

Ivana Márcia Alves Diniz

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA
QUIMIOTERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
SOBRE CULTURAS DE CÉLULAS PULPARES *IN VITRO***

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte/MG
2011**

Ivana Márcia Alves Diniz

Avaliação da citotoxicidade da quimioterapia
fotodinâmica antimicrobiana sobre culturas de células
pulparens *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em
Odontologia

Área de concentração: Dentística

Orientador: Prof. Dr. Luiz Thadeu de
Abreu Poletto

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria
Esperanza Cortés

Belo Horizonte/MG

Faculdade de Odontologia/ Universidade Federal de Minas Gerais

2011

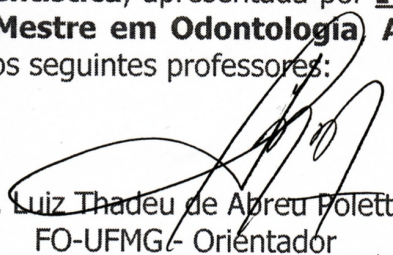
D585a Diniz, Ivana Márcia Alves
2011 Avaliação da citotoxicidade da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana sobre culturas de células pulparens in vitro / Ivana Márcia Alves Diniz.
T 2011.
97 f.: il.
Orientador: Luiz Thadeu de Abreu Polleto
Co-orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.
1. Fotoquimioterapia – efeitos adversos – Teses. 2. Citotoxicidade imunológica – efeitos de radiação – Teses. I. Polleto, Luiz Thadeu de Abreu. II. Cortés Segura, Maria Esperanza. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

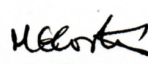
BLACK D047




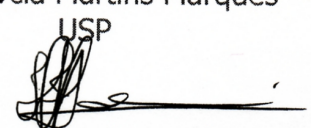
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

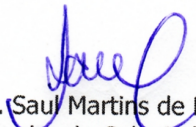
Dissertação intitulada "**Avaliação da citotoxicidade da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana sobre culturas de células pulpares *in vitro***", área de concentração em **Dentística**, apresentada por **Ivana Márcia Alves Diniz**, para obtenção do grau de **Mestre em Odontologia** **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:


Dr. Luiz Thadeu de Abreu Poletto
FO-UFMG - Orientador


Dra. Maria Esperanza Cortés Segura
FO-UFMG - Co-Orientadora


Dra. Márcia Martins Marques
USP


Dr. Hugo Henriques Alvim
FO-UFMG


Prof. Dr. Saul Martins de Paiva
Coordenador do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 25 de julho de 2011.

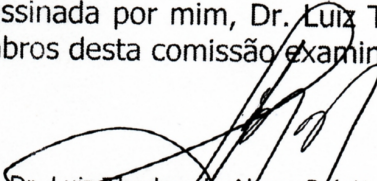



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Belo Horizonte - MG - 31.270-901
Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472
Email: posgrad@odonto.ufmg.br

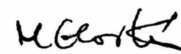


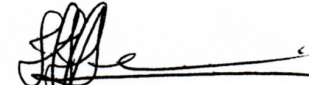
Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Dissertação de Mestrado em Odontologia, área de concentração em **Dentística**, da candidata **Ivana Márcia Alves Diniz**.

Aos 25 de julho de 2011, às 14:00 h, na sala de Pós-Graduação (3418) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dr. Luiz Thadeu de Abreu Poletto, Dra. Maria Esperanza Cortés Segura, Dra. Márcia Martins Marques e Dr. Hugo Henriques Alvim. O Professor Dr. Luiz Thadeu de Abreu Poletto, Orientador da Dissertação, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. À candidata foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho "**Avaliação da citotoxicidade da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana sobre culturas de células pulpareis *in vitro***". Encerrada a exposição, foi iniciada a arguição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dra. Márcia Martins Marques, Dr. Hugo Henriques Alvim, Dra. Maria Esperanza Cortés Segura e Dr. Luiz Thadeu de Abreu Poletto, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as arguições, o Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado à candidata. A Comissão Examinadora opta pela **APROVAÇÃO** da candidata. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim, Dr. Luiz Thadeu de Abreu Poletto, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 25 de julho de 2011.


Dr. Luiz Thadeu de Abreu Poletto
FO-UFMG - Orientador


Dra. Márcia Martins Marques
USP


Dra. Maria Esperanza Cortés Segura
FO-UFMG - Co-Orientadora


Dr. Hugo Henriques Alvim
FO-UFMG

DEDICATÓRIA

Ao meu grande amor, Frederico, que me motivou durante toda essa caminhada. Seu carinho, paciência e companheirismo foram essenciais na execução deste projeto. Você foi, e sempre será, um eterno cajado em minha vida!

A você dedico este trabalho...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés**, não há palavras que explicitem a minha gratidão. Agradeço pela coragem de ter me recebido, pela confiança, atenção e incentivo em todos os momentos. Obrigada pela amizade e carinho sinceros.

Ao **Prof. Dr. Luiz Thadeu**, meu orientador. Você me deu asas, independência, e eu o agradeço por sua generosidade!

Ao **Dr. Márcio Sobreira** do Centro de Pesquisas René Rachou (Fundação Oswaldo Cruz) pela valiosa colaboração nas etapas finais deste trabalho. Serei eternamente grata.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos mãe e pai, pelo apoio incondicional!

Karina, obrigada pelos ricos ensinamentos e pela parceria. Sua dedicação tem grande parte na realização deste trabalho!

Minhas queridas alunas de iniciação científica Mariana e Marcela! Vocês não serão esquecidas nunca! Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Rubén, espero ter a mesma paixão com que você faz ciência. Obrigada pela abertura e pelos conselhos sinceros!

Aos amigos do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais da Química: Alinne, tão prestativa e companheira; Joel, pelo agradável convívio; Fred, pelas opiniões divididas; Sávio, pela calma contagiante; Filipe, pelas ISOs! Kelen, Fernando, Kirla, Aina, Elgte, Arlete - todos os companheiros do laboratório - obrigada gente! Vocês são especiais...

Ao "Seu" Luís, porteiro da Química! Bom dia Seu Luís, que o senhor tenha sempre essa alegria estampada na cara. Energia boa para afastar qualquer mau-humor...

E aos amigos da Odonto, obrigada também. Quero lembrar aqueles que me acompanharam sempre e me ajudaram de alguma forma – Compart, Silvinha, Telminha, Elizete, Marcelo Cardoso, Renata, Dani, Vanessinha, Gió e Carol Nemésio! E às novas grandes amigas Alfonso, Giovana e John! Como foi bom conhecer vocês!

Aos que foram meus alunos na disciplina de Fundamentos da Prática Odontológica. Agradeço a oportunidade de participar do aprendizado de vocês e de todo o carinho com que vocês me receberam e se despediram... Aprendi muito!!!

Às professoras da dentística Patrícia e madrinha Rogéli, vocês me deram a luz! Obrigada pelas contribuições e amizade!!!

A todos os outros professores que me apoiaram: Herbert, Eduardo Lemos – viu? Segui seu conselho e olha o que deu! Obrigada pelo pontapé! Ricardo Gomez e Carolina Gomes, agradáveis companhias...E a todos aqueles que participaram da minha formação durante o mestrado, o meu muito obrigado!

Às funcionárias da pós-graduação Laís, Beth e Zuleica e aos funcionários Euclides e Vaneça, conversa jogada fora, colegas de clínica...obrigada vocês também!

Ao colegiado de pós-graduação na pessoa do Prof. Saul.

A todas as equipes que trabalharam no bloco cirúrgico no período da pesquisa! Em especial, ao Prof. Dr. Wagner Henriques Castro e sua equipe, obrigada pela receptividade. Aos Profs. Baretta e Wladimir, pelo esforço no fornecimento dos dentes. À Cris, funcionária querida do bloco, quantas vezes a amolei e agora agradeço toda sua paciência e auxílio...

Obrigada Rodolfo, da Faculdade de Medicina da UFMG, pelos primeiros impulsos de uma saga – o estabelecimento de uma cultura de células!

Aos professores Zé Bento e Lurdinha, o passo inicial foi dado com vocês. Agradeço a oportunidade que me deram de trabalhar e o apoio para continuar.

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e INCT NanoBiofar pelo apoio financeiro.

Por fim, mas não menos importante, aos familiares, aos meus próprios e àqueles emprestados pelo Fred. A vida é muito mais colorida na presença de vocês! Amo a todos!

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

PREFÁCIO

Esta dissertação de Mestrado foi elaborada a partir de uma pesquisa desenvolvida no Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais do Departamento de Química (Instituto de Ciências Exatas) da Universidade Federal de Minas Gerais, num período de 11 meses, coordenada pela Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés e pelo Prof. Dr. Luiz Thadeu de Abreu Poletto. Este trabalho foi editado na forma de uma monografia e está dividido nas seguintes partes:

Resumo e *Abstract*;

Introdução;

Revisão de Literatura;

Justificativa;

Objetivos (geral e específicos);

Metodologia;

Resultados;

Discussão;

Conclusões;

Perspectivas Futuras;

Referências.

RESUMO

A quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês, *Photodynamic Antimicrobial ChemoTherapy*, PACT) vem sendo utilizada com sucesso na redução dos principais patógenos cariogênicos, mas pouco se sabe sobre seus efeitos sobre as células do tecido dental. Para avaliar a citotoxicidade da PACT utilizando azul de metileno (AM) associado à luz branca ou *laser* diodo em cultura primária de células pulpares, $1,5 \times 10^5$ células/poço foram semeadas em placas de 96-poços e, após 48 h, incubadas com AM (12,5, 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/ml}$) e irradiadas por uma fonte de luz branca (500-800 nm; 400 mW/cm^2) ou *laser* vermelho (660 nm; 1000 mW/cm^2), durante um minuto. O metabolismo celular foi avaliado após 0 e 24 h por meio dos testes de MTT (metiltetrazólio), VN (vermelho neutro) e ALP (atividade de fosfatase alcalina). O tipo de morte celular foi analisado por citometria de fluxo pelo método anexina-V/iodeto de propídeo. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey foram realizados para comparar os grupos. Apenas quando o *laser* vermelho foi associado ao AM a 12,5 $\mu\text{g/ml}$ o protocolo testado se mostrou ligeiramente citotóxico. Houve uma diminuição estatisticamente significativa do metabolismo celular em todas as concentrações de AM testadas com luz branca e nas concentrações de 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/ml}$ irradiadas por *laser*. Após 24 h, os efeitos citotóxicos foram ainda mais severos demonstrando dano sem recuperação celular. Desaderência e alterações morfológicas foram visíveis à microscopia de luz. Observou-se maior predominância de morte celular por necrose quando a exposição foi feita por luz branca e de apoptose quando feita por *laser*. A PACT associando o AM a 12,5 ou 25 $\mu\text{g/ml}$ e *laser* vermelho parece apresentar potencial de aplicação *in vivo* da terapia. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para otimizar os parâmetros de dosimetria de luz da PACT diretamente aplicada às células pulpares.

Unitermos: PACT; citotoxicidade; células pulpares; cárie

ABSTRACT

Evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy cytotoxicity on pulp cell cultures *in vitro*

Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) has been used successfully to eradicate cariogenic microorganisms, but there is a lack of knowledge regarding PACT effects on dental pulp tissue. To evaluate the cytotoxicity of PACT with methylene blue (MB) associated to white light or diode laser on primary pulp cell cultures, 1.5×10^5 cells/well were seeded in 96-well plates for 48 h, incubated with MB (12.5, 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$) and irradiated with a white light source (500-800 nm; 400 mW/cm^2) or red laser (660 nm; 1000 mW/cm^2) for 1 minute. Cell metabolism was evaluated by the MTT (methyltetrazolium), NR (neutral red) and ALP (alkaline phosphatase activity) assays. The type of cell death was evaluated by annexin-V and propidium iodide assay by flow cytometry. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test were performed to compare all groups. Only MB at 12.5 $\mu\text{g/ml}$ exposed to red laser caused slightly cytotoxic effects on pulp cells. There was a statistically significant decrease of cell metabolism for all MB concentrations irradiated by white light and at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ irradiated by laser light. After 24 h, toxic effects were even more severe characterizing damage without cell recovery. Cell detachment and morphological alterations could also be observed under light microscope. After exposure to white light there was a predominance of necrotic cell death, whereas when laser did the exposure there was a predominance of apoptotic cell death. MB at 12.5 and 25 $\mu\text{g/ml}$ exposed to red laser seems to have the potential to be applied *in vivo*. However, news studies should be performed to further optimization of light dosimetry of PACT directly applied on pulp cells.

Keywords: PACT; cytotoxicity; pulp cells; caries

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ALP	<i>Alkaline phosphatase</i> (fosfatase alcalina)
AM/MB	Azul de Metileno (<i>methylene blue</i>)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
AT	Azul de Toluidina
<i>A. viscosus</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt</i> (5-bromo-4-cloro-3'-sal de fosfato indol p-toluidina)
°C	Graus Celsius (<i>celsius degrees</i>)
CA	<i>California</i>
C _{e6}	Clorina _{e6}
CCI-10	Linhagem de fibroblastos
(CH ₃) ₂ N	Amina terciária
cm	Centímetro (<i>centimeter</i>)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO ₂	Dióxido de carbono (<i>carbon dioxide</i>)
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid sodium</i> (ácido etileno diamino tetracético sal dissódico)
EUA	Estados Unidos da América
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (soro fetal bovino)
FITC	<i>Fluorescein isotiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
FO-UFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
FS	Agente fotossensibilizante
h	Hora (<i>hour</i>)
H	Hidrogênio

HCl	Ácido clorídrico
HeNe	Hélio neônio
H ₂ O	Água
INCT NanoBiofar	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica
IP	Iodeto de propídeo
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado (<i>Joule per centimeter square</i>)
λ	Lambda (comprimento de onda)
λ_{\max}	Lambda máximo
L929	Linhagem imortalizada de fibroblastos de ratos
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Laser	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i> (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LED	<i>Light emitting diode</i> (diodo emissor de luz)
M	Molar
$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitro (<i>microgram per milliliter</i>)
μl	Microlitro (<i>microliter</i>)
μm	Micrometro (<i>micrometer</i>)
μM	Micromolar
MDPC-23	<i>Mouse dental papilae cells</i> (linhagem imortalizada de células odontoblastóides de ratos)
min	Minuto (<i>minute</i>)
mg/ml	Miligrama por mililitro
mJ/cm ²	Milijoule por centímetro quadrado
ml	Mililitro (<i>milliliter</i>)
mm	Milímetro
MN	<i>Minnesota</i>
MO	<i>Missouri</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide</i> (metiltetrazólio)
mW	<i>Milliwatt</i>

mW/cm ²	<i>Milliwatt</i> por centímetro quadrado (<i>milliwatt per centimeter square</i>)
N	Nitrogênio
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium chloride</i> (cloreto de tetrazólio nitro-azul)
NH ₂	Amina primária
nm	Nanômetro (<i>nanometer</i>)
NR	<i>Neutral red</i>
NY	<i>New York</i>
PACT	<i>Photodynamic antimicrobial chemotherapy</i> (quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (solução salina tamponada)
PEI	<i>High-molecular-weight-branched</i> (molécula ramificada de alto peso)
p/v	Peso por volume
PI	Tempo pré-irradiação (<i>pre-irradiation time</i>)
%	Por cento (<i>percent</i>)
OR	<i>Oregon</i>
³ O ₂	Oxigênio molecular
¹ O ₂ *	Oxigênio singleto
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
rpm	Revoluções por minuto (<i>revolutions per minute</i>)
¹ S	Estado fundamental do agente fotossensibilizante
¹ S*	Estado singleto do agente fotossensibilizante
³ S*	Estado tripleto do agente fotossensibilizante
s	Segundo (<i>second</i>)
S	Enxofre
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SP	São Paulo
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>

USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultravioleta
VN	Vermelho Neutro
v/v	Volume por volume (<i>volume per volume</i>)
W	<i>Watt</i>

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Grupos experimentais.....	46
Quadro 2 – Gradação da citotoxicidade em relação ao percentual de sobrevivência celular.....	49
Quadro 3 – Dados estatísticos da aplicação do corante com e sem prevenção de luz ambiente.....	89
Quadro 4 – Dados estatísticos da aplicação do corante a 12,5 µg/ml em osteoblastos.....	97
Quadro 5 – Dados estatísticos da aplicação do corante a 25 µg/ml em osteoblastos.....	97
Quadro 6 – Dados estatísticos da aplicação do corante a 50 µg/ml em osteoblastos.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade de fosfatase alcalina dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno, imediatamente e 24 h, após a PACT utilizando <u>luz branca</u>	90
Tabela 2 – Atividade mitocondrial dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno, imediatamente e 24 h, após a PACT utilizando <u>luz branca</u>	91
Tabela 3 – Viabilidade celular determinada por VN dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno, imediatamente e 24 h, após a PACT utilizando <u>luz branca</u>	92
Tabela 4 – Atividade de fosfatase alcalina dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno, imediatamente e 24 h, após a PACT utilizando <u>laser vermelho</u>	93
Tabela 5 – Atividade mitocondrial dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno, imediatamente e 24 h, após a PACT utilizando <u>laser vermelho</u>	94
Tabela 6 – Viabilidade celular determinada por VN dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno, imediatamente e 24 h, após a PACT utilizando <u>laser vermelho</u>	95

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Viabilidade celular nos experimentos com luz branca medida por meio dos ensaios de MTT(1A) e VN(1B).....	55
Gráfico 2 – Viabilidade celular nos experimentos com <i>laser</i> vermelho medida por meio dos ensaios de MTT(1A) e VN(1B).....	56
Gráfico 3 – Avaliação da atividade de fosfatase alcalina - 0 e 24 h - para luz branca.....	57
Gráfico 4 – Avaliação da atividade de fosfatase alcalina - 0 e 24 h - para <i>laser</i> vermelho.....	57
Gráfico 5 – Tipo de morte celular decorrente da PACT avaliada após 24 h pelo método de anexina-V e iodeto de propídeo.....	59
Gráfico 6 – Representação da ação do azul de metileno em suas três concentrações com e sem prevenção de luz ambiente.....	88
Gráfico 7 – Avaliação do azul de metileno (12,5 µg/ml; 25 µg/ml e 50 µg/ml) em associação com luz branca em osteoblastos de ratos (VN/24 h).....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do azul de metileno e do azul de toluidina e pico máximo de absorção.....	27
Figura 2 – Espectro eletromagnético na região visível.....	29
Figura 3 – Distribuição dos grupos experimentais na placa de 96-poços...45	
Figura 4 – Células com 10 dias de incubação.....	53
Figura 5 – Células com 20 dias de incubação.....	53
Figura 6 – Semelhança com fibroblastos.....	53
Figura 7 – Confluência celular.....	53
Figura 8 – Marcação de fosfatase alcalina.....	54
Figura 9 – Estrutura semelhante a nódulo.....	54
Figura 10 – Sem tratamento (MTT).....	58
Figura 11 – Grupo PACT (MTT).....	58
Figura 12 – Sem tratamento (VN).....	58
Figura 13 – Grupo PACT (VN).....	58
Figura 14 – Desaderência celular (VN).....	58

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	24
2-REVISÃO DE LITERATURA	32
3-OBJETIVOS	40
4-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5-MATERIAIS E MÉTODOS	42
Aspectos Éticos e Legais	43
Seleção dos Casos	43
Extração das Células Pulpares	43
Aplicação da Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	44
Testes Celulares	47
ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA	47
MTT	47
VERMELHO NEUTRO	48
CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
Análise Estatística.....	51
6-RESULTADOS	52
7-DISCUSSÃO	61
8-CONCLUSÃO	72
9-PERSPECTIVAS FUTURAS	74
10-REFERÊNCIAS	76
11-APÊNDICES	86
APÊNDICE 1.....	87

APÊNDICE 2.....	88
APÊNDICE 3.....	90
APÊNDICE 4.....	96
APÊNDICE 5.....	99

1-INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O acúmulo de biofilme na superfície dental resulta em uma das mais prevalentes doenças induzidas por bactéria – a cárie (Konopka & Goslinski, 2007). A estagnação do biofilme durante longos períodos pode levar à progressiva dissolução do esmalte (devido à secreção de produtos ácidos pelas bactérias) e, eventualmente, da dentina subjacente (Wilson, 2004). Após a instalação e progressão da doença cárie, o tratamento convencional se baseia na remoção da dentina desmineralizada e no preenchimento da cavidade por material restaurador apropriado. Clinicamente, é difícil para o cirurgião-dentista distinguir a porção dentinária correspondente à dentina amolecida da porção de dentina infectada, que possui consistência um pouco mais endurecida, é removida em lascas e é passível de remineralização (Massara *et al.*, 2002). O desafio torna-se ainda maior em se tratando de lesões profundas, onde a fina camada remanescente de dentina é naturalmente mais úmida e menos rígida devido à proximidade com a câmara pulpar. Muitas vezes, a proteção indireta/direta do complexo dentino-pulpar e, até mesmo, o tratamento da polpa vital, podem ser necessários (Tziafas, 2004). Uma alternativa à remoção mecânica dos microorganismos seria a redução ou erradicação dos patógenos cariogênicos *in situ*. A literatura atual tem demonstrado a susceptibilidade dos principais agentes etiológicos da doença cárie, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, vários lactobacilli e *Actinomyces viscosus*, a produtos citotóxicos derivados da ativação de um fotossensibilizante por uma fonte de luz – a quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês, *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy* (PACT)) (Wainwright 1997). A possibilidade de erradicar bactérias por meio de PACT poderia levar a maior preservação de tecido dentinário sadio e menor risco de precipitar um estímulo doloroso, além de diminuir o tempo de consulta e aumentar as chances de sucesso do tratamento.

A quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana foi descrita pela primeira vez por Oscar Raab, em 1900 (Raab, 1900, citado por Jori *et al.* 2006) e envolve,

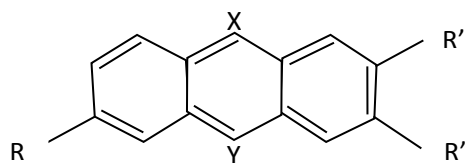
essencialmente, três componentes: uma fonte de luz, uma substância, chamada agente fotossensibilizante (FS) ou corante, e oxigênio molecular (von Tappeiner H, 1904, citado por Jori *et al.* 2006). O FS é deixado em contato com o tecido alvo para que seja absorvido pelo mesmo antes que ocorra a exposição à luz (período ou tempo pré-irradiação - PI). Em seguida, a área de interesse é irradiada por uma fonte de luz a um comprimento de onda (λ) apropriado – específico para cada tipo de corante – o qual é absorvido pelo FS. A absorção de fótons pelo FS, geralmente uma molécula aromática, faz com que este passe de um estado fundamental (estado de mínima energia), 1S , para um estado excitado singlete, $^1S^*$. Dependendo da sua estrutura molecular e do meio, a partir de $^1S^*$, o FS pode retornar ao seu estado fundamental por meio de perda energética ou pode sofrer uma transição para um estado excitado chamado tripleto, $^3S^*$ - mais estável eletronicamente que $^1S^*$ e, portanto, com maior tempo de vida e maior chance de interagir com outras moléculas. No estado tripleto, o FS pode sofrer novamente uma perda energética e retornar ao seu estado fundamental; ou pode sofrer reações redox com o meio ou reagir com o oxigênio molecular (3O_2) para produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais exercem o efeito terapêutico da PACT (Konopka & Goslinski, 2007).

Existem dois mecanismos em que o fotossensibilizante no estado tripleto reage quimicamente com o meio biológico: reações do tipo I e do tipo II. Nas reações do tipo I há produção de radicais livres devido à transferência de elétrons diretamente do fotossensibilizante, no estado $^3S^*$, para o substrato, ou remoção de elétrons de uma molécula do substrato pelo FS. Esses radicais então reagem com o oxigênio, resultando na produção de peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e superóxidos (Konopka & Goslinski, 2007). Nas reações do tipo II, o $^3S^*$ transfere energia ao oxigênio molecular, o qual passa ao seu mais baixo estado excitado singlete, $^1O_2^*$ - uma molécula lábil altamente citotóxica.

Um agente fotossensibilizante é caracterizado pela sua habilidade em absorver luz em alguma região do espectro visível e, desta forma, induzir ou participar de reações fotoquímicas (Machado, 2000). O FS ideal deve apresentar

qualidades como citotoxicidade apenas na presença de luz; ser retido preferencialmente pelo tecido alvo; possuir alta produção de estados tripleto; baixo custo e disponibilidade comercial; alta solubilidade em água; e estabilidade durante o armazenamento e na aplicação de luz (Detty *et al.*, 2004, Konopka & Goslinski, 2007). Por fim, deve apresentar forte absorbância na faixa de 600-800 nm, considerada a janela fototerapêutica dos tecidos (Jori *et al.*, 2006).

Uma gama de corantes como os (i) fenotiazínicos; (ii) ftalocianinos; (iii) clorinos; (iv) porfirinos; (v) xantenos, entre outros, tem sido utilizada na PACT (Wainwright, 1998). Os primeiros compostos fotossensibilizantes antibacterianos sintéticos foram os derivados azínicos. Esses compostos catiônicos têm uma estrutura química muito semelhante entre si, apresentado em comum um esqueleto tricíclico como base (Fig. 1). Os corantes azínicos são divididos em fenotiazínicos e acridinos. Os fenotiazínicos são compostos pelo azul de toluidina (AT) e pelo azul de metileno (AM), de especial interesse pela reconhecida atividade contra patógenos cariogênicos.



	R'	R''	R	X	Y	λ_{\max} (nm)
Azul de Metileno	H	N(CH ₃) ₂	(CH ₃) ₂ N	N	S	660
Azul de Toluidina	CH ₃	NH ₂	(CH ₃) ₂ N	N	S	625

Modificado de Wainwright 1998 (λ_{\max} em etanol)

Fig 1. Estrutura molecular do azul de metileno e azul de toluidina e pico máximo de absorção (λ_{\max})

A ação fotodinâmica do azul de metileno foi relatada pela primeira vez contra vírus e bacteriófagos na década de 1930 (Schultz *et al.*, 1928 citado por

Wainwright, 1998). No início de 1960, foi reportada também sua atividade contra bactérias. Atualmente, o AM vem sendo utilizado no tratamento de câncer, de distúrbios dermatológicos, contra cepas resistentes de bactérias e fungos, ou como agente fotoesterilizador em frações de plasma sanguíneo (Tardivo *et al.*, 2005).

O mecanismo de indução da morte celular pelo AM ainda não está bem estabelecido (Tardivo *et al.*, 2005, Rück *et al.*, 1997). Entretanto, devido à facilidade com que o AM é reduzido, Tuite e Kelly (1993) acreditam que o mecanismo tipo I seja o mais importante para este corante. Nos eucariotos, o AM se liga a múltiplos compartimentos como lisossomos e membrana mitocondrial ou polieletrólitos, como ácidos nucleicos e polissacarídeos (proteínas, lípidos) (Detty *et al.*, 2004, Tardivo *et al.*, 2005). As membranas plasmáticas ou membranas das organelas celulares são um importante alvo para PACT. Esses componentes celulares apresentam uma ampla área de superfície; alta concentração de proteínas; tendência de acúmulo dos FS; e o seu rompimento pode causar lise ou desequilíbrio na homeostasia celular (Paulino *et al.*, 2003). Em procariotos, os produtos da PACT interagem fortemente com várias enzimas celulares, levando a inibição da glicogenólise e hipóxia celular, inibição de síntese proteica e dano ao DNA, o que é considerado citotóxico às bactérias (Hamblin & Hasan, 2004, Maisch, 2007, Calin & Parasca, 2009). Além disso, os lipopolissacarídeos, constituintes predominantes da membrana externa das bactérias gram-negativas e que possuem natureza altamente aniônica, apresentam afinidade com os compostos catiônicos, como o azul de metileno e azul de toluidina, possibilitando a morte bacteriana por fotoativação (Usacheva *et al.*, 2003, Jori *et al.*, 2006, Konopka & Goslinski, 2007).

Uma ampla seleção de fontes de luz, desde a mais alta tecnologia dos *lasers* (do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), *LEDs* (do inglês, *Light Emitting Diode*) até as básicas lâmpadas pode ser usada para excitar o fotossensibilizante (Wainwright, 1998). A eficiência da PACT depende da penetração de luz dentro dos tecidos, ou seja, a aplicação é limitada aos locais

onde a luz possa alcançá-los (Smith, 2005). Sendo assim, fontes de luz com bandas de absorção acima de 600 nm, na região vermelha do espectro visível ou no infravermelho próximo (Fig. 2), são preferíveis, uma vez que penetram mais profundamente nos tecidos e, desta forma, são capazes de provocar mudanças químicas ou físicas no sistema (Wainwright *et al.*, 1997, Konopka & Goslinski, 2007). Neste momento, apenas a descrição dos *lasers* diodos e das lâmpadas de tungstênio-halógena nos interessa.

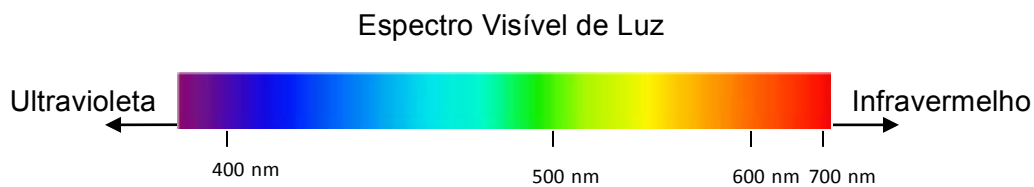


Fig 2. Espectro eletromagnético na região visível

Os *lasers* diodos representam um grande potencial para ampliar a aplicação clínica da PACT nos consultórios. São fáceis de operar, compactos e portáteis, podendo oferecer um ou múltiplos comprimentos de onda. Esses aparelhos são monocromáticos e geralmente apresentam emissão de luz na região vermelha ou verde do espectro visível, de forma coerente e colimada (Brancaleon & Moseley, 2002). Para que a terapia seja efetiva é necessária a correta escolha do fotossensibilizante que absorverá o comprimento de onda específico de luz emitida pelo *laser* a ser utilizado. Por sua versatilidade, tem sido relatado seu uso em uma variedade de tratamentos em pele, olhos e cavidade oral (Walsh, 2003, Oliveira *et al.* 2008, Dantas *et al.*, 2010).

As lâmpadas, dentre elas, as de tungstênio-halógena são uma alternativa ao uso dos *lasers* na PACT. São mais baratas, podem ser ainda mais fáceis de operar que os primeiros e, frequentemente, já foram adquiridas pelos dentistas em seus consultórios dentários para polimerização de resina composta. Em comparação com os *lasers*, apresentam um espectro de emissão muito mais

amplo (luz visível), podendo, dessa forma, serem utilizadas com uma maior variedade de fotossensibilizantes (Calin & Parasca, 2009). Ao contrário dos *lasers*, não podem ser usadas em conjunto com fibras óticas por causa da baixa qualidade e amplitude do seu feixe de luz. Devido ao amplo espectro de emissão destes aparelhos, uma combinação de filtros pode ser utilizada para selecionar um comprimento de onda desejado (Calin & Parasca, 2009). Os filtros também são utilizados para ajudar a evitar a radiação ultravioleta associada à lâmpada e controlar o calor excessivo produzido pela emissão infravermelho do filamento, o que poderia afetar os mecanismos do equipamento e causar dano tecidual à área tratada (Brancaleon & Moseley, 2002).

A superioridade de uma fonte luz monocromática para uma policromática ainda não foi demonstrada em termos de PACT (Brancaleon & Moseley, 2002). Na verdade, a escolha da fonte de luz a ser utilizada na PACT depende, essencialmente, da escolha do FS, da localização do alvo e da dose de energia liberada (Brancaleon & Moseley, 2002). Este último critério é de grande relevância e merece ser clarificado para o entendimento adequado da dosimetria de luz na PACT. De acordo com Silva *et al.*, (2010), a densidade de potência de uma fonte de luz, ou irradiância, é dada em W/cm^2 ou mW/cm^2 , medida por meio de radiômetro ou dividindo-se a potência do aparelho (em W) pela área da secção transversal da ponteira (em cm^2). Já a dose de energia significa a energia recebida, por exemplo, por um tecido, e pode ser calculada multiplicando-se a irradiância (em W/cm^2) pelo tempo de exposição à luz (em segundos) e é dada em J/cm^2 . Entretanto, a dose de energia recebida varia de acordo com o comprimento de onda que está sendo utilizado. Portanto, para as fontes de luz policromáticas este cálculo simples da dose de energia não é válido, sendo necessárias outras ferramentas para determinar a dose de energia em cada λ de sua emissão. A densidade de potência e o tempo de iluminação podem variar de forma a dar a mesma dose de energia (Wainwright, 1998).

Na odontologia, há grande investigação visando à aplicação de PACT para erradicação de microorganismos envolvidos no desenvolvimento de doenças

como a cárie (Burns *et al.*, 1993, Zanin *et al.*, 2005, Paulino *et al.*, 2005, Metcalf *et al.*, 2006, Wood *et al.*, 2006, Bevilacqua *et al.*, 2007, Giusti *et al.*, 2008, Lima *et al.*, 2009, Araújo *et al.*, 2010, Lüthi *et al.*, 2009), doença periodontal (Soukos *et al.*, 2003, Krespi *et al.*, 2005, Goulart *et al.*, 2010) e candidoses (Carvalho *et al.*, 2009, Mang *et al.*, 2010). Especificamente para o tratamento de lesões cariosas, inúmeros protocolos de PACT, utilizando-se várias fontes de luz e corantes, são descritos como promissores na redução ou eliminação de cepas isoladas de microorganismos cariogênicos como *A. viscosus*, *S. mutans* e *S. sobrinus*, ou até mesmo em biofilmes, na presença de saliva e sangue provenientes do meio oral, ou na dentina desmineralizada e colágeno desnaturado (Burns *et al.*, 1993 e 1995). No entanto, esses estudos foram, em sua grande maioria, realizados *in vitro* ou, no máximo, *in situ*. Estudos em cárie *in vivo* conduzidos em modelos animais ou humanos ainda não foram publicados. Além disso, poucos estudos laboratoriais têm sido desenvolvidos para verificar os parâmetros adequados para a realização de PACT dentro de uma janela terapêutica, quando é possível matar os microorganismos sem afetar demasiadamente as células do hospedeiro.

A partir de estudos previamente realizados dentro do grupo de pesquisa e de uma busca cuidadosa na literatura, procurou-se avaliar a biocompatibilidade de uma combinação de alguns protocolos de PACT que obtiveram sucesso na redução de patógenos cariogênicos, com o intuito de verificar a presença de uma janela terapêutica que possibilitasse a aplicação *in vivo* da terapia.

2-REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

Um biofilme é amplamente definido como microorganismos aderentes dentro de uma matriz polimérica que se desenvolve em uma comunidade complexa (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Organismos em biofilmes que crescem em culturas planctônicas nos laboratórios se tornam mais susceptíveis aos antimicrobianos (Smith, 2005). Os estudos descritos a seguir demonstram a eficiência da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana contra patógenos cariogênicos e da flora endodôntica, utilizando diferentes metodologias.

Um dos primeiros estudos conduzidos com a finalidade de testar a PACT contra bactérias responsáveis pelo desenvolvimento da cárie foi realizado em suspensões bacterianas de *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei* e *A. viscosus* pelo grupo inglês de Burns e colaboradores, em 1993. Os autores investigaram a aplicação de azul de toluidina a 25, 50 e 100 µg/ml por 15 minutos, seguida de irradiação por *laser* de gás Hélio-Neônio (~561 mW/cm²; 632,8 nm) durante 15-300 s. Uma taxa aceitável de morte bacteriana foi atingida ao utilizar o AT a 25 ou 50 µg/ml e irradiação por 60 s (33,6 J/cm²).

O mesmo grupo, em 1996, ao tentar estabelecer uma janela terapêutica para PACT comparou os efeitos do azul de toluidina e o mesmo *laser* HeNe descrito acima entre culturas celulares de fibroblastos e queratinócitos da mucosa oral e um dos microorganismos mais prevalentes na placa dental humana, o *S. sanguis*. Os autores testaram o AT em concentrações que variaram de 0,5-50 µg/ml, durante 5 minutos, para determinar as doses minimamente citotóxicas às células testadas. As concentrações de 2 µg/ml (queratinócitos) e 5 µg/ml (fibroblastos) foram então expostas à luz por 60 (~33,1 J/cm²) ou 120 s (~66,6 J/cm²) obtendo uma taxa de viabilidade celular de ~95%. Às culturas de *S. sanguis* foi adicionado AT a 2,5 ou 5 µg/ml e procedida irradiação por 30-120 s. A terapia se mostrou efetiva contra o microorganismo quando foram utilizadas ambas as concentrações seguidas de irradiação por 75 s (42,1 J/cm²) (Soukos *et al.*, 1996).

Frente às dificuldades inerentes à utilização dos *lasers* de baixa potência, principalmente relacionadas ao custo do aparelho, outras fontes de luz foram sendo pesquisadas para serem utilizadas na PACT visando o tratamento de cárie. Paulino e colaboradores, em 2005, avaliaram o desempenho de um fotopolimerizador dental (350-500 mJ/cm²; 400-500 nm) associado ao corante rosa de bengala (0-50 µM) na fotoinativação de suspensões de *S. mutans*, comparando seu efeito com fibroblastos CCI-10. A concentração de 0,5 µM (0,5 µg/ml) do corante aplicado por 10 min, seguida da exposição à luz por 20 s (216,6 mJ/cm²) até o máximo de 40 s (433,2 mJ/cm²), não afetou a viabilidade das células testadas e promoveu 100% de morte bacteriana.

Zanin e colaboradores, em 2005, avaliaram a susceptibilidade de *S. mutans* em biofilmes produzidos em discos de hidroxiapatita e saliva artificial suplementada com 2% de sacarose quatro vezes/dia. Os autores verificaram a eficiência de duas fontes de luz, um *laser* diodo HeNe (32 mW; 632,8 nm) e um diodo emissor de luz (32 mW; 638,8 nm), associados ao azul de toluidina a 100 µg/ml (5 min pré-irradiação), na redução do *S. mutans* em biofilmes com três, sete e dez dias de vida. Os tempos de irradiação foram de 5 (49 J/cm²), 15 (147 J/cm²) e 30 (294 J/cm²) minutos. Foi observado um efeito bactericida dose de luz – dependente, embora tenha havido morte bacteriana de mais de 99% em todos os experimentos testados, e que biofilmes mais velhos eram menos suscetíveis à PACT. Resultados muito semelhantes foram encontrados para as duas fontes de luz avaliadas.

Diante da comprovada atividade antibacteriana de alguns corantes como o azul de metileno e azul de toluidina, a busca de outros agentes fotossensibilizantes capazes de exercer essa atividade também foi investigada na literatura. O grupo de Wood e colaboradores, em 2006, comparou os efeitos antimicrobianos de dois compostos com reconhecida atividade bactericida, azul de metileno e fotofrin, com a eritrosina (22 µM), um corante frequentemente disponível nos consultórios dentários para evidenciação de placa dental. Utilizando uma fonte de luz branca com 500-550 nm de comprimento de onda, ou seja, na

região de absorção da eritrosina (densidade de potência de $22,7 \text{ mW/cm}^2$), ou 600-650 nm, na região de absorção do azul de metileno e fotofrin (densidade de potência de $22,5 \text{ mW/cm}^2$), os compostos foram irradiados por 900 s após contato de 15 min com biofilmes de diferentes idades. Todos os corantes utilizados foram efetivos, mas a eritrosina demonstrou excelente atividade bactericida, sendo, inclusive, 5-10 vezes mais efetiva que o AM.

No mesmo ano, este mesmo grupo verificou o efeito do fracionamento de luz na morte também de *S. mutans* em biofilmes (Metcalf *et al.*, 2006). As amostras foram incubadas com eritrosina a $22 \mu\text{M}$ por 15 min e irradiadas por 5 min ($6,25 \text{ J/cm}^2$), de forma contínua (5 min diretos) ou fracionada (5x1 min ou 10x30 s), por uma fonte de luz branca (22 mW/cm^2 ; 500-550 nm). Os autores observaram que o fracionamento da luz causou ainda mais morte bacteriana comparado à exposição contínua ($p < 0,05$).

Em 2007, Bevilacqua e colaboradores publicaram seus estudos em culturas planctônicas de *S. mutans* utilizando parâmetros mínimos de dosimetria de luz associando LED ao azul de toluidina a $100 \mu\text{g/ml}$. Ao utilizar a fonte de luz ($12,1 \text{ mW/cm}^2$; $640 \pm 20 \text{ nm}$) por 180 s ($2,18 \text{ J/cm}^2$) para irradiação do AT após 5 minutos de pré-irradiação, os autores observaram 100% de morte bacteriana nas suspensões.

Giusti *et al.* (2008) testaram um protocolo de PACT em dentina bovina contaminada com cepas de *S. mutans* e *L. acidophilus* para indução de cárie. Foram avaliados dois agentes fotosensibilizantes, Photogem (1, 2 ou 3 mg/ml), um derivado da porfirina, e o azul de toluidina (0,025 ou 0,1 mg/ml) em associação com um LED (400 mW/cm^2 ; 630 nm) com tempos de exposição de 60 s (24 J/cm^2) e 120 s (48 J/cm^2). Os experimentos foram efetivos na redução bacteriana em dentina cariada, mas a melhor combinação foi de AT a $0,1 \text{ mg/ml}$ e uma dose de energia de 48 J/cm^2 .

Com o avanço das pesquisas, a aplicação da PACT também foi realizada *in situ*. Em 2009, Lima e colaboradores avaliaram a efetividade da terapia aplicada

diretamente sobre dentina cariada produzida localmente, uma vez que nesta situação poderia haver dificuldade de propagação da luz através da dentina e limitada penetração do FS, levando a uma menor susceptibilidade dos microorganismos à PACT. Voluntários usaram dispositivos de acrílico palatinos contendo seis discos de dentina humana durante 14 dias. Esses discos eram irrigados com uma solução de 40% de sacarose, dez vezes/dia, sendo, dessa forma, submetidos a um desafio cariogênico. A alimentação e higienização bucal eram realizadas sem o dispositivo. A avaliação da PACT foi feita associando azul de toluidina a 100 µg/ml por 5 min e um diodo emissor de luz vermelha (156 mW/cm²; 638,8 nm) por cinco (47 J/cm²) ou dez (94 J/cm²) minutos. O sucesso na redução dos microorganismos foi alcançado utilizando as duas doses de energia testadas.

Na literatura, não existem artigos *in vivo* publicados verificando a atividade de PACT em lesões cariosas ou como tratamento de polpa vital. Contudo, parte dos estudos descritos no documento de tese de doutorado de Patrícia Valente Araújo Jacques Gonçalves (2009) se trata da realização de um protocolo de PACT aplicado diretamente na dentina cariada de pacientes atendidos nas clínicas de pediatria da Faculdade de Odontologia da UFMG. Neste estudo, foi utilizado o azul de metileno a 25 µg/ml, com 5 min pré-irradiação, associado a *laser* diodo (1000 mW/cm²; 660 nm) ou luz branca (400 mW/cm²; 500-800 nm), aplicados em dentina de diferentes profundidades. Apesar do baixo sucesso na erradicação de bactérias após irradiação com *laser*, houve redução significativa no número de células bacterianas viáveis quando a exposição de luz foi feita por luz branca.

Adicionalmente, em endodontia, a PACT tem sido aplicada conjugada à terapia endodôntica convencional em pacientes portadores de polpas necróticas e lesões periapicais. Após o tratamento endodôntico, Garcez e colaboradores (2008) verificaram que a aplicação de um fotossensibilizante conjugado de PEI (molécula de alto peso molecular ramificada) e c_{e6} (derivado da clorina) a 60 µM, por 2 min, e iluminação por *laser* diodo (1000 mW/cm²; 660 nm) por 240 s, podem aumentar a desinfecção do canal radicular, e que a realização do procedimento por mais de

uma sessão é ainda mais efetiva. Outro estudo *in vivo* muito semelhante ao anterior encontrou resultados similares ao avaliar a associação da PACT, utilizando baixíssimos parâmetros de dosimetria de luz (22,2 mW/cm²; 4 J/cm²) com a terapia endodôntica em dentes decíduos com polpa necrótica; no entanto, o corante utilizado foi o azul de toluidina (50 µg/ml) com 3 min pré-irradiação (Pinheiro *et al.*, 2009).

3-JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A presença de bactérias nas paredes cavitárias é o principal fator desencadeador de reações inflamatórias pulpares sob materiais restauradores (Camps *et al.*, 2000). Condições favoráveis de reparo pulpar após a exposição oral requerem um ambiente livre de bactérias, ausência de alterações hemodinâmicas severas e ausência de severo infiltrado inflamatório (Tziafas, 2004). Considerando a efetividade da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana na redução de patógenos cariogênicos (Burns *et al.*, 1993, Araújo, 2009, Lima *et al.*, 2009), e a possibilidade de se utilizar esta técnica no tratamento de lesões cariosas de qualquer profundidade e, até mesmo, no tratamento conservador da polpa, torna-se importante avaliar o grau de citotoxicidade desta terapia utilizando-se um modelo de cultura de células pulpares *in vitro*, o qual é tido como representativo do tecido pulpar exposto *in vivo* (Stanislawski *et al.*, 1997).

4-OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar, por métodos colorimétricos e citometria de fluxo, os efeitos da PACT em células pulpares humanas *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Mensurar a viabilidade e metabolismo celular de células pulpares com 0 e 24 h após aplicação da PACT associando azul de metileno em três concentrações (12,5 µg/ml; 25,0 µg/ml e 50,0 µg/ml) e dois períodos pré-irradiação (3 e 5 min) e *laser* vermelho (luz vermelha) de baixa potência, por meio dos ensaios de MTT, Vermelho Neutro e Atividade de Fosfatase Alcalina.
2. Mensurar a viabilidade e metabolismo celular com 0 e 24 h após aplicação da PACT associando luz branca e três concentrações de azul de metileno (12,5 µg/ml; 25,0 µg/ml e 50,0 µg/ml) e dois períodos pré-irradiação (3 e 5 min) por meio dos ensaios de MTT, Vermelho Neutro e Atividade de Fosfatase Alcalina.
3. Determinar o tipo de morte celular decorrente da PACT associada às duas fontes luz pelo método da anexina-V e iodeto de propídeo através de análise por citometria de fluxo.

5-MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos Éticos e Legais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), sob o parecer número 229/10 (APÊNDICE 1), obedecendo às exigências da legislação brasileira, conforme as resoluções CNS n° 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Seleção dos Casos

Vinte terceiros molares humanos impactados, extraídos de indivíduos na faixa etária entre 15 e 21 anos por razões ortodônticas, foram selecionados para o estudo. Dentes que apresentassem comprometimento periodontal ou lesão cariada em suas faces não foram incluídos na pesquisa. Voluntários que se encontravam em tratamento nos cursos de extensão em Cirurgia da Faculdade de Odontologia da UFMG participaram do estudo.

Extração das Células Pulpaes

Imediatamente após a exodontia realizada em bloco cirúrgico, os dentes foram desinfetados por fricção com gaze umedecida em álcool 70% durante 1 min e colocados num frasco contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO/Invitrogen, Grand Island, NY, USA), 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e 0,2% de anfotericina B. Um sulco horizontal de 2 mm de profundidade foi realizado

imediatamente abaixo da junção cimento-esmalte, com uma ponta adiantada (#3216 Kg Sorensen) em alta rotação e sob refrigeração, ao lado da chama de uma lamparina, sem, no entanto, atingir a câmara pulpar (Gronthos *et al.*, 2000). Em seguida, os frascos contendo os elementos dentais foram transportados para o Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais, Instituto de Ciências Exatas/Química, UFMG. Os dentes foram então submetidos aos procedimentos de extração das células pulpares em câmara de fluxo laminar, sob condições estéreis. O acesso à câmara pulpar foi feito através da clivagem do dente utilizando-se duas pinças goivas, uma posicionada na parte radicular e outra na coroa dental. Por meio de um movimento único em direções opostas os dentes foram segmentados em duas partes e as polpas coronárias removidas com uma colher de dentina. Para a extração celular, o tecido pulpar foi fragmentado com uma lâmina de bisturi nº 15 numa cuba contendo meio base. Os fragmentos foram então depositados num falcon estéril de 15 ml e incubados a 37°C, por 60 minutos, em meio base contendo 4 mg/ml de dispase e 3 mg/ml de colagenase tipo I (ambas da GIBCO/Invitrogen) (modificado de Gronthos *et al.*, (2000)). Esse procedimento foi repetido três vezes. O sobrenadante foi centrifugado a 1400 rpm por dez minutos. O *pellet* foi ressuscitado em meio DMEM completo, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e 0,2% de anfotericina B e foram incubadas a 37°C em atmosfera umidificada de CO₂ 5% e ar 95%.

As células de cada garrafa foram mantidas em culturas de monocamada e o meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias. Quando as células se tornaram subconfluentes, foram colhidas com solução tripsina-EDTA 0,5% e transferidas para novas garrafas. Apenas células entre as 3^o e 5^o passagens foram utilizadas para os experimentos celulares.

Aplicação da Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Uma solução aquosa de azul de metileno (AM) a 50 µg/ml (Chimiolux, Aptivalux, Belo Horizonte, BR) foi utilizada neste estudo como agente fotossensibilizante. Subsequentes diluições da solução estoque (50 µg/ml) foram procedidas em solução salina tamponada (PBS) para se obter as concentrações finais de 25 e 12,5 µg/ml. As soluções foram esterilizadas por filtração (membrana de 0,22 µm) e apenas aquelas recém preparadas foram utilizadas nos experimentos.

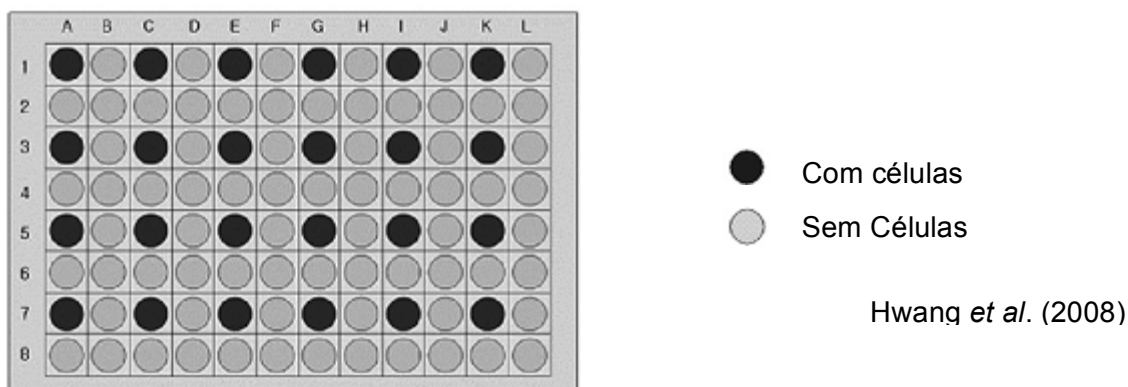


Fig 3. Distribuição dos grupos experimentais na placa de 96-poços. Coluna A (Controle negativo); Coluna C (Luz vermelha ou branca); Coluna E (AM 3'); Coluna G (AM 5'); Coluna I (PACT 3'); e Coluna K (PACT 5').

Alíquotas de $1,5 \times 10^5$ células/poço em 0,1 ml de meio foram semeadas em tetraplicata em microplacas de 96-poços. A contagem celular foi realizada utilizando o teste de exclusão com azul de Tripan em câmara de Neubauer e a distribuição dos grupos na placa foi feita de acordo com a Figura 3, a fim de se evitar exposição indireta de luz nas culturas adjacentes (Hwang *et al.*, 2008). Para cada concentração de AM e tempo de avaliação (0 ou 24 h) foi utilizada uma placa de testes. Após o plaqueamento, as placas foram então cultivadas por 48 h, até que atingissem a confluência de 90%, para realização dos testes. De acordo com o Quadro 1, três concentrações do agente fotossensibilizante (12,5 µg/ml; 25 µg/ml e 50 µg/ml) permaneceram em contato com as células durante 3 ou 5 minutos (PI) nos grupos com aplicação de azul de metileno sozinho e nos grupos onde foi realizada a aplicação do corante e a exposição de luz (PACT). Os experimentos foram realizados sob a luz artificial do ambiente, uma vez que o

percentual de viabilidade celular do AM aplicado no escuro e na presença de luz ambiente não foi estatisticamente diferente (APÊNDICE 2).

Quadro 1. Grupos Experimentais

Grupos	Tratamento
Controle Negativo (sem tratamento)	Sem AM e sem LUZ
AM 3´	AM com pré-irradiação de três minutos (12,5; 25 e 50 µg/ml)
AM 5´	AM com pré-irradiação de cinco minutos (12,5; 25 e 50 µg/ml)
PACT 3´	AM com pré-irradiação de três minutos (12,5; 25 e 50 µg/ml) + LUZ
PACT 5´	AM com pré-irradiação de cinco minutos (12,5; 25 e 50 µg/ml) + LUZ
Luz Branca	Luz branca (um minuto)
Luz Vermelha	<i>Laser</i> (um minuto)

AM, Azul de Metileno; LUZ, Luz branca ou *Laser*; PACT, *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*.

Para os grupos PACT, nos experimentos com luz branca, foi utilizado um aparelho de 260 mW de potência de lâmpada halógena (*Elipar 2500 Curing Light*, 3M Espe[®], St Paul, USA), sem o seu filtro azul para produzir um amplo espectro de emissão entre 500 e 800 nm. O tempo de exposição foi de 1 min dividido em duas aplicações de 30 s e um intervalo de 20 s entre elas para evitar calor excessivo (Araújo, 2009). A irradiância do aparelho foi medida, por radiômetro, em 400 mW/cm².

No grupo da luz vermelha, um *laser* diodo vermelho (40 mW) (TWINN FLEX II, MM *Optics* Ltda, São Carlos, Brasil) com 1000 mW/cm² de densidade de potência e comprimento de onda de 660 nm, também foi aplicado durante 1 minuto, gerando uma dose de energia de 60 J/cm².

As ponteiros das fontes de luz foram posicionadas em contato com a abertura da placa de 96-poços, de modo que a distância da luz às células girasse em torno de 7,5 mm. Essa distância reproduz clinicamente a distância da ponteira do aparelho ao tecido dental a ser irradiado no caso de uma cavidade profunda (Hwang *et al.* 2008). Os grupos-controle foram: (1) células sem tratamento (controle negativo); (2) células tratadas apenas com corante; e (3) células expostas à luz na ausência de corante.

Testes Celulares

ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

A atividade de fosfatase alcalina foi avaliada utilizando as soluções BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate *p*-Toluidine Salt) e NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) (Invitrogen/Zymed). A fosfatase alcalina é uma ectoenzima presente na superfície externa da membrana celular e está envolvida nos processos de mineralização tecidual (Wennberg *et al.*, 2000). A presença de fosfatase alcalina nas células provoca a hidrólise do grupo fosfato do composto BCIP gerando compostos redutores que reagem rapidamente com o NBT, formando, dessa forma, um precipitado arroxeadado insolúvel. Sendo assim, após o experimento, as células foram gentilmente lavadas com PBS e 60 µl da solução BCIP/NBT (1:1) recém preparada foi adicionada às placas. As placas foram incubadas por 2 h em estufa e 60 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado para solubilização do precipitado. Após incubação *overnight*, a densidade ótica foi lida por espectrofotômetro (*Thermo Scientific Multiscan Spectrum, Vantaa, Finland*) a 595 nm.

MTT

O ensaio de sal de tetrazólio - MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide*) (*Invitrogen/Vybrant MTT, Molecular Probes, Eugene, OR, USA*) - é um teste colorimétrico que possui o objetivo de medir a atividade mitocondrial das células. Este teste envolve a redução de um substrato incolor, MTT, num produto insolúvel com coloração azul escura, cristais de formazan, os quais são formados proporcionalmente a atividade de succinato desidrogenase nas mitocôndrias de células viáveis. O ensaio de MTT foi realizado imediatamente e 24 h após a PACT, precedido de lavagem das células com PBS (2x) para remover o excesso de azul de metileno. Após a realização do experimento, as células foram supridas com meio base e 100 µl de MTT (5 mg/ml) foram depositados nas mesmas. As placas foram então incubadas por 4 h a 37°C em atmosfera umidificada de CO₂ 5% e ar 95%. Em seguida, a formação dos cristais de formazan foi observada ao microscópio invertido de luz (BEL *Photonics*®, BEL Equipamentos Ltda, Piracicaba, SP). Numa segunda etapa, 100 µl de 10% SDS-HCl (Dodecil sulfato de sódio - ácido clorídrico) foi acrescentado nos grupos para solubilização dos cristais e as placas foram novamente incubadas *overnight* em estufa nas condições previamente descritas. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 570 nm.

VERMELHO NEUTRO

A viabilidade celular também foi avaliada pelo teste de vermelho neutro, um corante que prontamente ultrapassa membranas plasmáticas intactas e acumula-se nos lisossomos. Imediatamente e 24 h após a realização da PACT, seguido de lavagem delicada com PBS para remoção do excesso de azul de metileno, as células foram incubadas por 2 h em 100 µl de meio base contendo vermelho neutro numa concentração final de 0,01%. Em seguida, as células foram gentilmente lavadas com PBS. O corante foi extraído das células pela adição de 100 µl de solução removedora (51% H₂O, 48% de etanol, e 1% de ácido acético) por 20 minutos a temperatura ambiente em constante agitação suave. A

quantidade de vermelho neutro absorvido pelas células foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm.

A citotoxicidade celular foi avaliada de acordo com a porcentagem de viabilidade celular (MTT e VN) e de expressão de fosfatase alcalina (ALP) em relação ao controle negativo, segundo a equação:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{média da densidade ótica do grupo teste}}{\text{média da densidade ótica do controle negativo}^*} \times 100$$

* células sem tratamento

E classificada de acordo com Sjögren *et al.*, (2000):

Quadro 2. Gradação da citotoxicidade em relação ao percentual de sobrevivência celular

Citotoxicidade	Viabilidade celular
Não citotóxico	Maior que 90%
Ligeiramente citotóxico	60-90%
Moderadamente citotóxico	30-59%
Severamente citotóxico	Menor ou igual a 30%

CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica de análise celular automatizada, que permite a avaliação simultânea de múltiplas propriedades físicas e bioquímicas individuais de uma célula suspensa em meio líquido (Jaroszeski & Radcliff, 1999). A caracterização da viabilidade celular por citometria de fluxo inclui a análise básica de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Forward scatter” - FSC), granulosidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “Side Scatter” - SSC) e intensidade de fluorescência (FL1, FL2 e FL3). Estas características são detectadas utilizando-se um sistema ótico eletrônico acoplado, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula

hidrodinamicamente focalizada. Esses sinais óticos e eletrônicos podem ser medidos e armazenados para posterior análise.

Para diferenciação de células vivas de células apoptóticas ou necróticas foi empregado o kit de Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (IP) (ApoTarget, Invitrogen). As células foram semeadas em placas de 96-poços e após 48 h o meio de cultura foi removido e as células foram expostas ao AM nas três concentrações experimentais (12,5; 25 ou 50 µg/ml) por 5 min. Em seguida, os grupos PACT foram irradiados por 1 min por luz branca (2x30s e intervalo de 20s) ou vermelha. Após 24 h, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação de anexina V e incubadas com 10 µl de iodeto de propídeo e 5 µl de anexina V por 15 min à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, 400 µl do tampão de ligação foram adicionados às células. As amostras foram analisadas por um citômetro de fluxo FACScan (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA*) dentro de 1 h após a coloração no Centro de Pesquisas René Rachou. Um total de 10000 eventos foram avaliados para cada amostra.

Nas células vivas os fosfolípides da membrana plasmática estão organizados de forma assimétrica entre a superfície interna e externa dessa estrutura. A exposição do fosfolípide fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática é um indicativo da perda de sua assimetria – um sinal precoce de apoptose – uma vez que normalmente ele está presente na parte interna deste componente celular (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). A anexina V se liga à fosfatidilserina exposta e, dessa forma, com o auxílio do isotiocianato de fluoresceína (FITC), pode ser identificada por citometria de fluxo (FL1). Já o iodeto de propídeo é excluído de células vivas ou que sofrem apoptose precoce e penetra em células que perderam a integridade de suas membranas plasmáticas (apoptose tardia ou necrose) (FL3) (Darzynkiewicz *et al.*, 1992). Sendo assim, células que eram anexina V(-)/IP(-) (quadrante inferior esquerdo) foram consideradas vivas; anexina V(+)/IP(-) (quadrante inferior direito) foram

consideradas apoptóticas; anexina V(+)/IP(+) (quadrante superior direito) foram consideradas necróticas; e anexina V(-)/IP(+) (quadrante superior esquerdo) podem ser consideradas em necrose tardia, células sem núcleo ou debris celulares (Wakui *et al.* 2010). Para cada amostra foram realizados controles das reações (células não marcadas), uma vez que são importantes na avaliação da qualidade do perfil celular e na detecção de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

ANÁLISE MORFOLÓGICA

Alterações morfológicas nas culturas de células pulpares foram observadas diretamente através de um microscópio invertido de luz, fotografadas por uma câmera fotográfica (*Canon EOS 1000D*, CANON INC) e trabalhadas no *Paint* (*Windows Vista® Home Basic 32BIT SP1*, Microsoft).

Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados três vezes, sendo que, para cada conjunto de ensaios de MTT, VN ou ALP (tetraplicata), foram utilizadas três linhagens diferentes de células pulpares. Para estes testes, as médias e desvios-padrões de cada experimento foram calculados e analisados pelo programa *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software*, CA, USA). Os testes estatísticos *one-way ANOVA* seguido de Tukey foram realizados para verificar as diferenças entre os grupos. A análise por citometria de fluxo foi feita de forma descritiva para os grupos sem tratamento e PACT.

6-RESULTADOS

RESULTADOS

As Figuras 4 a 7 revelam o aspecto geral das culturas de células pulpares estabelecidas neste estudo. Sob microscópio invertido de luz, as células jovens apresentavam diferentes formatos e um padrão de crescimento inespecífico (Fig. 4). A partir da segunda passagem, a maioria das células apresentavam formato afilado, com processos celulares estendidos semelhantes a fibroblastos e uma tendência de crescimento radial, em ninhos. Estruturas semelhantes a nódulos puderam ser observadas nas culturas mais adiantadas. A confluência celular pode ser observada na Figura 7. Essas fotos foram trabalhadas utilizando inversão de cores.

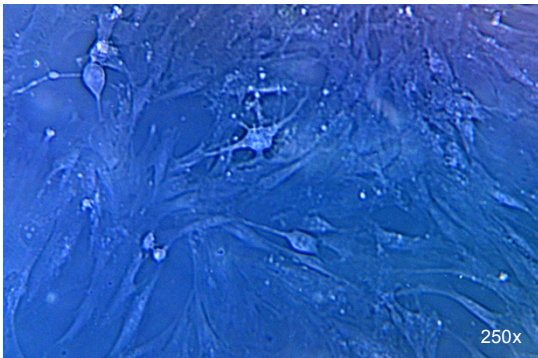


Fig 4. Células com 10 dias de incubação

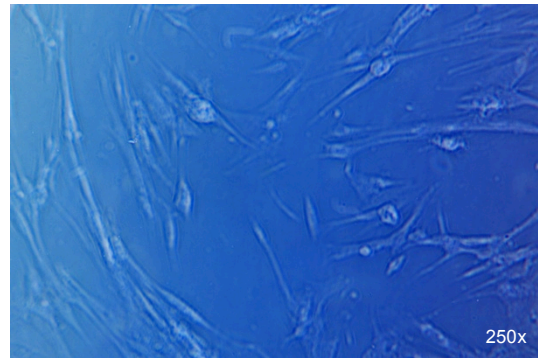


Fig 5. Células com 20 dias de incubação

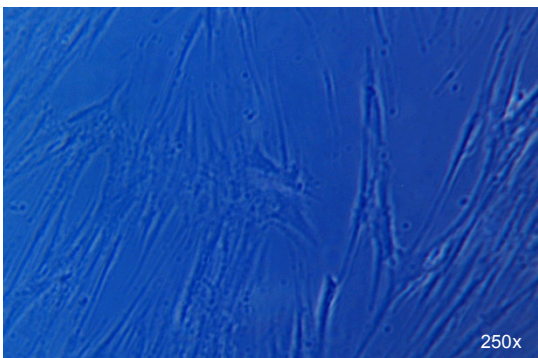


Fig 6. Semelhança com fibroblastos

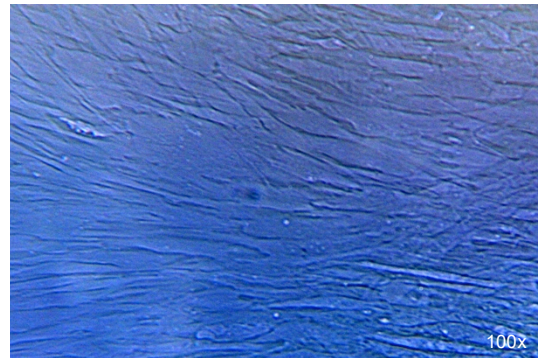


Fig 7. Confluência celular

A marcação para atividade de fosfatase alcalina pode ser observada nas Figuras 8 e 9 para os grupos sem tratamento.

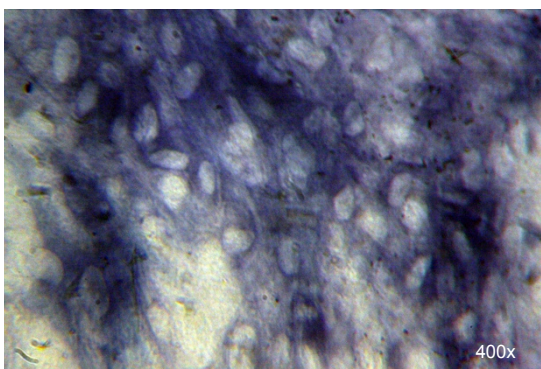


Fig 8. Marcação de fosfatase alcalina

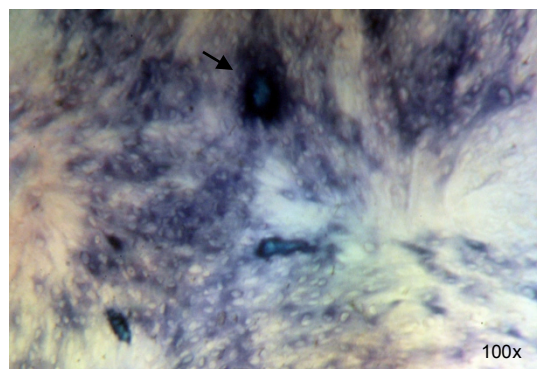


Fig 9. Estrutura semelhante a nóculo (seta)

Os Gráficos 1 e 2 mostram a viabilidade das células pulpares - imediatamente e 24 h - após o protocolo com luz branca (Gráf. 1) e luz vermelha (Gráf. 2), determinada por MTT (1A e 2A) e VN (1B e 2B). Os Gráficos 3 e 4 apresentam os resultados da atividade de fosfatase alcalina dos experimentos com luz branca e luz vermelha, respectivamente. As Tabelas 1 a 6 expressam os valores de viabilidade celular em porcentagem, com as médias e desvios-padrões para cada experimento (APÊNDICE 3).

A aplicação de apenas luz não causou redução significativa na viabilidade e metabolismo celular, independentemente da fonte de luz utilizada. O azul de metileno nas concentrações de 12,5 e 25 $\mu\text{g/ml}$ aplicado sem exposição à luz foi ligeiramente citotóxico em quase todos os experimentos avaliados pelos testes colorimétricos, imediatamente e 24 h depois. Para a concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$, a atividade de fosfatase alcalina se mostrou significativamente reduzida principalmente 24 h após a realização do experimento. Nos testes de MTT e VN, esta concentração demonstrou citotoxicidade moderada ou severamente citotóxica após 0 e 24 h. A variação no tempo pré-irradiação entre 3 e 5 minutos não obteve relação estatisticamente diferente em 95% dos experimentos realizados. Os resultados para os grupos PACT (luz+azul de metileno) foram os seguintes:

Luz branca (Gráf. 1 e 3): pelo MTT, todas as concentrações de AM testadas expostas à luz branca apresentaram-se severamente citotóxicas nos dois momentos avaliados ($p < 0,001$). Já pelos testes VN e ALP, os resultados foram semelhantes, mas os grupos demonstraram citotoxicidade importante principalmente após 24 h ($p < 0,001$).

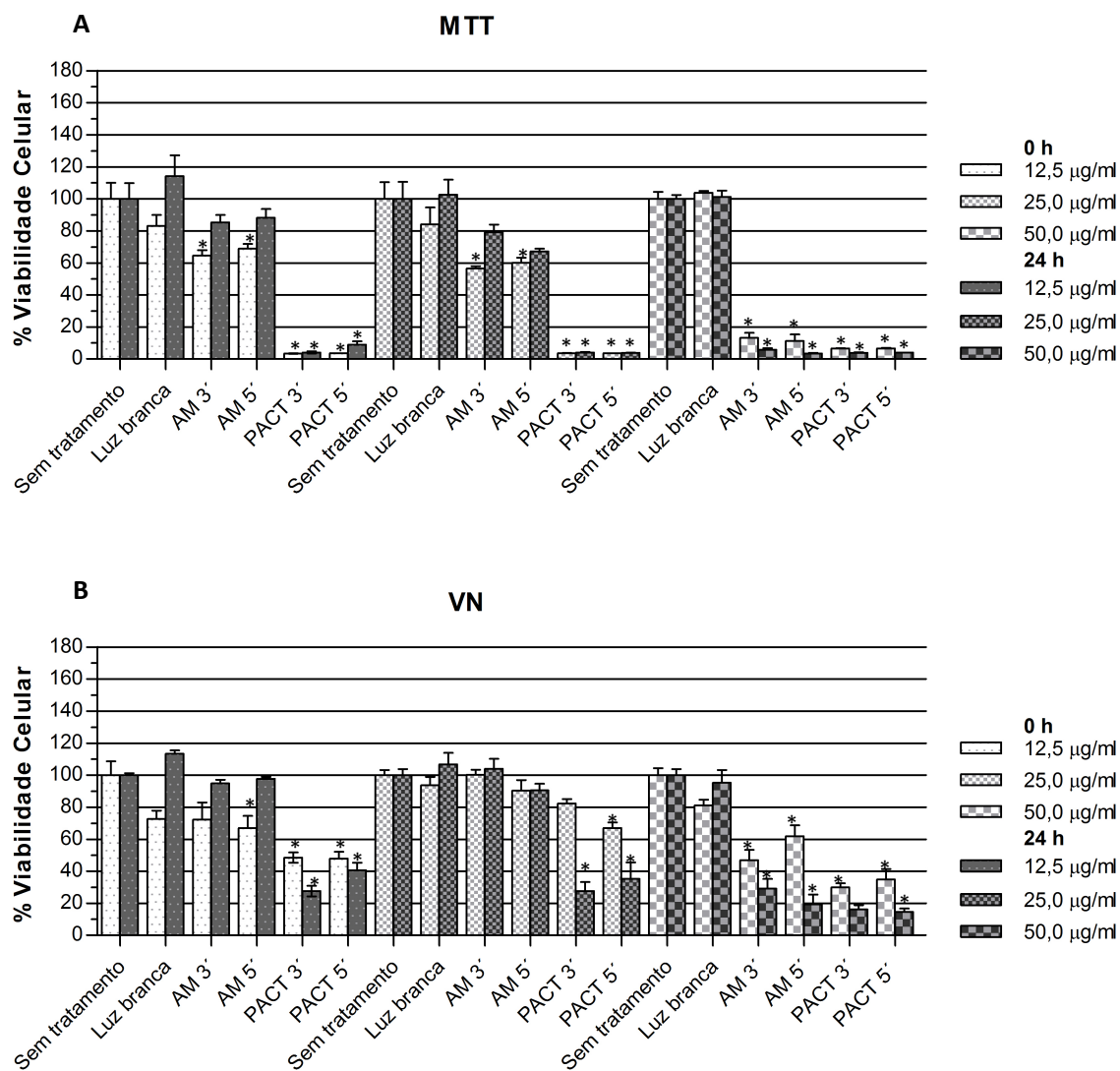


Gráfico 1: Viabilidade celular nos experimentos com luz branca medida por meio dos ensaios de MTT (1A) e VN (1B). * Resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo Sem tratamento

Luz vermelha (Gráf. 2 e 4): a atividade de fosfatase alcalina mostrou-se significativamente reduzida em relação ao controle em todos os grupos PACT.

Para a concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$ a redução da viabilidade celular foi de ~70%; e de mais de 90% para a concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ (24 h/MTT). Pelo VN, o grupo PACT de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ apresentou ligeira citotoxicidade e o grupo PACT de 25 $\mu\text{g/ml}$ mostrou-se moderadamente citotóxico (24 h). Os grupos PACT de 50 $\mu\text{g/ml}$ demonstraram reduções severas na viabilidade celular nos dois momentos avaliados.

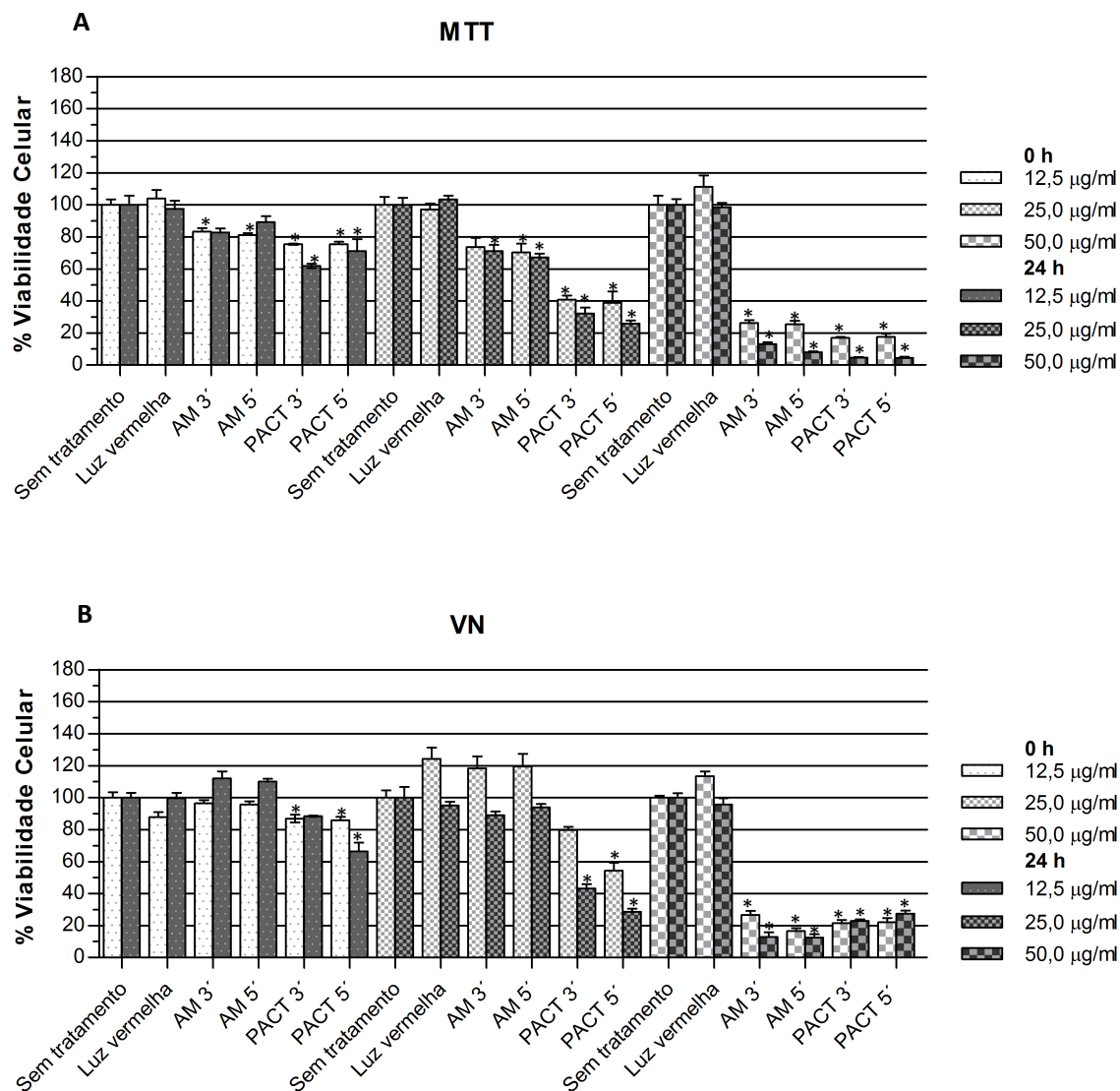


Gráfico 2: Viabilidade celular nos experimentos com *laser* vermelha (luz vermelha) medida por meio dos ensaios de MTT (2A) e VN (2B). * Resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo Sem tratamento

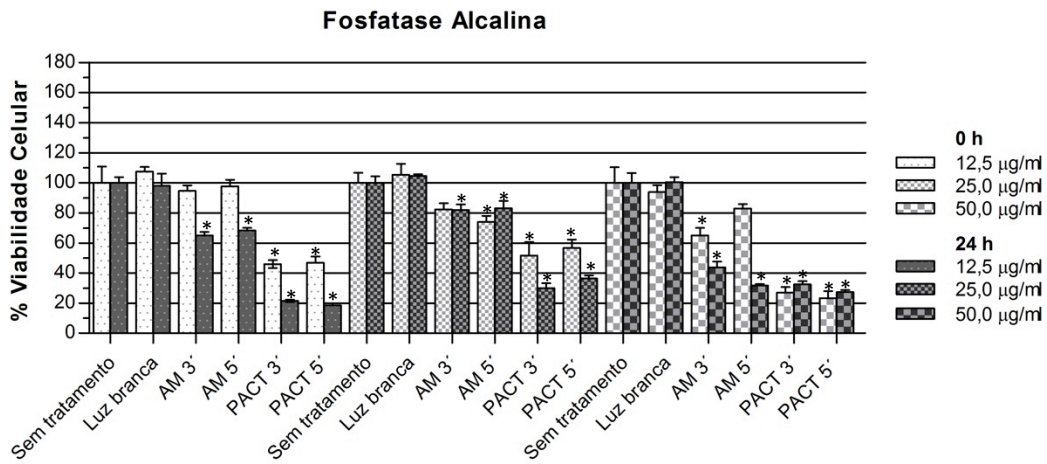


Gráfico 3: Avaliação da atividade de fosfatase alcalina nos experimentos para luz branca

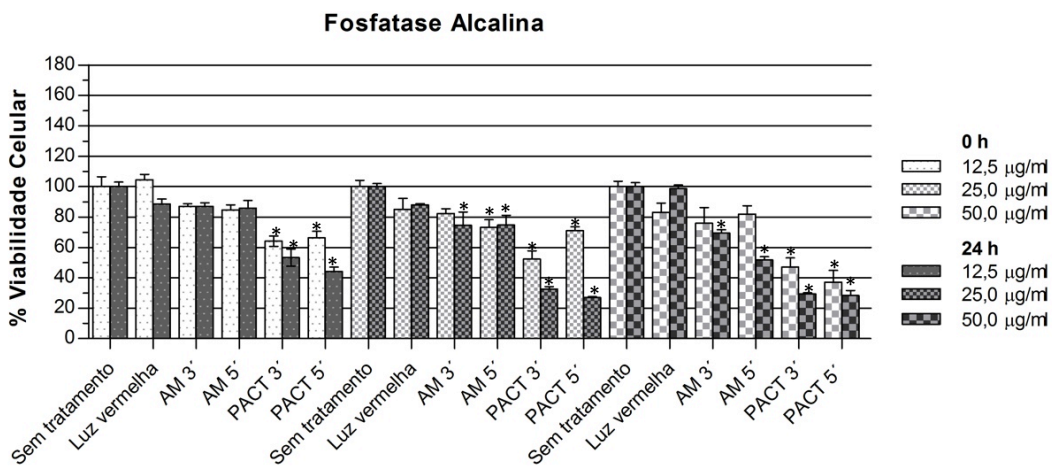


Gráfico 4: Avaliação da atividade de fosfatase alcalina nos experimentos para *laser* vermelho (luz vermelha)

A aparência das culturas celulares após a realização dos experimentos pode ser observada para os grupos sem tratamento e PACT, pelos testes MTT (Fig 10 e 11) e VN (Fig 12, 13 e 14).

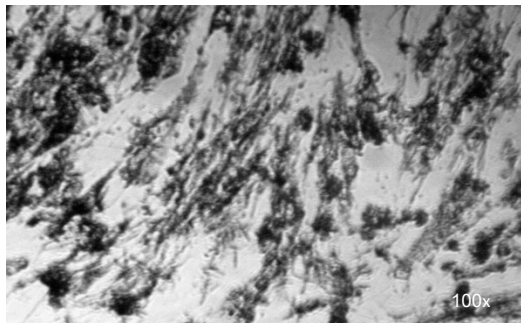


Fig 10. Sem tratamento (MTT)

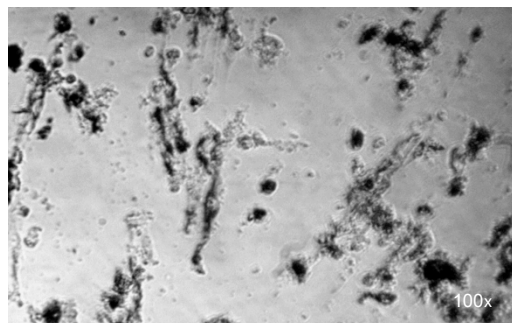


Fig 11. Grupo PACT (MTT)

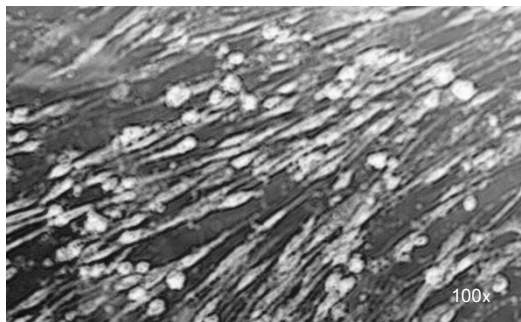


Fig 12. Sem tratamento (VN)

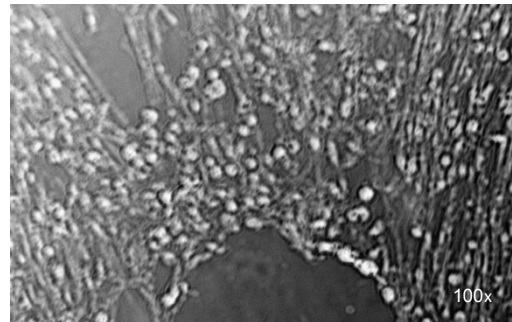


Fig 13. PACT (VN)

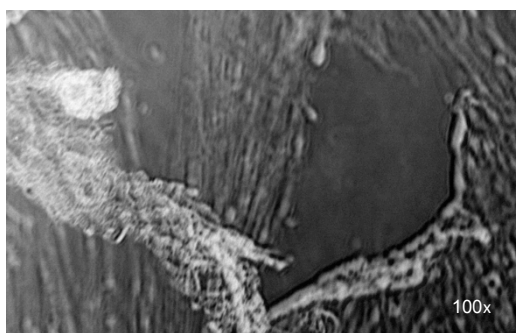


Fig 14. Desaderência celular (VN)

Citometria de Fluxo

O primeiro passo para a obtenção dos dados por citometria de fluxo consistiu na identificação da população celular de interesse (R1), após ajustes de ganho de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (APÊNDICE 5). Após esta seleção da região de interesse (R1), foi feita a análise da viabilidade através do percentual de células positivas expresso em gráficos de dispersão pontual de fluorescência, utilizando o programa *CELLQuest*.

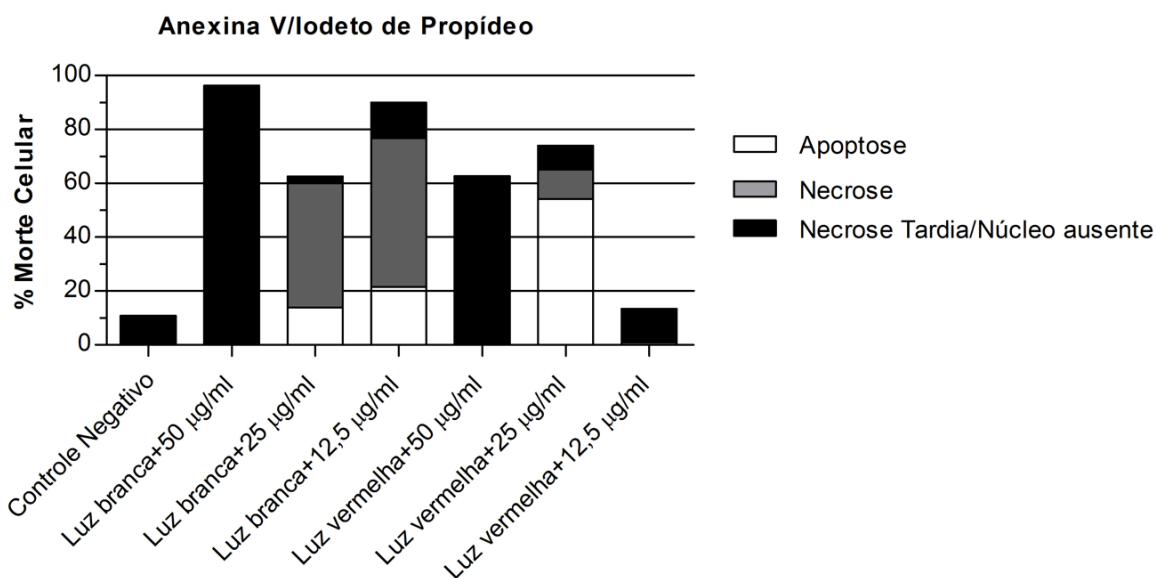


Gráfico 5. Tipo de morte celular decorrente da PACT avaliada após 24 h pelo método de anexina-V e iodeto de propídeo

As células não tratadas com luz e nem com FS foram caracterizadas como controle negativo. Os dados obtidos pela análise por citometria de fluxo estão representados no Gráf. 5 e APÊNDICE 5. Nos grupos em que foi realizada a aplicação de luz branca e azul de metileno nas três concentrações (12,5, 25 e 50 µg/ml) as porcentagens de morte celular por apoptose precoce foram 21,56%, 13,84% e 0,04% e por apoptose tardia ou necrose 55,19%, 46,25% e 0,30%, respectivamente. A porcentagem de estruturas e/ou células inviáveis

correspondentes ao quadrante superior esquerdo foram 13,31%, 2,51% e 95,93% para 12,5, 25 e 50 µg/ml, respectivamente.

Nos grupos PACT onde foi realizada aplicação de *laser* vermelho associado ao AM a 12,5, 25 e 50 µg/ml, os valores percentuais de morte por apoptose precoce foram 0,06%, 57,17% e 0,15% e por apoptose tardia ou necrose foram 0,83%, 10,93% e 0,09% respectivamente. As células anexina-V(-)/iodeto de propídeo(+) representaram 12,51%, 8,92% e 62,92% para as concentrações 12,5, 25 e 50 µg/ml, respectivamente.

7-DISSCUSSÃO

DISCUSSÃO

Células diplóides normais diferem significativamente de células de culturas estabelecidas, ou imortalizadas (Feigal *et al.*, 1985). Apesar das últimas apresentarem estabilidade e características previamente conhecidas (Schuster *et al.*, 2001), culturas primárias de células pulpares são preferíveis por apresentarem bastante homologia com o tecido humano original (Annunziata *et al.*, 2006). Isso permite maior aproximação do experimento *in vitro* com a situação *in vivo*. Por conterem maior volume de tecido pulpar, neste trabalho, foram utilizados terceiros molares de 14 pacientes diferentes. O estabelecimento de uma cultura de células da polpa dental é difícil e há variações entre linhagens celulares de indivíduos distintos com relação às características de proliferação (Wyk *et al.*, 2001). Sendo assim, é recomendável a utilização de várias linhagens, ou seja, tecido pulpar de vários doadores para se obter resultados aceitáveis estatisticamente. Além disso, o tamanho do tecido pulpar parece ter uma relação direta com a taxa de sucesso da cultura (Wyk *et al.*, 2001).

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo que possui uma organização típica e localização particular (Zago *et al.*, 2008). O tecido é composto por fibroblastos, odontoblastos, células indiferenciadas de origem mesenquimal, além de células de defesa, pericitos e células endoteliais (Goldberg *et al.*, 2008). Neste estudo, as células pulpares apresentaram geralmente um formato afilado com processos celulares estendidos, semelhantes a fibroblastos. Uma vez que as células pulpares possuem a capacidade intrínseca de se diferenciarem em odontoblastos, a expressão de fosfatase alcalina foi verificada por ser um bom marcador para caracterização dessas linhagens e por ser um produto metabólico delas (Chan *et al.*, 2005). As células dos grupos que não receberam qualquer tratamento apresentaram forte marcação para atividade de fosfatase alcalina, demonstrando, inclusive, a presença de estruturas semelhantes a nódulos

dispersos no leito celular. Esses achados também foram reportados por D'Aquino *et al.* (2008).

O perfil de citotoxicidade *in vitro* como um primeiro fator de biocompatibilidade de um material dentário deve ser determinado por meio de cultura celular (Feigal *et al.*, 1985, Huang & Chang, 2002). Os experimentos *in vitro* têm a vantagem de serem facilmente controlados, simples, reproduzíveis e relativamente baratos, o que pode não ocorrer em experimentos *in vivo* (Kong *et al.*, 2009). São testes relevantes, apesar de não representarem com integralidade o meio fisiológico, especialmente quando utilizadas culturas em monocamadas (Schuster *et al.*, 2001). Um fator importante é que as células pulpares no estágio quiescente parecem representar a condição *in vivo* mais fielmente que as mesmas células no estágio de proliferação (Hwang & Chang, 2002b). Sendo assim, os experimentos deste estudo foram realizados em culturas celulares confluentes e poucas passagens foram utilizadas para manter as células o mais próximo possível do seu fenótipo original (Arenholt-Bindslev & Bleeg, 1990).

A facilidade de se obter o azul de metileno e a possibilidade de utilizá-lo com uma ampla seleção de fontes de luz, desde as policromáticas até os *lasers*, faz deste FS uma alternativa promissora para o tratamento de uma variedade de doenças por meio de PACT (Tardivo *et al.*, 2005). Esse composto possui características adequadas para um fotossensibilizante, como alto rendimento quântico de $^1O_2^*$, assim como boa solubilidade em água, o que resulta em simples desenhos experimentais possibilitando incubação direta do corante em meio de cultura (Blázquez-Castro *et al.*, 2009). Apresenta ainda afinidade pelas células microbianas, um amplo espectro de ação e a possibilidade de excitação dentro da janela fototerapêutica dos tecidos (Jori *et al.*, 2006).

Apesar de poder ser utilizado em concentrações muito mais altas que as necessárias para matar microorganismos (1% p/v) sem causar toxicidade em humanos (Zeina *et al.* 2001), o Chimiolux, azul de metileno utilizado para os experimentos deste estudo, mostrou-se extremamente citotóxico quando utilizado diretamente nas células na concentração de apenas 50 µg/ml, mesmo sem

exposição à luz. Nos grupos PACT, os testes colorimétricos também revelaram graus importantes de citotoxicidade em todos os experimentos testados com luz branca e naqueles com aplicação de luz vermelha associada às concentrações mais alta e intermediária do AM (50 e 25 µg/ml). Os testes complementares de citometria de fluxo indicaram que quando a quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana é procedida com luz branca o tipo de morte celular induzido é preferencialmente por necrose. Utilizando a concentração de 50 µg/ml o dano celular foi tão severo que a análise revelou total deslocamento das células para o quadrante superior esquerdo do gráfico (APÊNDICE 5), indicando morte abrupta e/ou completa fragmentação celular. Nos testes de citometria para o *laser* vermelho associado à esta concentração (50 µg/ml) também foram observados estes aspectos, mas pouco mais de 30% das células ainda permaneceram viáveis. Para a concentração de 25 µg/ml, a maioria das células apresentaram morte celular por apoptose, o que é desejável, uma vez que no organismo é preferível a ocorrência de apoptose à necrose, especialmente porque a morte por apoptose ocorre sob controle imunológico prevenindo-se o processo inflamatório (Castano *et al.*, 2005). Na concentração de 12,5 µg/ml, a luz vermelha apresentou ligeira citotoxicidade, indicando a possibilidade de sua aplicação *in vivo*.

Na PACT, a apoptose parece ocorrer apenas em níveis mais baixos de irradiação que a necrose (Tardivo *et al.*, 2005). A apoptose começa com uma sinal intra/extracelular levando a ativação de caspase e fragmentação de DNA. A célula se contrói, a cromatina nuclear se torna picnótica e se condensa contra a membrana nuclear; eventualmente, o citoplasma e o núcleo se dividem em corpos apoptóticos. No processo de necrose ocorre dano a homeostasia iônica celular, um mecanismo que leva ao influxo de água e perda da integridade de membrana (Tardivo *et al.*, 2005). Para induzir apoptose, o dano celular deve ser severo suficiente para impedir o reparo, mas moderado o suficiente para produzir energia para que ocorra o processo de apoptose. Danos muito severos levarão à necrose. Os efeitos da PACT nos experimentos realizados com a luz branca foram mais danosos em relação à luz vermelha. As lâmpadas também podem excitar fotoprodutos das reações fotodinâmicas (Brancaleon & Moseley, 2002). Devido ao

amplo espectro de emissão deste aparelho é possível que estes fotoprodutos, decorrentes da fotólise do azul de metileno, tenham sido excitados em outras bandas de absorção gerando maior quantidade de radicais livres. Embora o mecanismo de produção de fotoprodutos ainda não esteja claro na PACT, é possível que um efeito adicional possa ter sido obtido pela ativação destes compostos. Ainda, a aplicação da luz branca foi fracionada, o que comprovadamente incrementa sua ação citotóxica (Paulino *et al.*, 2005).

Em cultura celular, há uma certa discrepância em relação a citolocalização exata do azul de metileno por meio de microscopia de fluorescência (Tardivo *et al.*, 2005), mas sítios como mitocôndria, lisossomos e núcleo já foram reportados como preferíveis para absorção deste corante. Em nosso estudo foi observado que os resultados dos ensaios de MTT se apresentaram mais sensíveis em comparação com os testes de vermelho neutro e de citometria de fluxo. Espécies reativas de oxigênio geradas dentro das mitocôndrias podem danificar seus componentes (Koizumi *et al.* 1996) e, sendo assim, um teste baseado na atividade respiratória mitocondrial, como o MTT, revelará sinais precoces de toxicidade diante do agente causador do dano (Fotakis & Timbrell, 2006). Dessa forma, nos experimentos deste estudo, o AM pareceu se acumular preferencialmente nas mitocôndrias.

A PACT parece ser um tratamento eficiente para o tratamento de infecções localizadas e superficiais. Os principais alvos seriam as infecções orais, como as endodônticas e mucosas, doença periodontal, cárie e periimplatites (Konopka & Goslinski, 2007). Estudos laboratoriais têm mostrado que os FS são mais tóxicos para as espécies microbianas que para células de mamíferos, e que a reação fotodinâmica ocorre mais rápido em procariotos que em eucariotos, minimizando, assim, os seus efeitos nestes últimos (George & Kishen, 2007). Em particular, as células pulpares, como previamente descrito na literatura (Feigal *et al.*, 1985), tendem a reagir mais sensivelmente aos testes de citotoxicidade. Entretanto, a partir de resultados obtidos em nossos laboratórios com osteoblastos de ratos neonatos Wistar, verificou-se que a PACT testada neste estudo mostrou-se

severamente citotóxica também para este tipo celular (APÊNDICE 4). A falha do protocolo testado em poupar células de mamíferos parece estar mais ligada à fonte e dosimetria de luz utilizadas e à concentração do corante do que às características celulares propriamente ditas.

Jori *et al.* (2006) sugerem uma seleção de parâmetros ótimos para o tratamento de infecções microbianas utilizando PACT. Uma combinação de curtos períodos pré-irradiação (5-10 minutos), baixa concentração de FS (0,1-5 μM) e baixos valores de densidade de potência ($< 50 \text{ mW/cm}^2$) e de dose de energia ($< 5 \text{ J/cm}^2$) parece ser ideal para permitir a morte seletiva de patógenos sob condições nas quais as células humanas são poupadas. Outros autores sugerem que condições genericamente aceitáveis seriam uma concentração de 1 μM para o FS e exposição por luz vermelha (600-700 nm) com irradiância de aproximadamente 10 mW/cm^2 (Wainwright, 1998). Waingwright (1998) ainda completa que uma alta dose de potência em um curto período de tempo pode apresentar efeitos antimicrobianos diferentes de uma baixa densidade de potência em um longo período de tempo, mesmo que a dose total de energia seja a mesma. Esta relação provavelmente vale também para as células eucariotas. Neste estudo, tanto para a fonte de luz branca como para o *laser*, a densidade de potência e dose de energia utilizadas no protocolo foi muito acima do recomendado por estes autores. De toda forma, a literatura ainda é muito conflitante neste aspecto.

Em três trabalhos diferentes conduzidos por um mesmo pesquisador, Nikolaos Soukos, realizaram-se experimentos em placas de 96-poços, comparáveis ao nosso estudo, obtendo sucesso na redução de microorganismos, sem, no entanto, afetar demasiadamente as células do hospedeiro. No primeiro, os autores provaram ser possível poupar fibroblastos e queratinócitos humanos utilizando concentrações muito pequenas de azul de toluidina, embora a densidade de potência da fonte de luz usada fosse de 553 mW/cm^2 e da exposição a esta luz ter gerado doses de energia de $\sim 33,1 \text{ J/cm}^2$ (60 s) e $\sim 66,6 \text{ J/cm}^2$ (120 s) (Soukos *et al.*, 1996). Uma importante observação em relação aos agentes fotossensibilizantes catiônicos, como o AT, se refere a sua seletividade

pelas células microbianas comparado às células de mamíferos (Dai *et al.*, 2009). As moléculas catiônicas são absorvidas lentamente pelas células do hospedeiro, enquanto que a absorção pelas bactérias é relativamente rápida. Uma explicação para o sucesso da terapia do grupo de Soukos pode ser devida ao curto período pré-irradiação utilizado (5 min) e concentrações mínimas de AT, que foram absorvidas preferencialmente e mais rapidamente pelos microorganismos que pelas células testadas. Prova disso é a verificação da morte de *S. mutans* induzida por PACT até mesmo sem um tempo pré-irradiação, utilizando apenas 0,5 µg/ml de um corante (Paulino *et al.*, 2005). Há que se lembrar que os efeitos da aplicação de apenas luz, em variadas combinações de densidades de potência e energia, não são danosos às culturas celulares em todos os trabalhos da literatura consultados.

O segundo estudo testou um conjugado catiônico de poli-L-lisina (pL)-clorina e6 (C_{e6}) em baixas concentrações (5 µM) e tempo pré-irradiação de apenas 60 s. O corante foi aplicado à bactérias periodontopatogênicas e a uma linhagem de células epiteliais orais cancerígenas (hamster) e, em seguida, irradiado por luz visível (25 mW/cm²; 671 nm) na região do vermelho do espectro eletromagnético, com uma dose de energia de 15 J/cm² (Soukos *et al.*, 1998). Desta forma, os autores alcançaram quase 100% de morte bacteriana e praticamente nenhum efeito citotóxico nas células cancerígenas.

Em 2009, no terceiro estudo, avaliaram a biocompatibilidade entre um protocolo de PACT, para tratamento endodôntico, e fibroblastos e osteoblastos humanos (Xu *et al.*, 2009). Testaram-se uma concentração de 50 µg/ml de azul de metileno por 10 minutos e exposição por fonte de luz por 5 minutos, variando as densidades de potência e doses de energia (3, 6 e 12 J/cm² com 10, 20 e 40 mW/cm², respectivamente). Foi observada maior susceptibilidade dos osteoblastos aos efeitos da PACT (59% de redução da viabilidade após 24 h do experimento com a maior densidade de potência - 40 mW/cm² pelo teste de VN e 34% pelo MTT), em comparação com os fibroblastos, nos quais o protocolo foi ligeiramente citotóxico. Entretanto, este estudo considerou que apenas 5 a 10 mW/cm² de

intensidade de luz alcançam realmente a região periapical do dente, local onde se encontram esses tipos celulares. Sendo assim, isso proveria uma ampliação da janela terapêutica, que poderia ser utilizada usando maiores concentrações de corantes e parâmetros de luz, por exemplo, de 100 mW/cm² e 30 J/cm².

Outro estudo comparável também foi realizado em culturas de *C. albicans*, um patógeno eucarioto (Carvalho *et al.*, 2009). As células desses microorganismos foram expostas aos azuis de metileno e toluidina em diferentes concentrações (10-100 µg/ml) por 5 min (PI). Em seguida, foi procedida exposição de luz por *laser* diodo (0,035 W; 684 nm para AM / 0,030 W; 660 nm para AT) com dose de energia total de 28 J/cm². Utilizando AM a 50 µg/ml e AT a 100 µg/ml, seguido de aplicação de luz, as culturas de *C. albicans* apresentaram 80-90% de morte celular após a terapia. Utilizando os mesmos corantes a 10 µg/ml e os mesmos parâmetros de luz, observou-se em torno de 90% de sobrevivência celular após a terapia. Esses resultados podem ser comparados aos estudos com células de mamíferos, uma vez que os efeitos estão sendo avaliados em células eucarióticas, e revelam como mudanças sutis na metodologia da PACT alteram significativamente o percentual de sobrevivência celular. Os eucariotos são menos sensíveis a ação da PACT devido à presença de membrana nuclear, que pode atuar como uma barreira adicional aos corantes e aos produtos energéticos da reação entre o FS e a luz (Zeina *et al.*, 2002). Além disso, são 25-50 vezes maiores que as espécies bacterianas e, desta forma, contêm maior número de alvos por célula, em que a saturação de mais de um destes alvos é necessária para a ocorrência de morte celular (Zeina *et al.*, 2001).

Os clássicos trabalhos de Zeina publicados em 2001 e 2002 avaliaram os efeitos citotóxicos da PACT em patógenos cutâneos e culturas de queratinócitos humanos, respectivamente. Os autores utilizaram uma fonte de luz policromática (42 mW/cm²; 400-700 nm) para irradiar o azul de metileno (100 µg/ml) por 60 ou 90 minutos em culturas de queratinócitos semeadas em placas de 16-poços. Enquanto os patógenos cutâneos morreram após menos de 10 min de exposição, com 60 min as células humanas apresentaram viabilidade celular inicial de 42% e,

após 6 h, de 85%. Com 90 min de exposição, a viabilidade inicial foi de 38% (0 h) e após 6 h, de 48%. Os resultados demonstraram a susceptibilidade à PACT, nos parâmetros testados, muito maior dos patógenos cutâneos do que das células de mamíferos testadas.

Em contraposição, Ribeiro *et al.* (2010) encontraram severa toxicidade da PACT utilizando Photogem (10, 25 e 50 µg/ml) com 30 min pré-irradiação, associado a um LED azul (22 mW/cm²; 460±3 nm) por 19 (25,5 J/cm²) ou 28 (37,5 J/cm²) minutos. Células de linhagens imortalizadas MDPC-23 (células odontoblastóides) e L929 (fibroblastos) apresentaram redução da atividade mitocondrial, alterações morfológicas e indução de morte celular por necrose após a terapia.

Diante destes estudos e dos resultados encontrados no nosso trabalho é possível pensar que os parâmetros ótimos para aplicação da PACT dependem de muitos fatores, atuando em conjunto ou isoladamente. A concentração do corante e o período pré-irradiação, o tipo de fonte luz e sua dosimetria, o tempo de irradiação e, principalmente, a finalidade terapêutica, podem variar de forma a culminar em múltiplos resultados. O que foi possível perceber a partir das publicações estudadas é que quando o corante é aplicado numa concentração muito pequena (em torno de 10 µg/ml ou menor) e com curtos períodos pré-irradiação (poucos minutos), a dosimetria de luz não é tão importante porque não houve tempo suficiente para absorção da substância pelas células de mamíferos. Já ao se utilizar maiores concentrações de FS, as densidades de potência e doses de energia aplicadas parecem determinar o limite entre o efeito terapêutico e o dano celular. Entretanto, esta relação depende do tipo de fonte de luz que está sendo utilizada – mono ou policromática.

Em nosso estudo, ponderando os piores resultados obtidos (luz branca – todas as concentrações de AM – e laser vermelho – 50 µg/ml) e considerando a nossa finalidade terapêutica e as particularidades do tecido pulpar, é possível que o alto percentual de morte celular observado indique que poderia haver um colapso pulpar, caso a terapia fosse aplicada diretamente sobre o tecido. Nessas

situações, o tipo de morte celular ocorre preferencialmente por necrose, o que acarretaria na indução de processo inflamatório. Embora o processo inflamatório possa ser resolvido ou reparado em outros tecidos, a polpa dental cronicamente inflamada sofre, frequentemente, degeneração tecidual irreversível (Barkhordar *et al.*, 2002). Contudo, talvez o mesmo não ocorresse se a terapia fosse aplicada sobre cavidades médias ou rasas. A dentina é uma importante barreira protetora da polpa dos efeitos de substâncias irritantes e sua espessura remanescente modifica a reação pulpar diante de um estímulo nocivo. Quanto mais fino o remanescente, mais severa a inflamação (Stanley, 1985), e apesar de, nestas condições, também possuir maior permeabilidade, é difícil determinar o quanto as substâncias que se difundem pela dentina realmente atuam nas células pulpares. Os resultados do *laser* vermelho associado à concentração de 25 µg/ml demonstram aproximadamente 30% de viabilidade celular, mas as células morrem preferencialmente por apoptose. Apesar de ser desejável a ocorrência de morte celular por apoptose, estes resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que experimentos em culturas de monocamadas não representam inteiramente a situação *in vivo*. Dessa forma, também o AM a 25 µg/ml irradiado por *laser* parece indicar a possibilidade de aplicação da PACT dentro de uma janela terapêutica, sendo, entretanto, necessários mais estudos, em modelos animais, para a comprovação destes achados.

A PACT está apenas no seu início, e apesar do sucesso *in vitro* no tratamento de infecções localizadas, há uma falta de acurácia na dosimetria de luz e no estabelecimento de aparelhos emissores de luz apropriados, assim como parâmetros de tratamento pouco definidos (Konopka & Goslinski, 2007, George & Kishen, 2007). Há uma variedade muito grande de protocolos sugeridos na literatura, mas, metodologicamente, continua ser necessária a busca pelas mínimas condições de PACT que levariam à morte microbiana sem, contudo, afetar a viabilidade celular das células do hospedeiro. De acordo com Konopka e Goslinski (2007), os trabalhos têm focado predominantemente em melhores propriedades óticas dos FS, enquanto que os problemas que persistem estão associados com baixa seletividade e tempos pré-irradiação inconsistentes.

Estudos bem controlados e randomizados comparando a atividade microbiana com a biocompatibilidade da terapia em células de mamíferos simultaneamente poderiam incrementar a eficácia da PACT possibilitando sua aplicação clínica.

8-CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

1. A aplicação de apenas luz, branca ou vermelha, não afetou de forma negativa a viabilidade celular das células testadas.
2. Os períodos pré-irradiação de três ou cinco minutos não foram estatisticamente diferentes entre si.
3. O azul de metileno nas concentrações de 12,5 e 25 $\mu\text{g/ml}$ sem exposição à luz foi ligeiramente citotóxico em quase todos os experimentos.
4. O azul de metileno na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ foi severamente citotóxico, mesmo sem exposição à luz.
5. A quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana associando o azul de metileno à luz branca, nas três concentrações testadas, causou efeitos citotóxicos severos nas culturas celulares.
6. A associação do azul de metileno a 12,5 $\mu\text{g/ml}$ e luz vermelha apresentou viabilidade celular entre 60 e 70% após 24 h (MTT). Nas outras concentrações, a PACT (*laser*) mostrou-se severamente citotóxica.
7. O tipo de morte celular decorrente da PACT associada à luz branca foi majoritariamente por necrose.
8. A luz vermelha associada ao AM na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$ apresentou maior proporção de morte celular por apoptose, enquanto que a associação com a concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ apresentou maior percentual de morte celular por necrose.
9. As células pulpares apresentaram forte marcação para atividade de fosfatase alcalina. Nos grupos PACT, a detecção de ALP apresentou-se significativamente reduzida em todos os experimentos, independentemente da fonte de luz utilizada.

9-PERSPECTIVAS FUTURAS

PERSPECTIVAS FUTURAS

- 1) Testar a terapia utilizando discos de dentina de várias espessuras interpostos entre a cultura celular e o azul de metileno, verificando a atuação da PACT indiretamente;
- 2) Testar em culturas de três dimensões, que reproduzem com mais fidelidade a situação *in vivo*;
- 3) Testar a terapia simulando os mecanismos circulatório e de pressão da polpa.

10-REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Annunziata M, Aversa R, Apicella A, Annunziata A, Apicella D, Buonaiuto C e Guida L. *In vitro* biological response to a light-cured composite when used for cementation of composite inlays. *Dental Materials* 2006; 22: 1081-1085.
2. Araújo PV. Aplicação da terapia fotodinâmica na redução de patógenos cariogênicos. 134 p. (Tese de Doutorado), Faculdade de Odontologia, UFMG, Belo Horizonte, 2009.
3. Araújo PV, Cortés ME e Poletto LTA. Photodynamic therapy of cariogenic agents: a systematic review. *Journal of Laser Applications* 2010; 22:13-21.
4. Araújo PV, Teixeira KIR, Lanza LD, Cortés ME e Poletto LTA. *In vitro* lethal photosensitization of *S. mutans* using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers. *Acta Odontológica Latinoamericana* 2009; 22:93-7.
5. Arenholt-Bindslev D & Bleeg H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *International Endodontic Journal* 1990; 23: 84-91.
6. Barkhodar RA, Ghani QP, Russell TR e Hussain MZ 2002. Interleukin-1beta activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. *Journal of Endodontics* 2002; 28(3):157-9.
7. Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera Jr A, Teodoro GR, Zângaro RA, *et al.* The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomedicine and Laser Surgery* 2007; 25:513-518.
8. Blázquez-Castro A, Stockert JC, Sanz-Rodriguez F, Zamarrón A e Juarrans A. Differential photodynamic therapy response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2009; 8:371-376.
9. Brancaleon L e Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science* 2002; 17:173–186.

10. Burns T, Wilson M e Pearson GJ. Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from helium-neon laser. *Journal of Medical Microbiology* 1993; 38:401-405.
11. Burns T, Wilson M e Pearson GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *S. Mutans*. *Caries Research* 1995; 29:192-197.
12. Calin MA e Parasca SV. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers in Medical Science* 2009; 24:453-460.
13. Camps J, Déjou J, Rémusat M e About I. Factors influencing pulpal response to cavity restorations. *Dental Materials* 2000; 16: 432-440.
14. Carvalho GG, Felipe MP e Costa MS. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. *The Journal of Microbiology* 2009; 47: 619-623.
15. Castano AP, Deminova TN e Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2:1-23.
16. Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH e Jeng JH. Effects of TGF- β s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts *in vitro*. *Archives of Oral Biology* 2005; 50: 469-479.
17. Dai T, Huang YY e Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2009; 6:170—188.
18. Dantas CMG, Vivan CL, Ferreira LS, Freitas PM e Marques, MM. *In vitro* effect of low intensity laser on the cytotoxicity produced by substances released by bleaching gel. *Brazilian Oral Research* 2010; 24:460-6.
19. D´aquino R, Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida LRullo R *et al*. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 2008; 310B:1-8.

20. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P e Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13:795-808.
21. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T e Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997; 27(1):1-20.
22. Detty MR, Gibson SL e Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004; 47(16):3897-3915.
23. Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH, Nelson J. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Archives of Oral Biology* 1985; 30(8):609-613.
24. Fotakis G e Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure of cadmium chloride. *Toxicology Letters* 2006; 160:171–177.
25. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR e Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *Journal of Endodontics* 2008; 34(2):138–142.
26. George S e Kishen A. Advanced noninvasive light-activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast *versus* antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 2007; 33(5):599-602.
27. Giusti JSM, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C e Bagnato VS. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomedicine and Laser Surgery* 2008; 26(4):281-287.
28. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N *et al.* Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacological Research* 2008; 58:137-147.
29. Goulart RC, Thedei Jr G, Souza SLS, Tedesco AC, Ciancaglini P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated

- Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Photomedicine and Laser Surgery 2010; 28(1):85-90.
30. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG e Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proceedings of the National Academy of Science 2000; 97(5):13625-13630.
 31. Hall-Stoodley L, Costerton JW e Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment of infectious diseases. Nature Reviews Microbiology 2004; 2:95-108.
 32. Hamblin MR e Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochemistry and Photobiology Science 2004; 3: 436–450.
 33. Huang FM e Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. International Endodontic Journal 2002; 35:905-909.
 34. Huang FM e Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cells. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics 2002; 93(3)361:365.
 35. Hwang IY, Son YO, Kim JH, Jeon YM, Kim JG, Lee CB, *et al*. Plasma-arc generated light inhibits proliferation and induces apoptosis of human gingival fibroblasts in a dose-dependent manner. Dental Materials 2008; 24:1036-42.
 36. Jaroszeski MJ e Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. Molecular Biotechnology 1999; 11:37-53.
 37. Jori G, Fabris C, Soncin M et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. Lasers in Surgery and Medicine 2006; 38:468-481.
 38. Koizumi T, Shirakura H, Kumagai H, Tatsumoto H e Suzuki KT. Mechanism of cadmium induced in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. Toxicology 1996; 114:124-134.
 39. Konopka K e Goslinski T. Photodynamic Therapy in Dentistry. Journal of Dental Research 2007; 86: 694-707.

40. Kong N, Jiang T, Zhou Z e Fu J. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells *in vitro*. *Dental Materials* 2009; 25:1371-1375.
41. Krespi YP, Slatkine M, Marchenko M e Protic J. Lethal photosensitization of oral pathogens via red-filtered halogen lamp. *Oral Diseases* 2005; 11(1):92–95.
42. Lima JPM, Melo MAS, Borges FMC, Teixeira AH, Steiner Oliveira C, Santos MN *et al.* Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries. *European Journal of Oral Sciences* 2009; 117: 568–574.
43. Lüthi M, Gyenge EB, Engström M, Bredell M, Grätz K, Walt H *et al.* Hypericin- and mTHPC-mediated photodynamic therapy for the treatment of cariogenic bacteria. *Medical Laser Application* 2009; 24:227–236.
44. Machado AEH. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Química Nova*, 2000; 23(2): 237-243.
45. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers in Medical Science* 2007; 22:83-91.
46. Mang TS, Mikulski L e Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2010; 7:98-105.
47. Massara MLA, Alves JB e Brandão PRG. Atraumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. *Caries Research* 2002; 36:430-6.
48. Metcalf D, Robinson C, Devine D e Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 58: 190-192.
49. Oliveira CF, Hebling J, Souza PPC, Sacono NT, et al. Effect of low-level laser irradiation on odontoblast-like cells. *Laser Physics Letters* 2008; 5(9):680-685.
50. Paulino TP, Cardoso Jr M, Bruschi-Thedei GCM, Ciancaglini P, Thedei Jr G. Fermentable and non-fermentable sugars: a simple experiment of

- anaerobic metabolism. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2003; 31:180-184.
51. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei Jr G, Tedesco AC e Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology* 2005; 50: 353—359.
 52. Pinheiro SL, Schenka AA, Neto AA, Souza CP et al. Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. *Lasers in Medical Science* 2009; 24: 521-526.
 53. Raab O. Über die wirkung fluorizierender stoffe auf infusorien. *Zeit Biol* 1900; 39:524-546.
 54. Ribeiro, APD, Pavarina AC, Trindade FZ, Inada NM, Bagnato VS e Costa, CAS. Photodynamic therapy associating Photogem and blue LED on L929 and MDPC-23 cell culture. *Cell Biology International* 2010; 34:343-351.
 55. Rück A, Heckelsmillerl K, Akgün N, Beck G, Kunzi-Rapp K, Schick E e Steinerl R. Nonlinear dynamics of intracellular methylene blue during light activation of cell cultures. *Photochemistry and Photobiology* 1997; 66(6): 837-841.
 56. Schultz EW e Krueger AP. Inactivation of staphylococcus bacteriophage by methylene blue. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 1928; 26:100-1. (citado por Wainwright, 1998)
 57. Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N e Metzl N. Citotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *Journal of Endodontics* 2001; 27(4):259-265.
 58. Silva DFT, Núñez SC, Suzuki LC e Ribeiro MS. Dosimetria na terapia com laser de baixa intensidade. In: *Fundamentos de Odontologia: Lasers em Odontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. P.26-35.
 59. Sjögren G, Sletten G e Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *Journal of Prosthetic Dentistry* 2000; 84:229-36.

60. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; 57: 1539-1550.
61. Soukos NS, Mulholland E, Socransky SS e Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers in Surgery and Medicine* 2003; 33: 161-168.
62. Soukos NS, Wilson M, Burns T e Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. *Lasers in Surgery and Medicine* 1996; 18:253-259.
63. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS e Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998; 42(10):2595-2601.
64. Stanislawski L, Carreau JP, Pouchelet M, Chen ZHJ e Goldberg M. *In vitro* culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from explants. *Clinical Oral Investigations* 1997; 1:131-40.
65. Stanley HR. Pulp irritation tests: restorative materials influencing dentin and pulp. In: Stanley HR, editor. *Toxicity testing of dental materials*, Boca Raton, FL: CRC Press, 1985. P. 91-121.
66. Tardivo JP, Giglio AD, Oliveira CS, Gabrielli DS, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2: 175-191.
67. Tuite, EM e Kelly, JM. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1993; 21:103-124.
68. Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Research*, 2004; 38:314-320.
69. Usacheva MN, Teichert MC e Biel MA. The Interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers in Surgery and Medicine* 2003; 33:311–319.

70. Von Tappeiner H. Zur Kenntnis der lichtwirkenden (fluoreszierenden) Stoffe. Dtsch Wed Wochen 1904; 1:579-580.
71. Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DRA e Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in phenothiazinium series. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1997; 19:75-80.
72. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1998; 42: 13-28.
73. Wakui M, Yoshihito Y, Wang H, Shigeto T, Futagami M e Mizunuma H. Efficacy of a methyl ester of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy for ovarian cancers. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2010; 136:1143-1150.
74. Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. Australian Dental Journal 2003; 48(3):146-155.
75. Wennberg C, Hessel L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH e Millan JL. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice, Journal of Bone and Mineral Research 2000, 15(10):1879– 1888.
76. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. Photochemistry and Photobiology Sciences 2004, 3, 412–418.
77. Wood S, Metcalf D, Devine D e Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2006; 57: 680-684.
78. Wyk CW, Olivier A e Maritz JS. Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for *in vitro* cytotoxicity testing? Journal of Oral Pathology and Medicine 2001; 30: 168-177.
79. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, Kent T e Soukos NS. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. Journal of Endodontics 2009; 35(11):1567-1572.

80. Zago M, Teti G, Mazzotti G, Ruggeri A *et al.* Expression of procollagen $\alpha 1$ type I and tenascin proteins induced by HEMA in human pulp fibroblasts. *Toxicology in Vitro* 2008; 22:1153-1159.
81. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Brugnera Jr A, Hope CK e Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56:324–330.
82. Zeina B, Greenman J, Corry D e Purcell WM. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes *in vitro*. *British Journal of Dermatology* 2002; 146: 568-573.
83. Zeina B, Greenman J, Purcell WM e Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *British Journal of Dermatology* 2001; 144: 274-278.

11-APÊNDICES

APÊNDICE 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0229.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Luiz Thadeu de Abreu Poletto
Departamento de Odontologia Restauradora
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de setembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Terapia Fotodinâmica: avaliação de seus efeitos sobre culturas de fibroblastos pulpaes**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

APÊNDICE 2

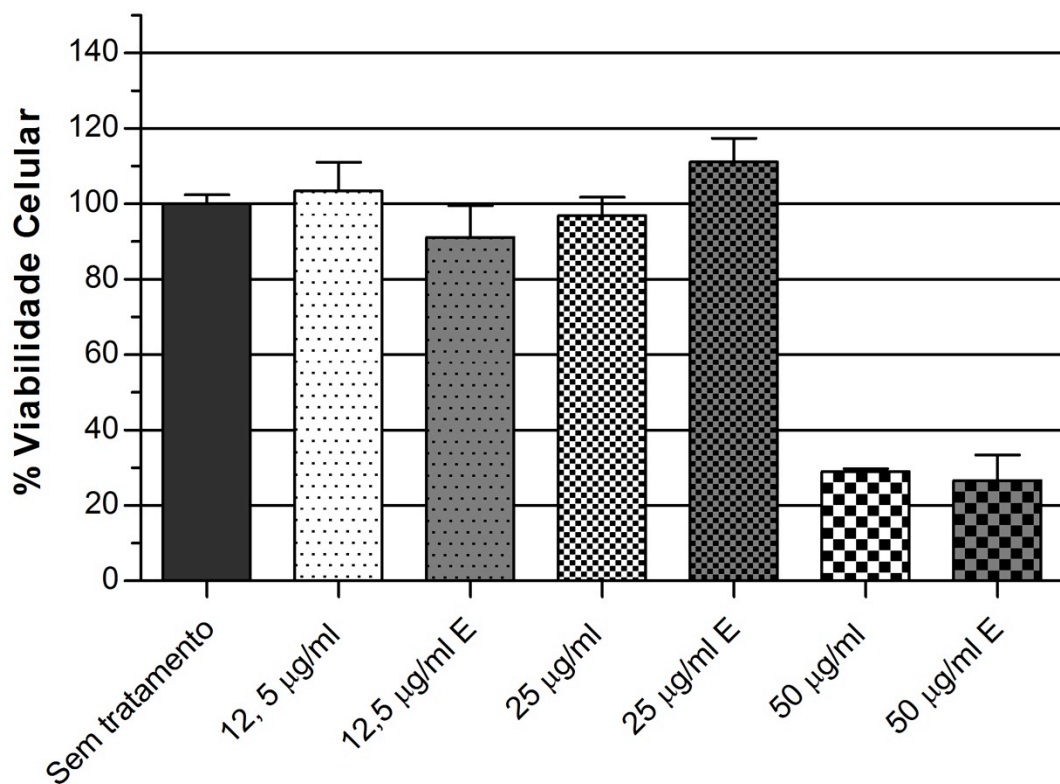


Gráfico 6. Representação da ação do azul de metileno em suas três concentrações com e sem prevenção de luz ambiente (concentrações com letra “E” foram aplicadas no escuro)

Quadro 3. Dados estatísticos da aplicação do corante com e sem prevenção de luz ambiente (*GraphPad Prism 5.0*)

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
Sem tratamento vs 12,5 µg/ml	-3,436	1,252	No	ns
Sem tratamento vs 12,5 µg/ml E	8,787	3,201	No	ns
Sem tratamento vs 25 µg/ml	3,030	1,014	No	ns
Sem tratamento vs 25 µg/ml E	-11,21	3,751	No	ns
Sem tratamento vs 50 µg/ml	70,97	25,85	Yes	***
Sem tratamento vs 50 µg/ml E	73,29	26,70	Yes	***
12,5 µg/ml vs 12,5 µg/ml E	12,22	4,224	No	ns
12,5 µg/ml vs 25 µg/ml	6,466	2,069	No	ns
12,5 µg/ml vs 25 µg/ml E	-7,776	2,488	No	ns
12,5 µg/ml vs 50 µg/ml	74,41	25,71	Yes	***
12,5 µg/ml vs 50 µg/ml E	76,73	26,51	Yes	***
12,5 µg/ml E vs 25 µg/ml	-5,758	1,842	No	ns
12,5 µg/ml E vs 25 µg/ml E	-20,00	6,398	Yes	**
12,5 µg/ml E vs 50 µg/ml	62,19	21,49	Yes	***
12,5 µg/ml E vs 50 µg/ml E	64,50	22,29	Yes	***
25 µg/ml vs 25 µg/ml E	-14,24	4,262	No	ns
25 µg/ml vs 50 µg/ml	67,94	21,74	Yes	***
25 µg/ml vs 50 µg/ml E	70,26	22,48	Yes	***
25 µg/ml E vs 50 µg/ml	82,19	26,29	Yes	***
25 µg/ml E vs 50 µg/ml E	84,50	27,03	Yes	***
50 µg/ml vs 50 µg/ml E	2,318	0,8010	No	ns

APÊNDICE 3

LUZ BRANCA

Tabela 1. Atividade de fosfatase alcalina dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno imediatamente e 24 h após a PACT utilizando luz branca

Tempo	Grupos	12,5 µg/ml	%	25 µg/ml	%	50 µg/ml	%
			Produção		Produção		Produção
0 h	Sem tratamento	0,396±0,074	100	0,453±0,051	100	0,374±0,067	100
	Luz branca	0,425±0,021	107,3	0,477±0,056	105,2	0,351±0,029	93,8
	AM 3'	0,374±0,025	94,5	0,373±0,032	82,3	0,243±0,032	64,9 ^{a,b}
	AM 5'	0,386±0,029	97,6	0,335±0,038	73,8 ^a	0,309±0,019	82,8
	PACT 3'	0,182±0,018	45,9 ^{a,b,c}	0,233±0,083	51,4 ^{a,b}	0,101±0,027	27 ^{a,b,c}
	PACT 5'	0,185±0,028	46,7 ^{a,b,d}	0,256±0,051	56,5 ^{a,b}	0,087±0,034	23,3 ^{a,b,d}
24 h	Sem tratamento	0,253±0,018	100	0,237±0,020	100	0,247±0,031	100
	Luz branca	0,248±0,040	98	0,248±0,005	104,5	0,248±0,016	100,4
	AM 3'	0,164±0,011	64,8 ^{a,b}	0,194±0,018	81,8 ^{a,b}	0,108±0,018	43,8 ^{a,b}
	AM 5'	0,173±0,008	68,3 ^{a,b}	0,197±0,020	83 ^{a,b}	0,078±0,004	31,7 ^{a,b}
	PACT 3'	0,054±0,004	21,5 ^{a,b,c}	0,070±0,016	29,8 ^{a,b,c}	0,080±0,010	32,5 ^{a,b}
	PACT 5'	0,047±0,007	18,5 ^{a,b,d}	0,086±0,010	36,2 ^{a,b,d}	0,067±0,007	27,3 ^{a,b}

Os valores expressam média ± desvio padrão.

a – significativo em relação ao grupo Sem tratamento; **b** – significativo em relação ao grupo Luz; **c** – significativo em relação ao grupo AM 3'; e **d** – significativo em relação ao grupo AM 5'.

Tabela 2. Atividade mitocondrial dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno imediatamente e 24 h após a PACT utilizando luz branca

Tempo	Grupos	12,5 µg/ml	% Viabilidade	25 µg/ml	% Viabilidade	50 µg/ml	% Viabilidade
0 h	Sem tratamento	1,094±0,216	100	1,258±0,224	100	0,765±0,056	100
	Luz branca	0,908±0,152	83	1,057±0,231	84	0,794±0,016	103,8
	AM 3'	0,705±0,063	64,4^a	0,708±0,042	56,3^a	0,100±0,046	13,1^{a,b}
	AM 5'	0,752±0,066	68,8^a	0,754±0,068	60^a	0,085±0,053	11,1^{a,b}
	PACT 3'	0,036±0,003	3,3^{a,b,c}	0,046±0,005	3,6^{a,b,c}	0,049±0,004	6,4^{a,b}
	PACT 5'	0,038±0,003	3,5^{a,b,d}	0,044±0,002	3,5^{a,b,d}	0,050±0,005	6,5^{a,b}
24 h	Sem tratamento	0,699±0,117	100	0,833±0,151	100	0,936±0,039	100
	Luz branca	0,797±0,130	114	0,855±0,154	102,6	0,948±0,069	101,2
	AM 3'	0,596±0,065	85,2	0,660±0,065	79,2	0,054±0,015	5,8^{a,b}
	AM 5'	0,616±0,076	88,1	0,559±0,025	67^{a,b}	0,032±0,005	3,4^{a,b}
	PACT 3'	0,028±0,009	4^{a,b,c}	0,032±0,006	3,9^{a,b,c}	0,035±0,006	3,8^{a,b}
	PACT 5'	0,061±0,031	8,8^{a,b,d}	0,031±0,004	3,7^{a,b,d}	0,037±0,001	3,9^{a,b}

Os valores expressam média ± desvio padrão.

a – significativo em relação ao grupo Sem tratamento; **b** – significativo em relação ao grupo Luz; **c** – significativo em relação ao grupo AM 3'; e **d** – significativo em relação ao grupo AM 5'.

Tabela 3. Viabilidade celular determinada por VN dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno imediatamente e 24 h após a PACT utilizando luz branca

Tempo	Grupos	12,5 µg/ml	% Viabilidade	25 µg/ml	% Viabilidade	50 µg/ml	% Viabilidade
0 h	Sem tratamento	0,209±0,031	100	0,246±0,015	100	0,245±0,018	100
	Luz branca	0,151±0,019	72,4	0,230±0,025	93,5	0,199±0,014	81,2
	AM 3´	0,150±0,039	72,1	0,246±0,015	100,1	0,115±0,026	46,9^a
	AM 5´	0,139±0,027	66,8^a	0,222±0,032	90,3	0,152±0,028	61,8^a
	PACT 3´	0,101±0,013	48,4^a	0,202±0,014	82,2	0,073±0,012	29,8^{a,b}
	PACT 5´	0,099±0,018	47,7^a	0,165±0,016	67^{a,b,d}	0,085±0,032	34,7^{a,b,d}
24 h	Sem tratamento	0,305±0,007	100	0,247±0,018	100	0,296±0,022	100
	Luz branca	0,346±0,011	113,3	0,264±0,035	106,6	0,282±0,040	95,2
	AM 3´	0,289±0,013	94,8^b	0,257±0,031	103,8	0,086±0,036	29,1^{a,b}
	AM 5´	0,298±0,006	97,6^b	0,224±0,017	90,5	0,057±0,035	19,4^{a,b}
	PACT 3´	0,084±0,020	27,5^{a,b,c}	0,068±0,024	27,6^{a,b,c}	0,047±0,015	16,1^{a,b}
	PACT 5´	0,124±0,028	40,5^{a,b,d}	0,087±0,044	35,2^{a,b,d}	0,043±0,012	14,5^{a,b}

Os valores expressam média ± desvio padrão.

a – significativo em relação ao grupo Sem tratamento; **b** – significativo em relação ao grupo Luz; **c** – significativo em relação ao grupo AM 3´; e **d** – significativo em relação ao grupo AM 5´.

LUZ VERMELHA

Tabela 4. Atividade de fosfatase alcalina dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno imediatamente e 24 h após a PACT utilizando *laser* vermelho (luz vermelha)

Tempo	Grupos	12,5 µg/ml	% Produção	25 µg/ml	% Produção	50 µg/ml	% Produção
0 h	Sem tratamento	0,304±0,039	100	0,317±0,022	100	0,356±0,022	100
	Luz vermelha	0,318±0,021	104,4	0,270±0,039	85	0,296±0,043	83
	AM 3'	0,265±0,011	87	0,261±0,019	82,3	0,270±0,062	75,9
	AM 5'	0,258±0,019	84,7 ^b	0,232±0,033	73 ^a	0,291±0,034	81,8
	PACT 3'	0,195±0,020	64,1 ^{a,b,c}	0,166±0,030	52,3 ^{a,b,c}	0,168±0,042	47,1 ^{a,b}
	PACT 5'	0,202±0,025	66,4 ^{a,b,d}	0,225±0,014	71 ^a	0,132±0,047	37,1 ^{a,b,d}
	24 h	Sem tratamento	0,646±0,038	100	0,661±0,023	100	0,379±0,016
Luz vermelha		0,571±0,043	88,4	0,581±0,010	87,8	0,373±0,015	98,6
AM 3'		0,562±0,026	87	0,493±0,100	74,5 ^a	0,263±0,013	69,5 ^{a,b}
AM 5'		0,554±0,058	85,7	0,494±0,072	74,7 ^a	0,195±0,014	51,6 ^{a,b}
PACT 3'		0,344±0,063	53,2 ^{a,b,c}	0,215±0,022	32,5 ^{a,b,c}	0,111±0,005	29,3 ^{a,b,c}
PACT 5'		0,285±0,031	44,2 ^{a,b,d}	0,179±0,006	27 ^{a,b,d}	0,107±0,022	28,2 ^{a,b,d}

Os valores expressam média ± desvio padrão.

a – significativo em relação ao grupo Sem tratamento; b – significativo em relação ao grupo Luz; c – significativo em relação ao grupo AM 3'; e d – significativo em relação ao grupo AM 5'.

Tabela 5. Atividade mitocondrial dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno imediatamente e 24 h após a PACT utilizando *laser* vermelho (luz vermelha)

Tempo	Grupos	12,5 µg/ml	% Viabilidade	25 µg/ml	% Viabilidade	50 µg/ml	% Viabilidade
0 h	Sem tratamento	0,438±0,026	100	0,463±0,040	100	0,595±0,067	100
	Luz vermelha	0,455±0,039	103,9	0,450±0,030	97	0,661±0,075	111
	AM 3'	0,364±0,015	83,2 ^{a,b}	0,340±0,046	73,4	0,156±0,020	26,1 ^{a,b}
	AM 5'	0,355±0,007	81,1 ^{a,b}	0,325±0,044	70,2 ^{a,b}	0,150±0,025	25,3 ^{a,b}
	PACT 3'	0,329±0,003	75,2 ^{a,b}	0,188±0,023	40,7 ^{a,b,c}	0,100±0,007	16,8 ^{a,b}
	PACT 5'	0,330±0,013	75,2 ^{a,b}	0,180±0,056	38,9 ^{a,b,d}	0,103±0,026	17,4 ^{a,b}
24 h	Sem tratamento	0,309±0,029	100	0,472±0,040	100	1,116±0,066	100
	Luz vermelha	0,302±0,030	97,5	0,488±0,018	103,4	1,098±0,054	98,3
	AM 3'	0,256±0,013	82,7	0,335±0,037	70,9 ^{a,b}	0,144±0,026	12,9 ^{a,b}
	AM 5'	0,276±0,022	89,1	0,317±0,018	67,1 ^{a,b}	0,087±0,016	7,8 ^{a,b}
	PACT 3'	0,191±0,007	61,8 ^{a,b}	0,151±0,035	31,9 ^{a,b,c}	0,051±0,007	4,6 ^{a,b,c}
	PACT 5'	0,219±0,041	70,9 ^{a,b}	0,122±0,018	25,8 ^{a,b,d}	0,049±0,017	4,4 ^{a,b}

Os valores expressam média ± desvio padrão.

a – significativo em relação ao grupo Sem tratamento; b – significativo em relação ao grupo Luz; c – significativo em relação ao grupo AM 3'; e d – significativo em relação ao grupo AM 5'.

Tabela 6. Viabilidade celular determinada por VN dos grupos controles e testes utilizando três concentrações de azul de metileno imediatamente e 24 h após a PACT utilizando *laser* vermelha (luz vermelha)

Tempo	Grupos	12,5 µg/ml	% Viabilidade	25 µg/ml	% Viabilidade	50 µg/ml	% Viabilidade
0 h	Sem tratamento	0,381±0,026	100	0,318±0,024	100	0,417±0,010	100
	Luz vermelha	0,334±0,023	87,7	0,396±0,044	124,2	0,473±0,026	113,3 ^a
	AM 3'	0,367±0,015	96,4	0,377±0,047	118,3	0,110±0,015	26,5 ^{a,b}
	AM 5'	0,364±0,016	95,6	0,380±0,050	119,4	0,068±0,016	16,4 ^{a,b}
	PACT 3'	0,333±0,016	86,8 ^a	0,254±0,012	79,7 ^{b,c}	0,090±0,016	21,5 ^{a,b}
	PACT 5'	0,327±0,016	85,7 ^a	0,172±0,032	54,1 ^{a,b,d}	0,092±0,020	22,1 ^{a,b}
24 h	Sem tratamento	0,527±0,027	100	0,589±0,068	100	0,341±0,016	100
	Luz vermelha	0,525±0,034	99,6	0,559±0,029	94,9	0,326±0,024	95,6
	AM 3'	0,590±0,046	111,9	0,524±0,027	89	0,043±0,017	12,8 ^{a,b}
	AM 5'	0,580±0,017	110	0,552±0,025	93,8	0,042±0,012	12,3 ^{a,b}
	PACT 3'	0,429±0,062	81,4 ^c	0,254±0,027	43,1 ^{a,b,c}	0,078±0,005	22,9 ^{a,b}
	PACT 5'	0,349±0,051	66,2 ^{a,b,d}	0,168±0,021	28,6 ^{a,b,d}	0,093±0,011	27,4 ^{a,b,d}

Os valores expressam média ± desvio padrão.

a – significativo em relação ao grupo Sem tratamento; **b** – significativo em relação ao grupo Luz; **c** – significativo em relação ao grupo AM 3'; e **d** – significativo em relação ao grupo AM 5'.

APÊNDICE 4

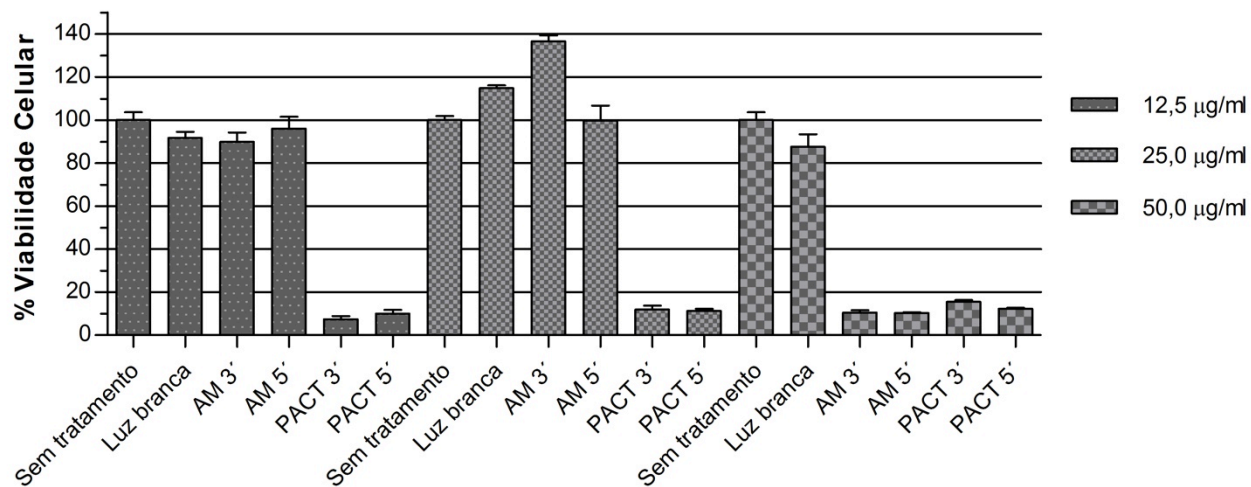


Gráfico 7. Avaliação do azul de metileno (12,5 µg/ml; 25 µg/ml e 50 µg/ml) em associação com luz branca em osteoblastos de ratos (VN/24 h)

Quadro 4. Dados estatísticos da aplicação do corante a **12,5 µg/ml** em osteoblastos

(GraphPad Prism)

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
Sem tratamento vs Luz branca	8,385	2,354	No	ns
Sem tratamento vs AM 3´	10,11	2,839	No	ns
Sem tratamento vs AM 5´	4,010	1,126	No	ns
Sem tratamento vs PACT 3´	92,55	25,98	Yes	***
Sem tratamento vs PACT 5´	89,98	25,26	Yes	***
Luz branca vs AM 3´	1,728	0,4853	No	ns
Luz branca vs AM 5´	-4,375	1,228	No	ns
Luz branca vs PACT 3´	84,17	23,63	Yes	***
Luz branca vs PACT 5´	81,60	22,91	Yes	***
AM 3´ vs AM 5´	-6,104	1,714	No	ns
AM 3´ vs PACT 3´	82,44	23,14	Yes	***
AM 3´ vs PACT 5´	79,87	22,42	Yes	***
AM 5´ vs PACT 3´	88,54	24,86	Yes	***
AM 5´ vs PACT 5´	85,97	24,14	Yes	***
PACT 3´ vs PACT 5´	-2,569	0,7212	No	ns

Quadro 5. Dados estatísticos da aplicação do corante a **25 µg/ml** em osteoblastos

(GraphPad Prism)

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
Sem tratamento vs Luz branca	-14,81	3,815	No	ns
Sem tratamento vs AM 3´	-36,58	9,425	Yes	***
Sem tratamento vs AM 5´	0,2682	0,07725	No	ns
Sem tratamento vs PACT 3´	88,02	25,35	Yes	***
Sem tratamento vs PACT 5´	88,71	25,55	Yes	***
Luz branca vs AM 3´	-21,78	5,121	Yes	*
Luz branca vs AM 5´	15,07	3,884	No	ns
Luz branca vs PACT 3´	102,8	26,49	Yes	***
Luz branca vs PACT 5´	103,5	26,67	Yes	***
AM 3´ vs AM 5´	36,85	9,494	Yes	***
AM 3´ vs PACT 3´	124,6	32,10	Yes	***
AM 3´ vs PACT 5´	125,3	32,28	Yes	***
AM 5´ vs PACT 3´	87,75	25,28	Yes	***
AM 5´ vs PACT 5´	88,44	25,47	Yes	***
PACT 3´ vs PACT 5´	0,6866	0,1978	No	ns

Quadro 6. Dados estatísticos da aplicação do corante a **50 µg/ml** em osteoblastos

(GraphPad Prism)

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
Sem tratamento vs Luz branca	12,40	4,302	No	ns
Sem tratamento vs AM 3´	89,54	31,08	Yes	***
Sem tratamento vs AM 5´	89,64	31,11	Yes	***
Sem tratamento vs PACT 3´	84,45	29,31	Yes	***
Sem tratamento vs PACT 5´	87,78	30,46	Yes	***
Luz branca vs AM 3´	77,15	26,78	Yes	***
Luz branca vs AM 5´	77,25	26,81	Yes	***
Luz branca vs PACT 3´	72,06	25,01	Yes	***
Luz branca vs PACT 5´	75,38	26,16	Yes	***
AM 3´ vs AM 5´	0,09843	0,03416	No	ns
AM 3´ vs PACT 3´	-5,091	1,767	No	ns
AM 3´ vs PACT 5´	-1,769	0,6139	No	ns
AM 5´ vs PACT 3´	-5,189	1,801	No	ns
AM 5´ vs PACT 5´	-1,867	0,6480	No	ns
PACT 3´ vs PACT 5´	3,322	1,153	No	ns

APÊNDICE 5

