

II Simpósio de Pesquisa do Ecosistema Ânima:
Juntos pelo Conhecimento: um novo saber cria um novo amanhã

**ANÁLISE DA BIOMASSA DE BIOFILME MICROBIANO MULTIESPÉCIE E DA
MICRODUREZA DENTINÁRIA APÓS IRRADIAÇÃO IONIZANTE**

Tainara Hawerth 1; Dr^a Josiane de Almeida 2 (orientadora)

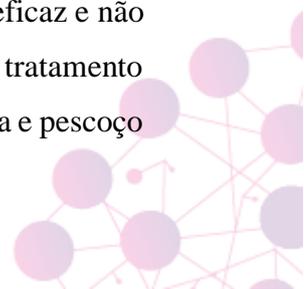
RESUMO:

A radioterapia é utilizada como modalidade de tratamento para uma ampla gama de tumores. Apesar de altamente eficaz, além das células neoplásicas outras células também são atingidas, portanto, os efeitos colaterais da radioterapia têm impacto nas estruturas próximas a esta região, como os dentes. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a radiação ionizante promove alteração na biomassa do biofilme microbiano multiespécie e na microdureza dentinária pós biofilme. Dez dentes incisivos bovinos foram segmentados em discos de dentina totalizando 30 amostras e divididos em dois grupos experimentais de acordo com a dose de radiação. A microdureza inicial das amostras (D0) foi obtida. Em seguida, um biofilme de 21 dias foi formado sobre as amostras. Após este período, os espécimes foram corados com cristal violeta 0,01% e a biomassa do biofilme foi quantificada. Posteriormente o teste de microdureza dentinária (D1) foi novamente conduzido. Os testes estatísticos apropriados foram aplicados ($\alpha = 0,05$). A radiação ionizante favorece a biodegradação dentinária após biofilme afetando a sua dureza, além de contribuir para uma maior biomassa do biofilme microbiano.

INTRODUÇÃO:

A radioterapia é utilizada como modalidade de tratamento para uma ampla gama de tumores (Dijk et al., 2020). Sua utilidade no tratamento do câncer de cabeça e pescoço é indiscutível (Dijk et al., 2020), podendo ser realizada em combinação com a cirurgia e a quimioterapia (Rodrigues et al., 2018). A localização e o tipo de tumor determinam tanto o melhor método de tratamento, como a dose de radiação necessária (Rodrigues et al., 2018). Normalmente, o núcleo do tumor recebe uma dose total de 50 a 70 Gy, fracionadas diariamente, por um período de 5 a 7 semanas (Jham; da Silva Freire, 2006).

O alvo da radiação é a molécula de DNA das células neoplásicas, que se encontram em estágio de maior atividade mitótica (Haddad et al., 2008). Apesar de ser um tratamento altamente eficaz e não invasivo, outras células, além das neoplásicas, também são atingidas durante o tratamento (Rodrigues et al., 2018). Portanto, os efeitos colaterais da radioterapia na região de cabeça e pescoço



têm impacto determinante nas estruturas próximas a esta região, como glândulas, ossos, tecidos moles e dentes (Ray-Chaudhuri et al., 2013).

A dentina é uma estrutura altamente afetada pela radioterapia (Rodrigues et al., 2018). A radiação ionizante produzida durante o tratamento radioterápico gera severa desidratação, levando à formação de trincas e fissuras ao redor dos túbulos dentinários, e destruição dos prolongamentos odontoblásticos (Rodrigues et al., 2018, Velo et al., 2018). Além disso, ocorre degradação das fibrilas colágenas e alterações no conteúdo orgânico que compõe o substrato (Rodrigues et al., 2018, Velo et al., 2018), tornando-a fragilizada (Rodrigues et al., 2018) e, possivelmente, mais susceptível à fratura. Além disso, a radiação ionizante é responsável pela formação de radicais livres e liberação de íons, dentre os quais, os íons fosfato (Rodrigues et al., 2018), que podem se agregar à estrutura do biofilme, tornando-o ainda mais resistente e aderido à dentina intrarradicular (Venegas et al., 2006). A presença de íons cálcio no biofilme aumenta a agregação celular, uma vez que esta é estabelecida através de pontes de cálcio (Venegas et al., 2006). As alterações na estrutura dentinária aumentam a sua rugosidade, afetando a interação dos microrganismos com a superfície do substrato (Teughels et al., 2006). Uma superfície dentinária desmineralizada garante maior força de adesão aos microrganismos aderentes do que a dentina hígida, em decorrência da exposição das fibrilas colágenas (Mayrand et al., 1985, Xu et al., 2019). O *Enterococcus faecalis*, por exemplo, apresenta proteínas de ligação ao colágeno, serina protease e gelatinase (Hubble et al., 2003), que são fatores potenciais de virulência, e que lhe conferem grande capacidade de se ligar mais facilmente à dentina (Hubble et al., 2003, Xu et al., 2019). Os microrganismos, quando presentes na dentina intrarradicular hígida, são capazes de dissolvê-la (Eick, 2021), promovendo a precipitação de hidroxiapatita, cujos íons cálcio servirão de substrato primário para a adesão bacteriana e formação de biofilme (Ozdemir et al., 2010). Tal processo leva a alterações profundas na estrutura dentinária, tornando-a mais frágil e com aspecto mais erodido (Buzalaf et al., 2015). Consequentemente, é possível hipotetizar que a radioterapia, além de fragilizar o substrato dentinário, também contribua para o estabelecimento de um biofilme mais estruturado e complexo, o qual, por sua vez, poderá exacerbar ainda mais o processo de erosão. Contudo, a literatura ainda não evidenciou tais achados. Tendo em vista a escassez de estudos relacionados às consequências da radioterapia sobre a estrutura dentinária e sua relação com a formação do biofilme, surge a seguinte questão de pesquisa: “A radiação ionizante promove alteração na biomassa do biofilme microbiano multiespécie e na microdureza dentinária?”



PALAVRAS-CHAVE:

Biomassa, biofilme, radioterapia.

MÉTODO:

Tipo de estudo: Estudo experimental *ex vivo*.

Aspectos Éticos: O presente projeto de pesquisa foi construído em conformidade com a Lei Federal 11.794, de 8/10/2008. Os dentes bovinos foram adquiridos no Frigorífico “Carnes e Vinhos Moreira”, razão social “Comércio de Carnes e Vinhos Moreira Ltda – Epp”. O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unisul, para apreciação. As atividades foram iniciadas somente após a aprovação do trabalho pelo CEUA. O Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON), aonde os discos de dentina foram irradiados, assim como a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foi realizado o teste de microdureza, institutos com os quais já se mantém parceria, não necessitam de aprovação em comitê de ética, visto que os dentes a serem empregados são bovinos.

Critério de inclusão e exclusão: Não se aplica.

Preparo dos espécimes: Dez dentes incisivos bovinos foram utilizados nesse estudo, os quais foram armazenados em solução de formol 10% à 37°C até o início do experimento. Os dentes tiveram suas coroas e a porção apical removidas com o auxílio de um disco diamantado dupla-face sob refrigeração constante, de forma a se obter segmentos radiculares de aproximadamente 20 mm de comprimento. O tecido pulpar foi extirpado com o auxílio de limas e extirpa-nervos, sob irrigação constante de 5 mL de soro fisiológico 0,85%. Em seguida, os segmentos radiculares foram seccionados, com o auxílio de um disco diamantado, onde foram obtidos discos de dentina (4 mm altura x 4 mm largura x 2 mm espessura), totalizando 30 amostras. As amostras foram lixadas, sob irrigação constante e polidas com pastas à base de alumina com granulação decrescente (0,3; 0,1 e 0,05 µm) em discos de pano para polimento. Entre o uso de cada lixa e pasta, as amostras foram cuidadosamente lavadas em água corrente. Ao final, os discos foram imersos em banho ultrassônico contendo solução de EDTA à 17%, seguido de solução de NaOCl à 1%, ambos por 3 minutos, para

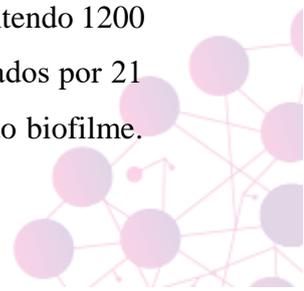


remoção da lama dentinária. Em seguida, o primeiro teste de microdureza (D0) foi realizado, conforme descrito a seguir.

Grupos experimentais: Após a primeira avaliação da microdureza, as amostras foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais ($n = 15$): G1) dentina hígida (não irradiada) e G2) dentina irradiada com 70 Gy. Os discos de dentina irradiados foram submetidos a um acelerador linear, pela técnica de radioterapia de intensidade modulada (IMRT) com colimadores dinâmicos (Dynamic Multileaf Collimator - DMLC). A irradiação foi realizada no Departamento de Radioterapia do CEPON, Florianópolis, SC; sob a responsabilidade e supervisão de pessoal específico, utilizado um acelerador linear (Clinac 2100C; Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, EUA). Os espécimes foram completamente imersos em água destilada e deionizada dentro de um suporte plástico, alinhado e equidistante a partir da fonte emissora de radiação, garantindo uma distribuição padronizada das doses (400 UM/min). A irradiação dos dentes seguiu o protocolo do CEPON para o tratamento de CCP, com 6MV de energia (fótons) e administração total de 70 Gy, fracionados em 2 Gy diários, 5 dias por semana, durante 7 semanas (YAMIN et al., 2018). Finalizado cada ciclo de irradiação, a água destilada e deionizada foi substituída por saliva artificial e os dentes mantidos à 37°C para simular as condições orais. A cada novo ciclo de irradiação, a saliva artificial foi substituída por água destilada e deionizada. Finalizada a etapa de irradiação, os dentes foram novamente armazenados em saliva artificial a 37°C até o uso.

Espécies microbianas e condições de crescimento: Foram utilizadas as espécies microbianas anaeróbias facultativas *S. mutans* (ATCC 25175), *E. faecalis* (ATCC 29212) e *C. albicans* (ATCC 10231). Os microrganismos foram coletados de um estoque a -80°C. Uma cultura fresca de cada espécie foi obtida por meio da incubação overnight de 500 μ L do estoque em 10 mL de meio caldo Brain Heart Infusion (BHI), pH 7,1, contendo glicose 0,2%, em aerobiose a 37° para *E. faecalis* e *S. mutans* e a 30°C para *C. albicans*. Previamente ao início do experimento, a densidade óptica de cada cultura foi corrigida para DO600 \approx 0,5.

Formação do biofilme: Previamente à formação do biofilme, os discos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 24 minutos. Após, foram acondicionados em tubos Eppendorf contendo 1200 μ L de inóculo da cultura mista (1:100 (CF \approx 106 UFC/MI). Os espécimes foram incubados por 21 dias, com renovação diária do meio, em condições aeróbicas a 37°C para a formação do biofilme.



Ao final, para a remoção das células microbianas não aderentes, as amostras foram transferidas para novos tubos Eppendorf com 1200 μ L de solução tampão fosfato-salino (PBS).

Análise da biomassa do biofilme: Após o período de incubação, o biofilme formado sobre a dentina radicular foi corado com cristal violeta 0,01% por 10 min. Para isto, os discos de dentina foram removidos dos tubos Eppendorf contendo PBS e imersos em 1 mL de solução de cristal violeta, contida em poços de uma placa de cultura de 48 poços. Em seguida, os discos foram imersos, consecutivamente, por três vezes, em outros tubos Eppendorf contendo PBS, para a remoção do excesso do corante. Após, o cristal violeta foi solubilizado, por meio da imersão dos discos de dentina em 1 mL de deoxicolato de sódio 2%, contido nos poços de uma placa de cultura de 48 poços. Quatro alíquotas de 200 μ L da solução corada obtida e removidas de cada poço e adicionada aos poços de uma placa de 96 poços. Após, a quantificação do biofilme foi realizada por meio da mensuração da absorvância a 608 nm.

Teste de microdureza: As amostras foram submetidas ao teste de microdureza utilizando um microdurômetro Knoop (Buehler). Neste teste, a microdureza inicial da dentina de cada amostra, designada “D0” (controle), foi calculada pela média de 3 indentações nas distâncias de 150 μ m aplicadas com carga de 50g por 10 segundos. A área das superfícies dos recortes foi medida usando um microscópio óptico (Shimadzu HMV2, aumento 400 X) e o programa Newage C.A.M.S (Computer Assisted Measurement System; Newage Testing Instruments, Inc., Southampom, PA, EUA). O valor de microdureza para cada amostra foi considerado como uma média desses 3 pontos. Após a realização do teste colorimétrico com cristal violeta, as amostras foram submetidas à segunda avaliação da microdureza “D1”. O cálculo para “D1” seguiu o mesmo protocolo utilizado na obtenção da dureza inicial (D0).

Análise estatística: Considerando dados paramétricos, para a análise da biomassa do biofilme foram aplicados os testes One way anova e *post hoc* Tukey e para o teste de microdureza, o Teste *t* pareado. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software SPSS versão 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA).



RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A tabela 1 mostra os valores de biomassa do biofilme formada nos diferentes tipos de dentina, hígida e irradiada com 70 Gy. A maior quantidade de biomassa do biofilme foi evidenciada na dentina irradiada com 70 Gy, comparada com a biomassa formada na dentina hígida ($P < 0,001$), na qual foi observada a menor quantidade.

Tabela 1. Quantificação da massa de biofilme multiespécie formada sobre os dentes e coloração com cristal violeta através da densidade ótica (OD).

Dentina	Biomassa do biofilme (DO620 nm) \pm DP
Hígida	$0,026467 \pm 0,00807^a$
Irradiada 70 Gy	$0,063021 \pm 0,0103756^b$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa.

Os valores de microdureza Knoop da dentina hígida e irradiada com 70 Gy após 21 dias de formação de biofilme multiespécie, são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão (DP) da microdureza Knoop da dentina hígida e irradiada com 70 Gy após 21 dias de formação de biofilme multiespécie.

Dentina	Microdureza	
	D0	D1
Hígida	$29,55 \pm 6,57$	$18,88 \pm 5,22^*$
Irradiada 70 Gy	$39,93 \pm 6,27$	$14,42 \pm 2,38^*$

(*) na mesma linha indica diferença significativa entre D0 e D1.

Após 21 dias de biofilme foi observado uma redução significativa na microdureza da dentina hígida e irradiada com 70 Gy ($p < 0,001$). Uma redução na microdureza aproximadamente duas vezes maior foi observada nos dentes irradiados. Os dentes são frequentemente expostos a doses cumulativas de irradiação durante a radioterapia dos tumores de cabeça e pescoço. Devido as alterações nas fases orgânicas e inorgânicas, a dentina é severamente afetada pela irradiação. Dentre essas alterações podemos citar mais especificamente a diminuição dos íons cálcio (Ca) e fósforo (P) (Velo et al.,

2018). A razão Ca/P determina a taxa de mineralização da hidroxiapatita, parâmetro diretamente relacionado com as propriedades mecânicas do substrato dentinário e a sua taxa de biodegradação (Slosarczyk et al., 1999). Valores mais baixos do peso Ca/P indicam que a estrutura da dentina radicular irradiada é menos mineralizada, ou seja, a irradiação é capaz de tornar a hidroxiapatita mais suscetível à degradação (Celik et al., 2008). Essas alterações na estrutura dentinária podem ter um impacto adicional na formação do biofilme e na microdureza da dentina após biofilme, como visto no presente estudo.

Durante a formação do biofilme, os microrganismos são capazes de dissolver a estrutura dentinária devido a liberação de ácidos e de induzir à precipitação de carbonato de cálcio e fosfato de cálcio. O cálcio quando incorporado a estrutura do biofilme, é capaz de levar a um aumento na resistência coesiva do biofilme e, conseqüentemente, na sua estabilidade (Ahimou et al., 2007). Além disso, a extensão do acúmulo de biofilme pode aumentar com o aumento da concentração de cálcio (Patrauchan et al., 2005). Portanto, as alterações na dentina irradiada com 70 Gy podem ter contribuído para um aumento na concentração de íons e, hipoteticamente, no número de microrganismos, levando à uma maior biomassa do biofilme, além de diminuir significativamente a dureza da estrutura dentinária pós biofilme.

CONCLUSÕES:

Com base no presente estudo, pode-se concluir que a radiação ionizante favorece a biodegradação dentinária após biofilme afetando a sua dureza, além de contribuir para uma maior biomassa do biofilme microbiano.



REFERÊNCIAS:

AHIMOU, FRANCOIS.; SEMMENS, MICHAEL J.; NOVAK, PAIGE J.; HAUGSTAD, GREG. Biofilm Cohesiveness Measurement Using a Novel Atomic Force Microscopy Methodology. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 73, n. 9, p. 2897-2904, maio 2007.

BUZALAF, M. A. R.; CHARONE, S.; TJÄDERHANE, L. Role of Host-Derived Proteinases in Dentine Caries and Erosion. **Caries Research**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 30-37, 2015.

ÇELIK, E. U.; ERGÜCÜ, Z.; TÜRKÜN, L. S.; TÜRKÜN, M. Effect of Different Laser Devices on the Composition and Microhardness of Dentin. **Operative Dentistry**, [S.L.], v. 33, n. 5, p. 496-501, 1 jan. 2008.

HADDAD, R.; ANNINO, D.; TISHLER, R. B. Multidisciplinary Approach to Cancer Treatment: focus on head and neck cancer. **Dental Clinics Of North America**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 1-17, jan. 2008.

HUBBLE, T. S.; HATTON, J. F.; NALLAPAREDDY, S. R.; MURRAY, B. E.; GILLESPIE, M. J. Influence of Enterococcus faecalis proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 121-126, 21 mar. 2003.

JHAM, B. C.; FREIRE, A. R. S. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, [S.L.], v. 72, n. 5, p. 704-708, out. 2006.

JUNGBAUER, G.; MOSER, D.; MÜLLER, S.; PFISTER, W.; SCULEAN, A.; EICK, S. The Antimicrobial Effect of Cold Atmospheric Plasma against Dental Pathogens—A Systematic Review of In-Vitro Studies. **Antibiotics**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 211, 20 fev. 2021.

MAYRAND, D.; GRENIER, D. Detection of collagenase activity in oral bacteria. **Canadian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 134-138, 1 fev. 1985.



NASER, M. A.; VAN DIJK, L. V.; HE, Renjie; WAHID, K. A.; FULLER, C. D. Tumor Segmentation in Patients with Head and Neck Cancers Using Deep Learning Based-on Multi-modality PET/CT Images. **Head And Neck Tumor Segmentation**, [S.L.], p. 85-98, 2021.

OZDEMIR, H. O.; BUZOGLU, H. D.; ÇALT, S.; ÇEHRELI, Z. C.; VAROL, E.; TEMEL, A. Chemical and Ultramorphologic Effects of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite in Young and Old Root Canal Dentin. **Journal Of Endodontics**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 204-208, fev. 2012.

PATRAUCHAN, M. A.; SARKISOVA, S.; SAUER, K.; FRANKLIN, M. J. Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine Pseudoalteromonas sp. **Microbiology**, v. 151, n. 9, p. 2885-2897, 1 set. 2005.

RAY-CHAUDHURI, A.; SHAH, K.; PORTER, R. J. The oral management of patients who have received radiotherapy to the head and neck region. **British Dental Journal**, [S.L.], v. 214, n. 8, p. 387-393, 26 abr. 2013.

RODRIGUES, R. B.; SOARES, C. J.; SIMAMOTO JUNIOR, P. C.; LARA, V. C.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; NOVAIS, V. R. Influence of radiotherapy on the dentin properties and bond strength. **Clinical Oral Investigations**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 875-883, 4 ago. 2017.

SLOSARCZYK A; PIEKARCZYK J. Ceramic materials on the basis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate. **Ceram Int**, v. 25, n. 6, p. 561–565, 1999.

TEUGHELS, W.; VAN ASSCHE, N.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clinical Oral Implants Research**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 68-81, out. 2006.

VELO, M. M. A. C. et al. **Controle da cárie de radiação em pacientes submetidos à radioterapia de cabeça-e-pescoço: estudo controlado randomizado**. Brazilian Oral Research. São Paulo: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.



VENEGAS, S.C.; PALACIOS, J.M.; APELLA, M.C.; MORANDO, P.J.; BLESA, M.A. Calcium Modulates Interactions between Bacteria and Hydroxyapatite. **Journal Of Dental Research**, [S.L.], v. 85, n. 12, p. 1124-1128, dez. 2006.

XU, J. et al. Influence of Endodontic Procedure on the Adherence of Enterococcus faecalis. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 7, p. 943-949, 2019.

FOMENTO

O trabalho teve a concessão de Bolsa pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

