



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CURSO DE MEDICINA- *CAMPUS* SOBRAL**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ELIANE DOS SANTOS PEREIRA**

**“EXPRESSÃO GÊNICA DE *Streptococcus mutans* EM  
BIOFILMES PRODUZIDOS *in vitro* SUBMETIDOS À  
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA”**

**SOBRAL - CE**

**2011**

**ELIANE DOS SANTOS PEREIRA**

**“EXPRESSÃO GÊNICA DE *Streptococcus mutans* EM  
BIOFILMES PRODUZIDOS *in vitro* SUBMETIDOS À  
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA”**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin

**SOBRAL-CE**

**2011**

P49e

Pereira, Eliane dos Santos

Expressão gênica de *Streptococcus Mutans* em biofilmes produzidos *in vitro* submetidos à terapia fotodinâmica antimicrobiana. / Eliane dos Santos Pereira. - Sobral (CE), 2011

70p.: il.; 31 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Sobral (CE), 2011.

Orientação: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin.

1- CÁRIE DENTÁRIA - TERAPIA. 2- FOTOQUIMIOTERAPIA. 3- BIOFILMES. 4- LASERS SEMICONDUTORES – USO TERAPÊUTICO. 5- STREPTOCOCCUS MUTANS. I- Zanin, Iriana Carla Junqueira (Orient.). II - Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. III - Título.

CDD: 615.831

**ELIANE DOS SANTOS PEREIRA**

**“ EXPRESSÃO GÊNICA DE *Streptococcus mutans* EM  
BIOFILMES PRODUZIDOS *in vitro* SUBMETIDOS À  
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA”**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profª. Dra. Lúcia Betânia da Silva Andrade  
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

---

Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa  
Universidade Federal do Ceará - UFC

À DEUS, por ter cuidado de cada passo que dei , das escolhas que fiz e pela vida que me foi dada.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional.

A professora Iriana que me deu a oportunidade de entrar na carreira científica.

Ao meus amigos pelo incentivo e compreensão em especial a Fernanda e Emanuel que serviram de apoio sempre...

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Ceará na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Jesualdo Pereira Farias.

À Faculdade de Medicina de Sobral, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, representado pelos professores e demais funcionários, pelo empenho na formação científica de seus pós-graduandos.

Ao Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto, coordenador do programa de Pós-graduação, pela competente e exemplar função.

À professora Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin que acreditou no meu potencial com seus ensinamentos, por suas palavras de apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa pela preciosa colaboração, ensinamentos e estimada participação na banca examinadora.

À toda família NUBIS, especialmente Prof. Rodrigo Maranguape pela inestimável colaboração.

À Fauzer Deison Araújo, pela parceria e amizade, não medindo esforços pra me ajudar.

À Joseíres Lira de Sousa Fontenelle por sua disponibilidade em colaborar com o andamento da pesquisa.

Aos meus colegas de turma do Mestrado, pela amizade, companheirismo e boa convivência.

Aos meus amigos Alrieta Henrique Teixeira, Isaac Fernandes , Geresa Brito e Glaycianne de Souza Alves pelo inestimável apoio.

À equipe do laboratório de Microbiologia na pessoa de Ruliglesio Rocha pelo esforço de me ajudar em todos os momentos da pesquisa.

Aos meus Amigos Emanuela de Lima Rebouças, e José Jackson do Nascimento Costa pela parceria e amizade e por compartilhar comigo momentos de angústia, alegria e dúvidas .

Aos meus amigos Fernanda Jovino Freitas, Pollyanna Thalia Ferreira e Emanuel Cunha Souza e Iramar Miranda por compartilhar comigo os momentos de angústia, alegrias e pelo apoio dado sempre que necessário.

A todos os funcionários da Faculdade de Medicina de Sobral em especial aos vigilantes que contribuíram para o desempenho da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoa de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de estudos.

A Juliana Paiva Marques Lima, Rafael Nobrega Stipp e Renata de Oliveira Mattos-Graner que contribuíram para finalizar esta pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, a minha sincera gratidão.

**MUITO OBRIGADA !**

“Se pude ver mais longe foi porque me apoiei em ombros de gigantes”

Albert Einstein

## RESUMO

Os estágios iniciais da formação das lesões de cárie em humanos estão relacionados diretamente com a presença de *Streptococcus mutans* no biofilme dental. O tratamento das doenças ocasionadas por biofilmes orais envolve basicamente a remoção mecânica e o uso de antibióticos e agentes anti-sépticos os quais podem originar cepas resistentes aos antimicrobianos tradicionais. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) apresenta-se como uma opção alternativa ao tratamento clássico, promovendo a morte bacteriana por meio da fotossensibilização dos componentes microbianos. O objetivo dessa dissertação foi avaliar o potencial antimicrobiano da TFDA e sua capacidade de alterar o padrão de expressão gênica de *Streptococcus mutans* em biofilmes orais produzidos *in vitro* utilizando para tanto um diodo emissor de luz (LED) associado ao fotossensibilizador azul de orto-toluidina (TBO). Para tanto biofilmes de *S. mutans* UA159, foram formados sobre discos de hidroxiapatita utilizando um modelo de banhos de cultura e submetidos a TFDA após 5 dias. O material coletado passou por um processo de disrupção para a dispersão das células e diluição em série decimal, após o que foi plaqueado em meio de cultura e incubado em condições ideais de crescimento. Adicionalmente, a expressão dos genes de virulência *gtfB*, *gtfC* e *gpbB* de *S. mutans* foram avaliados após a extração do RNA total, síntese de cDNA e realização da técnica da reação da polimerase em cadeia em tempo real utilizando primers específicos. O gene ribossomal 16S foi utilizado com gene de referência. Reduções significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas na viabilidade das colônias de *S. mutans* quanto exposto ao TBO e LED. A expressão gênica de *gtfC* em biofilme de *S. mutans* foi significativamente reduzida após a realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana enquanto a expressão de *gtfB* parece ter sido menos influenciada pela terapia. Não houve alterações na expressão de *gpbB* em função da terapia fotodinâmica antimicrobiana. Assim, outros estudos são necessários para avaliar ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em condições mais semelhantes daquelas encontradas no ambiente clínico, bem como para favorecer o entendimento de seus efeitos na expressão de importantes genes de virulência de *S. mutans*.

**Palavras-chave:** Biofilme oral. *Streptococcus mutans*. Terapia Fotodinâmica. Estudo *In vitro*

## ABSTRACT

The early stages of the formation of caries lesions in humans are directly related to the presence of *Streptococcus mutans* in biofilm. The treatment of diseases caused by oral biofilms basically involves mechanical removal and use of antibiotics and antiseptic agents which may lead to strains resistant to traditional antimicrobials. Antimicrobial Photodynamic Therapy (PACT) presents itself as an alternative option to conventional treatment, promoting bacterial killing by photosensitizing of microbial components. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial potential of PACT and its ability to alter the pattern of gene expression of *S. mutans* in oral biofilms produced in vitro using both a LED light (LED) associated with the photosensitizer ortho-toluidine blue (TBO). To this end, *S. mutans* UA159 biofilms were formed on hydroxyapatite discs using a model of bathing culture and were subjected to PACT after 5 days. The collected material has gone through sonication for dispersion and dilution of cells in decimal series. After that, material was plated in rich medium and incubated under optimum growth conditions. Additionally, expression of virulence *gtfB*, and *gtfC gbpB* genes of *S. mutans* were evaluated after extraction of total RNA, cDNA synthesis and realization of the technique of polymerase chain reaction in real time using specific primers. The 16S ribosomal gene was used as the reference gene. Significant reductions ( $p < 0.05$ ) were observed in the viability of colonies of *S. mutans* when exposed to TBO and LED at the same time. Gene expression of *gtfC* in *S. mutans* biofilm was significantly reduced after the completion of antimicrobial photodynamic therapy, whereas expression of *gtfB* seems to have been less influenced by therapy. No change in the expression of *gbpB* a function of antimicrobial photodynamic therapy was observed. Therefore, further studies are needed to evaluate the action of antimicrobial photodynamic therapy in conditions more like those found in the clinical environment and to encourage understanding of their effects on the expression of important virulence of *S. mutans* genes.

**Keywords:** Oral biofilms. *Streptococcus mutans*. Photodynamic Therapy. *In vitro* study

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios envolvidos no desenvolvimento do biofilme dental.....	23
Figura 2. Representação dos domínios presentes nas seqüências dos precursores das Gtfs de <i>S. mutans</i> .....	28
Figura 3. Representação esquemática da organização dos genes <i>gtfB</i> e <i>gtfC</i> no cromossomo de <i>S. mutans</i> .....	29
Figura 4. Delineamento experimental do experimento <i>in vitro</i> .....	37
Figura 5. Fotossensibilizador utilizado, azul de orto-toluidina (Sigma-CI 52040) e Aparelho de LED Laser Beam.....	38
Figura 6. Aparelho de fio desenvolvido a fim de suportar os discos HÁ na posição vertical.....	38
Figura 7. Discos HA em placa de poliestireno de 24 poços contendo 2 mL de meio TYB com 1% de sacarose.....	39
Figura 8. Discos contendo os biofilmes em uma placa de poliestireno de 24 poços contendo TBO (grupos F+L- e F+L+) ou água Mili Q estéril (grupos F-L- e F-L+).....	40
Figura 9. Biofilme expostos por 15 minutos a uma luz LED (grupos F-L+ e F+L+) e Coleta do biofilme para extração de RNA.....	41
Figura 10. Contagens de <i>Streptococcus mutans</i> no biofilme bacteriano.....	45
Figura 11. RNA Bruto extraído dos diferentes tratamentos realizados e RNA purificado das mesmas amostras após a coluna de purificação e utilização das DNases.....	46
Figura 12. Expressão gênica de <i>16 S</i> na placa 1, 2 e 3.....	47
Figura 13. Comparação da expressão gênica de <i>16 S</i> nas três placas.....	47
Figura 14. Comparação da expressão do gene <i>gtfB</i> após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L-, F-L+ e F+L-.....	48
Figura 15. Comparação da expressão do gene <i>gtfC</i> após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L-, F-L+ e F+L-.....	49
Figura 16. Comparação da expressão do gene <i>gpbp</i> após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L-, F-L+ e F+L-.....	50

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. *Primers* utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real ....44

## LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS

°C: grau Celsius.

10%CO<sup>2</sup>: pressão parcial de dióxido de carbono a 10%

*16SRNA*: gene codificador do RNA ribossômico 16S

Anm: absorvância no comprimento de onda especificado

cDNAs: DNAs obtido a partir da transcrição reversa

DNA: ácido desoxirribonucléico genômico (de *desoxy-ribonucleic-acid*).

*et al.*: e outros (de *et alli*)

F-L-: Sem corante e sem luz

F-L+: Sem corante e com luz

F+L-: Com corante e sem luz

F+L+: Com corante e com luz

*gbpB*: gene codificador da proteína ligante de glucano B

GbpB: proteína ligante de glucano B.

Gbps: proteínas ligantes de glucano (de *Glucan-binding proteins*, deste trabalho).

GtfB: proteína glucosiltransferase B.

*gtfB*: gene codificador da proteína glucosiltransferase B.

*gtfC*: gene codificador da proteína glucosiltransferase C.

GtfC: proteína glucosiltransferase C.

*gtfs*: genes glucosiltransferases (deste trabalho).

Gtfs: proteínas glucosiltransferases (deste trabalho).

HA: hidroxiapatita

h: horas.

µl: microlitro

mL: mililitro

ORF: fases abertas de leitura (de *Open Reading frame*).

pb: pares de base.

PCR: reação em cadeia da polimerase (de *Polymerase Chain Reaction*).

Lenth Polymorphism).

RNA: ácido ribonucléico (de *Ribonucleic Acid*).

*S. mutans*: *Streptococcus mutans*.

s: segundo.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Cárie dental.....	20
2.2 Biofilme dental.....	21
2.3 <i>Streptococcus mutans</i> .....	24
2.4 Fatores de virulência associado aos <i>Streptococcus mutans</i> .....	26
2.5 Glucosiltransferases.....	27
2.6 Proteínas ligantes de glucanos.....	29
2.7 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	31
2.7.1 Mecanismo de ação.....	32
2.7.2 Fotossensibilizadores.....	33
2.7.3 As fontes de luz.....	34
3 OBJETIVO.....	35
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Delineamento experimental.....	36
4.2 Aspectos éticos.....	37
4.3 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	37
4.4 Preparo dos espécimes.....	38
4.5 Formação de biofilme <i>in vitro</i> .....	39
4.6 Terapia Fotodinâmica em biofilmes <i>in vitro</i> .....	39
4.7 Extração do RNA.....	41
4.8 Obtenção do cDNA.....	43
4.9 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....	43
4.10 Análise dos resultados.....	44

5	RESULTADOS.....	45
5.1	Contagem microbiológica.....	45
5.2	Extração de RNA.....	46
5.3	Gene de referência.....	46
5.4	Comparação da expressão do gene <i>gtfB</i> .....	48
5.5	Comparação da expressão do gene <i>gtfC</i> .....	49
5.6	Comparação da expressão do gene <i>gbpb</i> .....	50
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÕES.....	56
8	REFERÊNCIAS.....	57

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, cerca de 700 diferentes espécies de bactérias já foram detectadas na cavidade oral dos seres humanos e a grande parte delas encontra-se organizada na forma de biofilmes (AAS *et al.*, 2005). Esses micro-organismos crescidos de forma planctônica ou organizados em biofilmes e associados a fatores de riscos sócio-comportamentais, ao meio-ambiente e a componentes genéticos do hospedeiro, podem, potencialmente, causar doenças bucais sendo a cárie dental e a doença periodontal, as mais comumente relatadas (SBORDONE; BORTOLAIA, 2003).

Os biofilmes bacterianos são formados quando micro-organismos unicelulares se tornam irreversivelmente aderidos a uma superfície sólida e envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares, podendo haver a formação de biofilmes a partir de uma ou múltiplas espécies bacterianas (SPRATT; PRATTEN, 2003). A diversidade anatômica existente na cavidade oral e a interdependência entre as suas estruturas tornam o desenvolvimento dos biofilmes particularmente interessante.

Apesar da complexidade da comunidade bacteriana que coloniza o biofilme dental, existem evidências consideráveis de que a presença de *Streptococcus mutans* esteja diretamente relacionada aos estágios iniciais da formação das lesões de cárie em humanos. Isso se dá devido à produção de ácidos e à capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares. Assim, encontra-se estabelecido na comunidade científica o conceito de que o surgimento das duas doenças mais prevalentes na cavidade bucal dos humanos, a cárie dental (LOESCHE, 1986) e a doença periodontal (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1991), estejam intimamente relacionadas à presença dos biofilmes organizados sobre a superfície dos dentes (SBORDONE; BORTOLAIA, 2003).

A cárie dentária é uma patologia crônica caracterizada pela destruição localizada e progressiva dos tecidos duros do dente e está intimamente associada com a microbiota residente do biofilme dental. Após a desmineralização do esmalte, a lesão pode progredir lentamente em direção à dentina, sendo inicialmente caracterizada por uma área de dentina amplamente desmineralizada localizada sob uma zona parcialmente desmineralizada e infectada com bactérias (KIDD; JOYSTON-BECHAL, 2000).

A colonização e acúmulo de *S. mutans* no biofilme dental são dependentes da sua capacidade em sintetizar uma matriz extracelular de glucanos, principalmente os insolúveis em água (HAMADA *et al.*, 1981). Esses polissacarídeos são sintetizados a

partir da sacarose ingerida na dieta por enzimas extracelulares livres ou associadas à célula bacteriana, as glucosiltransferases (Gtfs). Três Gtfs - GtfB, GtfC e GtfD - foram identificadas em *S. mutans*, as quais são codificadas pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*, respectivamente. A GtfB catalisa principalmente a síntese de polímeros insolúveis em água; a GtfC a síntese de glucanos solúveis e insolúveis em água enquanto GtfD, a síntese de glucanos solúveis em água. Apesar deste papel fundamental das Gtfs na virulência de *S. mutans*, há pouca informação sobre os fatores que regulam a expressão dos genes codificadores dessas enzimas (STIPP, 2006). Não se sabe ainda se a expressão de *gtfB* e *gtfC* é policistrônica, se estes genes são coordenadamente expressos ou se são expressos monocisticamente. Diferentes grupos de pesquisa apresentam resultados divergentes (FUJIWARA *et al.* 2002; YOSHIDA; KURAMITSU, 2002), enquanto que um promotor de *gtfC* foi caracterizado experimentalmente através de fusos de transcrição em plasmídeos (GOODMAN; GAO, 2000).

Alguns estudos realizados em *S. mutans* e outras espécies do gênero *Streptococcus* têm sugerido a ação de sistemas regulatórios de dois componentes na regulação de genes envolvidos no crescimento em biofilmes e virulência (QI *et al.*, 2004; SENADHEERA *et al.*, 2005). E outros estudos abordam relações entre tais sistemas e expressão de *gtfB*, *gtfC* e *gbpB* em diferentes genótipos clínicos (STIPP, 2006).

Devido à participação dos *S. mutans* na etiologia da cárie dental, grande importância tem sido dada ao estudo desses micro-organismos (ARTHUR *et al.*, 2007). Trabalhos indicam que a expressão de genes por enzimas sintetizadas a partir de matriz exopolissacarídica de *S. mutans* depende diretamente das condições ambientais locais, incluindo tipo e quantidade de nutriente, pH, fonte de carbono e nível de adesão dos micro-organismos à superfície além da idade e espessura dos biofilmes (BURNE, 1998; LI; BURNE, 2001; BURNE, 2004).

Atualmente, o tratamento proposto para prevenir o desenvolvimento da cárie dentária em humanos, envolve a remoção mecânica dos biofilmes e o uso de antissépticos. Entretanto, com o notório aumento de desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos aos agentes antimicrobianos tradicionais, estratégias visando terapêuticas antimicrobianas alternativas vêm sendo pesquisadas, onde se destaca a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA). Essa terapia baseada na associação de drogas fotossensíveis e fontes de luz, foi descrita no início do século XX por Oscar Raab, o qual observou a morte de micro-organismos quando expostos a luz em baixa

intensidade, na presença do corante hidrocloreto de acridina (RAYMOND, 1999). Apesar dos resultados positivos, a utilização da TFDA para obtenção de efeito antimicrobiano caiu em desuso devido ao surgimento dos antibióticos e à popularização da penicilina e sulfonamidas (MAISCH *et al.*, 2005) e só voltou a ser estudada nos últimos anos.

O uso combinado de uma substância fotossensibilizadora (SF) e uma fonte de luz, tem se tornado uma alternativa aos tratamentos convencionais no combate aos micro-organismos bucais em uma técnica conhecida como Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (BEVILACQUA *et al.*, 2007). Durante esse processo, componentes celulares fotossensíveis passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. Neste estado excitado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular iniciando a formação de oxigênio singlete altamente reativo (fotoprocesso Tipo II) ou interagir com outras moléculas como aceptores de elétrons resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos (fotoprocesso do Tipo I) (MACROBERT *et al.*, 1989; DOUGHERTY *et al.*, 1998). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem, então, danificar componentes essenciais das células ou alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível resultando na morte bacteriana (MALIK *et al.*, 1990).

Como a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, a utilização de um agente cromóforo que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é importante para a efetividade da terapia fotodinâmica (WILSON *et al.*, 1992). Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz ao serem coradas com fotossensibilizadores exógenos como derivados das porfirinas, azul de orto-toluidina ou compostos de cloro conjugado (WILSON, 1993; GAD *et al.*, 2004).

Com relação à fonte de luz utilizada, a grande maioria dos estudos sobre o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica utiliza lasers de baixa potência com diversos meios ativos e comprimentos de onda. Nos últimos anos, os diodos emissores de luz (LED) surgiram como luzes alternativas a essa terapia (ZANIN *et al.*, 2005, 2006). Os LEDs são dispositivos semicondutores que, quando polarizados adequadamente emitem luz na faixa do visível, ultra-violeta ou infra-vermelho. Embora tanto os lasers quanto os LEDs produzam luzes monocromáticas, os LEDs apresentam colimação e coerência menos eficientes, resultando em bandas de emissão mais largas

que acabam por favorecer a obtenção de efeito antimicrobiano, uma vez que a luz é emitida em todo o espectro de absorção dos fotossensibilizadores durante a realização da terapia fotodinâmica.

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

A ação antimicrobiana de lasers diodos ou LEDs associados a fotossensibilizadores específicos sobre bactérias crescidas em caldo de cultura está bem documentada na literatura (DOBSON; WILSON, 1992; BURNS *et al.*, 1994; ZANIN *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2003). Da mesma forma, o efeito antimicrobiano dessa terapia sobre biofilmes bacterianos já foi estabelecido (WILSON *et al.*, 1996; WOOD *et al.*, 1999; O'NEILL *et al.*, 2002; SOUKOS *et al.*, 2003; ZANIN *et al.*, 2005, 2006). No entanto, ainda não foi verificada a ocorrência ou não de alterações genotípicas bacterianas em função da utilização da terapia fotodinâmica. Assim, diante do exposto este trabalho teve por objetivo avaliar o padrão de expressão genética de *Streptococcus mutans* em biofilmes produzidos *in vitro* submetidos ou não à terapia fotodinâmica, utilizando um diodo emissor de luz (LED) associado com o azul de orto-toluidina (TBO).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cárie dental

A cárie dental é uma doença infecto-contagiosa, de caráter multifatorial e biofilme-dependente (SBORDONE; BORTOLAIA, 2003). É a manifestação clínica de um processo patológico de desmineralização que ocorre na superfície dental por meses ou anos, a partir da interação entre bactérias orais e constituintes da dieta, com a superfície do dente (BOWEN, 2002). Esse processo é resultante de um desequilíbrio na microbiota residente que resulta na proliferação de bactérias acidúricas e acidogênicas favorecendo, assim, a desmineralização dental em detrimento da remineralização (MARSH, 1994; 2003).

O processo cariioso tem sido intensivamente estudado (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; BOWEN, 2002), sendo caracterizado primariamente como uma desmineralização do tecido dentário mais externo provocado por ácidos, em especial o ácido láctico, produzido através da fermentação de carboidratos por microorganismos presentes no biofilme bacteriano que se forma na superfície dos dentes (MARSH, 2004).

Dentre os fatores relacionados à etiologia da cárie dental, os carboidratos presentes na dieta desempenham um papel fundamental no seu desenvolvimento (GUSTAFSSON *et al.*, 1954; HARRIS, 1963; SCHEININ *et al.*, 1976; MOYNIHAN, 1998; BOWEN, 2002; TOUGER-DECKER; VAN LOVEREN, 2003; ZERO, 2004; MOYNIHAN, 2005). Evidências epidemiológicas demonstraram que a incorporação de carboidratos fermentáveis (sacarose, glicose e frutose) à dieta de determinados grupos populacionais provocou um aumento na incidência de cárie quando comparado ao período em que esses carboidratos não estavam presentes na dieta (RUGG- GUNN; MURRAY, 1983). Dentre esses carboidratos, a sacarose é considerada o açúcar mais cariogênico e por ser o açúcar predominante na dieta moderna (ZERO, 2004), seu papel no desenvolvimento da cárie tem sido amplamente estudado (CURY *et al.*, 2000; NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002; AIRES *et al.*, 2006). Em acréscimo, tão importante quanto o tipo de carboidrato utilizado na dieta, está a frequência de ingestão desse açúcar, fato que possui relação direta com o desenvolvimento, a severidade da doença de cárie, conforme demonstrado por diversos estudos em animais (KÖNIG,

1969; KÖNIG *et al.*, 1968; HEFTI; SCHMID, 1979), estudos *in situ* (CURY *et al.*, 1997; DUGGAL *et al.*, 2001; PAES LEME *et al.*, 2004) e *in vivo* (GUSTAFSSON *et al.*, 1954; ARCELLA *et al.*, 2002).

A saliva é um outro fator que tem influência no desenvolvimento da lesão da cárie em humanos (WEYNE, 1992), destacando-se a velocidade de seu fluxo e os componentes salivares (KRASSE, 1988). A saliva secretada na cavidade bucal é uma mistura complexa de vários componentes como (água, íons e glicoproteínas), formada a partir de secreções das glândulas salivares, fluido gengival, células epiteliais descamadas, micro-organismos, leucócitos e resíduos alimentares, dentre outros componentes. Além disso os componentes antimicrobianos da saliva incluem imunoglobinas, lisozimas, lactoferrinas, peroxidases, amilases e proteínas aniônicas (VALDEVITE, 2007), sendo essenciais para manutenção da homeostase bucal.

Neste contexto, um fluxo salivar aumentado pode diminuir a concentração microbiana na cavidade bucal devido a sua alta capacidade de lavagem oral e a deficiência do mesmo pode resultar em uma maior concentração de bactérias na saliva (TENOVUO, 1998). Além disso, a saliva reveste a mucosa oral e a protege contra irritação, forma reservatório de íons para remineralização dentária, apresenta função de tamponamento do pH bucal, participa da formação da película adquirida que recobre o esmalte dental, realiza a digestão enzimática do amido e da sacarose promovendo ainda, as sensações gustativas por sua ação solvente. Por outro lado, seus componentes orgânicos, especialmente as glicoproteínas também funcionam como nutrientes para os micro-organismos bucais. Estima-se que a saliva possua em media  $10^9$  bactérias por mililitro e sabe-se que as proteínas salivares podem ser degradadas por proteases produzidas por diversos micro-organismos como *S. mutans* e *S. sanguinis* (BARBIERI, 2005).

## **2.2 Biofilme Dental**

Nos últimos anos, o conhecimento sobre a microbiologia bucal tem se multiplicado exponencialmente graças em grande parte ao desenvolvimento das técnicas envolvendo biologia molecular. Considerando que a cavidade oral é o nincho ecológico com maior diversidade conhecida, temos na literatura recente o registro de que o número de espécies colonizadoras da cavidade oral saltou de 500 espécies em 2001 para cerca de 700 espécies em 2005 (AAS *et al.*, 2005). Enquanto a vasta maioria desses

micro-organismos é inofensiva, algumas espécies são identificadas como agentes causadores de uma variedade de doenças dentro e fora da cavidade oral como a cárie e a doença periodontal (MEYER; FIVES-TAYLOR, 1998).

Os biofilmes bacterianos são formados quando micro-organismos unicelulares se tornam irreversivelmente aderidos a uma superfície sólida e envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares, podendo haver a formação de biofilmes a partir de uma ou múltiplas espécies bacterianas (SPRATT; PRATTEN, 2003). A diversidade anatômica existente na cavidade oral e a interdependência entre as suas estruturas tornam o desenvolvimento dos biofilmes particularmente interessante. Contrariamente ao que ocorre nas superfícies mucosas onde há uma constante descamação do epitélio e conseqüente renovação dos microrganismos aderidos; os dentes constituem superfícies duras favoráveis à formação e maturação do biofilme bacteriano tanto na região supragengival como na região subgengival (MARSH, 1994; MARCOTTE; LAVOIE, 1998). A placa dental é um biofilme bacteriano encontrado naturalmente na superfície dos dentes, apresentando composições bacteriana e bioquímica que podem variar em decorrência de fatores intrínsecos e extrínsecos ao hospedeiro (MARSH, 1992; KOLENBRANDER, 2000; WATNICK; KOLTER, 2000).

Com relação ao desenvolvimento dos biofilmes dentais temos que após a limpeza profissional da superfície dos dentes inicia-se a deposição de uma camada acelular denominada película adquirida (NYVAD, 1993). Os principais constituintes da película são componentes originários da saliva e do fluido gengival como proteínas, glicoproteínas e lipídios, além de componentes bacterianos como as glucosiltransferases (MARCOTTE; LAVOIE, 1998). A colonização bacteriana da película adquirida inicia-se poucas horas após a limpeza profissional, sendo os estreptococos (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*) e em proporções menores *Neisseria* e *Actinomyces* os micro-organismos pioneiros na colonização da película (BOWDEN; EDWARDSSON, 1995). Neste momento, as bactérias com pouca ou nenhuma afinidade pela película são eliminadas pelo fluxo salivar, enquanto que interações moleculares entre as proteínas da película adquirida e a superfície bacteriana são responsáveis pela especificidade da colonização bacteriana nos primeiros estágios de formação do biofilme dental (GIBBONS; HAY, 1988). Após a colonização inicial, os microrganismos pioneiros crescem rapidamente formando micro colônias que ficam embebidas em uma matriz extracelular onde as relações interbacterianas, como coagregação, produção de bacteriocinas e interações nutricionais, contribuem para o

aumento da diversidade microbiana até o estabelecimento de uma comunidade clímax como ilustrado na figura 1 (PRATTEN, & WILSON, 1999).

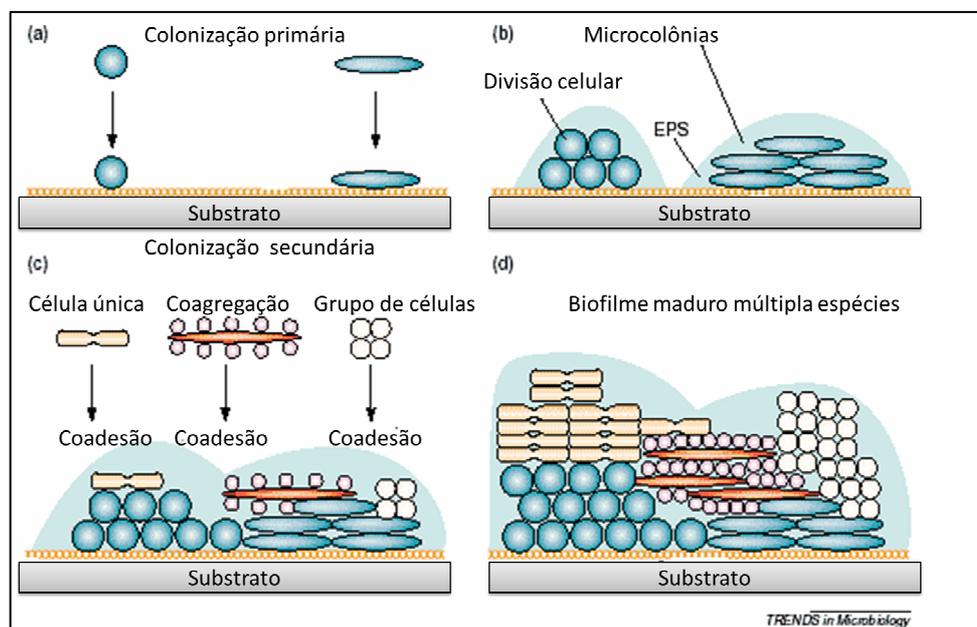


Figura 1. Diagrama ilustrando os estágios envolvidos no desenvolvimento do biofilme dental a partir de múltiplas espécies bacterianas. (a) colonizadores primários unicelulares “revestem” o substrato dental ligando-se a compostos de origem salivar e bacteriana como polissacarídeos e proteínas; (b) Células em crescimento e divisão iniciam a produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) e o desenvolvimento de microcolônias; (c) Coadesão de células de diferentes espécies formam uma comunidade jovem de múltiplas espécies no biofilme; (d) Maturação e formação de mosaicos clonais com múltiplas espécies no biofilme. (Adaptado de : RICKAR *et al.*, 2003- Bacterial coaggregation : an integral process in the development of multi-species biofilms).

A análise química de amostras de biofilme dental recolhidas de seres humanos e animais revelou que aproximadamente 20% de sua massa seca é composto por carboidratos (HOTZ *et al.*, 1972; BOWEN *et al.*, 1977; CURY *et al.*, 2000). As células bacterianas podem constituir 60% à 70% da massa do biofilme, o qual pode conter de  $10^5$  a  $10^{11}$  micro-organismos por grama (ORTHE, 1993; RAMBERG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, tem sido observado que bactérias inseridas nos biofilmes passam a exibir características fisiológicas distintas que resultam no aumento de resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos quando comparadas às mesmas bactérias crescidas de forma planctônica (EVANS; HOLMES, 1987; MAH; O'TOOLE, 2001). Aparentemente, o crescimento dos biofilmes de forma organizada sobre a superfície dos dentes pode funcionar como uma proteção contra as forças mecânicas da

mastigação, contra os mecanismos de defesa inata e adquirida do hospedeiro bem como contra agentes agressores externos (BOWDEN, 1999). Além disso, os mecanismos de defesa dos microrganismos podem incluir a formação de uma barreira física constituída especialmente por polissacarídeos que pode dificultar a difusão dos agentes antimicrobianos no interior dos biofilmes, a transição para uma taxa de crescimento mais lento decorrente das limitações nutricionais no interior dos biofilmes, a ativação de mecanismos gerais de resposta ao estresse, bem como a expressão de fenótipos específicos para microrganismos organizados na forma de biofilmes (MAH; O'TOOLE, 2001).

Apesar da complexidade da comunidade bacteriana que coloniza o biofilme dental, existem evidências consideráveis de que a presença de *Streptococcus mutans* esteja diretamente relacionada aos estágios iniciais da formação das lesões de cárie em humanos. Isso se dá devido a sua presença em altos níveis imediatamente antes do surgimento das lesões, a sua habilidade em rapidamente degradar carboidratos fermentáveis promovendo a formação abundante de ácido, além da sua capacidade de tolerar ambientes com baixo pH (SVENSATER *et al.*, 2001). Assim, encontra-se estabelecido na comunidade científica o conceito de que o surgimento de uma das doenças mais prevalentes na cavidade bucal de humanos, a cárie dental (LOESCHE, 1986) esteja intimamente relacionadas a presença dos biofilmes organizados sobre a superfície dos dentes (COSTERTON *et al.*, 1999; SBORDONE; BORTOLAIA, 2003).

### **2.3 *Streptococcus mutans***

A literatura tem demonstrado consistentemente que o grupo mutans de bactérias gram positivas, particularmente, o *Streptococcus mutans*, são os micro-organismos sempre presentes no biofilme dental cariogênico, desempenhando papel chave na patogênese da cárie em humanos (HAMADA *et al.*, 1984; LOESCHE, 1986; LI; BURNE, 2001).

Nesse contexto, o *S. mutans* é considerado um dos principais micro-organismos relacionados à patogenia da cárie dental (HAMADA; SLADE, 1980), por possuírem alguns fatores de virulência, como a capacidade de produção de ácidos, ou acidogenicidade, e a capacidade de sobrevivência e de manutenção do metabolismo em ambientes ácidos, ou aciduricidade (LÖESCHE, 1986). Belli e Marquis (1991)

descreveram que essas bactérias são capazes de manter a produção de ácidos a partir da glicólise em ambientes com pH menor que 5,0. Essa habilidade em resistir à acidificação do meio está relacionada ao aumento na atividade da bomba translocadora de prótons localizada na membrana plasmática bacteriana.

Esse sistema, denominado FATPase, regula o pH intracelular bacteriano, pois bombeia os prótons, originados na fermentação dos carboidratos, para o meio extracelular, evitando, assim, a acidificação do pH intracelular (BENDER *et al.*, 1986). A estabilidade do pH intracelular torna esses microrganismos capazes de suportar as condições ambientais adversas. Além disso, outros mecanismos de adaptação ao estresse ácido têm sido identificados em *S. mutans*, como indução de proteínas de estresse (JAYARAMAN *et al.*, 1997; LEMOS *et al.*, 2001) e modificações na composição da membrana celular (QUIVEY *et al.*, 2000; FOZO; QUIVEY, 2004). Tais mecanismos de resistência tornam essas bactérias mais competitivas frente aos demais micro-organismos do biofilme dental durante períodos de acidificação do meio (MARSH, 2003). Outro fator que influencia a colonização e acúmulo de *S. mutans* no biofilme dental é sua capacidade em sintetizar uma matriz extracelular de glucanos, principalmente os insolúveis em água a partir da sacarose (HAMADA *et al.*, 1981). Embora a cavidade oral das crianças seja estéril durante a fase intra-uterina, a colonização inicia-se após o parto estabelecendo-se de maneira transitória nos primeiros meses de vida devido a descamação e consequente deglutição dos tecidos orais. O surgimento dos dentes nesse micro ambiente é um momento decisivo para o estabelecimento da microbiota permanente e nessa fase a criança parece estar mais susceptível a aquisição de micro-organismos de fontes externas.

Estudos usando métodos fenotípicos/genotípicos sugerem fortemente que a “mãe” é a principal fonte de infecção das crianças por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (KLEIN *et al.*, 2004) e a saliva é o principal veículo de transmissão. No entanto, a detecção de genótipos que não são encontrados nas mães e em outros membros da família indicam que estes micro-organismos podem ser adquiridos por outros meios. Esta variabilidade na transmissão pode estar associada a susceptibilidade de cada criança, incluído o período definido como janela imunológica, condição imunológica da criança (CAUFIELD *et al.*, 1993), a presença de alterações na estrutura do esmalte, o consumo de sacarose (MATTOS-GRANER *et al.*, 1998), além da ação de fatores não específicos da saliva e sistema imune da mucosa bucal (LI; CAUFIELD, 1995).

## 2.4 Fatores de virulência associado aos *Streptococcus mutans*

A virulência de uma bactéria consiste em propriedades que promovem ou favorecem sua entrada, colonização e crescimento no organismo do hospedeiro (VALDEVITE, 2007).

A capacidade de *S. mutans* em desenvolver uma lesão de cárie dentária depende da associação de vários fatores de virulência, incluindo (1) a composição de sua superfície celular (sorotipo), (2) a produção de bacteriocinas (mutacinas) (RODRIGUES *et al.*, 2008), (3) aderência inicial à superfície dos dentes por meio de proteínas de adesão, (4) capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis, por meio de enzimas glucosiltransferases, o que promove o acúmulo e a permanência do micro-organismo na superfície dos dentes, (5) alta capacidade para catabolizar carboidratos e produzir ácidos que desmineralizam o esmalte dental, o que lhe dá o caráter acidogênico e, (6) habilidade para crescer e da continuidade a metabolização de carboidratos em baixo pH, o que lhe confere o caráter acidúrico (KURAMITSU, 1993; BURNE, 1998).

Devido à participação dos *S. mutans* na etiologia da cárie dental, grande importância tem sido dada ao estudo desse micro-organismo (ARTHUR *et al.*, 2007). Alguns trabalhos têm demonstrado que na cavidade bucal existem diferentes genótipos de *S. mutans*, tanto na saliva quanto no biofilme dental, (SAARELA *et al.*, 1993; SAARELA *et al.*, 1996; KLEIN *et al.*, 2004; LEMBO; MAYER, 2005). Características genéticas podem estar relacionadas a diferenças na virulência entre as cepas de *S. mutans*. A habilidade da bactéria em sobreviver e persistir na cavidade bucal irá depender da sua plasticidade genética, que determina a sua capacidade pra responder às flutuações locais das condições ambientais ou de estresse (DOBRINDT; HACKER, 2001). A microbiota residente do biofilme dental está sujeita a variações, tais como, redução na disponibilidade de nutrientes e redução do pH, devido a exposição aos ácidos orgânicos (CARLSSON, 1989; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da espécie *S. mutans* no biofilme dentário pode fornecer elementos importantes para o desenvolvimento de novas estratégias para controle de infecção por estes micro-organismos e conseqüentemente do desenvolvimento da cárie em humanos.

## 2.5 Glucosiltransferases

A síntese extracelular de glucano, durante o crescimento de *S. mutans* no biofilme dentário, ocorre pela ação de enzimas glucosiltransferases (Gtfs), as quais utilizam a sacarose como seu único substrato (GOODMAN; GAO, 2000). A matriz polissacarídea do biofilme dental, formada inicialmente pela ação desses glucanos, funciona ainda como uma forma de proteção frente as bruscas variações de pH do meio, atuando como uma barreira protetora (HOJO *et al.*, 1976), e como reserva de nutrientes em períodos onde a disponibilidade de substratos é insuficiente (GIBBONS, 1968).

Diferenças na síntese de glucanos insolúveis podem estar associada aos diferentes genótipos bacterianos e aos diferentes graus de virulência. A produção destes glucanos modifica as propriedades físico-químicas do biofilme dental, resultando em uma menor concentração de cálcio, fósforo e fluoreto (CURY *et al.*, 1997), bem como, o aumento da porosidade da matriz do esmalte dental (ZERO *et al.*, 1992) tornando o dente mais susceptível ao desenvolvimento da cárie dentária.

Três enzimas glucosiltransferases (GtfB, GtfC e GtfD) são codificadas respectivamente pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*, e suas atividades são distinguidas pelo tipo de ligação glucosídica predominante no glucano sintetizado (AOKI *et al.*, 1986; HANADA; KURAMITSU, 1988). GtfB catalisa a síntese de glucanos ricos em ligações glucosídicas do tipo  $\alpha$ -1-3 (AOKI *et al.*, 1986), que resultam em polímeros insolúveis em água. GtfD catalisa a formação de glucanos ricos em ligações glucosídicas  $\alpha$ -1-6, que resultam em moléculas solúveis em água (HANADA; KURAMITSU, 1988), enquanto que a GtfC está envolvida na síntese de glucanos solúveis e insolúveis em água (HANADA; KURAMITSU, 1988).

As Gtfs possuem cerca de 1500 aminoácidos (1477 e 1456 aminoácidos para GtfB e GtfC, respectivamente), e apresentam dois domínios de maior importância: um domínio catalítico (Figura 2, III), localizado após a sua extremidade aminoterminal, o qual se liga à sacarose e a hidrolisa (MOOSER *et al.*, 1991) e um domínio C-terminal (Figura 2, IV), caracterizado por diversas repetições de aminoácidos, que se liga ao glucano recém sintetizado, sendo também necessário para a atividade enzimática de extensão e crescimento das cadeias de glucano (KATO; KURAMITSU, 1990; MOOSER; WONG, 1988).



Figura 2 - Representação dos domínios presentes nas seqüências dos precursores das Gtfs de *S. mutans*: I) peptídeo sinal (42% de homologia entre GtfB, GtfC e GtfD); II) região variável de aproximadamente 200 aminoácidos, que é única a cada Gtf (função desconhecida); III) região referente ao domínio catalítico de aproximadamente 800 aminoácidos (43% de homologia entre Gtfs); IV) região essencial para ligação de glucanos (domínio C-terminal) (89% de homologia entre as Gtfs). Adaptado de Colby e Russell, 1997. Escala aproximada.

Os genes codificadores das Gtfs (*gtfs*) são altamente homólogos (*GenBank GeneID*: 1028336 *gtfB*; 1028343 *gtfC*; 1028270 *gtfD*). As seqüências de aminoácidos das proteínas precursoras codificadas por estes genes compartilham 50% de identidade, sendo que as proteínas GtfB e GtfC apresentam 75% de homologia nas suas seqüências de aminoácidos (GOODMAN; GAO, 2000). As fases abertas de leitura (ORF) de GtfB e GtfC estão organizadas em um mesmo sentido, estando os genes *gtfB* e *gtfC* separados por apenas 198 pares de base no cromossomo do *S. mutans* (Figura 3). Não há um consenso sobre os promotores envolvidos na transcrição dos genes *gtfB* e *gtfC*. Alguns estudos sugerem que a expressão de *gtfB* e *gtfC* é policistrônica e que estes genes são coordenadamente expressos (HUDSON; CURTISS, 1990; WEXLER *et al.*, 1993, YOSHIDA; KURAMITSU, 2002). Por outro lado, há dados que indicam que o gene *gtfC* apresenta um promotor independente (SMORAWINSKA; KURAMITSU, 1995; FUJIWARA *et al.* 1996; GOODMAN; GAO, 2000), o qual demonstrou uma atividade 10 vezes maior do que o promotor localizado a montante da ORF de GtfB (GOODMAN; GAO, 2000). O gene *gtfD* localiza-se em uma região do cromossomo distante dos genes *gtfB* e *gtfC* e apresenta promotor independente (FUJIWARA *et al.* 2002).

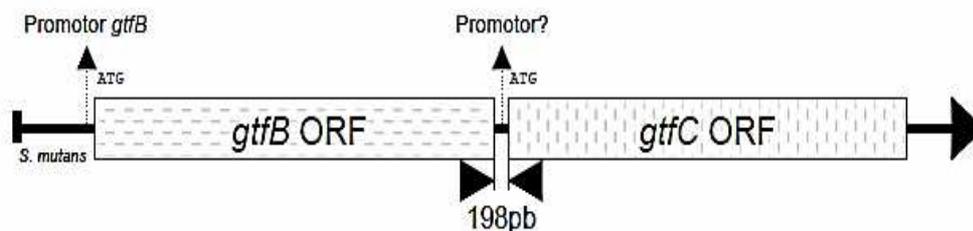


Figura 3 - Representação esquemática da organização dos genes *gtfB* e *gtfC* no cromossomo de *S. mutans*. A transcrição ocorre na fita superior do DNA, onde as fases abertas de leitura (ORFs) encontram-se próximas e no mesmo sentido. Adaptado de Stipp, 2006.

Apesar deste papel fundamental das Gtfs na virulência de *S. mutans*, há pouca informação sobre os fatores que regulam a expressão dos genes codificadores dessas enzimas. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da espécie *S. mutans* no biofilme dentário pode fornecer elementos importantes para o desenvolvimento de novas estratégias para controle de infecção por estes micro-organismos (STIPP, 2006).

## 2.6 Proteínas ligantes de glucanos

As proteínas ligantes de glucano (Gbps de *Glucan-binding proteins*) compõem um grupo heterogêneo de proteínas extracelulares ou de superfície, que exibem afinidade a glucanos insolúveis em água em ensaios *in vitro* (STIPP, 2006). Quatro Gbps foram identificadas para a espécie *S. mutans*, GbpA, GbpB, GbpC e GbpD (SATO *et al.*, 1997; SHAH, RUSSELL, 2004; SMITH *et al.*, 1997). Estas proteínas podem ser secretadas ou associadas às superfícies celulares (GbpA, GbpB e GbpD) ou ligadas covalentemente à parede celular (GbpC) e apresentam diferentes afinidades a polissacarídeos (BANAS; VICKERMAN, 2003).

Pouco se sabe sobre a regulação das Gbps. Recentemente Yoshida *et al.* (2002) relataram que o rompimento do gene *luxS* em *S. mutans* atrapalha a formação de biofilme, talvez devido à maior auto-agregação. Os autores especulam que a expressão de Gtfs e Gbps pode ser regulada pela auto-indução-2 (AI-2) de uma molécula de sinalização para um sistema de “quorum sensing” que é mantida entre muitas espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas (SCHAUDER *et al.*, 2001).

A GbpA é uma proteína secretada com alta homologia ao domínio carboxi-terminal das Gtfs, também conhecido como domínio ligante de glucano, que inclui

seqüências repetidas ricas em resíduos de tirosina (RUSSEL *et al.*, 1979). A GbpB é composta de 431 a 432 aminoácidos, e não apresenta homologia com outras Gbps, embora apresente cerca de 70% de homologia com hidrolases de mureína (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001). A GbpC é um componente da parede celular de *S. mutans*, cuja expressão parece ser mais intensa em condições de estresse osmótico (SATO *et al.*, 1997).

GbpB foi primeiramente purificada de sobrenadantes de cultura *S. mutans*; através de sua afinidade por dextrano (SMITH *et al.*, 1994). Até o momento, esta proteína demonstrou ser produzida por todas as cepas de *S. mutans* testadas, mas as quantidades produzidas e a localização desta proteína parecem ser dependentes do *background* genético da cepa (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001). Entre os 44 genótipos de *S. mutans* analisados, foi identificada uma relação positiva entre quantidade de GbpB detectada no sobrenadante de cultura e a formação de biofilme *in vitro*, através de ensaios de imuno *dot-blot* com anticorpo policlonal de rato (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001).

Inúmeras formas de elaboração de vacinas anticárie vêm sendo desenvolvidas com Gbps em ratos e macacos, através de imunizações sistêmicas, mucosas ou passivas. Embora várias proteínas ligantes de glucano (Gbps) tenham sido descritas (BANAS *et al.*, 2003), somente a GbpB de *S. mutans* (SMITH *et al.*, 1994) pareceu apresentar propriedades imunogênicas e protetoras contra a cárie dentária. Diversas características desta proteína ressaltam seu potencial como um alvo no desenvolvimento de vacinas. A GbpB é produzida por todas as cepas laboratoriais ou clínicas testadas até o momento. Mais de 80 isolados clínicos de *S. mutans* testados em imuno-ensaios com anticorpos GbpB-específicos apresentaram níveis detectáveis de GbpB em fluídos de cultura e em extratos celulares (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001). Smith *et al.*, 2003 mostraram que a imunização sistêmica ou de mucosas contra GbpB inibe, em média, em 50% o desenvolvimento da cárie em animais infectados com *S. mutans* (cepa SJ32) e submetidos a uma dieta com 56% de sacarose. Entretanto, pouco se sabe sobre a função biológica da proteína GbpB no acúmulo dependente de sacarose em biofilmes e sobre os fatores que regulam a expressão do gene *gpbB* (STIPP, 2006).

## 2.7 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Os primeiros relatos da terapia fotodinâmica ocorreram no início do século passado com os experimentos de Raab (1900), no qual é descrito a ação letal do corante acridina quando ativado pela luz de relâmpagos sobre paramécios (RAAB, 1900). Mais tarde, von Tappeiner relatou que esses efeitos tóxicos não se deviam apenas à presença da luz e criou o termo “reação fotodinâmica” (VON, 1904). Vinte anos depois, Policard publicou as primeiras observações clínicas a respeito dessa terapia (POLICARD, 1924). A aplicabilidade dessa técnica foi demonstrada em bactérias, vírus e protozoários bem antes da Segunda Guerra, mas foi abandonada devido à popularização das sulfonamidas e da penicilina (WAINWRIGHT, 1996). O retorno da aplicação antimicrobiana de fotossensibilizador (FS) nas últimas décadas é resultado da busca de novas terapias antimicrobianas devido ao enorme crescimento de bactérias resistentes aos fármacos. A evolução microbiana tem sido mais veloz do que a capacidade do homem em desenvolver novas drogas e os surtos de resistência microbiana observados recentemente nos hospitais parece ser decorrente do princípio de sobrevivência dos mais adaptados. Assim, as bactérias patogênicas, que em pequena porcentagem são naturalmente resistentes a fármacos (tais como penicilinas), logo se tornam a população dominante.

No Brasil, os estudos em Terapia Fotodinâmica (TFD) começaram a ganhar espaço a partir de 1987 (KIM *et al.*, 2003; ZECELL, 1987; ZECELL, 1991). Atualmente, a TFD já ocupa um espaço relativamente grande, com alguns grupos em diferentes universidades e centros de pesquisa realizando estudos nessa área. Além disto, o Hospital Amaral de Carvalho, em Jaú-SP, já conta com um centro de terapia fotodinâmica que vem beneficiando muitos pacientes portadores de câncer. Além desse hospital, a TFD já começa a ser utilizada também pelo Instituto da Visão, ligado à Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), para o tratamento da degeneração macular senil, uma doença comum, mas que é considerada a segunda causa de cegueira nos idosos.

A década de 90 marcou o recomeço da utilização da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana (TFDA). A TFDA antimicrobiana encontra-se bem fundamentada na literatura, principalmente em casos de infecções localizadas, de pouca profundidade e microbiota conhecida. Sua ação antifúngica também está sendo estudada (SARKAR; WILSON, 2003; SHIBLI *et al.*, 2003; GARCEZ *et al.*, 2006).

### 2.7.1 Mecanismo de ação

A Terapia Fotodinâmica é um novo e promissor tratamento clínico que emprega a combinação de luz, oxigênio e um composto fotossensibilizador (FS) para o tratamento de uma variedade de patologias de caráter oncológico (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001), cardiovascular, dermatológico, oftálmico e microbiológico (SEGALA *et al.*, 2002). O processo fotodinâmico é obtido pela ação da luz sob o fotossensibilizador que, na presença do oxigênio, causa a destruição da célula alvo, seja ela do hospedeiro ou de algum micro-organismo causador de uma infecção.

Durante a terapia antimicrobiana dois processos fotoquímicos podem acontecer: na reação do tipo I, ocorre a transferência de energia do fotossensibilizador excitado a célula alvo, ocorrendo reações de óxido-redução com biomoléculas e produção das espécies reativas de oxigênio, como superóxido, radical hidroxila, etc; na reação do tipo II, a molécula do fotossensibilizador reage com moléculas de oxigênio molecular resultando na formação de oxigênio singleto altamente reativo. Este estado do oxigênio é quimicamente muito ativo e pode induzir várias reações em cadeia com componentes da célula, tais como DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, etc, podendo causar danos irreversíveis a célula levando a sua morte (HAYEK *et al.*, 2005).

Por outro lado, a molécula de oxigênio no estado singleto pode perder sua energia por processos de emissão de fótons ou cruzamento intersistemas e voltar para seu estado fundamental sem começar qualquer reação (YAMADA, 2007).

Assim, para aumentar a eficiência do processo também pode ser aumentada a velocidade de reação do oxigênio singleto com certos reagentes, tais como DNA, proteínas ou membranas celulares. Isto acontece quando o oxigênio singleto é gerado perto deste reagente, o que significa aumentar a probabilidade de encontro entre este reagente e o oxigênio singleto. Outra estratégia útil caminho para aumentar a eficiência do processo fotodinâmico seria aumentar a afinidade do sensibilizador com as estruturas que devem ser destruídas (HAYEK *et al.*, 2004).

### 2.7.2 Fotossensibilizadores

Para que a terapia antimicrobiana fotodinâmica exerça algum efeito na célula bacteriana, a luz deve ser absorvida por um ou mais de seus constituintes. Embora algumas bactérias apresentem componentes capazes de absorver parte do espectro de luz visível, a maioria das espécies não apresenta esses componentes, de modo que o uso de fotossensibilizadores exógenos, que atraia para si a luz, é fundamental ao sucesso dessa terapia (WILSON; DOBSON; HARVEY, 1992).

A essência da TFDA provém da utilização de um fotossensibilizador com banda de absorção ressonante com o comprimento de onda de uma fonte de luz, uma vez que a complementariedade entre esses fatores é o responsável pela morte da célula. Para Wainwright, 2006 o agente fotossensibilizador ideal deve apresentar como características: estabilidade biológica, eficiência fotoquímica, seletividade pela célula alvo e mínimo efeito tóxico às células normais. Dentre os fotossensibilizadores, mais utilizados na terapia fotodinâmica antimicrobiana temos as porfirinas e seus derivados as ftalocianinas, as fenotiazinas, as cianinas, as acridinas, os corantes fitoterápicos e as clorinas (YAMADA, 2007).

A maioria dos fotossensibilizadores que vem sendo estudados para o tratamento do câncer e outras doenças teciduais estão baseadas nas porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e nas ftalocianinas (CASTAÑO *et al.*, 2004). No entanto, entre os corantes frequentemente utilizados como fotossensibilizadores antimicrobianos temos o rosa bengal (SCHAFER *et al.*, 2000), as fenotiazinas tais como azul de metileno (BHATTI *et al.*, 1998) e azul de toluidina (GAD *et al.*, 2004). Esses corantes têm grande afinidades com os ácidos nucleicos com espectro de absorção muito semelhante na região do vermelho visível ( $\approx \lambda = 660\text{nm}$  e  $630\text{nm}$ , respectivamente) podendo induzir reduções nas contagens microbiológicas, *in vitro*, de 4-5 logs na população após um curto período de tempo (JORI *et al.*, 2006).

Com relação à eficiência da inativação bacteriana, é conhecido que bactérias Gram-positivas (+) são geralmente mais susceptíveis à TFDA e as espécies Gram-negativas (-) são significativamente mais resistentes a essa terapia (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). Essas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças estruturais nas paredes das células bacterianas. Uma vez que a coloração de Gram age de forma similar aos corantes utilizados na TFDA temos que as espécies Gram (+) que facilmente capturam o corante são também facilmente mortas, enquanto o reverso é verdadeiro para as bactérias Gram (-) (MAISH *et al.*, 2005). Além disso, o envelope celular das

bactérias Gram (-) conhecido como membrana externa pode funcionar como uma barreira física e funcional entre a célula e seu ambiente dificultando a captação do fotossensibilizador durante a terapia (PERUSSI, 2007).

### 2.7.3 As fontes de luz

Assim como o fotossensibilizador, a escolha da fonte de luz é um importante fator para o êxito da terapia fotodinâmica. As primeiras fontes de luz utilizadas em terapia fotodinâmica foram lâmpadas convencionais, com luz não coerente e policromática, com um forte componente térmico associado. Com o advento dos lasers, este passou a substituir as demais fontes de luz por serem monocromáticos e com isso poderem ser associados a fotossensibilizadores com banda de absorção ressonante ao comprimento de onda do laser, ou seja, capazes de absorver a maior parte da irradiação emitida pela fonte de luz. Assim, a densidade de energia é facilmente calculada e a área de irradiação pode ser bem controlada (ACKROYD *et al.*, 2001).

A emissão de luz advinda de um laser pode ter os mais variados comprimentos de onda dependendo do seu meio ativo (argônio, He-Ne e diodos metálicos). No entanto, os lasers de diodo de emissão em  $\lambda = 660\text{nm}$  são os mais utilizados nessa terapia. Esses equipamentos apresentam potência suficiente para geração do processo fotodinâmico, são compactos, robustos, com sistemas ópticos relativamente simples, e de custo mais acessível, além de possuírem um comprimento de onda ressonante a banda de absorção da maioria dos corantes atualmente utilizados (RIBEIRO *et al.*, 2005).

A mais recente fonte de luz alternativa utilizada são os LEDs (*light emitting diodes* - diodos emissores de luz), que também podem ser utilizados com sucesso como fonte de luz em terapia fotodinâmica, principalmente no tratamento de melanomas, pois tem baixo custo, apresenta um baixo componente térmico e luz monocromática, com largura de banda da ordem de 40 nm (RIBEIRO *et al.*, 2005). Apesar de serem capazes de produzir luz monocromática como os lasers, os LEDs não apresentam boa colimação e coerência, resultando em faixas mais amplas de emissão o que acaba sendo vantajoso para a TFDA por aumentar a possibilidade de sobreposição do espectro de irradiação do LED com o espectro de absorção da luz pelo fotossensibilizador (ZANIN *et al.*, 2005; PELOI *et al.*, 2008).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo dessa dissertação foi avaliar o potencial antimicrobiano da TFDA e sua capacidade de alterar o padrão de expressão gênica de *Streptococcus mutans* em biofilmes orais produzidos *in vitro*, utilizando, para tanto, um diodo emissor de luz (LED) associado ao fotossensibilizador azul de orto-toluidina (TBO).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Delineamento experimental

Para o experimento *in vitro*, 72 discos de hidroxiapatita estéreis (HA) foram randomicamente alocados em 4 grupos que foram utilizados para permitir a realização de três experimentos independentes a fim de diminuir o viés inerente ao experimento, com 12 unidades experimentais por conjunto de grupo. Biofilmes de *Streptococcus mutans* UA159 foram crescidos em discos de hidroxiapatita imersos em banho de cultura em placas de poliestireno contendo 24 poços, onde os 24 discos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais, e submetidos à terapia fotodinâmica antimicrobiana, após 5 dias de formação dos biofilmes. O biofilme formado sobre seis discos referentes a cada tratamento foram então agrupados em grupo de três biofilmes a fim de aumentar a quantidade de biofilme coletada e permitir a realização das técnicas de contagem microbiológica e extração de RNA, de modo que eram obtidos 2 amostras de cada tratamento em cada repetição do experimento (figura 4). Para isolar a habilidade dos micro-organismos em produzir biofilme, alguns discos foram expostos apenas a um caldo não inoculado. Como era esperado, não foi observado crescimento bacteriano e este grupo não foi incluído na avaliação. Os quatro grupos experimentais utilizados nesse estudo estão descritos a seguir:

(FL<sup>-</sup>) Biofilmes não foram expostos ao fotossensibilizador ou luz (controle negativo). Os discos foram colocados em água estéril em vez de azul de orto-toluidina (TBO) e esperado 15 minutos em temperatura ambiente afim de simular o tempo de irradiação do LED.

(F<sup>+</sup>L<sup>-</sup>) Biofilmes foram expostos somente ao fotossensibilizador. Discos receberam solução TBO e foi deixado 15 minutos em temperatura ambiente a fim de simular o tempo de irradiação do LED.

(FL<sup>+</sup>) Biofilmes foram somente expostos à luz. Os discos foram colocados em água estéril em vez de TBO seguido por  $55 \pm \text{J.cm}^{-2}$  de irradiação por 15 minutos usando uma luz LED.

(F<sup>+</sup>L<sup>+</sup>) Biofilmes foram expostos ao fotossensibilizador e luz. Os discos foram colocados em TBO seguido por  $55 \pm \text{J.cm}^{-2}$  de irradiação por 15 minutos usando uma luz LED.

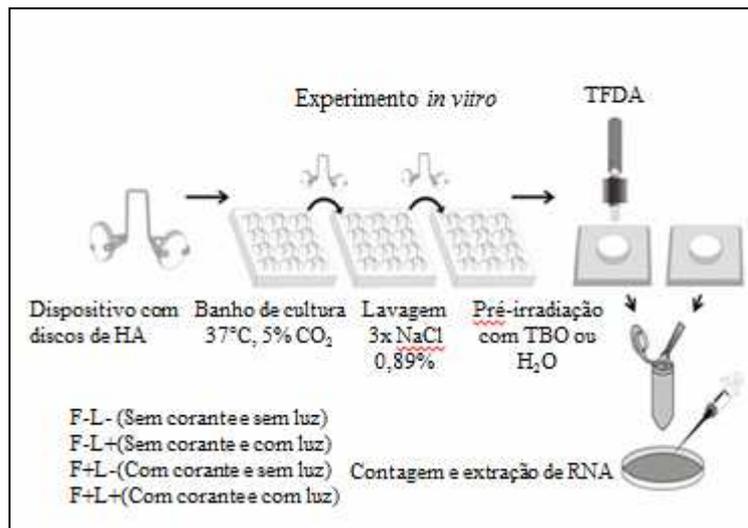


Figura 4- Delineamento experimental dos ensaios *in vitro*

## 4.2 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú (protocolo 669). Todos os voluntários doadores de saliva assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação da Pesquisa antes do início dos procedimentos experimentais.

## 4.3 Fotossensibilizador e fonte de luz

O fotossensibilizador utilizado foi o azul de orto-toluidina (Sigma, CI 52040), ilustrado na figura 5(A), dissolvido em água deionizada na concentração de 100µg/ml e estocado em frasco âmbar em temperatura ambiente. A fonte de luz utilizada foi um diodo emissor de luz-LED (Laserbeam, Rio de Janeiro, Brasil) com espectro de emissão de 620 a 660nm e comprimento de onda predominante em 638.8nm, ilustrado na figura 5(B).

A luz foi distribuída por um cabo de fibra óptica com 9,5mm. A potência de luz LED foi de 40mW e as amostras submetidas a uma densidade de energia de  $\pm 55 \text{ Jcm}^{-2}$  após 15 minutos de irradiação. A densidade de energia foi calculada a partir da fórmula a seguir utilizando para efeito de cálculo a área do bloco.

$$DE = (P \times T)/A$$

DE = densidade de energia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )

T= tempo

P = potência (W)

A= área estimada ( $\text{cm}^2$ )

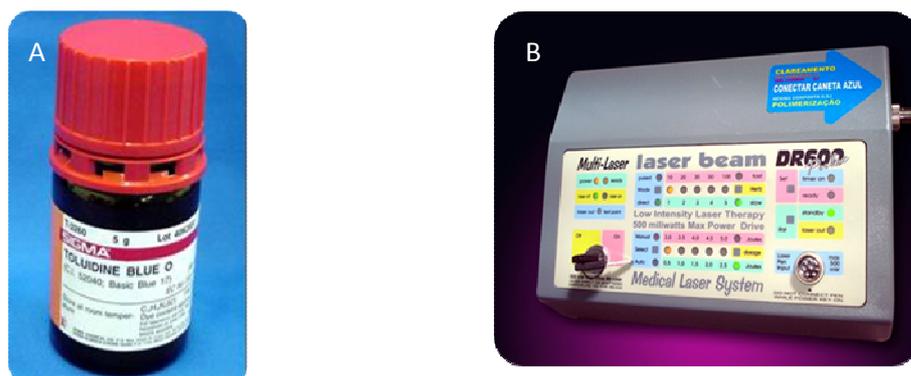


Figura 5. (A) Fotosensibilizador utilizado, azul de orto- toluidina (Sigma-CI 52040). (B) Aparelho de LED Laser Beam com espectro de emissão de 620 a 660nm e comprimento de onda predominante 632.8nm

#### 4.4 Preparo dos espécimes

Discos de hidroxiapatita (Clarkson Chromatography Products Inc.) foram usados nestes estudos. Dispositivos metálicos de fio de aço inoxidável foram desenvolvidos a fim de suportar os discos HA na posição vertical simulando as forças de gravitação encontradas nos biofilmes formados na boca (figura 6). Os discos de HA foram submetidos a um banho ultrassônico por 10 minutos para a remoção do pó de hidroxiapatita, posicionados nos dispositivos metálicos e a seguir foram autoclavados em posição a 121°C, por 15 minutos (DUARTE *et al*, 2008).



Figura 6- Dispositivo metálico desenvolvido a fim de manter os discos de HA na posição vertical.

#### 4.5 Formação de biofilme *in vitro*

O micro-organismo utilizado nesse estudo foi *Streptococcus mutans* UA159. Para preparar o inóculo, *S. mutans* foi primeiramente crescido por 18 horas em Tryptone- Yeast Broth- TYB (Difco, Kansas City, Missouri) contendo uma concentração final de 1% de glicose em temperatura de 37°C e atmosfera parcial de 5% CO<sub>2</sub>. Depois da esterilização os discos foram imersos em água Mili-Q por 1 hora em temperatura ambiente para promover a umidificação dos mesmos. Em seguida os discos foram colocados em uma placa de poliestireno de 24 poços contendo saliva humana clarificada diluída 1/1 (v/v) com o tampão de adsorção (50 mM KCl; 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>; 1.0 mM MgCl<sub>2</sub> de pH 6.5) e 0,1 M de fluoreto fenilmetilsufonil na razão de 1:1000. Os discos foram em seguida incubados a 37°C por 1 hora em um agitador orbital para simular a formação de película adquirida. Na sequência os discos HA foram transferidos para outra placa de poliestireno de 24 poços contendo 2 mL de meio TYB contendo 1% de sacarose (figura 7) e 100µl de *Streptococcus mutans* da cultura overnight para cada 40 mL de meio. Os biofilmes foram então formados nos discos HA por 120 horas com troca periódica do meio de cultura a cada 24 horas (DUARTE *et al*, 2008). No final do período experimental, os biofilmes foram lavados três vezes com solução NaCl 0,89% e então submetidos a um dos quatro tratamentos inicialmente propostos.



Figura 7- Discos HA em placa de poliestireno de 24 poços contendo 2 mL de meio TYB com 1% de sacarose.

#### 4.6 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana nos biofilmes formados *in vitro*

Depois de 5 dias de formação de biofilme, os discos contendo os biofilmes foram transferidos para outra placa de poliestireno de 24 poços contendo TBO (grupos F+L- e F+L+) ou água Mili-Q estéril (grupos F-L- e F-L+) durante o tempo de pré-irradiação de 5 minutos na ausência da luz (figura 8). Na sequência, os biofilmes foram

expostos a 15 minutos de irradiação por uma fonte luminosa do tipo LED (grupos F-L+ e F+L+) (figura 9A) ou mantidos em temperatura ambiente durante o mesmo período (F+L- e F-L-).

O biofilme formado sobre seis discos referentes a cada tratamento foram então agrupados em grupo de 3, a fim de aumentar a quantidade de biofilme coletada e permitir a realização da técnicas de contagem microbiológica e extração de RNA, de modo que eram obtidas 2 amostras de cada tratamento em cada repetição do experimento. Para a contagem microbiológica, amostras dos biofilmes formados foram coletados em eppendorfs pré-pesados contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,89%. O material foi sonicado com 3 pulsos de 10 segundos a 6 watts com intervalo de 1 minutos entre eles. A suspensão foi então diluída em série decimal de (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) e foi plaqueada em triplicada em placas de Ágar BHI utilizando a técnica da gota após o que foram incubados na temperatura de 37°C, por 48h, em atmosfera parcial de 10% de CO<sub>2</sub>. Decorrido o tempo de incubação, a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada e o número de UFC/mg de biofilme foi estabelecido. Adicionalmente, o restante do biofilme formado foi coletado em um estabilizador de RNA (RNAlater® Ambion Inc., Austin, TX, USA) para posterior extração de RNA e análise da expressão de *S. mutans* submetido a terapia fotodinâmica antimicrobiana (figura 9B).

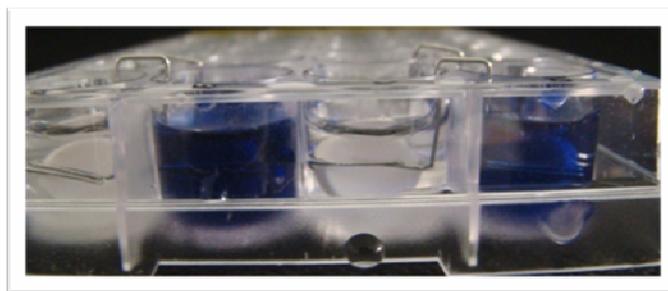


Figura 8. Discos contendo os biofilmes em uma placa de poliestireno de 24 poços contendo TBO (grupos F+L-e F+L+) ou água Mili Q estéril (grupos F-L- e F-L+).

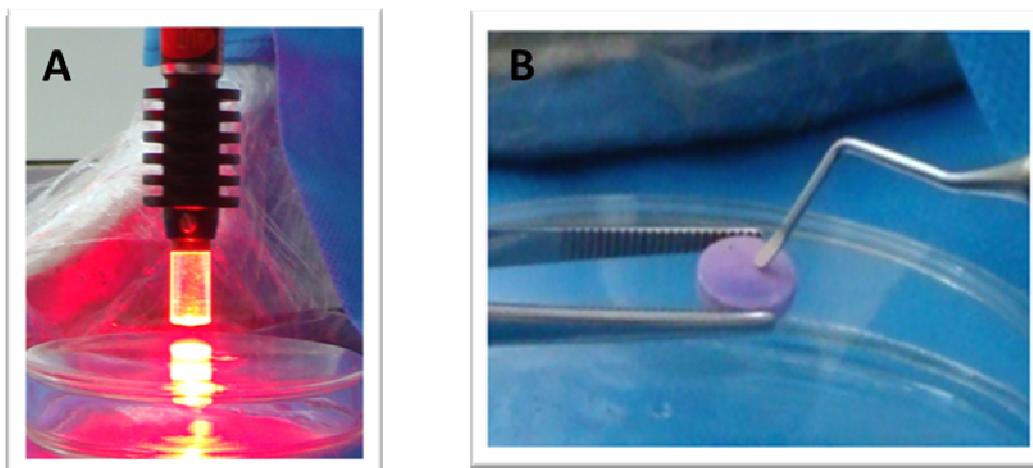


Figura 9. (A) Biofilme expostos a  $55 \text{ Jcm}^{-2}$  utilizando uma fonte de luz LED durante 15 minutos de irradiação (grupos S-L+ e S+L+). (B) Coleta do biofilme com instrumento afiado estéril para contagem microbiológica e extração de RNA.

#### 4.7 Extração do RNA

O RNA total presente nas amostras de biofilmes submetidos aos diversos tratamentos descritos anteriormente foi extraído pelo método descrito por Stipp *et al* (2008) com algumas alterações. Inicialmente, as amostras foram retiradas do freezer  $80^\circ\text{C}$  e parte da solução de RNA *later* foi removida através de centrifugação a  $11.000g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , por 1 minuto. Em seguida,  $220\mu\text{l}$  das amostras foram colocados em tubos criogênicos com rosca contendo pequenas pérolas de zircônia. Os tubos criogênicos foram levados para o equipamento “Bead-beater” (Mini bead-beater 16 - BioSpec Products. Bartlesville, OK, USA), a fim de promover disrupção mecânica das células, sendo a amostra misturada por 60 segundos na potência máxima do aparelho. Após esse período, as amostras permaneceram no gelo, por 60 segundos para posterior repetição do processo,  $850\mu\text{l}$  da solução de beta mercapto com RLT (kit Rneasy<sup>®</sup> Mini Kit da Qiagen) na proporção de  $10 \mu\text{l}$  de beta mercapto para  $1 \text{ mL}$  de RLT foi adicionada à amostra, vortexada por 30 segundos e centrifugada por 2 minutos,  $11.000g$  a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente  $400 \mu\text{l}$  do sobrenadante resultante foi transferido para um tubo eppendorf<sup>®</sup> contendo  $285,7 \mu\text{l}$  de etanol absoluto.

A continuidade do processo de extração total ocorreu com a transferência da solução contendo a amostra juntamente com etanol absoluto para as colunas de purificação do kit Rneasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen). Os reagentes RW1 e RPE, na quantidade de  $700 \mu\text{l}$  e  $500 \mu\text{l}$  respectivamente, foram adicionados separadamente à coluna

intercalados com centrifugação à 20°C, 11.000g por 30 s. As amostras foram tratadas com DNase I (Qiagen, Duesseldorf, Germany) para remoção de contaminantes de DNA genômico. Para isso, 80 µl de uma solução contendo 70 µl de RDD e 10 µl de DNase foi adicionada à coluna e incubados à temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, 350µl de RW1 e 500 µl de RPE foram adicionados, intercalando com centrifugação à 20°C, 11.000g por 30 segundos. Neste momento a coluna foi transferida para um tubo eppendorf<sup>®</sup> de 1,5 ml sem tampa e 30 µl de água livre de DNase e RNase foi adicionada para posterior centrifugação a 20°C, 11.000g por 30 segundos. O processo foi repetido por mais uma única vez, para salvar o eluente resultando em uma quantidade total de 60 µl de RNA extraído.

A concentração, pureza e integridade do RNA foram verificadas através da análise da razão entre as absorvâncias  $A_{260}/A_{280}$  utilizando para isso, NanoDrop 2000 Thermo Scientific (NanoDrop products Wilmington, DE, USA) e um fotodocumentador de eletroforese.

A fim de minimizar a contaminação por DNA genômico a enzima Turbo<sup>™</sup> DNase (Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA) foi utilizada. A amostra de RNA bruto foi adicionada a uma solução contendo 10 µl de tampão da Turbo DNase, 5µl da enzima Turbo DNase, e proporcional quantidade de água livre de DNase e RNase (Sigma) em relação à quantidade de amostra de RNA bruto, resultando em uma solução final de 100 µl. A solução permaneceu por 30 min à 37°C. Em seguida, toda a amostra foi adicionada a um tubo eppendorf<sup>®</sup> contendo 350µl de RLT e 250 µl de etanol absoluto. A solução foi misturada e transferida para colunas de purificação do kit Rneasy<sup>®</sup> MinElute<sup>™</sup> Cleanup Kit (Qiagen) e centrifugada a 20°C, 11.000g por 30 segundos. Em seguida 500µl de RPE e 500µl de etanol 80% foram adicionados individualmente e intercalados por centrifugação a 20°C, 11.000g por 30 segundos. A coluna foi transferida para um tubo eppendorf<sup>®</sup> sem tampa de 1,5 ml e então adicionado 25µl de água livre de DNase e RNase centrifugado por 1 min, 10.000g e 24°C . Esse procedimento foi repetido e o eluente foi salvo em uma quantidade total de 50 µl.

As amostras foram levadas imediatamente para o freezer -80°C e a concentração, pureza e integridade do RNA após a Turbo DNase foram verificadas novamente através da análise da razão entre as absorvâncias  $A_{260}/A_{280}$  e da verificação da imagem em um fotodocumentador de eletroforese.

#### 4.8 Obtenção do cDNA

Os cDNAs foram sintetizados a partir de RNA purificado oriundo de cada amostra de biofilme utilizando o kit iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis kit (BioRad). As reações de transcriptase reversa foram preparadas a partir de uma mistura contendo 4µl de IScript, 1 µl IScript RT, 0,5 µg de RNA purificado da amostra e água livre de DNase e RNase em uma quantidade suficiente para uma solução final de 20 µl. A solução resultante foi misturada por 5 s e em seguida incubada a 25°C por 5 minutos e 42°C por 30 minutos. A reação foi completada com o aquecimento da mistura a 85°C por 5 minutos. Após o processo, 30µl de água livre de DNase e RNase foi adicionada para a solução de cDNA tornar-se em uma concentração final de 10 ng/µl. Logo em seguida as amostras de cDNA foram estocadas a -20°C.

#### 4.9 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A partir do cDNA obtido, reações de PCR em tempo real foram realizadas para avaliar a expressão dos genes *gtfB*, *gtfC* e *gpbB*. Os pares de *primers* específicos foram utilizados de acordo com Stipp *et al.* (2008) os quais delimitam produtos de tamanhos entre 150 e 200pb (Tabela 1).

As reações de PCR quantitativa foram realizadas em uma máquina de ciclagem (MJ MiniOpticon<sup>TM</sup>, Bio-Rad) com 12,5 µL de solução master mix SYBR Green (iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, Biorad), 3 µL de cDNA de cada amostra e 3 µL de cada primer F/R e 6,5µl de água. Curvas padrões foram realizadas para cada primer, os experimentos foram realizados em duplicata e o gene 16S de *S. mutans* foi utilizado como gene de referência. A contaminação por DNA genômico foi determinada pela realização de reações controles de cDNA sem a adição de transcriptase reversa. A expressão dos genes de interesse foi calculada a partir da equação da reta da curva padrão, sendo então normalizada pela expressão dos genes de referência (PFAFFI, 2001). Os dados relativos à expressão de interesse em bactérias crescidas em discos de hidroxiapatita submetidas ou não a terapia fotodinâmica foram então comparados.

Tabela 1. *Primers* utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Gene	Gene ID <sup>1</sup>	Orientação	Seqüência (5'→3')	Tamanho do produto
<i>16SRNA</i> <sup>2</sup>	2886106	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5'-CGGCAAGCTAATCTCTGAAA-3' 5'-GCCCCTAAAAGGTTACCTCA-3'	190 pb
<i>gtfB</i> <sup>2</sup>	1028336	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5'-CGAAATCCCAAATTTCTAATGA-3' 5'-TGTTTCCCAACAGTATAAGGA-3'	197 pb
<i>gtfC</i> <sup>2</sup>	1028343	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5'-ACCAACCGCCACTGTTACT-3' 5'-AACGGTTTACCGCTTTTGAT-3'	161 pb
<i>gbpB</i> <sup>2</sup>	1029610	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5'-CAACAGAAGCACAACCATCA-3' 5'-TGTCCACCATTACCCAGT-3'	151

<sup>1</sup> GenBank: [http:// www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi?db=gene](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi?db=gene)

<sup>2</sup> Sequência do primer de Stipp,2008.

#### 4.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para estabelecer a diferença entre os grupos experimentais foi aplicado um teste de variância (ANOVA one way) seguido do teste Tukey- Kramer. O nível de significância foi definido em 5%. O software BioStat 2007 professional (AnalysSoft Robust Business solutions company, Vancouver, Canadá) foi usado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONTAGEM MICROBIOLÓGICA

Para determinar a atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica em biofilmes formados *in vitro* foram comparados os números das unidades formadoras de colônias (UFC mg<sup>-1</sup>) obtido do controle negativo e os grupos testes. A fotossensibilização letal (F+L+) em biofilmes de *S.mutans* UA159 formados *in vitro* com TBO 100µg/ml e densidade de energia de 55± Jcm<sup>-2</sup> resultou em uma média de contagem viável de 8,58 x 10<sup>3</sup> UFC mg<sup>-1</sup>, comparando com o grupo controle de 9,48 x 10<sup>8</sup> UFC mg<sup>-1</sup> (F-L-) representando uma redução expressiva na contagem microbiológica. No grupo teste (F+L+) observamos redução de 5 log<sub>10</sub> na viabilidade dos biofilmes de *S.mutans* (Figura 10).

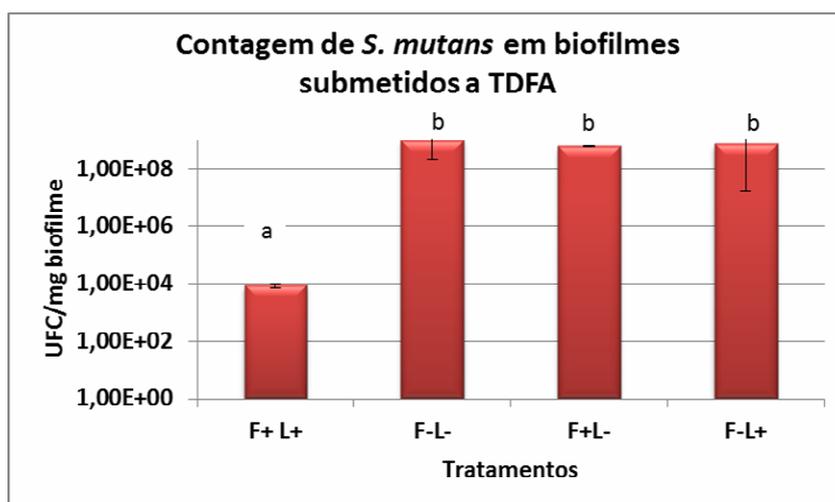


Figura 10. Contagens de *Streptococcus mutans* no biofilme bacteriano. F-L- indica não exposição ao corante e a luz LED, F-L+ indica exposição somente a luz LED, F+L- indica somente exposição ao corante e F+L+ indica exposição ao corante e a luz LED. Dados são médias de 3 repetições (n=12) ± desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste ANOVA (p<0,05).

## 5.2 EXTRAÇÃO DE RNA

O método de extração padronizado neste estudo demonstrou resultados satisfatórios quanto à qualidade e à integridade dos RNAs totais extraídos. A integridade das amostras de RNA foi monitorada em géis de agarose (Figura 11).

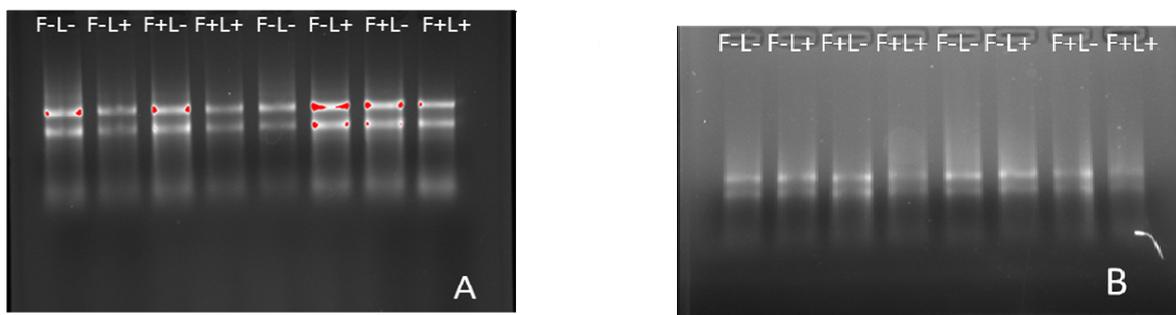


Figura 11. Imagem A apresenta RNA Bruto extraído dos diferentes tratamentos realizados. Imagem B apresenta o RNA purificado das mesmas amostras após a coluna de purificação e utilização das DNases.

## 5.3 GENE DE REFERÊNCIA

O gene de referência *16SRNA*, foi analisado em todos os ensaios. A figura 12 demonstra o valor de expressão desse gene em três ensaios independentes com a cepa UA159. A expressão do gene de referência apresentou variação nos três experimentos independentes, mas estas diferenças não foram significativas (figura 13).

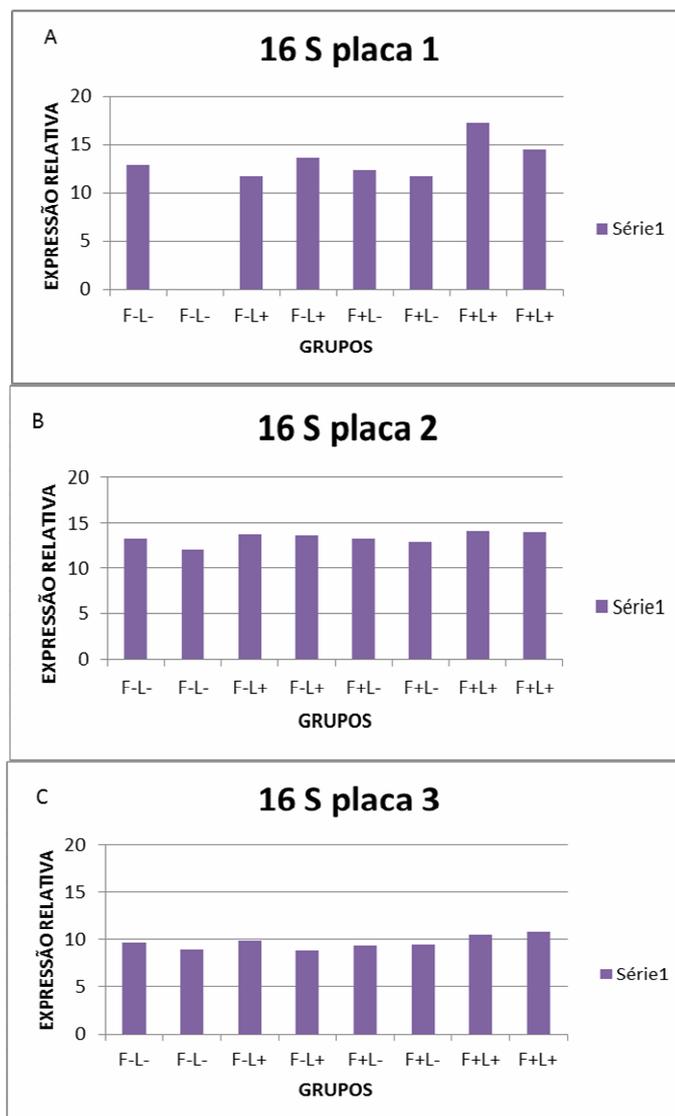


Figura 12. (A) Expressão gênica de 16 S na placa 1. (B) Expressão gênica de 16 S na placa 2.(C) Expressão gênica de 16 S na placa 3.

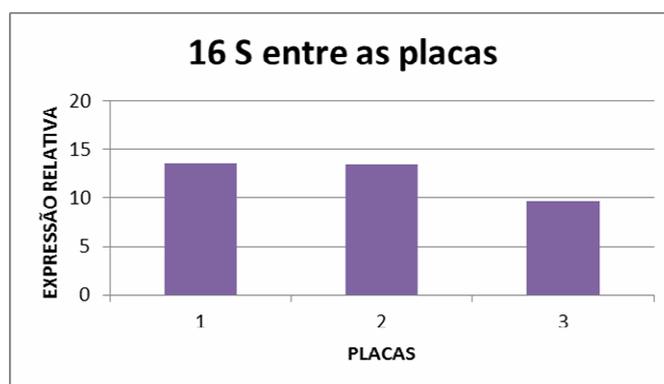


Figura 13. Comparação da expressão gênica de 16S nas três placas.

## 5.4 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *gtfB*

Ao analisar os dados da expressão do gene *gtfB* não houve diferença estatística significativa quando comparamos o grupo F+L+ ao grupo controle F-L-(figura 14A). Já comparando F+L+ com os grupos também controle F-L+ e F+L-, houve diferença estatística  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente. Houve redução estatisticamente significativa na expressão do gene *gtfB* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana comparado aos grupos F-L+ e F+L- (figuras 14B e 14C).

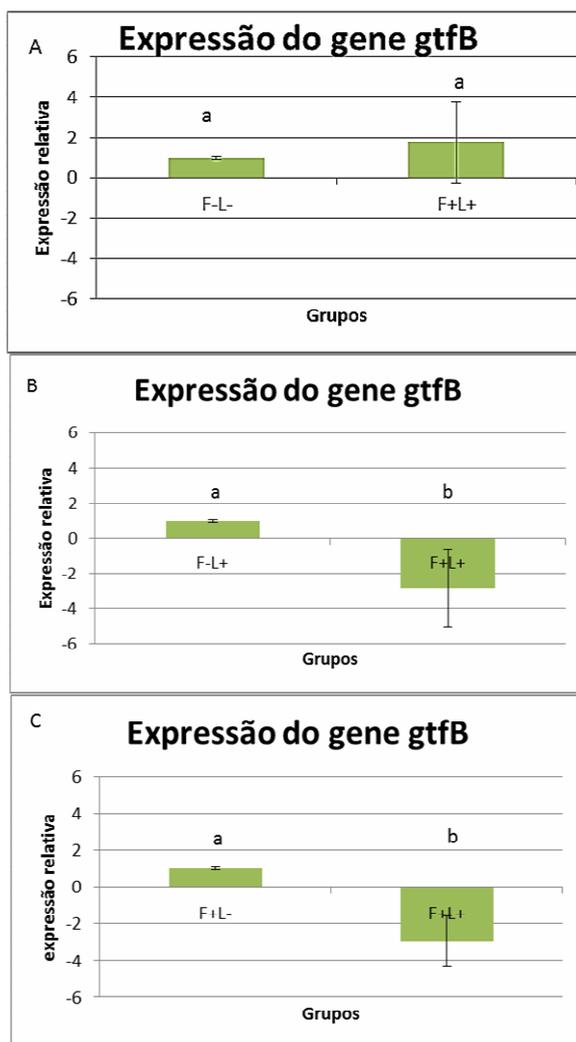


Figura 14. (A) Comparação da expressão do gene *gtfB* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L-. (B) Comparação da expressão do gene *gtfB* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L+. (C) Comparação da expressão do gene *gtfB* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F+L-. Dados são médias de 3 repetições  $\pm$  desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey- Kramer ( $p < 0,05$ ).

## 5.5 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *gtfC*

Os ensaios com a terapia fotodinâmica para o gene *gtfC* demonstram diminuição estatisticamente significativa da expressão desse gene no grupo F+L+ em relação a todos os grupos controles F-L- ( $p < 0,05$ ), F-L+ ( $p < 0,01$ ), F+L- ( $p < 0,01$ ). Como ilustrado nas figuras 15.

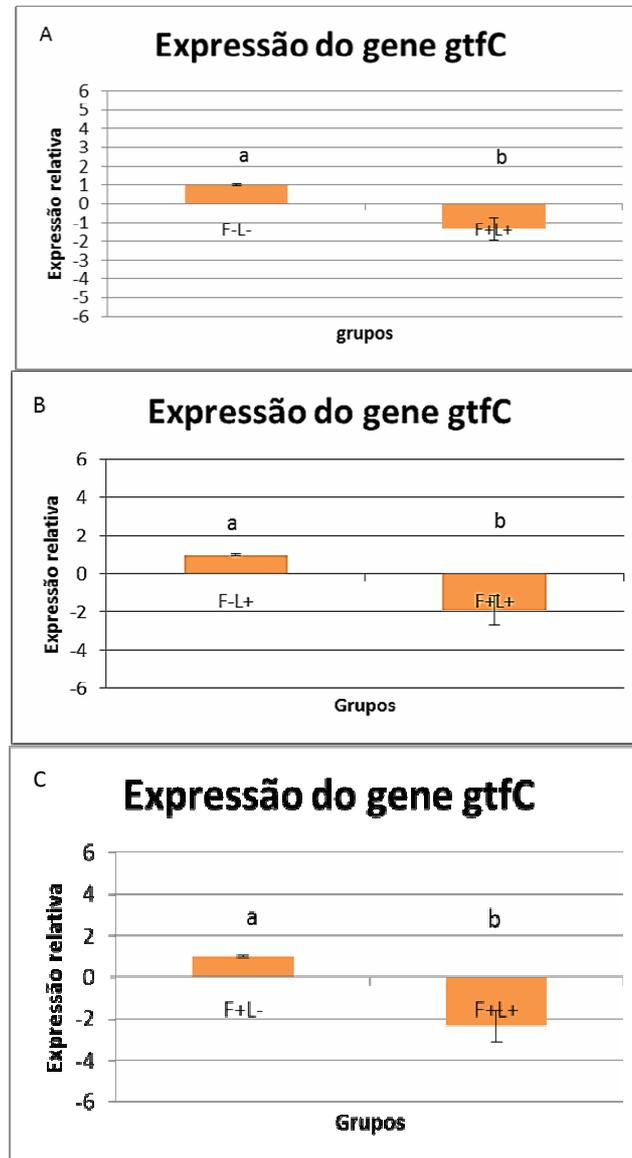


Figura 15. (A) Comparação da expressão do gene *gtfC* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L-. (B) Comparação da expressão do gene *gtfC* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L+. (C) Comparação da expressão do gene *gtfC* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F+L-. Dados são médias de 3 repetições  $\pm$  desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ).

## 5.6 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *gpbB*

O padrão de expressão do gene *gpbB* não demonstrou diferença estatística entre o grupo experimental e todos os grupos controles testados. Embora, pequenas variações nos valores de expressão tenham sido observadas nos diversos tratamentos testados (Figura 16). Assim, a utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana parece não ter influenciado a expressão desse gene por *S. mutans* inseridos em biofilmes formados *in vitro*.

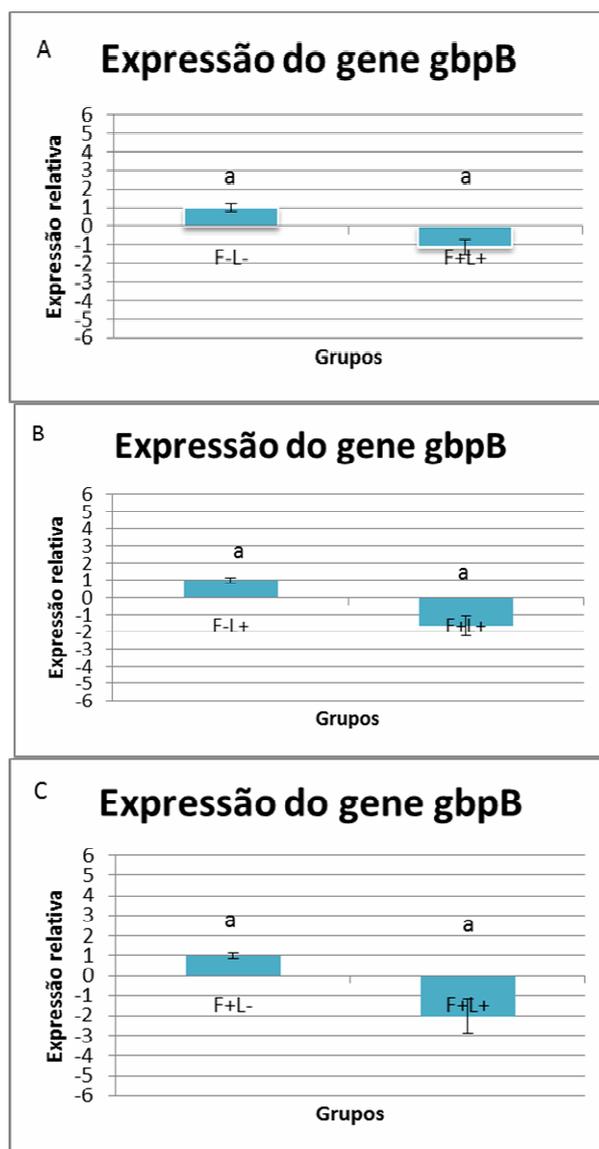


Figura 16. (A) Comparação da expressão do gene *gpbB* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L-. (B) Comparação da expressão do gene *gpbB* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L+. (C) Comparação da expressão do gene *gpbB* após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao grupo F-L-. Dados são médias de 3 repetições  $\pm$  desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo observamos o padrão de expressão genética de *Streptococcus mutans* em biofilmes orais produzidos *in vitro* submetidos à terapia fotodinâmica utilizando um diodo emissor de luz (LED) associado a um fotossensibilizador azul de orto-toluidina (TBO). Para tanto, biofilme de *Streptococcus mutans* UA159 formados *in vitro* foram crescidos em discos de hidroxiapatita.

Atualmente, o tratamento proposto para evitar manifestações causadas por estes micro-organismos, envolve a remoção mecânica do biofilme e o uso de antissépticos e antibióticos. No entanto, devido ao crescente aumento da resistência de patógenos bacterianos a terapêuticos antimicrobianos comuns, a necessidade de alternativas eficientes e tratamentos acessíveis a infecções e doenças causadas por estes patógenos vem despertando um interesse cada vez maior da comunidade científica. A natureza estrutural do biofilme e seus atributos fisiológicos como a dificuldade de penetração do antimicrobiano através da matriz do biofilme, dentre outros, conferem uma inerente resistência a agentes antimicrobianos (DONLAN E COSTERTON, 2002; RICE *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2010). A terapia fotodinâmica antimicrobiana aparece nesse contexto, com redução da possibilidade de surgimento de resistência microbiana, uma vez que o dano ou morte bacteriana é obtido em curto período de tempo (WAINWRIGHT, 1998) através da ação de oxigênios moleculares reativos gerados nas reações fotoquímicas, os quais podem interagir com proteínas mitocondriais da célula alvo alterando sua estrutura e atividade, provocar desnaturação de proteínas e lipídios da membrana e modificar a estrutura do DNA celular (CHABRIER-ROSELLO *et al.*, 2005).

Muitos estudos avaliam o efeito antimicrobiano da TFD envolvendo o uso de lasers convencionais em diferentes comprimentos de onda. A opção do uso do LED em nosso trabalho foi devido principalmente a vantagem econômica desse tipo de luz quando comparada com a irradiação com laser convencional. Adicionalmente, a menor colimação e coerência observada nas luzes do tipo LED resultam na otimização do processo fotodinâmico, uma vez que bandas de emissão mais largas podem interagir com todo espectro de absorção dos fotossensibilizadores utilizados (ZANIN *et al.*, 2006). Além disso, Zanin *et al.* (2005) demonstraram que o uso de laser HeNe ou de luzes do tipo LED em associação com TBO apresentaram o mesmo efeito antibacteriano na viabilidade de biofilme de *S. mutans*.

Um grande número de estudos tem mostrado que bactérias orais são susceptíveis a ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana quando estão suspensas em culturas planctônicas (WILSON, 1992; BURNS *et al.*, 1994; SOUKOS *et al.*, 1998; KOMERIK E WILSON, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2003; PAULINO *et al.*, 2005), em biofilmes orais (WOOD *et al.*, 1999; O'NEILL *et al.*, 2002; ZANIN *et al.*, 2005; WOOD *et al.*, 2006; METCALF *et al.*, 2006) e também em dentina cariada (WILLIAMS *et al.*, 2004; GIUSTI *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2009). Embora, estudos avaliando o uso da TFDA em lesões tumorais demonstrem que a utilização dessa terapia pode alterar significativamente a expressão gênica nas células após o tratamento (BHUVANESWARI *et al.*, 2008; MATOS *et al.*, 2010) até este momento não existe trabalhos que avaliem o efeito da TFDA sobre a expressão dos principais genes de virulência de *Streptococcus mutans*.

A aplicação da TFDA mostrou alterações na expressão de alguns dos principais genes de virulência de *Streptococcus mutans*. A capacidade deste patógeno em iniciar uma cárie depende da associação de vários fatores de virulência, incluindo a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis. A síntese extracelular de glucanos, durante o crescimento de *S. mutans* no biofilme dentário, ocorre pela ação de enzimas glucosiltransferases (Gtfs), as quais utilizam a sacarose como seu único substrato (GOODMAN; GAO, 2000). A matriz polissacarídea do biofilme dental, formada inicialmente pela ação dessas glucanos, funciona ainda como uma forma de proteção para frente a bruscas variações de pH do meio, atuando como uma barreira protetora (HOJO *et al.*, 1976), e reserva de nutriente para suprir os períodos em que a disponibilidade de substratos é insuficiente (GIBBONS, 1968).

O gene de referência utilizado na nossa pesquisa 16SRNAr teve a expressão constante nas condições estudadas. O gene *16S* é essencial para a sobrevivência bacteriana, pois faz parte do complexo ribossômico que irá realizar a tradução protéica. Em células procarióticas, a concentração de RNAs ribossômicos é fator limitante na síntese ribossomal. A concentração de ribossomos é proporcional à síntese total de proteínas e então ao metabolismo total celular (LAMOND; TRAVERS, 1985). É de se esperar, portanto, que o gene *16SRNA* seja constitutivamente expresso enquanto houver metabolismo celular. Estudos de expressão já realizados em *S. mutans* (YOSHIDA; MERRITT; KURAMITSU, 2002) e em outras espécies gram-positivas (VANDECASTEELE *et al.*, 2001) também utilizaram este gene como referência em análises de expressão gênica, embora em condições experimentais distintas.

Os fatores que regulam a expressão dos genes *gtfs* em *S. mutans* ainda não são bem compreendidos. Nos tratamentos experimentais com a terapia fotodinâmica, os resultados referentes a expressão de *gtfB* demonstraram não haver diferenças estatisticamente significativas do tratamento TFDA em relação ao controle não tratado embora reduções significativas na expressão gênica de *S. mutans* tenha sido observado comparando a TFDA com os controles somente tratados com o fotossensibilizador (F+L-) e somente irradiados com a luz LED (F-L+). Os resultados relativos a expressão dos genes da *gtfC* apresentaram reduções significativas na expressão gênica no grupos submetido a TFDA comparada a todos os controles testados. Essa divergência no padrão de expressão gênica pode ser um indicativo de que os genes *gtfB* e *gtfC* são transcritos de forma independente, como relatado por autores (GOODMAN; GAO, 2000; BISWAS; BISWAS, 2006) o que contraria estudos que sugerem que ambos os genes são transcritos a partir do promotor localizado a montante de *gtfB* (WEXLER *et al.*, 1993; YOSHIDA; KURAMITSU, 2002).

No entanto alguns trabalhos mostram que como não foram detectados polimorfismos nas regiões promotoras de *gtfB* e *gtfC* que justificassem as diferenças de transcrição, foi sugerido que outros fatores pudessem estar envolvidos na regulação global de diversos genes de virulência, incluindo-se os genes *gtf* (YAMASHITA *et al.*, 1996). Algumas divergências vistas neste trabalho com padrões de expressão de *gtfB* e *gtfC* não apenas indicam que estes genes apresentam promotores independentes, mas sugerem também que estes genes sofrem influência de sistemas regulatórios distintos. Por outro lado, é possível que os genes *gtfB* e *gtfC* possam apresentar expressão coordenada a partir de um único promotor ou a partir de promotores independentes regulados pelos mesmos sistemas regulatórios (STIPP, 2006).

Segundo Biswas e Biswas (2006) a expressão de *gtfC* é cerca de 3 a 4 vezes inferior à de *gtfB*. No entanto, neste estudo, não foi detectada altas divergências com os genes *gtfB* e *gtfC* relacionados com a terapia fotodinâmica, já que ambos tiveram expressão diminuída em relação aos controle, com exceção somente de F-L- para *gtfB*. Estes estudos podem fornecer dados importantes para o entendimento dos mecanismos que regulam o processo de acúmulo de *S. mutans* no biofilme dentário.

As proteínas ligantes de glucano (Gbps de Glucan-binding proteins) compõem um grupo heterogêneo de proteínas extracelulares ou de superfície, que exibem afinidade a glucanos insolúveis em água em ensaios *in vitro*. Até o momento, quatro Gbps distintas foram identificadas em *S. mutans*, GbpA, GbpB, GbpC e GbpD (BANAS

e VICKERMAN, 2003). Dentre estas proteínas, GbpB demonstrou ser produzida por todas as cepas de *S. mutans* testadas e por isso essa foi a GbpB escolhida nesse estudo, embora as quantidades produzidas dessa proteína e a sua localização pareçam ser dependentes do *background* genético da cepa (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001).

Experimentos em modelos animais demonstram a importância da GbpB na patogênese da cárie, uma vez que a imunização sistêmica ou de mucosas contra GbpB inibe, em média, em 50% o desenvolvimento da cárie em animais infectados com *S. mutans* (cepa SJ32) e submetidos a uma dieta com 56% de sacarose (SMITH; TAUBMAN, 1996; SMITH *et al.*, 2003). Entretanto, pouco se sabe sobre a função biológica da proteína GbpB no acúmulo dependente de sacarose em biofilmes e sobre os fatores que regulam a expressão do gene *gbpB*.

Neste trabalho a expressão do gene *gbpB* foi reduzida quando comparada com os controles, mas não houve uma diferença estatística significativa para esta redução ( $p=0,05$ ), sugerindo que a expressão desse gene se manteve relativamente constante durante todos os tratamentos experimentais testados. A partir da hipótese de que *gbpB* participa do processo de divisão celular, esperava-se observar uma redução significativa na sua expressão durante a aplicação da terapia fotodinâmica, já que esta pode alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível resultando na morte bacteriana (MALIK *et al.*, 1990). Por outro lado, alguns estudos indicam que a GbpB é uma proteína induzida por estresse osmótico e ácido, aumentando sua expressão ao final da fase estacionária (CHIA *et al.*, 2001). Segundo Stipp (2006) a expressão de *gbpB* em relação a curva de crescimento se manteve constante em grande parte das cepas testadas. A sua função biológica ainda não é bem compreendida (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001) embora pareça ser uma proteína essencial em *S. mutans*.

Não há dados experimentais disponíveis na literatura mostrando o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre a expressão das glucosiltransferases e proteínas ligadoras de glucanos que estão relacionadas com a virulência de *S. mutans*. Os resultados deste estudo demonstram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana diminuiu de forma, significativa, a expressão de *gtfB*, comparando a terapia fotodinâmica com todos os grupos que receberam somente a luz ou somente o fotossensibilizador. Isto é relevante, pois este gene está relacionado a produção de polímeros insolúveis, que facilita mais intensivamente o acúmulo de *S. mutans* na superfície dentária e a sua agregação intercelular via receptores da superfície celular (WOOD e BOWEN, 2000).

Resultados semelhantes foram observados na expressão de *gtfC*, que produz tanto polímeros solúveis quanto insolúveis. Embora nas condições experimentais testadas a TFDA não tenha sido capaz de alterar a expressão de *gbpB*, a combinação dos resultados encontrados tem importância significativa quando entendemos se tratar de uma terapia antimicrobiana altamente efetiva (com reduções nas populações microbianas de até 5 logs em biofilmes organizados) que, adicionalmente, é capaz de inibir a expressão de importantes fatores de virulência de *S. mutans* nas populações microbianas sobreviventes a terapia. Assim, outros estudos *in situ* e *in vivo* são necessários para avaliar a ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em condições mais semelhantes daquelas encontradas no ambiente clínico, bem como para favorecer o entendimento de seus efeitos na expressão de importantes genes de virulência de *S. mutans*.

## 7 CONCLUSÕES

Baseado nas condições experimentais empregadas no presente estudo podemos concluir que:

- ✓ A associação de TBO (100µg/ml) e LED (densidade de energia de 55 J/cm<sup>-2</sup>), foi efetiva na redução da contagem microbiológica de *S. mutans* crescido em biofilmes organizados, podendo ser uma ferramenta biotecnológica útil no controle da cárie dentária.
- ✓ A expressão gênica de *gtfC* em biofilme de *S. mutans* formado *in vitro* foi significativamente reduzida após a realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana enquanto a expressão de *gtfB* parece ter sido menos influenciada pela terapia.
- ✓ Não houve alterações na expressão de *gbpB* em função da terapia fotodinâmica antimicrobiana.

## 8 REFERÊNCIAS

- AAS, J. A. ; PASTER, B. J. ; STOKES, L. N. ; OLSEN, I. ; DEWHIRST, F.E. ; Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5721-32, 2005.
- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v.74, n. 5, p.656- 669, 2001.
- AIRES, C. P.; TABCHOURY , C. P. M.; CURY, A. A.; KOO, H.; CURY, J. A. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and enamel demineralization. **Caries Res**, v. 40, n. 1, p. 28-32, 2006
- ALBUQUERQUE, A. C. L.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; SILVA, D. F.; MACEDO-COSTA, M. R.; HIGINO, J. S. Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. sobre micro-organismos do biofilme dental. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, n. 1, p. 21-25, 2010.
- AOKI, H.; SHIROZA, T.; HAYAKAWA, M.; SATO, S.; KURAMITSU, H. K. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. **Infect Immun**, v. 53, n. 3, p. 587-594, 1986.
- ARCELLA, D.; OTTOLENGHI, L.; POLIMENI, A.; LECLERC, Q .C. The relationship between frequency intake and dental caries: a cross-sectional study in italian teenagers. **Public Health Nutr**, v. 5, n. 4, p. 553-60, 2002.
- ARTHUR, R. A.; TABCHOURY, C. P. M.; GRANER, R. O. M.; CURY, A. A. D. B.; LEME, A. F. P.; VALE, G. C.; CURY, J. A. Genotypic Diversity of *S. mutans* in Dental Biofilm Formed In Situ under Sugar Stress Exposure. **Braz Dent J**, vol.18, n. 3, p. 185-191, 2007.
- BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Crit rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 2, p. 89-99, 2003.
- BARBIERI, D. S. Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentaria. **Dissertação (Mestrado)**. 124p.- Universidade Federal do Pará, Curitiba, 2005.
- BEVILACQUA, I. M.; BRUGNEIRA JUNIOR, A.; NICOLAU, R. M. Ação do laser de baixa potência associado à substâncias fotoativadoras na redução de cândidas em meio bucal (revisão da Literatura) . **In: VII Encontro latino americano de pos-graduação**, 2007.
- BELLI, W. A.; MARQUIS, R. E. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, n. 4, p. 1134-38, 1991.

BENDER, G. R.; SUTTON, S. V. W.; MARQUIS, R. E. Acid tolerance, proton permeabilities and membrane ATP-ases of Oral Streptococci. **Infect Immun**, v. 53, n. 2, p. 331-8, 1986.

BHATTI, M.; MACROBERT, A.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; WILSON, M. A study of the uptake of toluidine blue 0 by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem Photobiol**, v. 68, n. 3, p.849- 852, 1998.

BISWAS, S.; BISWAS, I. Regulation of the glucosyltransferase (gtfBC) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. **J Bacteriol**, v. 188, n. 3, p. 988-98, 2006.

BHUVANESWARI R; GAN, Y.Y.; LUCKY S. S.; CHIN WW, ALI SM.; SOO KC; OLIVO M. Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. **Mol Cancer**, v. 13, n. 7, p. 56, 2008.

BOWDEN, G.; EDWARDSSON, S. Ecologia oral e cárie dentária. In: Thylstrup A, Fejerskov O. **Cariologia clínica**. São Paulo: Santos, p.45-49, 1995.

BOWDEN, G. H. Controlled environment model for accumulation of biofilms of oral bacteria. **Methods Enzymol**, v. 310, p. 216-24, 1999.

BOWEN, W. H.; VELE, Z.; AGUILA, M.; VELASQUEZ, H.; SIERRA, L. I.; GILLESPIE, G. The microbiology and biochemistry of plaque, saliva, and drinking water from two communities with contrasting levels of caries in Colombia, S. A. **J Dent Res**, Chicago, v.56, p. C32-C39, 1977.

BOWEN, W. H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 2, p. 126-31, 2002.

BURNE, R. A. Oral streptococci: products of their environment. **J Dent Res**, v.77, n. 3, p.445-452, 1998.

BURNE, R. A. Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. **J. Bacteriol**, v. 186, p. 6383-6390, 2004.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. **J Dent**, v. 22, n. 5, p. 273-8, 1994.

CARLSSON, J. Microbiol aspects of frequent intake of products with high sugar concentration. Scand **J Dent Res**, v. 97, p. 110-114, 1989.

CAUFIELD, P. W. ; CUTTER, G. R. DASANAYAKE, A. P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J Dent Res**, v. 72, p. 32-45, 1993.

CHABRIER-ROSELLO, Y.; FOSTER, T. H.; PEREZ-NAZARIO, N.; MITRA, S.; HAIDARIS, C. G. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 4288–4295, 2005.

CHIA, L. Y. Y.; HUANG, P. T.; CHEN, J. Y. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. **Infect Immun**, v. 69, n. 4, p. 2493-2501, 2001.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CURY, J. A.; REBELO, M. A.; CURY, A. A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**, v. 31, p. 356-360, 1997.

CURY, J. A. ; REBELO, M. A. ; CURY, A. A. ; DERBYSHIRE, M. T.; TABCHOURY, C. P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**. V. 34, p. 491-497, 2000.

CURY, J. A.; REBELO, M. A. B.; DEL, B. E. L.; CURY, A. A. Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, v. 34, p. 491-497, 2000.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R.; **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, p. 2329, 2005.

DOBRINDT, U.; HACKER, J. Role genome plasticity in pathogenic bacteria . **Curr Opin microbial**, v.4, p. 550-557, 2001.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch Oral Biol**. v. 37, p. 883-887, 1992.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbial Rev*, v. 15, p. 167-193, 2002

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W. *et al.* Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, p. 889-905, 1998.

DUARTE, S.; KLEIN, M. I; AIRES, C. P.; CURY, J. A.; BOWEN, W. H.; KOO, H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. **Oral microbial Immunol**, v. 23, p. 206-212, 2008.

DUGGAL, M. S.; TOUBA, K. J.; AMAECHI, B. T; KOWASH, M. B; HIGHAM, S. A. Enamel demineralization *in situ* with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. **J Dent Res**, v. 80, p. 1721-4, 2001.

EVANS, R. C.; HOLMES CJ Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 31, p. 889-94, 1987.

FOZO, E. M.; QUIVEY, R. G. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 2, p. 929-36, 2004.

FUJIWARA, T.; TAMESADA, M.; BIAN, Z.; KAWABATA, S.; KIMURA, S.; HAMADA, S. Deletion and reintroduction of glucosyltransferase genes of *Streptococcus mutans* and role of their gene products in sucrose dependent cellular adherence. **Microb Pathog**, v. 20, p. 225- 233, 1996.

FUJIWARA, T.; HOSHINO, T.; OOSHIMA, T.; HAMADA, S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. **J Dent Res**, v. 81, p. 109-113, 2002.

GAD, F.; ZAHRA, T.; HASAN, T.; HAMBLIN, M.R. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 2173-2178, 2004.

GARCEZ, A.S.; NÚÑEZ, S.C.; LAGE-MARQUES, J.L.; JORGE, A.O.C.; RIBEIRO, M.S. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, p. 93-98. 2006.

GIBBONS, R. J. Role of extracellular bacterial polysaccharides in the caries process. **J Dent Res**, Chicago, v. 47 n. 6, p. 926-927, 1968.

GIBBONS, R. J.; HAY, D. I. Human salivary acidic proline-rich-proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatite surfaces. **Infect Immun**, v. 56, p. 439-45, 1988.

GIUSTI, J. S.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITO, A. C.; HELMERSON, K.; CARVALHO-FILHO, E.; KURACHI, C.; BAGNATO, B. S. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomed Laser Surg**. v. 26, p.281-287, 2008.

GOODMAN, S. D.; GAO, Q. Characterization of the *gtfB* and *gtfC* promoters from *Streptococcus mutans* GS-5. **Plasmid**, v. 43, p. 85-98, 2000.

GUSTAFSSON, B. E.; QUENSEL, C. E; SWENANDER, L. L.; LUNDQVIST, C.; GRAHNÉN, H.; BONOW, B. E.; KRASSE, B. The Vipeholm dental caries study. **Acta Odontol Scand**, v. 11, p. 232- 364, 1954.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology immunology and a cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, Amsterdam, v.44, n.2, p.331-384, 1980.

HAMADA, S.; TORII, M.; KOTANI, S.; TSUCHITANI, Y. Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interactions of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. **Infect Immun**, v. 32, p. 364-372, 1981.

HAMADA, S.; XOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v.63, p.407-411, 1984.

HANADA, N.; KURAMITSU HK: Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. **Infect Immun**, v. 56, p. 1999-2005, 1988.

HARRIS, R. Biology of the children of Hopewood House, Bowral, Australia. 4. Observations on dental caries experience extending over five years (1957-1961). **J Dent Res**, v. 42, p. 1387-99, 1963.

HAYEK, R. R. A.; ARAÚJO, N. S.; GLOSO, M. A.; FERREIRA, J.; BAPTISTASOBRINHO, C. A.; YAMADA JUNIOR, A. M.; RIBEIRO, M.S. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature induced peri-implantitis in dogs. **J.Periodontol**, v. 76, p.1275-81, 2005.

HAYEK, R. R. A.; YAMADA J. A. M.; GARCEZ, A.S.; NUNEZ, S.C.; SUZUKI, L.C.; RIBEIRO, M.S. Comparison between photodynamic therapy and a bactericidal solution in the treatment of dental alveolitis – microbiological evaluation. **Braz Dental J**, v. 15, p. 110, 2004.

HEFTI, A.; SCHIMID, R. Effect on caries incidence in rats of increasing dietary sucrose levels. **Caries Res**, v. 13, p. 298-300, 1979.

HOJO, S.; HUGUCHI, M.; ARAYA, S. Glucan inhibition of diffusion in plaque. **J Dent Res**, Chicago, v.55, n.1, p.169-173, 1976.

HOTZ, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMID, R. Carbohydrates in pooled dental plaque. **Caries Res**, Basel, v. 6, p. 103-121, 1972

JAYARAMAN, G. C.; PENDERS, J. E.; BURNE, R. A. Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock environmental acidification. **Mol Microbiol**, v. 25, p. 329- 41, 1997.

JORI, G *et al* . Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections; Basic Principles and Perspective Applications. **Lasers Surg Med**, v. 38, p. 468-481, 2006.

KATO, C.; KURAMITSU, H. K. Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. **FEMS Microbiol Lett**, v. 60, n. 3, p. 299-302, 1990.

KIDD, E. A. M.; JOYSTON-BECHAL, S. Essentials of Dental Caries: The Disease and Its Management, Oxford University Press, Oxford, **United Kingdom**, Second Edition, 2000.

KIM, K. K.; KAWANO, Y.; YAMAZAKI, Y. A novel porphyrin photosensitizer from bamboo leaves that induces apoptosis in cancer cell lines. **Anticancer Res**, v. 23, n. 3, p. 2355-631, 2003.

KLEIN, M. I.; FLORIO, F. M.; PEREIRA, A. C.; HOFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4620-6, 2004.

KRASSE, B. Exame salivar. In: Risco de cáries. Guia prático para controle e assessoramento. 2 ed. São Paulo: **Quintessence**, p.41-44, 1988.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 413-37, 2000.

KÖNIG, K. G.; SCHMID, P.; SCHMID, R. An apparatus for frequency-controlled feeding of small rodents and its use in dental caries experiments. **Arch Oral Biol**, v. 13, p. 13-26, 1968.

KÖNIG, K. G. Caries activity induced by frequency-controlled feeding of diets containing sucrose or bread to Osborne-Mendel rats. **Arch Oral Biol**, v. 14, p. 991-93, 1969.

KOMERIK, N.; WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of Gram- negative bacteria to toluidine blue O- mediated lethal photosensitization. **J Appl Microbiol**, v. 92, p. 618-623, 2002.

KURAMITSU, H. K. Virulence factor of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Crit Rev Oral Bio Med**, v 4, p. 159-176, 1993.

LAMOND, A. I.; TRAVERS, A. A. Stringent control of bacterial transcription. **Cell**, v. 41, n. 1, 1985.

LEMBO, F. L, MAYER, M. P. A. Distribution of *Streptococcus mutans* genotypes in the human mouth. **Caries Res**, v. 39, n. 4, p. 306, 2005.

LEMOS, J. A.; CHEN, Y. Y.; BURNE, R. A. Genetic and physiologic analysis of the *groE* operon and the role of HcrA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. **J Bacteriol**, v. 183, p. 6074-84, 2001.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mother. **J Dent Res**, v. 74, p. 681-685, 1995.

LI, Y.; BURNER, R. A. Regulation of the *gtfBC* and *fff* genes os *Streptococcus mutans* in biofilms in response to ph and carbohydrate. **Microbiol**, v. 147, p. 2841-2848, 2001.

LI, Y-H.; LAU, P. C. Y.; LEE, J. H.; ELLEN, R. P.; CVITKOVITCH, D. G. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. **Infect Immun**, v. 183, p. 897-908, 2001.

LIMA, J. P. M.; SAMPAIO DE MELO, M. A; BORGES, F. M. C.; TEIXEIRA, A. H.; STEINER-OLIVEIRA, C.; NOBRE DOS SANTOS, M.; RODRIGUES, L. K. A.; ZANIN, I. C. J. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in a in situ model of dentine caries. **Eur J Oral Sci**, v. 117, p. 568-574, 2009.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, v.50, p. 353-380, 1986.

MACDONALD, I. J., T.J.; DOUGHERTY, J. Porphyrins and Phthalocyan. **Sci**, v. 5, n. 105, 2001.

MACROBERT, A. J.; BOWN, S. G.; PHILLIPS, D. What are the ideal properties of a photosensitizer? In: **Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use**. Chichester, p. 4-16, 1989.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 34-9, 2001.

MAISCH, T.; BOSL, C.; SZEIMIES, R.-M.; LEHN, N.; ABELS, C.; Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1542–1552, 2005.

MALIK, Z.; HANANIA, J.; NITZAN, Z. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. **J Photochem Photobiol B**, v. 5, n. 3-4, p. 281-93, 1990.

MARCOTTE H, LAVOIE MC. Oral microbial ecology and the hole of salivary immunoglobulin A. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 1, p. 71-109, 1998.

MARSH P. D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J Dent Res**, v. 71, p. 1431-8, 1992.

MARSH, P. D.; Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent**, Washington, v. 8, p. 263-271, 1994.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology** **149**:279-294, 2003.

MATTOS-GRANER, K. O.; ZELANTE, F. ; LINE, R. C. ; MAYER, M. P. Association between caries prevalence and clinical microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5 year old Brazilian children. **Caries Res**, v. 32, p. 319-323, 1998.

MATTOS-GRANER R, O; JIN, S.; KING W. F; CHEN, T.; SMITH, D. J.; DUNCAN, M. J. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding Glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infect Immun**, v. 69, n. 11, p. 6931-41, 2001.

MATOS, L. G.; CARMO, N. G.; SOARES, S. K. P.; MORAIS, P. C.; TESTECO, A. C.; LACAVAL, Z. G. M.; ANDRADE, R. V. Avaliação da expressão dos genes Bcl2 e FN1 em pacientes com câncer de pele submetidos ao tratamento com terapia fotodinâmica no Distrito Federal. **Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética**. 2010

METCALF, D.; ROBINSON, C.; DEVINE, D.; WOOD, S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. **J Antimicrobial Chemoter**, v. 58, p. 190-192, 2006.

MEYER, D. H.; FIVES-TAYLOR, P. M. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. **Curr Opin Microbiol**, v. 1, p. 88-95, 1998.

- MOOSER, G.; WONG, C. Isolation of a glucan-binding domain of glucosyltransferase (1,6-alpha-glucan synthase) from *Streptococcus sobrinus*. **Infect Immun**, v. 56, n. 4, p. 880-4, 1988.
- MOOSER, G.; HEFTA, S. A.; PAXTON, R. J.; SHIVELY, J. E.; LEE, T. D. Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* alpha-glucosyltransferases. **J Biol Chem**, v. 266, n. 14, p. 8916-22, 1991.
- MOYNIHAN, P. J. Update on the nomenclature of carbohydrates and their dental effects. **J Dent**, v. 26, n. 3, p. 209-18, 1998.
- MOYNIHAN, P. J. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. **Bull WHO**, v. 83, n. 9, p. 694-99, 2005.
- NASCIMENTO, M. M.; LEMOS, J. A.; ABRANCHES, J.; GONÇALVES, R. B.; BURNE, R. A. Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. **J Bacteriol**, v. 186, p. 6383-6390, 2004.
- NYVAD, B. Microbial colonization of human tooth surfaces. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl**, v. 32, n. 1, p. 1-45, 1993.
- NOBRE, M. S.; SANTOS, L. M.; CURY, J.A. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Research**, v. 36, n. 5, p. 347-35, 2002.
- O'NEILL, J. F.; HOPE, C.; WILSON, M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. **Lasers Surg Med**, v. 3, p. 86-90, 2002.
- ORTHE, D. S. Handbook of cosmetic microbiology. Marcel Dekker, **Inc**, v. 12, n. 8, p. 591, 1993.
- PAES LEME AF, DALCICO R, TABCHOURY CP, DEL BEL CURY AA, ROSALEN PL, CURY JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. **J Dent Res**, v. 83, n. 1, p. 71-5 2004.
- PAULINO, T. P.; RIBEIRO, K. F.; THEDEI, G. JR.; TEDESCO, A. C.; CIANCAGLINI, P. Use of hand held photopolymerize to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, v. 50, p. 353-359, 2005.
- PELOI, L. S.; SOARES, R. R. S.; BIONDO, C. E. G.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J. Biosci**, v. 33, n. 2, p.231-237, 2008.
- PERUSSI, J. R. Photodynamic inactivation of microorganisms. **Quim. Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.
- PFAFFI, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n.9, p. 2001, 2010.

POLICARD, A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. **CR Soc Biol**, v. 91, p. 1423, 1924.

PRATTEN, J.; WILSON, M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p.1595-1599, 1999.

QI, F.; MERRITT, J.; LUX, R.; SHI, W. Inactivation of the *ciaH* Gene in *Streptococcus mutans* diminishes mutacin production and competence development, alters sucroseedependent biofilm formation, and reduces stress tolerance. **Infect Immun**, v. 72, p. 4895-4899, 2004.

QUIVEY, R. G.; FAUSTOFERRI, R.; MONAHAN, K.; MARQUIS, R. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 189, p. 89-92, 2000.

RAAB, V. Ueber die wirkung fluorescirender stoffe auf infosurien. **Archiv F kiln Med**, v. 39, p. 524-546, 1900.

RAMBERG, P.; SEKINU, S.; UZEL, N. G.; SOCRANSKY, S.; LINDHE, J. Bacterial colonization during de novo plaque formation. **J Clin Periodontal**, Copenhagen, v. 30, p. 990-995, 2003.

RAYMOND, B. Photodynamic therapy in historial perspective. **Contemp Pharmacoter**, v. 10, p.1-14, 1999.

RIBEIRO, M. S.; GROTH, E. B.; YAMADA JUNIOR, A. M.; GARCEZ, A. S.; SUZUKI, L. C.; PRATES, R. A.; NUNEZ, S. C. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. aplicações na odontologia. **Livro virtual - 23º CIOSP**. Capítulo 07, São Paulo, 2005.

RICE, K. C.; NELSON, J. B.; PATTON, T. G.; YANG, S. J.; BAYLES, K. W. Acetic acid induces expression of the *Staphylococcus aureus* cidABC and IrgAB murein hydrolase regulator operons. **J Bacteriol**, v. 187, p. 813–821, 2005.

RICKAR, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; Handley, P. S. Bacterial coaggregation : an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, v.11, n.2, p. 94-100, 2003.

RODRIGUES, M. R. ; MACIEL, S. M. ; FERREIRA, F. B. A.; PIOVEZAN, A. ; PIERALISI, F. J. S. ; POLI-FREDERICO, R. C.; Analysis of serotypes and gene for mutacins in streptococcus mutans isolated from preschool children with different caries experiences . **Cienc Odontol Bras**, v. 11, n. 4, p. 40-46, 2008.

RUGG-GUNN, A. J, MURRAY JJ. The role of sugar in the etiology of dental caries. The epidemiological evidence. **J Dent**, v. 11, n. 3, p. 189-213, 1983 .

RUSSELL, R. R. Glucan-binding proteins of *Streptococcus mutans* serotype c. **J Gen Microbiol**, v. 112, n. 1, p. 197-201, 1979.

SAARELA, M.; ALALUUSUA, S.; TSUTOMU, T.; ASIKAINEN, S. Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an rRNA gene probe. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 3, p. 584-87, 1993.

SAARELA, M.; HANNULA, J.; MÄTTO, J.; ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol**, v. 41, n. 8, p. 821-26, 1996.

SARKAR, S.; WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. **J Periodont Res**, v.28, p.204-210, 2003.

SATO, Y.; AMAMOTO, Y.; KIZAKI, H. Cloning and sequence analysis of the *gbpc* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, v. 65, n. 2, p. 668-75, 1997.

SBORDONE, L.; BORTOLAIA, C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral to disease. **Clin Oral Invest**, v. 7, p. 181-88, 2003.

SCHAUDER, S.; SHOKAT, K.; SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum- sensing signal molecule. **Molec Microbiol**, v. 41, p. 463-476, 2001.

SCHAFER, M.; SCHMITZ, C; FACIUS, R.; HORNECK, G.; MILOW, B.; FUNKEN, K.H.; ORTNER, J. Systematic study of parameters influencing the action of rose bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. **Photochem Photobiol**, v. 71, p. 514-523, 2000.

SCHEININ, A.; MAKINEN, K. K, YLITALO K. Turku sugar studies. 5. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. **Acta Odontol Scand**, v. 34, p. 179-216, 1976.

SEGALLA, A. C. D.; BORSARELLI, S. E.; BRASLAVSKY, J. D.; SPIKES, G.; RONCUCCI, D.; DEI, G.; CHITI, G.; JORI, E. R. Photoch. Photobiol. **Sci**, v. 1, p. 641, 2002.

SENADHEERA, M. D.; GUGGENHEIM, B.; SPATAFORA, G. A.; HUANG, Y. C.; CHOI, J.; HUNG, D. C.; TREGLOWN, J. S.; GOODMAN, S. D.; ELLEN, R. P.; CVITKOVITCH, D. G. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. **J Bacteriol**, v. 187, p. 4064-4076, 2005.

SHAH, D. S; RUSSELL, R. R. A. Novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v.150, n. 6, p.1947-56, 2004.

SHIBLI, J.A.; MARTINS, M.C.; NOCITI, F.H.; GARCIA, V.G.; MARCANTONIO JR., E. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. **J Periodontol**, v.74, p.338-345, 2003.

SMITH, D. J.; AKITA, H.; KING, W. F.; TAUBMAN, M. A. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 6, p. 2545, 1994.

SMITH, D. J.; TAUBMAN, M. A. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. **Infect Immun**, v. 64, n. 8, p. 3069-73, 1996.

SMITH, D. J.; SHOUSHARI, B.; HESCHEL, R. L.; KING, W. F.; TAUBMAN, M. A. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with a catalytic subdomain of mutans group streptococcal glucosyltransferase. **Infect Immun**, v. 65, n. 11, p. 4424-30, 1997.

SMITH, D. J.; KING, W. F.; BARNES, L. A.; PEACOCK, Z.; TAUBMAN, M. A. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with putative immunodominant regions of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein B. **Infect Immun**, v. 71, n.3, p. 1179-84, 2003.

SMORAWINSKA, M.; KURAMITSU, H. K. Primer extension analysis of *Streptococcus mutans* promoter structures. **Oral Microbiol Immunol**, v. 10, p. 188-192, 1995.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. **J Periodont Res**, v. 26, p. 195-212, 1991.

SOUKOS, N. S.; XIMENES- FYVIE, L. A; HAMBLIN, M. R.; SOCRANSKY, S. S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrob Agents Chemoter**, v. 42, p. 2595-2601, 1998.

SOUKOS, N. S.; MULHOLLAND, S. E.; SOCRANSKY, S. S.; DOUKAS, A. G. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Lasers Surg. Med**, v. 33, p. 161-168, 2003.

SPRATT, D. A.; PRATTEN, J. Biofilms and the oral cavity. **Re/Views Environ Sci Bio Technol**, v. 2, p. 109-120, 2003.

STIPP, R. N. Caracterização dos padrões de expressão de glucosiltransferases b e c, da proteína ligante de glucano b e de possíveis genes reguladores em genótipos distintos de *streptococcus mutans*. **Dissertação** apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Buco-Dental, Área de Microbiologia e Imunologia, 2006.

STIPP, R. N.; GONÇALVES, R. B.; HOFLING, J. F.; SMITH, D. J.; MATTOS-GRANER, R. O. Transcriptional analysis of gtfb, gtfC and gbpB and their putative response regulators in several isolates os *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology Immunology**, v. 23, p. 466-473, 2008.

SVENSATER, G.; WELIN, J.; WILKINS, J. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p.139-46, 2001.

TENOVUO, J. Antimicrobial function of human saliva- how important is it for oral health? **Acta Odontologic Sandinavian**, v.56, p. 250-256, 1998.

TOUGER-DECKER, R.; VAN LOVEREN, C. Sugars and dental caries. **Am J Clin Nutr**, v. 78, p. 881S-92, 2003.

VALDEVITE, L.M. Estudo do efeito *in vitro* de extrato das folhas e do óleo-resina de copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, relacionados a cárie dental. **Dissertação** apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de medicamentos e cosméticos, 2007.

VANDECASTEELE, S, J.; PEETERMANS, W. E.; MERCKX, R.; VAN ELDERE, J. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during *in vitro* growth and under different conditions. **J Bacteriol**, v. 183, n. 24, p. 7094-101, 2001.

VON TAPPEINER, H.; JESIONEK, A. Zur behandlung der hautcarcinom mit fluoreszierenden stoffen. **Muench Med Wochenschr**, v. 47, p. 2042–2044, 1903.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **J Bacteriol**, v. 182, n. 10, p. 2675-9, 2000.

WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitisers in biomedicine. **Chem Soc Rev** v. 25, p.351-358, 1996.

WAINWRIGHT M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v 42, p. 13-28, 1998.

WEYN, S.; BARATIERI, L. Dentística- procedimentos preventivos restauradores. 2 ed. Rio de Janeiro: **Quintessence**, p. 1-42, 1992.

WEN, Z. T.; BURNE, R. A. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol**, v.68, p. 1196–1203, 2002.

WEXLER, D. L.; HUDSON, M. C.; BURNE, R. A. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase (ftf) and glucosyltransferase (*gtfBC*) operon fusion strains in continuous culture. **Infect Immun**, v. 61, p. 1259-1267, 1993.

WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; COLLES, M. J.; WILSON, M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, v. 37, p. 190-3, 2003.

WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; COLLES, M. J.; WILSON, M. The photo-activated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine. **Caries Res**, v. 38, p. 530-536, 2004.

WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol**, v. 25, n. 2, p. 77-81, 1992.

WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J Appl Bacteriol**, v. 75, n. 4, p. 299-306, 1993.

WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilmes using a light-activated antimicrobial agent. **J Antimicrobial Chemother**, v. 37, n. 2, p. 377-81, 1996.

WILSON, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy or oral infections. **Photochem. Photobiol**, v. 3, p. 412-8, 2004.

WOOD, D.; BOWEN, W. H. Effects of antibodies to glucosyltransferase on soluble and insolubilized enzymes. **Oral Dis London**, v. 6, p. 286-296, 2000.

WOOD, S.; NATTRESS, B.; KIRKHAM, J.; SHORE, R.; BROOKES, S.; GRIFFITHS, J. *et al.* An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilmes formed *in vivo*. **J Photochem Photobiol B**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 1999.

WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, p. 680-684, 2006.

YAMADA, J. A. M; Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica em periodontite induzida em ratos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2007.

YAMASHITA, Y.; TSUKIOKA, Y.; NAKANO, Y.; SHIBATA, Y.; KOGA, T. Molecular and genetic analysis of multiple changes in the levels of production of virulence factors in a subcultured variant of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 144, p. 81-87, 1996.

YOSHIDA, A.; MERRITT, J.; KURAMITSU, H. K. Role of the *Streptococcus mutans luxS* gene in biofilm formation. In: 102nd **General Meeting of the American Society for Microbiology**. Salt Lake City, UT: American Society for Microbiology, p. 161, 2002.

YOSHIDA, A.; KURAMITSU, H. K. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a *gtfB* promoter-green fluorescent protein (*PgtfB::gfp*) construct to monitor development. **Microbiology**, v. 148, p. 3385-3394, 2002.

ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA, J. R. A.; GONÇALVES, R. B. *In vitro* study of bactericidal effect of low level laser therapy in the presence of photosensitizer on cariogenic bacteria. **Lasers in Dentistry VIII**, v. 3, n. 2, p. 154-161, 2002.

ZANIN, I. C.; GONÇALVES, R. B.; JUNIOR, A. B.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 2, p. 324-30, 2005.

ZANIN, I. C.; LOBO, M. M.; RODRIGUES, L. K.; PIMENTA, L. A.; HOFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **Eur J Oral Sci**, v. 114, n. 1, p. 64-9, 2006.

ZERO, D. T.; FU, J.; ANNE, K. M.; CASSATA, S.; McCORMACK, S. M.; GWINNER, L. M. Na improved intra oral enamel desmineralization test model for the study of dental caries. **J Dent Res**, v.71, p.871-878, 1992.

ZERO, D. T. Sugars – The arch criminal? **Caries Res**, v. 38, p.277-85, 2004.

ZEZELL, D.M. Efeito Raman, luminescência e absorção óptica de hematoporfirina e seus derivados, de interesse para terapia de câncer por fotorradiação(Mestrado). Universidade Estadual de Campinas (1987).

ZEZELL, D.M. Processos para monitoração e otimização da Terapia Fotodinâmica de tumores (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas (1991).