastos que estão substituindo os odontoblastos primários que foram afetados por agressões externas severas, e não possuem continuidade tubular com a matriz dentinária secundária (Graham *et al.*, 2006; Ten Cate, 2008; Perdigão, 2010).

2.2. TÚBULOS DENTINÁRIOS

Os túbulos são uma distinta e importante característica da dentina, e representam os percursos dos odontoblastos a partir da junção esmalte-dentina (JED) ou cemento à câmara pulpar. Os túbulos convergem para a câmara pulpar, e a densidade e orientação variam a depender da localização. Observa-se uma menor quantidade de túbulos na JED, e maior na superfície da pré-dentina, na junção com a câmara pulpar, onde estão os corpos celulares dos odontoblastos. Menores densidades dos túbulos também são verificadas na raiz. O conteúdo dos túbulos incluem processos de odontoblastos, em sua totalidade ou parte do seu

curso, e de fluido. A extensão do processo dos odontoblastos ainda é incerto, mas a evidência é que se estenda até a JED (Marshall *et al.*, 1997).

A formação da dentina intratubular é essencial para defesa da polpa contra invasão bacteriana, pois reduz a permeabilidade dentinária, além de ser uma característica dos túbulos dentinários da região de cúspide, que contém processos odontoblásticos e largas fibrilas de colágeno (Hawkinson & Eisenmann, 1983; Magne *et al.*, 2002). Proteínas de matriz extracelular de dentina (ECMs) são sintetizadas na zona supranuclear dos odontoblastos e secretadas principalmente na região de pré-dentina, e parcialmente transportadas por meio dos processos odontoblásticos para dentro dos túbulos dentinários para formar a dentina intratubular (Sasaki & Garant, 1996).

Estudos anteriores (Thomas, 1979; Thomas & Carella, 1983) com microscópio eletrônico de varredura relataram que fibrilas de colágeno ocupavam o espaço entre o processo odontoblástico e a parede do túbulo, sem, no entanto, mencionar sua extensão e distribuição. Hoje, sabe-se, que nos dentes humanos, o colágeno intratubular se apresenta em maior quantidade nos túbulos da dentina mais interna. Realmente, um número significativo de túbulos é quase totalmente preenchido com colágeno, o que pode impedir a presença de um processo odontoblástico e fundamentar a idéia de que a extensão deste processo é variável. (Dai *et al.*, 1991).

O lúmen dos túbulos é revestido pela dentina intratubular, altamente mineralizada, contendo principalmente cristais de apatita e pouca matriz orgânica. Os túbulos são separados pela dentina intertubular, composta por uma matriz de colágeno tipo I reforçado com cristais de apatita (Ten Cate, 2008). Estima-se que a área e diâmetro dos túbulos variam cerca de 22% e 2,5 µm próximo à polpa, e 1% e 0,8 µm na JED. A área da matriz intertubular varia de 12% na pré-dentina, a 96% próximo à JED; enquanto que a dentina intratubular de 60% na pré-dentina, a 3% na JED (Pashley, 1989).

2.3. COLÁGENO

O colágeno tipo I corresponde a 90% das proteínas extracelulares da matriz dentinária (Sasaki & Garant, 1996) e pulpar (Ten Cate, 2008). Essas proteínas são secretadas pelos fibroblastos e por uma grande variedade de outros tipos celulares. São as proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo 25% da massa protéica total desses animais. Os colágenos são proteínas fibrosas e sua principal característica é a estrutura rígida de sua fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas individuais de colágeno, denominadas cadeia α , são enroladas umas nas outras. Sua estrutura é rica em prolina, que estabiliza a conformação da hélice em cada cadeia α , e glicina, que permite as três hélices de cadeia α se agruparem firmemente (Alberts *et al.*, 2004).

As cadeias α são sintetizadas pelos ribossomos ligados à membrana e liberados no lúmen do retículo endoplasmático como precursores maiores, denominados pro-cadeia α . Estes precursores apresentam aminoácidos adicionais, os propeptídeos, nas extremidades N e C terminal. Cada pro-cadeia α combina-se com outras duas para formar uma molécula helicoidal de três fitas ligadas por pontes de hidrogênio, chamada procolágeno (Alberts *et al.*, 2004).

Vesículas secretoras se fundem com a membrana plasmática, formando bolsas, onde os procolágenos são liberados. E é nesse meio extracelular que as enzimas proteolíticas removem os propeptídeos das moléculas de procolágeno, convertendo-as em colágeno. Essas moléculas hidrofóbicas tendem a se reunir formando fibrilas de colágeno (Alberts *et al.*, 2004). A formação e secreção da molécula de colágeno leva em torno de 35 a 60 minutos (Junqueira & Carneiro, 2008).

A análise da birrefringência do colágeno através da microscopia de polarização permite uma mensuração acurada, interpretação e validação da ordem de organização de tais estruturas (Vidal, 2003). A análise quantitativa da birrefringência, denominada retardo óptico, constitui-se, desta forma, em um método útil para investigar a orientação macromolecular e a organização de fibras

colágenas. Valores elevados do retardo óptico implicam em uma estrutura de forte birrefringência, ou seja, elevada organização estrutural do colágeno; e valores baixos do retardo óptico significam baixa birrefringência, ou seja, desorganização estrutural do colágeno (Wolman & Kasten, 1986, Vidal & Mello, 1987).

A birrefringência é a anisotropia óptica devido à diferença de índices de refração do objeto, o que significa uma propagação da luz com velocidade e direção diferentes. Ou seja, um corpo birrefringente tem dois índices de refração diferentes, e conseqüentemente duas direções diferentes de propagação que são perpendiculares entre si. Quando a luz polarizada entra no corpo birrefringente propaga-se em dois caminhos ópticos diferentes, na direção do raio ordinário (obedece às leis da refração) e na direção do raio extraordinário (não segue as leis da refração), que são perpendiculares entre si. A luz polarizada sai do objeto em duas frentes de onda. Essas duas frentes apresentam uma diferença de fase, e conseqüentemente a diferença de caminho óptico ou retardo óptico. Então, o brilho exibido pelo objeto birrefringente é devido à diferença de caminho óptico, ou retardo óptico. As conseqüências dessa diferença de fase serão as diferentes cores de interferência que o brilho da birrefringência apresentará. O corpo birrefringente colocado entre polarizadores deverá exibir um máximo de brilho quando um dos seus eixos de propagação é colocado a 45 graus dos dois polarizadores (Vidal & Mello, 1987).

A teoria e tratamento matemático da birrefringência do colágeno são baseados em estudos realizados com cortes de tecidos, e pode ser de dois tipos, intrínseca e de forma textual. A birrefringência intrínseca é determinada pela força de orientação e oscilação das transições eletrônicas da molécula que compõem a fibrila ou filamentos. Em contraste, a birrefringência textual depende da geometria da molécula, por exemplo, o colágeno, e varia de acordo com a fração do volume das moléculas de colágeno (Vidal, 2003).

Uma forma de implementar a análise dos feixes de colágeno através da microscopia de polarização é fazendo-se uso de corantes de tecidos conjuntivos. Foi observado que a combinação do Sirius Red F3BA com o ácido pícrico,

comumente chamado *picrosirius*, aumentava a birrefringência das fibras colágenas quando estudadas sob microscopia de polarização (Constantine & Mowry, 1968).

As moléculas de colágeno são ricas em aminoácidos básicos, assim reagem fortemente com ácidos. Sirius Red, um ácido forte, é uma molécula de corante alongada que reage com o colágeno e promove um aumento da sua birrefringência normal devido ao fato de que as moléculas do corante ficam alinhadas em paralelo com o longo eixo de cada molécula de colágeno (Junqueira *et al.*, 1979).

O colágeno sendo o principal componente orgânico da dentina e do tecido pulpar, modificações em sua birrefringência sugerem uma alteração ou desorganização das fibrilas de colágeno frente a uma agressão externa (Ten Cate, 2008).

Além da análise da birrefringência do colágeno através da microscopia de polarização, utilizando-se a coloração com *picrosirius*, o colágeno secretado pode ser quantificado através do Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), onde são utilizados anticorpos, proteínas que apresentam especificidade a um sítio de ligação, permitindo o reconhecimento de uma molécula alvo específica (ou antígeno) (Alberts *et al.*, 2004), nesse caso, o colágeno tipo I.

2.4. CÉLULAS PULPARES

Os fibroblastos são as células mais numerosas na polpa, particularmente na porção coronária, onde formam a zona rica em células. A função dos fibroblastos na polpa é formar e manter a matriz pulpar, que consiste em colágeno e substância fundamental. Estão presentes ainda no tecido pulpar, as células ectomesenquimais indiferenciadas, que constituem um reservatório do qual se derivam as células do tecido conjuntivo da polpa. De acordo com o estímulo, tais células podem originar odontoblastos e fibroblastos, sendo encontradas por toda a área rica em células, assim como na região central da polpa (Ten Cate, 2008).

As células mais características da polpa dentária são os odontoblastos, os responsáveis pela produção da matriz de colágeno da dentina. O tempo de vida destas células, geralmente, é o mesmo do dente viável, pois são células terminais, e uma vez diferenciadas não podem sofrer mais divisão celular. No entanto, quando o tecido pulpar é exposto, o reparo pode ocorrer pela formação de uma nova dentina, chamada terciária, seja por odontoblastos que sobreviveram à injúria ou por células que se diferenciaram em células semelhantes aos odontoblastos e que começaram a secretar a nova dentina (Ten Cate, 2008).

A capacidade das células pulpares de resistir e reparar injúrias são fundamentais na manutenção da integridade e homeostasia do órgão dental. A mais comum e conhecida característica do reparo pulpar é a formação da dentina terciária, que pode ser distinguida em reacional ou reparativa (Tziafas *et al.*, 2000).

É importante no processo de reparação dental compreender os sinais que desencadeiam diversas linhagens celulares da polpa a proliferar, migrar e, em seguida, formar uma nova matriz rica em colágeno. Fatores de crescimento presentes no local da lesão podem atuar como fatores quimiotáticos de células da polpa. TGF- β (Fator de Transformação de Crescimento), BMPs (Proteínas Morfogenéticas do Osso), FGF (fatores de crescimento de fibroblastos) e IGFs (Fatores de Crescimento de Insulina) são secretados por odontoblastos funcionais e fibroblastos da polpa, e são capturados na matriz dentinária, servindo como um reservatório de fatores de crescimento (Ruch *et al.*, 1995). Após injúrias, essas moléculas são liberadas da dentina para estimularem o processo de reparo (Tziafas *et al.*, 2000).

TGF- β é importante na dentinogênese, no processo de reparo e na mineralização da dentina (Tjaderhane *et al.*, 2001). Em polpas saudáveis, TGF- β é secretado por odontoblastos e fibroblastos, e tem sua expressão aumentada na pulpíte irreversível (Piattelli *et al.*, 2004). Martelli-Junior *et al.* (2003) e Magloire *et al.* (2001) têm sugerido que TGF- β 1 aumentam a síntese de colágeno tipo I e podem reduzir atividades proteolíticas. E sabe-se que o padrão de síntese do colágeno pelos odontoblastos é semelhante ao dos fibroblastos (Ten Cate, 2008).

Também foram observadas junções do tipo *gap* entre odontoblastos e fibroblastos da polpa (Sasaki *et al.*, 1982).

Em paralelo, pulpite irreversível também está relacionada com o aumento do fator de necrose tumoral (TNF- α) (Pezelj-Ribaric *et al.*, 2002; Kokkas *et al.*, 2007). Pan & Halper (2003) relataram um aumento na expressão gênica de mRNA de procolágeno tipo I quando os fibroblastos foram estimulados com TGF- β 1, e redução da expressão gênica de mRNA de procolágeno tipo I quando estimulados com TNF- α . Acredita-se que TNF- α estimule, em conjunto com outras citocinas, as células humanas da polpa a sintetizar e secretar enzimas proteolíticas que destroem a matriz extracelular (Ueda & Matsushima, 2001).

As células pulpares, fibroblastos e odontoblastos, participam ativamente durante o processo inflamatório provocado pela invasão bacteriana. Fibroblastos possuem um papel importante na patogênese da inflamação pulpar, produzindo citocinas pró-inflamatórias em resposta à estimulação bacteriana (Coil *et al.*, 2004). E os odontoblastos, com seus processos celulares se estendendo dentro dos túbulos dentinários, são os primeiros a encontrar as bactérias e/ou seus subprodutos (Hahn & Liewehr, 2007) e representam a primeira linha de defesa do hospedeiro (Farges *et al.*, 2009).

2.5. *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Uma das doenças bucais que reflete falha no equilíbrio da microbiota bucal é a cárie, que em sua progressão desencadeia a destruição de tecidos mineralizados dos dentes. Os estreptococos do grupo mutans são geralmente considerados os principais agentes etiológicos da cárie dental (Loesche, 1986).

Beg *et al.* (2002) demonstraram que *S. mutans* se ligam ao colágeno, fibronectina e fibrinogênio, e que a proteína de superfície do *S. mutans* que permite essa interação é a proteína I/II. Da mesma forma, foi observado que *S. mutans* invade a periferia das fibrilas de colágeno e provoca a sua ruptura. Também foi relatado que o *S. mutans* tem atividade colagenolítica na presença de

um peptídeo sintético similar ao colágeno (Jackson *et al.*, 1997). Switalski *et al.*, (1993) sugere que o colágeno media a adesão do *S. mutans* à dentina, e que esta interação tem um papel importante na patogênese da cárie.

2.6. PORPHYROMONAS GINGIVALIS

A microbiota oral é composta por mais de 500 espécies de bactérias, entretanto, um número limitado delas são capazes de colonizar o sistema de canais radiculares (Gomes *et al.*, 2004). Estes microorganismos invasores e/ou seus produtos no interior dos canais radiculares ativam o sistema de defesa do organismo e provocam uma resposta inflamatória no tecido pulpar (Stashenko *et al.*, 1998).

Estudos contemporâneos sobre a patogênese da periodontite apical mostram que as infecções primárias são de caráter polimicrobiano e predominam bactérias anaeróbias Gram-negativas (Gomes *et al.*, 2004). As espécies usualmente isoladas são as do gênero *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Actinomyces* e *Streptococcus* (Jacinto *et al.*, 2003).

Porphyromonas gingivalis é um Gram-negativo, anaeróbio estrito e produtor de pigmento negro (Shah & Collins, 1988) que está presente na cavidade oral de humanos, sendo conhecido como um importante patógeno periodontal (Van Winkelhoff *et al.*, 1988), pode contribuir para o desenvolvimento de doenças sistêmicas como a aterosclerose (Chun *et al.*, 2005), e são comumente isolados nas infecções primárias dos canais radiculares (Gomes *et al.*, 2004). Jacinto *et al.* (2006) mostraram em seu estudo que estas bactérias foram relacionadas aos casos sintomáticos, presença de exsudado purulento e dor a palpação. Gomes *et al.* (2007) encontrou correlação estatisticamente significativa entre *P. gingivalis* e inchaço, mobilidade e radiolusência periapical.

Estas bactérias possuem diversos fatores de virulência, tais como a presença de fimbria, haemagglutinin, cápsula, lipopolisacarídeo (LPS),

membranas externas vesiculares (outer membrane vesicles) e atividades enzimáticas hidrolíticas capazes de perturbar o mecanismo de defesa do hospedeiro, bem como iniciar a destruição tecidual. Pathirana *et al.* (2008) mostraram que *P. gingivalis* foi capaz de se ligar à fibroblastos MRC-5, e que proteinases específicas e adesinas possam estar envolvidas nesse processo, somado à presença de fimbrias (Inaba *et al.*, 2008). A literatura também relata a capacidade dessa bactéria de invadir e se replicar dentro de fibroblastos (Dogan *et al.*, 2000).

Sugerindo, assim, que seja uma das espécies mais patogênicas identificadas na cavidade oral (Mayrand & Holt, 1988). Esses e outros fatores de virulência permitem *P. gingivalis* colonizar e invadir tecidos do hospedeiro (Lamont & Jenkinson, 1998).

P. gingivalis está relacionado com a liberação e ativação de metaloproteinases da matriz (MMPs) por fibroblastos do periodonto, degradação de fibrilas de colágeno tipo I, e aumento da expressão e ativação de certas MMPs das células do hospedeiro (Chang *et al.*, 2002, Zhou & Windsor, 2006). Odell *et al.* (1999) apresentaram em seu estudo, através de análise por PCR, a presença do gene prtC para colagenase em *P. gingivalis* ATCC 33277 e em 16 espécies isoladas clinicamente de infecções endodônticas. Zhou & Windsor (2006) também relataram a degradação do inibidor de MMPs (TIMP-1) purificada *in vitro* na presença do *P. gingivalis*.

2.7. ENTEROCOCCUS FAECALIS

As infecções secundárias são causadas por microorganismos que conseguiram entrar nos sistema de canais radiculares depois da intervenção profissional ou como resultado da infiltração coronária ou da obturação dos canais (Sakamoto *et al.*, 2008). As bactérias mais identificadas nestes casos são os *Enterococcus faecalis* (Gomes *et al.*, 2006). Estes são anaeróbios facultativos, Gram-positivos que também habitam os tratos gastrointestinal, geniturinário

(Murray, 1990), a cavidade oral em lesões na mucosa de pacientes imunocomprometidos (Wahlin & Holm, 1988) e o periodonto (Rams *et al.*, 1992). Das espécies de enterococcus associadas com a colonização e infecção em humanos, *E. faecalis* é o mais comum (Murray, 1990).

Enterococcus constituem uma pequena porcentagem das espécies isoladas dos canais radiculares de dentes com polpas necrosadas (Sundqvist, 1992). Em contraste, eles são as espécies mais identificadas em canais radiculares com falha no tratamento endodôntico (Gomes *et al.*, 2006). Estes microorganismos possuem fatores de virulência que os tornam capazes de resistir a medicação intracanal, invadir túbulos dentinários (Haapasalo & Orstavik, 1987) e permanecer por tempo prolongado à restrição de nutrientes (Figdor *et al.*, 2003).

Os mecanismos de virulência dos *E. faecalis* mais citados são substância de agregação (AS), adesinas de superfície, sex pheromones, ácido lipoteicóico (LTA), produção extracelular de superóxido, enzimas gelatinase e hialuronidase, e a toxina cytolysin (Kayaoglu & Ørstavik, 2004).

Hubble *et al.* (2003) avaliaram a adesão à raiz radicular de quatro espécies de *E. faecalis*: uma selvagem e três mutantes com deficiência de protease serina, gelatinase e proteína de ligação ao colágeno (Ace). Assim objetivaram avaliar qual a influencia desses fatores de virulência na ligação do *E. faecalis* ao colágeno da dentina. Puderam observar que a aderência da espécie selvagem foi superior às demais. Os autores também relataram que protease serina e Ace auxiliaram na adesão bactéria-colágeno, enquanto que o papel da gelatinase ainda é incerto.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi:

- Avaliar se as bactérias *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* promovem uma alteração na secreção de colágeno tipo I por fibroblastos 3T3 e odontoblastos MDPC-23 em cultura celular.
- Verificar se essa alteração é dependente do contato direto entre bactérias/células, ou estimulada apenas pelos subprodutos produzidos por essas bactérias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

As células utilizadas neste estudo foram de linhagem imortalizada, fibroblastos 3T3 e odontoblastos MDPC-23. Estas células foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's médium – DMEM (GIBCO) com 10% soro fetal bovino (FBS) (GIBCO), a 37°C em estufa de 5% CO₂.

4.2. Cultura bacteriana

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus mutans* (VA159) foram cultivados em placas de Brain Heart Infusion (BHI) ágar contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado, incubadas aerobicamente a 37°C, por 48 horas.

- *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) foi cultivado em Fastidious Anaerobe Agar (FAA) ágar-sangue contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado, acrescidos de hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L), incubados anaerobicamente a 37°C, por 7 dias.

4.3. Contato direto e indireto entre células e bactérias

Ao atingirem 90% de confluência, as células foram tripsinizadas e redistribuídas 3.10^5 células em cada poço da placa de 6 poços, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer. Após 48 horas, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS 1% e acrescido 1 mL de DMEM suplementado com 10% de FBS. Em seguida, o ensaio de contaminação foi realizado pela adição de 200 µL de solução de DMEM suplementado com 10% FBS contendo 300.000 bactérias em cada poço. A metodologia empregada para contagem de bactérias foi baseada no estudo de Tyrrel *et al.* (2002).

Para a infecção no contato direto, o meio contaminado foi adicionado diretamente sobre as células, já no contato indireto foi adicionado dentro de um filtro, *inserts* com 0,4 μm (Becton Dickinson - BD) (figura 01), que permite apenas a passagem dos subprodutos das bactérias. Com esse dispositivo, não haverá o contato direto entre células e bactérias.



Figura 01 - Ilustração de um *insert*

A distribuição das placas se deu da seguinte forma:

- 3 placas de cultura controle dos odontoblastos MDPC-23;
- Em uma placa de 6 poços: 3 poços com odontoblastos e *S. mutans* por contato direto, os três poços restantes, com as mesmas células, mas por contato indireto através dos *inserts*;
- Em uma segunda placa de 6 poços: 3 poços com odontoblastos e *P. gingivalis* por contato direto, os três poços restantes, com as mesmas células, mas por contato indireto através dos *inserts*;
- Em uma terceira placa de 6 poços: 3 poços com odontoblastos e *E. faecalis* por contato direto, os três poços restantes, com as mesmas células, mas por contato indireto através dos *inserts*;
- 3 placas de cultura controle dos fibroblastos 3T3;
- Em uma quarta placa de 6 poços: 3 poços com fibroblastos e *S. mutans* por contato direto, os três poços restantes, com as mesmas células, mas por contato indireto através dos *inserts*;

- Em uma quinta placa de 6 poços: 3 poços com fibroblastos e *P. gingivalis* por contato direto, os três poços restantes, com as mesmas células, mas por contato indireto através dos *inserts*;
- Em uma sexta placa de 6 poços: 3 poços com fibroblastos e *E. faecalis* por contato direto, os três poços restantes, com as mesmas células, mas por contato indireto através dos *inserts*.

A distribuição acima foi realizada três vezes, pois foram avaliados três períodos de tempo: 2, 4 e 8 horas de infecção. O controle foi a linhagem celular sem a exposição às bactérias, e também foram realizados nos três períodos de tempo avaliados. Cada ensaio foi feito em triplicata, incluindo o controle. O ensaio de contaminação foi repetido duas vezes, uma para avaliação pela ELISA e outra para avaliação pela microscopia de polarização, para esta última, as células foram cultivadas em cima de lamínulas de vidro de 24x24 mm.

4.4. Processamento histológico para microscopia de polarização

Após o período de contaminação, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas com Formol 10% por 24 horas. As lamínulas foram lavadas em água destilada, e permaneceram no corante *picrosirius* por 1 hora. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com álcool absoluto, seguidas por dois banhos de xilol. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando balsamo do Canadá.

4.5. Microscopia de polarização

Cada lâmina corada com *picrosirius* foi analisada através do uso do Microscópio Óptico de Polarização Leica DMLP (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Hesse, Germany). Para a realização da mensuração do retardo óptico de cada lâmina foi acoplado o condensador Brace-Köhler (Wild Leitz, Wetzlar, Hesse, Germany). Foram mensurados, aleatoriamente, 10 pontos para se obter a média

do retardo óptico de cada lâmina; como o experimento foi realizado em triplicata, foram avaliados 30 pontos para cada grupo.

Os valores indicados pelo condensador, dados em ângulos, foram posteriormente transformados em nanômetros (nm) por meio da fórmula:

$$Y = 52 \times \text{sen} (2 \times RT)$$

RT – valor do retardo óptico em ângulos

Y – valor do retardo óptico em nanômetros

4.6. Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

A quantificação de colágeno tipo I foi determinada pelo ELISA. Após o período de infecção, coletou-se o sobrenadante para análise pelo Mouse Type I Collagen Detection Kit (n° 6012, Chondrex), seguindo-se as recomendações do fabricante. A absorbância foi lida em 490 nm no microplate reader, e os valores expressos em µg/mL.

A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA (Analysis of Variance) e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Foram realizados dois controles onde as células foram cultivadas sem qualquer tipo de contato com as bactérias. Num primeiro controle, as células foram cultivadas em condição de aerobiose e usadas como parâmetro no ensaio de contaminação com *S. mutans* e *E. faecalis*; num segundo, as células foram cultivadas em condição de anaerobiose e usadas como parâmetro no ensaio de contaminação com *P. gingivalis*.

Da mesma forma que na condição experimental, os controles foram realizados nos três períodos de tempo propostos: 2, 4 e 8 horas. Assim, nos resultados, as médias das porcentagens foram obtidas dividindo a condição experimental pelo seu respectivo controle, sendo este considerado como 100%; acima de 100% representa o quanto se tem a mais de colágeno que o controle, abaixo desse, representa a quantidade de colágeno inferior ao seu respectivo controle.

5.1. Resultado da produção de colágeno pelos fibroblastos através do ELISA

Para testar a influência das bactérias, do tempo e do tipo de contato sobre a produção de colágeno, foi aplicada a análise de variância, e observou-se que apenas o fator tempo foi relevante ($p < 0,01$) (Tabela 01). Posteriormente, foi aplicado o teste de Tukey para avaliar o efeito do tempo na produção de colágeno (Tabela 02).

Os resultados mostraram diferença significativa entre as médias no período de 8 e 2 horas. Houve um aumento de 23,15% de colágeno em 8 horas, e redução de 21,53% da secreção de colágeno em 2 horas.

É válido ressaltar que esta comparação das médias observadas nos diferentes níveis do fator tempo é válida para todas as bactérias e formas de contato estudadas já que não foram detectadas interações significativas.

Tabela 01- Tabela da análise de variância dos fatores que influenciam a produção de colágeno pelos fibroblastos. Avaliação pelo ELISA.

Efeito	Valor- <i>p</i>
Bactéria	0,1832
Contato	0,5850
Bactéria*contato	0,5232
Tempo	0,0004
Bactéria*tempo	0,1004
Contato*Tempo	0,3328
Bactéria*contato*tempo	0,6216

Tabela 02 - Média, desvio padrão, limites de confiança e teste de Tukey para a comparação das médias da produção de colágeno pelos fibroblastos. Avaliação pelo ELISA.

Tempo (h)	Média (%)	Desvio padrão	Limite superior	Limite inferior	Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)
8	123,151	10,077	143,081	103,221	A
4	102,122	32,496	118,282	85,963	A B
2	78,465	16,552	86,696	70,234	B

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%

5.2. Resultado da avaliação do colágeno dos fibroblastos através da microscopia de polarização

Para testar a influência das bactérias, do tempo e do tipo de contato sobre o retardo óptico, foi aplicada a análise de variância, e observou-se que apenas a interação entre bactéria e tipo de contato não foi significativa ($p > 0,01$) (Tabela 03).

Tabela 03 - Tabela da análise de variância dos fatores que influenciam a produção de colágeno pelos fibroblastos. Retardo óptico mensurado através da Microscopia de Polarização.

Efeito	Valor-p
Bactéria	0,0001
Contato	0,0006
Bactéria*contato	0,7527
Tempo	0,0001
Bactéria*tempo	0,0001
Contato*Tempo	0,0096
Bactéria*contato*tempo	0,0146

As interações significativas foram desdobradas, inicialmente pela comparação dos efeitos do tempo dentro de cada nível dos fatores bactéria e tipo de contato (Tabela 04).

Para *E. faecalis*, tanto no contato direto quanto indireto, existe uma diferença significativa da média observada no tempo de 8h, sendo significativamente menor que nos períodos de 2h e 4h. Este mesmo comportamento foi observado para *S. mutans*, mas apenas no contato indireto.

Para *P. gingivalis*, em ambos os contatos direto e indireto, observou-se que a média no período de 2h foi significativamente maior que no período de 4h. Não

foi possível mensurar o retardo óptico no período de 8h, pois a contaminação com essa bactéria por um período de tempo maior provocou morte celular, e conseqüentemente as lâminas ficaram parcial e/ou totalmente descoradas pelo *picrosirius*.

Para *S. mutans*, apenas no contato direto, o período de 2h apresentou média significativamente maior quando comparado aos períodos de 4h e 8h.

Tabela 04 - Média, desvio padrão, limites de confiança e teste de Tukey para a comparação das médias do retardo óptico para os fibroblastos, mensurado pela Microscopia de Polarização, nos diferentes tempos estudados dentro dos níveis de tipo de contato e bactéria.

Bactéria	Tipo de contato	Tempo (h)	Média (%)	Desvio padrão	Limite superior	Limite inferior	Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)
<i>E. faecalis</i>	direto	2	127,672	2,602	134,135	121,209	A
		4	123,565	7,816	142,982	104,149	A B
		8	74,576	5,930	89,307	59,844	E
	indireto	2	127,990	8,745	149,715	106,265	A
		4	132,884	4,694	144,545	121,224	A
		8	84,873	6,223	100,331	69,415	D E
<i>P. gingivalis</i>	direto	2	125,038	8,090	145,135	104,941	A B
		4	92,512	4,215	102,982	82,041	CD
	indireto	2	130,188	6,342	145,943	114,433	A
		4	99,103	5,472	112,698	85,509	CD
<i>S. mutans</i>	direto	2	127,486	5,002	139,913	115,059	A
		4	108,000	4,552	119,307	96,692	B C
		8	95,578	2,810	102,558	88,597	CD
	indireto	2	126,541	8,462	147,561	105,521	A
		4	133,878	3,706	143,085	124,672	A
		8	94,901	5,153	107,701	82,101	CD

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%

**Cores iguais mostram comportamentos semelhantes

Foram fixados os níveis bactéria e tempo para avaliar as diferenças entre os tipos de contato, conforme descrito na Tabela 05. Pode-se observar que apenas para o *S. mutans*, no período de 4h, o contato indireto foi significativo. Nas demais bactérias, o tipo de contato não parece ser relevante.

Tabela 05 - Média, desvio padrão, limites de confiança e teste de Tukey para a comparação das médias do retardo óptico para os fibroblastos, mensurado pela Microscopia de Polarização, nos diferentes contatos estudados dentro dos níveis tempo e bactéria.

Bactéria	Tempo (h)	Tipo de contato	Média (%)	Desvio padrão	Limite superior	Limite inferior	Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)
<i>E. faecalis</i>	2	direto	127,672	2,602	134,135	121,209	A
		indireto	127,990	8,745	149,715	106,265	A
	4	direto	123,565	7,816	142,982	104,149	A B
		indireto	132,884	4,694	144,545	121,224	A
	8	direto	74,576	5,930	89,307	59,844	E
		indireto	84,873	6,223	100,331	69,415	D E
<i>P. gingivalis</i>	2	direto	125,038	8,090	145,135	104,941	A B
		indireto	130,188	6,342	145,943	114,433	A
	4	direto	92,512	4,215	102,982	82,041	CD
		indireto	99,103	5,472	112,698	85,509	CD
<i>S. mutans</i>	2	direto	127,486	5,002	139,913	115,059	A
		indireto	126,541	8,462	147,561	105,521	A
	4	direto	108,000	4,552	119,307	96,692	BC
		indireto	133,878	3,706	143,085	124,672	A
	8	direto	95,578	2,810	102,558	88,597	CD
		indireto	94,901	5,153	107,701	82,101	CD

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%

**Cores iguais mostram comportamentos semelhantes

Para avaliar o efeito do tipo de bactéria no retardo óptico do colágeno, foram fixados os níveis tempo e contato conforme Tabela 06.

Notou-se que nos períodos de 2h e 8h (neste, apenas para o contato indireto), as médias do retardo óptico do colágeno para o tipo de bactéria não mostrou ser significativo. No entanto, em 4 h, no contato direto, observa-se que o retardo óptico é significativamente maior para *E. faecalis* que *P. gingivalis*; e no contato indireto, o *S. mutans* também mostrou ser significativamente maior que *P. gingivalis*.

Por fim, no contato direto no tempo de 8h, a média do retardo óptico na presença de *S. mutans* é significativamente maior que a de *E. faecalis*, apesar de ambos apresentarem retardos ópticos menores que os seus respectivos controles.

Tabela 06 - Média, desvio padrão, limites de confiança e teste de Tukey para a comparação das médias do retardo óptico para os fibroblastos, mensurado pela Microscopia de Polarização, nas diferentes bactérias dentro dos níveis tempo e contato.

Tempo (h)	Tipo de contato	Bactéria	Média (%)	Desvio padrão	Limite superior	Limite inferior	Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)
2	direto	<i>E. faecalis</i>	127,672	2,602	134,135	121,209	A
		<i>P. gingivalis</i>	125,038	8,090	145,135	104,941	A B
		<i>S. mutans</i>	127,486	5,002	139,913	115,059	A
	indireto	<i>E. faecalis</i>	127,990	8,745	149,715	106,265	A
		<i>P. gingivalis</i>	130,188	6,342	145,943	114,433	A
		<i>S. mutans</i>	126,541	8,462	147,561	105,521	A
4	direto	<i>E. faecalis</i>	123,565	7,816	142,982	104,149	A B
		<i>P. gingivalis</i>	92,512	4,215	102,982	82,041	CD
		<i>S. mutans</i>	108,000	4,552	119,307	96,692	BC
	indireto	<i>E. faecalis</i>	132,884	4,694	144,545	121,224	A
		<i>P. gingivalis</i>	99,103	5,472	112,698	85,509	CD
		<i>S. mutans</i>	133,878	3,706	143,085	124,672	A
8	direto	<i>E. faecalis</i>	74,576	5,930	89,307	59,844	E
		<i>S. mutans</i>	95,578	2,810	102,558	88,597	CD
	indireto	<i>E. faecalis</i>	84,873	6,223	100,331	69,415	D E
		<i>S. mutans</i>	94,901	5,153	107,701	82,101	CD

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%

**Cores iguais mostram comportamentos semelhantes

As imagens representativas da cultura de fibroblastos 3T3 corados com *picrosirius* para avaliação em microscopia de polarização estão ilustradas nas figuras 02, 03 e 04.

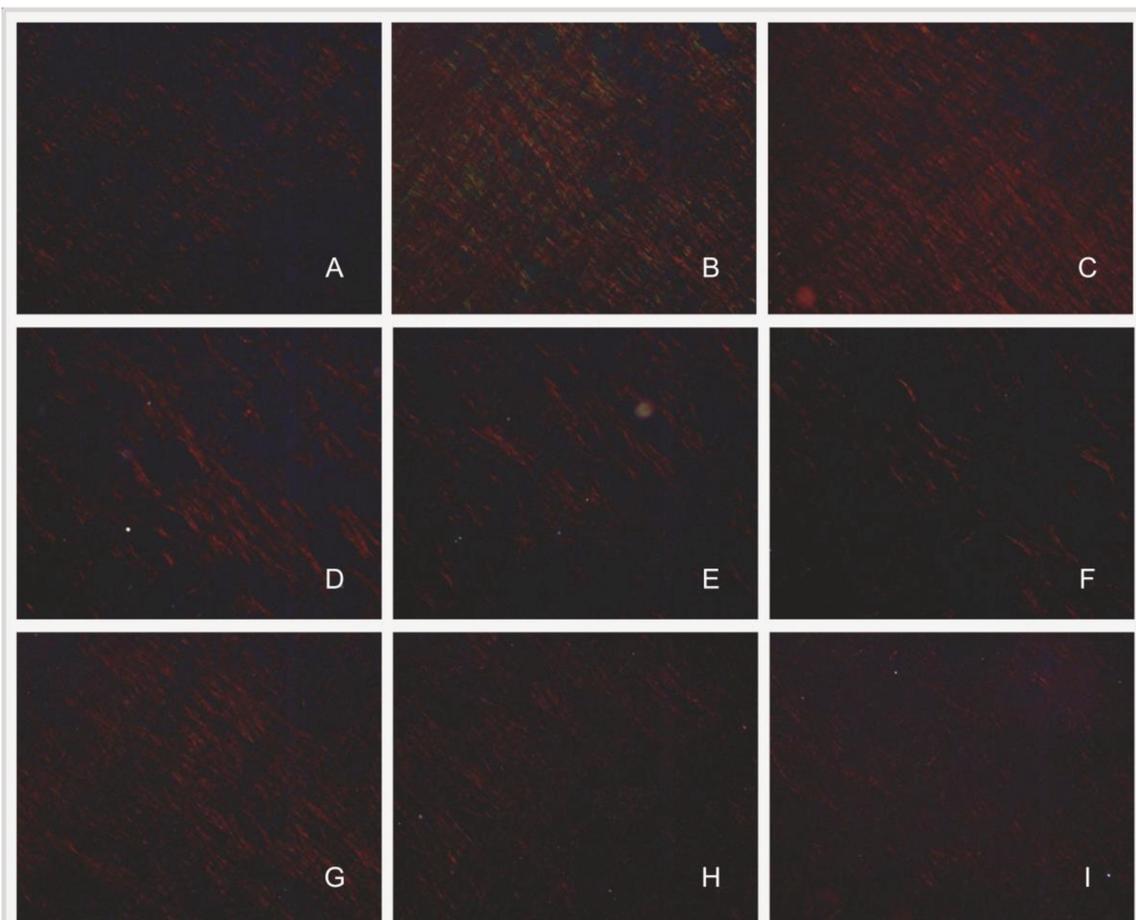


Figura 02 - Imagens ilustrativas da cultura de fibroblastos 3T3 corados com *picrosirius* para avaliação pela microscopia de polarização. Aumento de 100X. A – controle em 2 horas. B – contato direto entre fibroblastos e *S. mutans* em 2 horas. C – contato indireto entre fibroblastos e *S. mutans* em 2 horas. D – controle em 4 horas. E – contato direto entre fibroblastos e *S. mutans* em 4 horas. F – contato indireto entre fibroblastos e *S. mutans* em 4 horas. G – controle em 8 horas. H – contato direto entre fibroblastos e *S. mutans* em 8 horas. I – contato indireto entre fibroblastos e *S. mutans* em 8 horas. As imagens no período de 2 horas, principalmente no contato indireto, exibem um brilho mais acentuado quando comparadas as demais imagens obtidas, mostrando maiores valores para o retardo óptico.

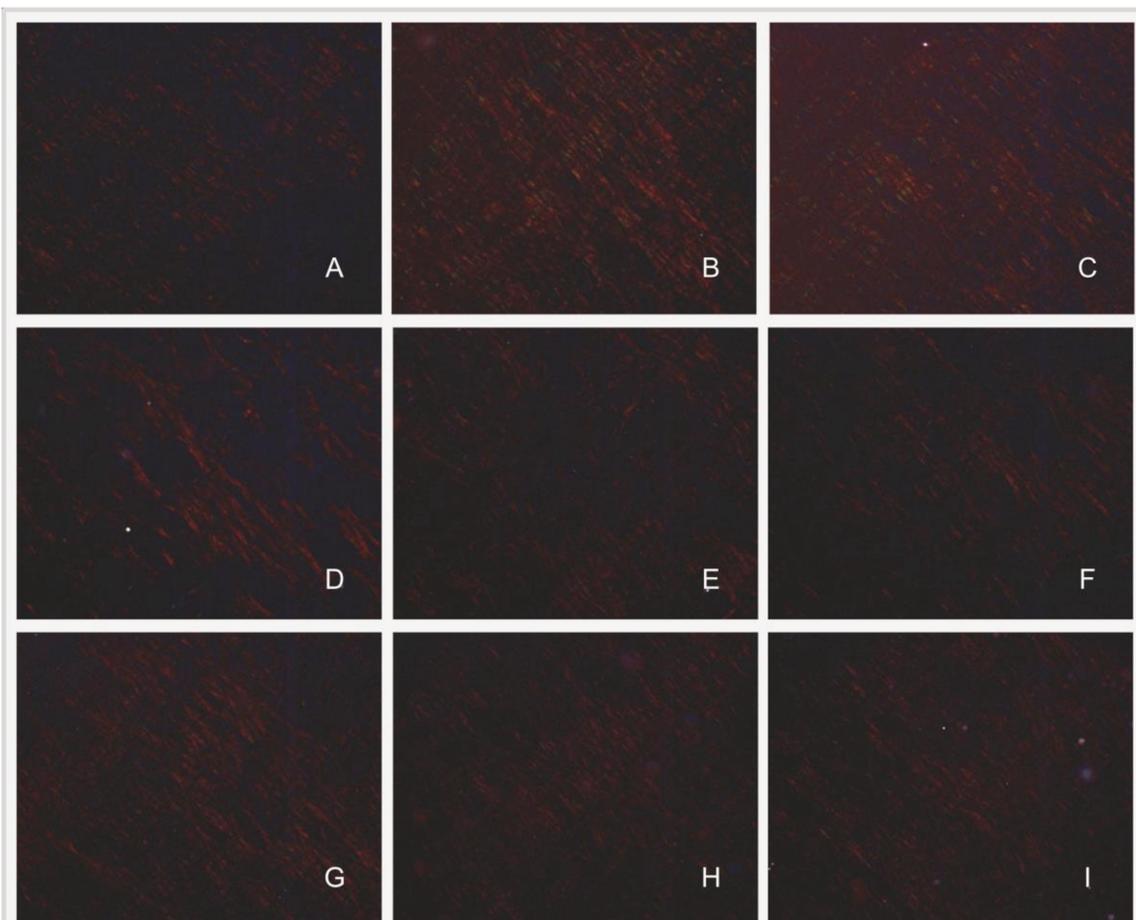


Figura 03 - Imagens ilustrativas da cultura de fibroblastos 3T3 corados com *picrosirius* para avaliação pela microscopia de polarização. Aumento de 100X. A – controle em 2 horas. B – contato direto entre fibroblastos e *E. faecalis* em 2 horas. C – contato indireto entre fibroblastos e *E. faecalis* em 2 horas. D – controle em 4 horas. E – contato direto entre fibroblastos e *E. faecalis* em 4 horas. F – contato indireto entre fibroblastos e *E. faecalis* em 4 horas. G – controle em 8 horas. H – contato direto entre fibroblastos e *E. faecalis* em 8 horas. I – contato indireto entre fibroblastos e *E. faecalis* em 8 horas. As imagens obtidas no período de 2 horas exibem um brilho mais acentuado quando comparadas as demais imagens obtidas. As células contaminadas pelo *E. faecalis* apresentaram os maiores valores para o retardo óptico do colágeno quando comparadas as demais bactérias.

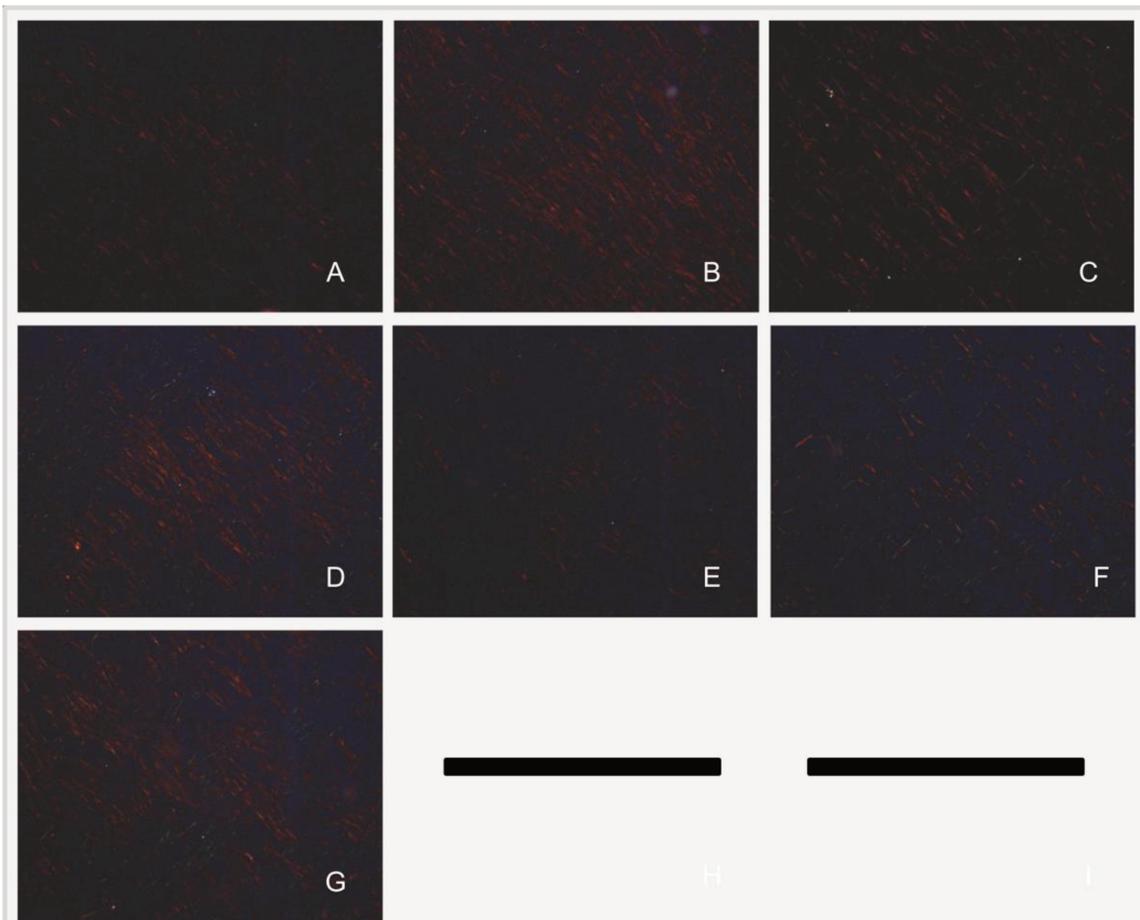


Figura 04 - Imagens ilustrativas da cultura de fibroblastos 3T3 corados com *picrosirius* para avaliação pela microscopia de polarização. Aumento de 100X. A – controle em anaerobiose 2 horas. B – contato direto entre fibroblastos e *P. gingivalis* em 2 horas. C – contato indireto entre fibroblastos e *P. gingivalis* em 2 horas. D – controle em anaerobiose em 4 horas. E – contato direto entre fibroblastos e *P. gingivalis* em 4 horas. F – contato indireto entre fibroblastos e *P. gingivalis* em 4 horas. G – controle em anaerobiose 8 horas. Pode ser observado um brilho mais acentuado no período de 2 horas, enquanto que em 4 horas há uma significativa redução. Nota-se que mesmo em condição de anaerobiose, os controles permanecem semelhantes as células cultivadas em condições normais. As células contaminadas com *P. gingivalis* apresentaram os menores valores do retardo óptico do colágeno quando comparadas as demais bactérias.

5.3. Resultado da produção de colágeno pelos odontoblastos através do ELISA

Para testar a influência das bactérias, do tempo e do tipo de contato sobre a produção de colágeno, foi aplicada a análise de variância, e observou-se que apenas o fator tempo foi relevante ($p < 0,01$) (Tabela 07).

Tabela 07 - Tabela da análise de variância dos fatores que influenciam a produção de colágeno pelos odontoblastos. Avaliação pelo ELISA.

Efeito	Valor-p
Bactéria	0,3006
Contato	0,5553
Bactéria*contato	0,6022
Tempo	0,0146
Bactéria*tempo	0,1726
Contato*Tempo	0,8252
Bactéria*contato*tempo	0,4075

Posteriormente, foi aplicado o teste de Tukey para avaliar o efeito do tempo na produção de colágeno (Tabela 08).

Tabela 08 - Média, desvio padrão, limites de confiança e teste de Tukey para a comparação das médias da produção de colágeno pelos odontoblastos. Avaliação pelo ELISA.

Tempo (h)	Média (%)	Desvio padrão	Limite superior	Limite inferior	Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)
2	242,438	264,824	374,132	110,744	A B
4	389,899	448,498	612,932	166,866	A
8	113,614	50,603	138,778	88,449	B

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%

Pode ser observado que há um aumento de aproximadamente 290% da produção de colágeno em 4 horas quando comparado ao período de 8 horas, que é de apenas 13,61%.

É válido ressaltar que esta comparação das médias observadas nos diferentes níveis do fator tempo é válida para todas as bactérias e formas de contato estudadas já que não foram detectadas interações significativas.

5.4. Resultado da avaliação do colágeno dos odontoblastos através da microscopia de polarização

Para testar a influência das bactérias, do tempo e do tipo de contato sobre o retardo óptico, foi aplicada a análise de variância, e observou-se que apenas a variável tipo de contato não mostrou ser relevante (Tabela 09).

Tabela 09 - Tabela da análise de variância dos fatores que influenciam a produção de colágeno pelos odontoblastos. Retardo óptico mensurado através da Microscopia de Polarização.

Efeito	Valor-p
Bactéria	0,0001
Contato	0,8211
Bactéria*contato	0,0122
Tempo	0,0001
Bactéria*tempo	0,0008
Contato*Tempo	0,0039
Bactéria*contato*tempo	0,0026

Assim como nos fibroblastos, houve a necessidade do desdobramento das interações triplas para comparação das médias. A avaliação do efeito do tempo dentro dos níveis contato e bactéria é apresentada na tabela 10.

Tabela 10 - Média, desvio padrão, limites de confiança e teste de Tukey para a comparação das médias do retardo óptico para os odontoblastos, mensurado pela Microscopia de Polarização, nos diferentes tempos estudados dentro dos níveis de tipo de contato e bactéria.

Bactéria	Tipo de contato	Tempo (h)	Média (%)	Desvio padrão	Limite superior	Limite inferior	Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)
<i>E. faecalis</i>	direto	2	122,970	3,370	131,342	114,597	BC DE
		4	183,277	22,597	239,411	127,143	A
		8	88,040	6,553	104,319	71,761	FG
	indireto	2	128,988	2,409	134,974	123,003	BC
		4	116,941	15,515	155,481	78,400	BC DEF
		8	92,654	5,610	106,589	78,718	EFG
<i>P. gingivalis</i>	direto	2	119,371	2,348	125,203	113,538	BC DE
		4	96,562	5,265	109,643	83,482	DEFG
	indireto	2	116,815	1,071	119,476	114,154	BC DEF
		4	97,905	1,693	102,112	93,698	C DEF G
<i>S. mutans</i>	direto	2	121,878	1,312	125,136	118,620	BC DE
		4	127,857	13,509	161,415	94,299	BC D
		8	81,264	4,770	93,113	69,415	G
	indireto	2	127,670	2,683	134,335	121,005	BC D
		4	131,262	16,891	173,223	89,301	B
		8	92,762	9,478	116,306	69,217	EFG

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%

**Cores iguais mostram comportamentos semelhantes

Em relação ao efeito do tempo para *E. faecalis* observa-se dois comportamentos distintos; no contato direto houve diferença significativa entre os três períodos estudados, sendo a maior média observada em 4 horas, seguida pelos tempos de 2 h e 8h, neste último, a média do retardo óptico foi inferior ao

seu respectivo controle. Já no contato indireto, verifica-se diferença estatística apenas entre os períodos de 2 horas, com maior média para o retardo óptico, quando comparado com 8 horas, média inferior ao controle.

O efeito do tempo não mostrou ser relevante para *P. gingivalis*. A análise dos dados para *S. mutans* mostrou que, independente dos contatos, a média do retardo óptico é significativamente menor no tempo 8h em relação às médias observadas nos tempos 2 e 4 horas, não havendo indícios de diferenças entre estes dois tempos.

O efeito do contato foi avaliado fixando-se os níveis tempo e bactéria (Tabela 11). Os dados evidenciaram apenas a existência de diferenças significativas entre as médias dos tipos de contato direto e indireto para *E. faecalis*, em 4 horas; a média do retardo óptico se apresentou 83,27% maior que o controle no contato direto, enquanto que no contato indireto a média é somente 16,94% maior que o controle.

Tabela 11 - Média, desvio padrão, limites de confiança e teste de Tukey para a comparação das médias do retardo óptico para os odontoblastos, mensurado pela Microscopia de Polarização, nos diferentes contatos dentro dos níveis tempo e bactéria.

Bactéria	Tempo (h)	Tipo de contato	Média (%)	Desvio padrão	Limite superior	Limite inferior	Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)
<i>E. faecalis</i>	2	direto	122,970	3,370	131,342	114,597	BC DE
		indireto	128,988	2,409	134,974	123,003	BC
	4	direto	183,277	22,597	239,411	127,143	A
		indireto	116,941	15,515	155,481	78,400	BC DEF
	8	direto	88,040	6,553	104,319	71,761	FG
		indireto	92,654	5,610	106,589	78,718	EFG
<i>P. gingivalis</i>	2	direto	119,371	2,348	125,203	113,538	BC DE
		indireto	116,815	1,071	119,476	114,154	BC DEF
	4	direto	96,562	5,265	109,643	83,482	DEFG
		indireto	97,905	1,693	102,112	93,698	C DEF G
<i>S. mutans</i>	2	direto	121,878	1,312	125,136	118,620	BC DE
		indireto	127,670	2,683	134,335	121,005	BC D
	4	direto	127,857	13,509	161,415	94,299	BC D
		indireto	131,262	16,891	173,223	89,301	B
	8	direto	81,264	4,770	93,113	69,415	G
		indireto	92,762	9,478	116,306	69,217	EFG

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%

**Cores iguais mostram comportamentos semelhantes

Para a análise do efeito da bactéria, foram fixados os níveis tempo e contato (Tabela 12).

Tabela 12 - Média, desvio padrão, limites de confiança e teste de Tukey para a comparação das médias do retardo óptico para os odontoblastos, mensurado pela Microscopia de Polarização, nas diferentes bactérias dentro dos níveis tempo e contato.

Tempo (h)	Tipo de contato	Bactéria	Média (%)	Desvio padrão	Limite superior	Limite inferior	Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)
2	direto	<i>E. faecalis</i>	122,970	3,370	131,342	114,597	BC DE
		<i>P. gingivalis</i>	119,371	2,348	125,203	113,538	BC DE
		<i>S. mutans</i>	121,878	1,312	125,136	118,620	BC DE
	indireto	<i>E. faecalis</i>	128,988	2,409	134,974	123,003	BC
		<i>P. gingivalis</i>	116,815	1,071	119,476	114,154	BC DEF
		<i>S. mutans</i>	127,670	2,683	134,335	121,005	BC D
4	direto	<i>E. faecalis</i>	183,277	22,597	239,411	127,143	A
		<i>P. gingivalis</i>	96,562	5,265	109,643	83,482	DEFG
		<i>S. mutans</i>	127,857	13,509	161,415	94,299	BC D
	indireto	<i>E. faecalis</i>	116,941	15,515	155,481	78,400	BC DEF
		<i>P. gingivalis</i>	97,905	1,693	102,112	93,698	C DEF G
		<i>S. mutans</i>	131,262	16,891	173,223	89,301	B
8	direto	<i>E. faecalis</i>	88,040	6,553	104,319	71,761	FG
		<i>S. mutans</i>	81,264	4,770	93,113	69,415	G
	indireto	<i>E. faecalis</i>	92,654	5,610	106,589	78,718	EFG
		<i>S. mutans</i>	92,762	9,478	116,306	69,217	EFG

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%

**Cores iguais mostram comportamentos semelhantes

Nos tempos 2 e 8 horas não foram observadas diferenças entre as médias do retardo óptico, mostrando que o efeito do tipo de bactéria não foi relevante.

No entanto, em 4 horas, são observados comportamentos distintos a depender do tipo de contato. Para o contato direto, as amostras contaminadas com *E. faecalis* apresentaram a média do retardo óptico significativamente maior que seu controle quando comparada as média obtidas para *S. mutans* e *P. gingivalis*, respectivamente. Sendo esta última bactéria com valor inferior ao seu controle. No contato indireto, somente foram detectadas diferenças significativas entre *S. mutans* e *P. gingivalis*, a primeira com a média do retardo óptico 31,26% maior que o controle, e a segunda, com 2,10% menor que o seu respectivo controle.

As imagens representativas da cultura de odontoblastos MDPC-23 corados com *picrosirius* para avaliação em microscopia de polarização estão ilustradas nas figuras 05, 06 e 07.

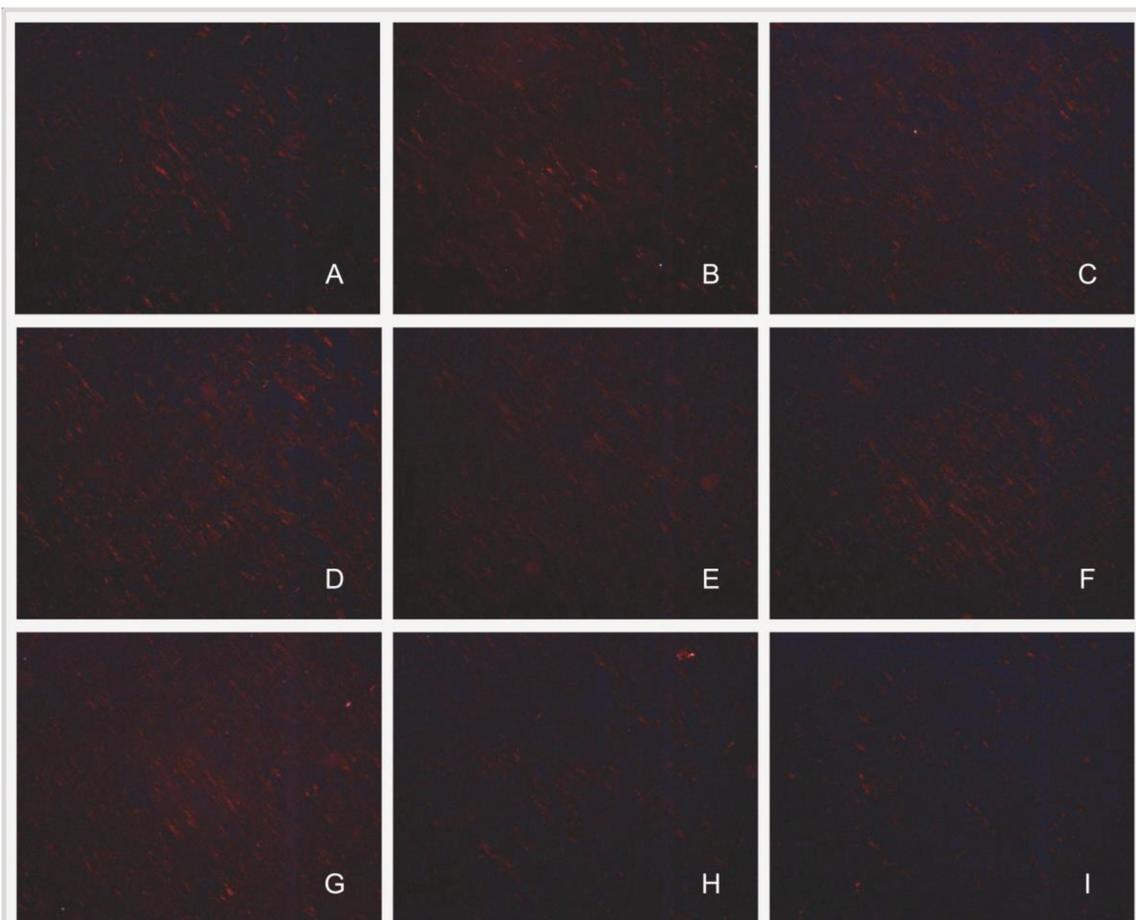


Figura 05 - Imagens ilustrativas da cultura de odontoblastos MDPC-23 corados com *picrosirius* para avaliação pela microscopia de polarização. Aumento de 100X. A – controle em 2 horas. B – contato direto entre odontoblastos e *S. mutans* em 2 horas. C – contato indireto entre odontoblastos e *S. mutans* em 2 horas. D – controle em 4 horas. E – contato direto entre odontoblastos e *S. mutans* em 4 horas. F – contato indireto entre odontoblastos e *S. mutans* em 4 horas. G – controle em 8 horas. H – contato direto entre odontoblastos e *S. mutans* em 8 horas. I – contato indireto entre odontoblastos e *S. mutans* em 8 horas. Nota-se uma redução do brilho exibido pelas amostras com o decorrer do tempo, comprovados pelos baixos valores obtidos do retardo óptico .

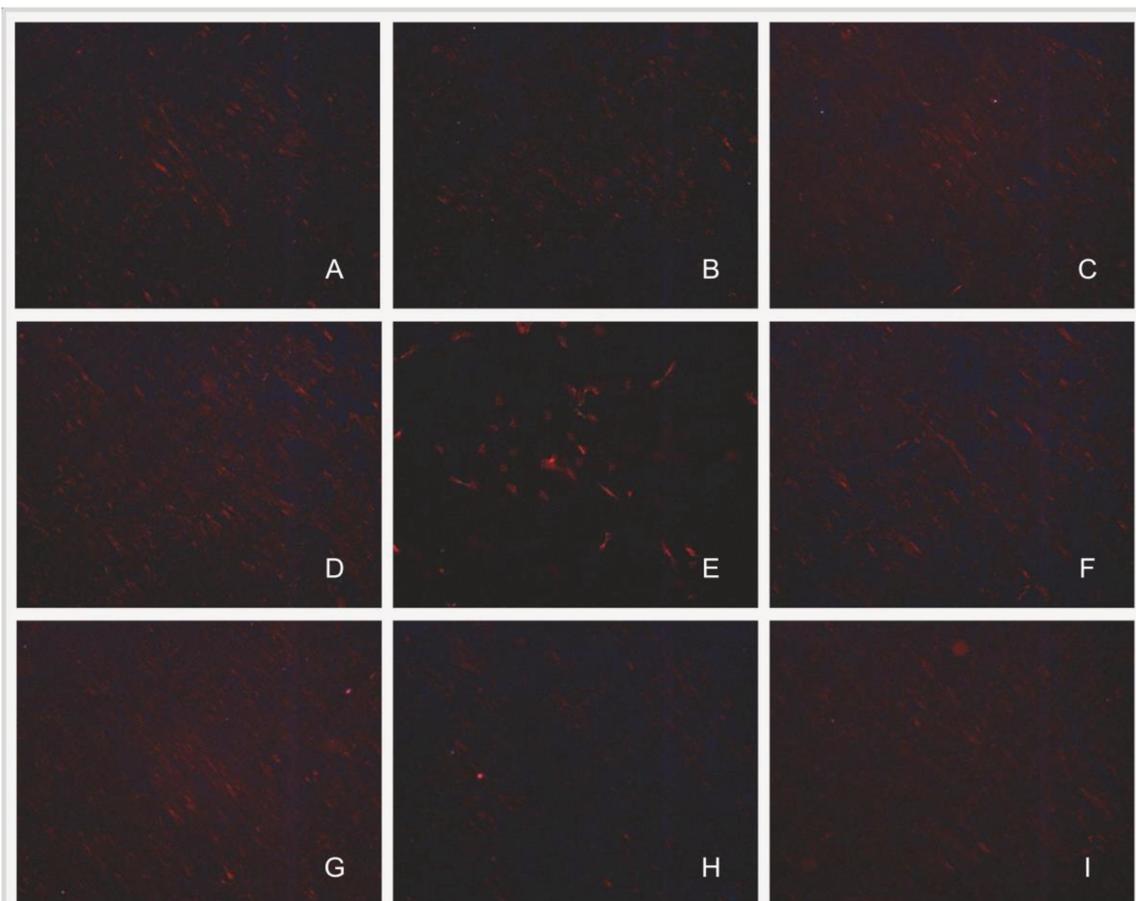


Figura 06 - Imagens ilustrativas da cultura de odontoblastos MDPC-23 corados com *picrosirius* para avaliação pela microscopia de polarização. Aumento de 100X. A – controle em 2 horas. B – contato direto entre odontoblastos e *E. faecalis* em 2 horas. C – contato indireto entre odontoblastos e *E. faecalis* em 2 horas. D – controle em 4 horas. E – contato direto entre odontoblastos e *E. faecalis* em 4 horas. F – contato indireto entre odontoblastos e *E. faecalis* em 4 horas. G – controle em 8 horas. H – contato direto entre odontoblastos e *E. faecalis* em 8 horas. I – contato indireto entre odontoblastos e *E. faecalis* em 8 horas. Nessas amostras, observa-se que os valores do retardo óptico tendem a aumentar em 2 horas, com pico em 4 horas, seguidos de uma significativa redução no período de 8 horas. As células contaminadas com *E. faecalis* apresentaram os maiores valores para o retardo óptico do colágeno quando comparadas as demais bactérias.

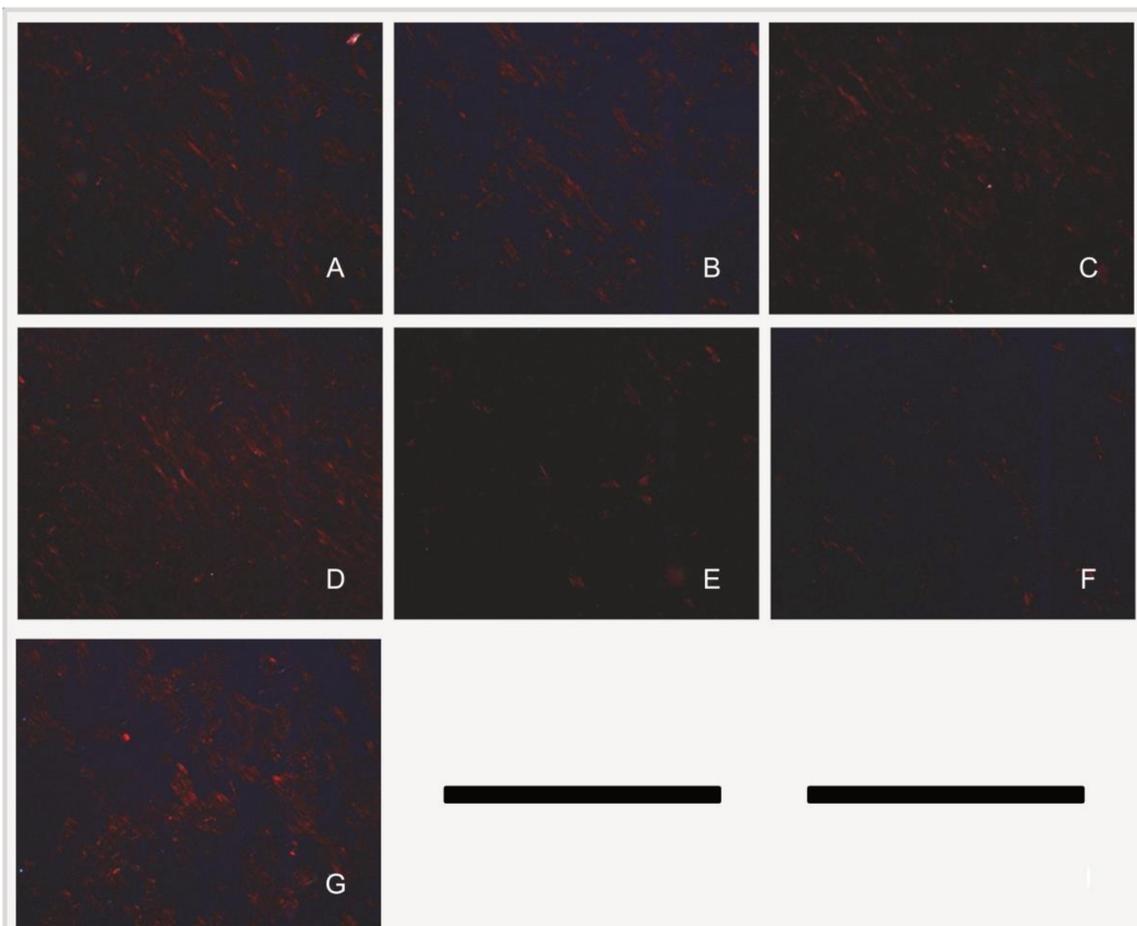


Figura 07 - Imagens ilustrativas da cultura de odontoblastos MDPC-23 corados com *picrosirius* para avaliação pela microscopia de polarização. Aumento de 100X. A – controle em anaerobiose 2 horas. B – contato direto entre odontoblastos e *P. gingivalis* em 2 horas. C – contato indireto entre odontoblastos e *P. gingivalis* em 2 horas. D – controle em anaerobiose em 4 horas. E – contato direto entre odontoblastos e *P. gingivalis* em 4 horas. F – contato indireto entre odontoblastos e *P. gingivalis* em 4 horas. G – controle em anaerobiose 8 horas. Pode ser observado um brilho mais acentuado no período de 2 horas, enquanto que em 4 horas há uma significativa redução. Nota-se que mesmo em condição de anaerobiose, os controles permanecem semelhantes as células cultivadas em condições normais. As células contaminadas com *P. gingivalis* apresentaram os menores valores para o retardo óptico do colágeno quando comparadas as demais bactérias.

6. DISCUSSÃO

Pashley (1996) descreve a dentina como um composto biológico constituído de partículas de cristais de apatita numa matriz de colágeno. Essa matriz é formada pelos odontoblastos e estão intimamente relacionados com os fibroblastos pulpares. Sendo estes as células mais numerosas na polpa cuja função é formar e manter a matriz pulpar, que consiste em colágeno e substância fundamental. A íntima relação dos fibroblastos pulpares com odontoblastos também é observada através de junções do tipo *gap* entre essas células (Sasaki *et al.*, 1982) e o padrão de síntese de colágeno é semelhante para fibroblastos e odontoblastos (Ten Cate, 2008).

Visto que o principal componente das matrizes dentinária e pulpar é o colágeno, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência das bactérias e/ou seus subprodutos na secreção do colágeno. Assim, foram utilizados, no presente estudo, odontoblastos MDPC-23 e fibroblastos 3T3, que apesar de serem células de linhagem imortalizada, também podem ser utilizadas para avaliação da secreção de colágeno (Bohari *et al.*, 2012; Man *et al.*, 2012).

O teste do ELISA para os fibroblastos 3T3 mostrou que os níveis de colágeno aumentaram progressivamente de 2 para 8 horas; e em odontoblastos MDPC-23, aumentaram em 2 e 4 horas. Observa-se que a polpa responde ao processo carioso através da completa obliteração do lúmen dos túbulos dentinários, ou pela diminuição do diâmetro do túbulo para reduzir a permeabilidade das bactérias e seus produtos tóxicos para a polpa (Perdigão, 2010). Assim sugere-se que esse aumento nos níveis de colágeno se deva a capacidade das células de formar matriz extracelular como um dos mecanismos de defesa inatos dos fibroblastos e odontoblastos. Uma vez que a mais comum e conhecida característica do reparo pulpar é a formação da dentina terciária (Tziafas *et al.*, 2000).

Os resultados encontrados pelo teste do ELISA não mostraram diferença nos níveis de colágeno tipo I em relação aos tipos de contatos estudados,

indicando, assim, que a presença da bactéria não foi relevante para estimular o aumento nos níveis de colágeno, diferentemente dos subprodutos bacterianos, que estavam presentes tanto no contato direto quanto indireto. Sugerindo assim, que o estímulo para o aumento na produção de colágeno se deva a ação dos subprodutos liberados pelas bactérias e não pelo contato célula/bactéria.

Coil *et al.* (2004) cita a participação ativa de fibroblastos durante o processo inflamatório provocado pela invasão bacteriana, produzindo, em contra-partida, citocinas pró-inflamatórias. Os odontoblastos, com seus processos celulares se estendendo dentro dos túbulos dentinários, são os primeiros a encontrar as bactérias e/ou seus subprodutos (Hahn & Liewehr, 2007) e representam a primeira linha de defesa do hospedeiro (Farges *et al.*, 2009).

A partir do período de 4 horas, observa-se que há uma redução significativa nos níveis de colágeno tipo I para odontoblastos MDPC-23. Sugere-se que seja devido ao aumento da secreção de enzimas degradativas, como metaloproteinases, liberadas pelas células após estimulação com subprodutos bacterianos (Chang *et al.*, 2002), somando-se à ação colagenolítica das bactérias estudadas.

S. mutans invade a periferia das fibrilas de colágeno e provoca a sua ruptura, além de possuir atividade colagenolítica (Frank *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 1997). *P. gingivalis* está relacionado com a liberação e ativação de metaloproteinases da matriz (MMPs) por fibroblastos do periodonto, degradação de fibrilas de colágeno tipo I, e aumento da expressão e ativação de certas MMPs das células do hospedeiro (Chang *et al.*, 2002, Zhou & Windsor, 2006). Foi verificado que *P. gingivalis* possui o gene prtC para colagenase (Odell *et al.* 1999), e é capaz de degradar o inibidor de MMPs (TIMP-1) (Zhou & Windsor, 2006). *E. faecalis*, entre outros fatores de virulência, está relacionado com a produção de gelatinase (Kayaoglu & Ørstavik, 2004), que são metaloproteinases da matriz envolvidas na proteólise e rompimento de membranas basais, bem como na degradação de colágenos tipo IV, V, colágenos desnaturados (gelatinas), fibronectina e elastina (Thomaz *et al.*, 1999; Kahari & Saarialho-Kere, 1999).

No presente estudo, sugere-se que, para os odontoblastos, a redução da secreção de colágeno com o decorrer do tempo possa estar relacionada também com o efeito provocado pelo fator de transformação de crescimento (TGF- β) e fator de necrose tumoral (TNF- α). Em polpas saudáveis, TGF- β é secretado por odontoblastos e fibroblastos, e tem sua expressão aumentada na pulpíte irreversível (Piattelli *et al.*, 2004). Martelli-Junior *et al.* (2003) e Magloire *et al.* (2001) têm sugerido que TGF- β 1 aumentam a síntese de colágeno tipo I e podem reduzir atividades proteolíticas, concordando com Chang *et al.* (2001) que observaram uma redução na produção de MMP-2 na presença de TGF- β . No entanto, foi observado diminuição da expressão gênica de TGF- β 1 nos odontoblastos após estimulação com LPS, e o colágeno tipo I foi desregulado pelo ácido lipoteicóico (LTA) (Farges *et al.*, 2009).

Em paralelo, pulpíte irreversível também está relacionada com o aumento do fator de necrose tumoral (TNF- α) (Pezelj-Ribaric *et al.*, 2002; Kokkas *et al.*, 2007). Acredita-se que TNF- α estimule, em conjunto com outras citocinas, as células humanas da polpa a sintetizar e secretar enzimas proteolíticas que destroem a matriz extracelular (Ueda & Matsushima, 2001). Pan & Halper (2003) relataram um aumento na expressão gênica de mRNA de procolágeno tipo I quando os fibroblastos foram estimulados com TGF- β 1, e redução da expressão gênica de mRNA de procolágeno tipo I quando estimulados com TNF- α . TNF- α estimula o crescimento de fibroblastos e a produção de colagenase pelos próprios fibroblastos (Coil *et al.*, 2004).

Sabendo-se que valores elevados do retardo óptico implicam em uma estrutura de forte birrefringência, ou seja, elevada organização estrutural do colágeno; e baixos valores do retardo óptico significam fraca birrefringência, ou seja, baixa organização estrutural do colágeno (Wolman & Kasten, 1986, Vidal & Mello, 1987), as imagens obtidas pela microscopia de polarização mostram que a monocamada de células é uma estrutura de fraca birrefringência, pois existem moléculas de colágeno em várias direções. Pode-se, entretanto, observar uma

alteração no brilho emitido pelo corpo birrefringente após o estímulo bacteriano, verificado pela variação dos valores obtidos com o retardo óptico.

Os resultados encontrados com a análise da birrefringência do colágeno através da microscopia de polarização, em relação à influência do tempo, tanto para fibroblastos 3T3 e odontoblastos MDPC-23, mostraram uma tendência à redução do valor do retardo óptico com o decorrer do tempo, ou seja, uma redução da birrefringência, significando uma desorganização estrutural. Em alguns casos, foi observado um aumento dos valores do retardo óptico em 4 horas, mas posteriormente, seguiu-se com uma significativa diminuição.

Os resultados obtidos pela microscopia de polarização, em relação à influência do tipo de contato sobre o retardo óptico para os fibroblastos (Tabela 05), mostram que apenas para *S. mutans* o contato indireto foi significativamente maior que o contato direto no período de 4 horas. Isso significa que apenas os subprodutos foram suficientes para estimularem um aumento no brilho exibido pela estrutura birrefringente. Em relação à influência do tipo de contato sobre o retardo óptico para os odontoblastos (Tabela 11), apenas para *E. faecalis* o contato direto foi significativamente maior que o contato indireto no período de 4 horas. Indicando que a presença da bactéria foi mais relevante que os seus subprodutos.

E. faecalis foi a bactéria que mais estimulou um aumento no brilho exibido pelo corpo birrefringente, principalmente no período de 4 horas. Em ordem decrescente, é seguido pelo *S. mutans* e *P. gingivalis*; essa sequência se repetiu para fibroblastos (Tabela 06) e odontoblastos (Tabela 12). *E. faecalis* está relacionado com a síntese de gelatinase (Kayaoglu & Ørstavik, 2004), por isso sugere-se que não esteja diretamente envolvido com a degradação de colágeno tipo I, justificando os maiores valores encontrados para o retardo óptico; no entanto, o LTA, um dos fatores de virulência das bactérias Gram-positivas, é capaz de desregular o colágeno tipo I (Farges *et al.*, 2009), situação observada no período de 8 horas.

Com os resultados obtidos nesse estudo, observa-se a necessidade de avaliar outros componentes que também são liberados pelas células estudadas e que podem interferir na produção do colágeno como as metaloproteinases, e citocinas tipo TNF- α e TGF- β 1. Outro fator importante de se avaliar é a morfologia celular a fim de compreender os eventos que interferem na secreção do colágeno quando uma célula é estimulada pelas bactérias e/ou seus subprodutos. Como certeza, essas novas informações irão contribuir para compreender o processo que acontece *in vivo* quando o complexo dentina-polpa é exposto à ação de bactérias patogênicas da cárie dental e da infecção do sistema de canais radiculares.

7. CONCLUSÃO

Com esse estudo, pode-se concluir que:

- A infecção com as bactérias *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. gingivalis* estimularam um aumento nos níveis de colágeno tipo I nos períodos de 2 e 4 horas em cultura de odontoblastos MDPC-23, e um aumento nos progressivo de colágeno tipo I entre 2 e 8 horas em cultura de fibroblastos 3T3.
- O estímulo para o aumento na produção de colágeno se deve a ação dos subprodutos liberados pelas bactérias e não pelo contato célula/bactéria.

REFERÊNCIAS*

Adriaens PA, de Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. *J Periodontol.* 1988; 59: 222-30.

Alberts BBD, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia Molecular da Célula.* 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Beg AM, Jones MN, Miller-Torbert T, Holt RG. Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 298: 75-9.

Bohari SP, Grover LM, Hukins DW. Pulsed-low intensity ultrasound enhances extracellular matrix production by fibroblasts encapsulated in alginate. *J Tissue Eng.* 2012; 3 (1): 2041731412454672.

Chang YC, Lai CC, Yang SF, Chan Y, Hsieh YS. Stimulation of matrix metalloproteinases by Black-pigmented *Bacteroides* in human pulp and periodontal ligament cell cultures. *J Endod.* 2002; 28: 90-3.

Chun YH, Chun KR, Olguin D, Wang HL. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. *J Periodontal Res.* 2005; 40: 87-95.

Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod.* 2004; 30: 88-91.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do Internacional Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Constantine VS & Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen II – The use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol.* 1968; 50: 419-23.

Dai XF, Ten Cate AR, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. *Arch Oral Biol.* 1991; 36 (10): 775-8.

Dogan S, Gunzer F, Guenay H, Hilmlmann G, Geurtsen W. Infection of primary human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Clin Oral Invest.* 2000; 4: 35-41.

Farges JC, Keller JF, Carrouel F, Durand SH, Romeas A, Bleicher F, Lebecque S, Staquet MJ. Odontoblasts in the Dental Pulp Immune Response. *J Exp Zool (Mol Dev Evol).* 2009; 312B: 425-36.

Frank RM, Steuer P, Hemmerle J. Ultrastructural study on human root caries. *Caries Res.* 1989; 23: 209-17.

Goldberg M, Septier D, Lécolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AN, Gafni G, Dillouya D, Vermelin L, Thonemann B, Schmalz G, Bissila-Mapahou P, Carreau JP. Dental mineralization. *Int. J. Dev. Biol.* 1995; 39: 93-110.

Gomes BFFA, Pinheiro ET, Souza ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 247-53.

Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tanarella forsythia* in primary endodontics infections. *J Endod.* 2007; 33: 1049-52.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 71-6.

Graham L, Cooper PR, Cassidy N et al. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*. 2006; 27 (14): 2865-73.

Hahn CL, Liewehr FR. Innate Immune Responses of the Dental Pulp to Caries. *J Endod*. 2007; 33: 643-51.

Hawkinson RW, Eisenmann DR. Electron microscopy of dentinal tubule sclerosis in the enamel-free region of the rat molar. *Arch Oral Biol*. 1983; 28: 409-14.

Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18: 121-6.

Inaba H, Nakano K, Kato T, Nomura R, Kawai S, Kuboniwa M, Ishihara K, Ooshima T, Amano A. Heterogenic virulence and related factors among clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23: 29-35.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *International Endodontic Journal*. 2006; 39: 62-70.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical

periodontitis and the antimicrobial periapical periodontitis and the antimicrobial bacteria. *Oral Microbial Immunol.* 2003; 18: 285-92.

Jackson RJ, Lim DV, Dao ML. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol.* 1997; 34 (1): 49-54.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrossírius staining plus polarization microscopy – a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11: 447-55.

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixate of high osmolarity for use in electronmicroscopy. *J Cell Biol.* 1965; 27: 137-38.

Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15 (5): 308-20.

Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. *Ann Med.* 1999; 31 (1): 34-45.

Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14 (1): 13-29.

Kokkas AB, Goulas A, Varsamidis K, Mirtsou V, Tziafas D. Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp. *Int Endod J.* 2007; 40 (3): 198-203.

Komatsu K, Mosekilde L, Viidik A, Chiba M. Polarized light microscopic analyses of collagen fibers in the rat incisor periodontal ligament in relation to areas, regions and ages. *Anat Rec.* 2002; 268: 381-7.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62: 1244-63.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Ver.* 1986; 50: 353-80.

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol M.* 2002; 13: 171-83.

Magne D, Guicheux J, Weiss P, Pilet P, Daculsi G. Fourier transform infrared microspectroscopic investigation of the organic and mineral constituents of peritubular dentin: a horse study. *Calcif Tissue Int.* 2002; 71: 179–185.

Magloire H, Romeas A, Melin M, Coble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res.* 2001; 15: 46-50.

Man J, Shelton RM, Cooper PR, Scheven BA. Low-intensity low-frequency ultrasound promotes proliferation and differentiation of odontoblast-like cells. *J Endod.* 2012; 38 (5): 608-13.

Marshall GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J. Dent.* 1997; 25: 441-58.

Martelli-Junior H, Cotrim P, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type

I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol.* 2003; 74 (3): 296-306.

Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black pigmented species. *Microbiology Review* 1988; 52: 134-52.

Murray BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3: 46-65.

Nisengard RJ, Newman MG. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Odell LJ, Baumgartner JC, Xia T, David LL. Survey for collagenase gene prtC in *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis* isolated from endodontic infections. *J Endod.* 1999; 25 (8): 555-8.

Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6: 142-9.

Pan H, Halper J. Regulation of heat shock protein 47 and type I procollagen expression in avian tendon cells. *Cell Tissue Res.* 2003; 311: 373-82.

Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Visvanathan K, Hamilton JA, Reynolds EC. The role of the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes in the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to fibroblasts. *Microbiology.* 2008; 154: 2904-11.

Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate – a review. *Scanning Microscopy.* 1989; 3 (1): 161-174.

Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7 (2): 104-33.

Perdigão J. Dentin bonding—Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Materials.* 2010; 26: 24-37.

Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, Van Winkelhoff AJ. Viable Bacteria in Root Dentinal Tubules of Teeth with Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics.* 2001; 27 (2): 76-81.

Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M, Simunovic-Soskic M. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res.* 2002; 33 (5): 482-4.

Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Tripodi D, Strocchi R. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis. *Int Endod J.* 2004; 37 (2): 114-9.

Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7: 249-52.

Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39 (1): 51-68.

Safavi KE, Spangberg L, Langeland K. Smear layer removal effects on root canal dentin tubule infection. *J Endodon.* 1989; 15: 175-6.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rocas IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiology and Immunology.* 2008; 23: 275-81.

Sasaki T, Nakagawa K, Higashi S. Ultrastructure of odontoblasts in kitten tooth germs as revealed by freeze-fracture. *Arch Oral Biol.* 1982; 27 (10): 897-904.

Sasaki T, Garant PR. Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec.* 1996; 245: 235-49.

Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in new genus *Porphyromonas*. *International Journal of Systemic Bacteriology.* 1988; 3: 128-31.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch J-V, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995; 39: 273-80.

Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* 1998; 9: 498-21.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992; 18: 427-30.

Switalski LM, Butcher WG, Caufield PC, Lantz MS. Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin. *Infect Immun.* 1993; 61 (10): 4119-25.

Ten Cate. *Histologia Oral: desenvolvimento, estrutura e função.* 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Thomas HF, Carella P. A scanning electron microscope study of dentinal tubules from un-erupted human teeth. *Archs Oral Biol.* 1983; 28 (12): 1125-30.

Thomas HF. The extent of the odontoblast process in human dentine. *J. Dent. Res.* 1979; 58: 2207-18.

Thomaz GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* 1999; 35 (3): 227-33.

Tjaderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res.* 2001; 15: 55-8.

Tyrreal GJ, Kennedy A, Shokoples SE, Sherburne RK. Binding and invasion of HeLa and MRC-5 cells by *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology.* 2002; 148: 3921-31.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000; 28 (2): 77-92.

Ueda L, Matsushima K. Stimulation of plasminogen activator activity and matrix metalloproteinases of human dental pulp-derived cells by tumor necrosis factor-alpha. *J Endod.* 2001; 27 (3): 175-9.

Van Winkelhoff AJ, Van Steenberghe TJM, De Graaff J. The role of black pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *Journal of Clinical Periodontology.* 1988; 15: 145-55.

Vidal BC & Mello MLS. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu; 1987.

Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron.* 2003; 34: 423-32.

Zhou J, Windsor LJ. Porphyromonas gingivalis affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. J Periodontal Res. 2006; 41 (1): 47-54.

Wahlin YB, Holm AK. Changes in the oral microflora in patients with acute leukemia and related disorders during the period of induction therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1988; 65: 411-17.

Wolman M, Kasten FH. Polarized light microscopy in the study of the molecular structure of collagen and reticulin. Histochemistry. 1986