

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

FERNANDA MARIA PRADO BRAGA

**“Influência da Terapia Fotodinâmica sobre a interação
Yersinia enterocolitica-célula hospedeira”**

São José dos Campos, SP

2007

FERNANDA MARIA PRADO BRAGA

**“Influência da Terapia Fotodinâmica sobre a interação
Yersinia enterocolitica-célula hospedeira”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof^ª. Dra. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos, SP

2007

B794a

Braga, Fernanda Maria Prado

Influência da Terapia Fotodinâmica sobre a interação *Yersinia enterocolitica*-célula hospedeira/ Fernanda Maria Prado Braga. São José dos Campos: UniVap, 2007.

1 disco laser, color

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Engenharia biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

1. *Yersinia enterocolitica* 2. Fagocitose 3. Fotoquimioterapia I. Soares, Cristina Pacheco, Orient., II. Título

CDU: 615.831

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Aluno: *Fernanda Maria Prado Braga*

Data: *06/09/07*

“Influência da Terapia Fotodinâmica sobre a interação *Yersinia enterocolitica*-célula hospedeira”

Fernanda Maria Prado Braga

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. **MARICÍLIA SILVA COSTA** (UNIVAP) Maricélia Costa

Prof^ª. Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP) Cristina Pacheco Soares

Prof. Dr. **MARCELO DE CASTRO PAZOS** (UNIFESP) Marcelo de Castro Pazos

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

Dedico este trabalho

*Aos meus queridos pais, **Aguinaldo Guimarães Braga** e **Marlene Prado Braga**, por todo amor, carinho, dedicação e atenção em todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu irmão, **Aguinaldo Guimarães Braga Júnior**, pelo carinho e por ser meu verdadeiro amigo.*

*Ao meu amor, **Leandro Procópio Alves**, um presente de Deus. Uma pessoa maravilhosa, presente e companheiro, pelo incentivo, amor, carinho, paciência e pelo apoio para lutar por esta etapa da minha vida.*

*E dedico ainda, à duas pessoas inesquecíveis, minhas irmãs, **Fabiana Prado Braga** e **Flávia Aparecida Prado Braga**, que mesmo não estando aqui próximas de mim, sei que de onde estiverem sempre estarão me dando forças, amo muito vocês!!*

Muito Obrigada!!!!

Vocês são tudo pra mim!!!!

Nanda

Agradecimentos

À *Deus* e *Nossa Senhora de Fátima* pois tudo de bom que acontece em minha vida são bênçãos recebidas.

Em especial à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cristina Pacheco Soares, por ter me acolhido em seu laboratório com muito carinho e atenção, agradeço pela imensa ajuda e orientação em todo este percurso.

Agradeço ao Prof. Dr. Newton Soares, por toda a atenção e pela grande ajuda na concessão da minha bolsa de estudos.

À amiga de todas as horas, Aline Helena Araujo Machado, por sempre me incentivar, dando conselhos, força e auxílio na realização deste trabalho.

À todos os meus familiares, pelo amor e carinho, mesmo que distante.

À todos os colegas do Laboratório que de alguma forma contribuíram com o meu trabalho.

À CAPES, pela minha bolsa de estudos.

Muito obrigada.

*“Quando passamos por um lugar e seguimos,
não seguimos sós....*

*Deixamos um pouco de nós mesmos
e levamos um pouco de alguém.*

*Há os que levaram muito,
mas não há os que não deixaram nada.*

*Essa é a maior responsabilidade de nossa vida
e a prova de que duas almas não se encontram por acaso”.*

(Saint-Exupéry)

“Influência da Terapia Fotodinâmica sobre a interação *Yersinia enterocolitica*-célula hospedeira”

Resumo

Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica relativamente nova aplicada tanto para doenças neoplásicas, quanto não neoplásicas, que requer exposição de células ou tecidos a um fármaco fotossensibilizante não tóxico agindo após irradiação com luz visível de comprimento de onda apropriado. Uma das aplicações da TFD é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA). Esta é uma técnica recentemente desenvolvida, que segue princípios semelhantes ao da TFD, capaz de destruir patógenos microbianos no tratamento de infecções localizadas. O presente trabalho teve por objetivo analisar a interação entre *Yersinia enterocolitica* após TFDA tendo como fotossensibilizante Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS₄), com a linhagem celular J774. A cultura bacteriana *Yersinia enterocolitica* foi incubada por 1 hora com AIPcS₄, irradiada com laser ($\lambda=660\text{nm}$) e interagida com macrófagos J774 por 24 e 48 horas, sendo analisadas através da microscopia óptica e de fluorescência a interiorização e adesão bacteriana, e eletroforese para acompanhar a alteração no DNA genômico. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar uma significativa redução do número de bactérias *Yersinia enterocolitica* quando estas foram interagidas com macrófagos J774 após a terapia fotodinâmica antimicrobiana. Tal redução não foi observada nos demais grupos, os quais apresentaram um elevado número de bactérias. A análise do material demonstrou que o DNA bacteriano apresenta-se íntegro após a TFDA, não sendo observado danos referentes a fragmentação do DNA.

Palavras chaves: Terapia Fotodinâmica, Laser, Fotossensibilizante, *Yersinia enterocolitica*.

“Photodynamic Therapy influence about the interaction host cell *Yersinia enterocolitica*”

Abstract

Photodynamic Therapy (PDT) is a relatively new therapeutic modality for neoplastic and non-neoplastic diseases that requires exposure of cells or tissues to a non-toxic photosensitizing drug after irradiation with visible light of appropriate wavelength. One of the PDT applications is the Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT). This is a recently developed technique, which follows principles similar to those of PDT, capable of destroy pathogens microbes in the treatment of localized infections. The aim of the present work was to analyze the interaction between *Yersinia enterocolitica*, after APDT with photosensitizing tetrasulfonated phthalocyanine alluminum (AlPcS₄), with J774 cell strains. The *Yersinia enterocolitica* bacteria culture was incubated for 1 hour with AlPcS₄, irradiated with laser ($\lambda=660\text{nm}$) and interacted with J774 macrophages for 24 and 48 hours, being analyzed through of optical and Fluorescence Microscopy the internalize and adhesion bacterial and eletrophoresis to register changes on the genomic DNA. According to the results, could be observed a significant reduction of the *Yersinia enterocolitica* bacteria number when these were interacted with J774 macrophages after Antimicrobial Photodynamic Therapy. This significance was not observed in the others groups, which presented a high number of bacteria. Analysis of the material showed intact bacterial DNA after APDT. No DNA fragmentation was observed.

Keywords: Photodynamic Therapy, Lasers, Photosensitizer, *Yersinia enterocolitica*.

Lista de Figuras, Gráficos e Tabelas

Figura 1: Diagrama de Jablonski. Os estados singletos e tripletos estão representados por S e T, respectivamente. (20)	4
Figura 2: Representação esquemática da TFDA.	6
Figura 3: Atividade imunitária do intestino delgado.	12
Figura 4: Imagem representativa do processo de contagem do número de bactérias.	23
Figura 5: Fotomicrografias da interação <i>Yersinia enterocolitica</i> – linhagem celular J774 com marcador fluorescente DAPI dos grupos estudados para o tempo de 24 horas..	27
Figura 6: Fotomicrografias da interação <i>Yersinia enterocolitica</i> – linhagem celular J774 com marcador fluorescente DAPI dos grupos estudados para o tempo de 48 horas..	28
Figura 7: Extração de DNA bacteriano.	29
Gráfico 1: Curva de crescimento bacteriano	22
Gráfico 2: Contagem média de bactérias para o tempo de 24 horas.	25
Gráfico 3: Contagem média de bactérias para o tempo de 48 horas.	25
Tabela 1: Parâmetros do laser	18

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AlPcS₄: alumínio ftalocianina tetrasulfonada

BHI: caldo infusão de cérebro e coração

CCV: concentração de células vermelhas

cm²: centímetros quadrados

°C: grau centígrado

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

DE: densidade de energia

DMEM: dulbecco's modified eagle media

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etilenodiamínicotetraacético sal dissódico

EROS: espécies reativas de oxigênio

g: grama

Hp: hematoporfirinas

HpD: derivados de hematoporfirinas

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

J: joules

J774: macrófagos de camundongo Balb-C

l: litro

MgCl₂: cloreto de magnésio

M: molar

mg: miligrama

mm: milímetro

mM: milimolar

ml: mililitro

mW: miliwatts

μ l: microlitro

μ M: micromolar

NaCl: cloreto de sódio

Nd:YAG: *Neodymium-Yttrium-Aluminium-Garnet*

nm: nanômetro

$^1\text{O}_2$: oxigênio singleto

$\text{O}_2(^1\Delta_g)$: oxigênio singleto molecular

PA: paraformaldeído

PBS: salina tampão fosfato

PHEM: salina tampão

RPM: rotações por minuto

SFB: soro fetal bovino

S_{00} : estado fundamental

S_{nv} : estado singleto

T_{nv} : estado tripleto

TFD: terapia fotodinâmica

TFDA: terapia fotodinâmica antimicrobiana

UV: ultra violeta

VSV: vírus estomatite vesicular

Y.: *Yersinia*

λ : comprimento de onda

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo Geral	2
2.2 Objetivos Específicos	2
3 REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)	3
3.2 LASER	6
3.3 FOTOSSENSIBILIZANTES	8
3.4 YERSINIA ENTEROCOLITICA	9
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Linhagem celular	14
4.2 Cepa Bacteriana	14
4.3 Meio de Cultura para linhagem de Macrófago – J774 (GibcoBRL)	14
4.4 Meio de Cultura para cepa Yersinia enterocolitica	14
4.5 Soro Fetal Bovino (SFB)	15
4.6 Tampão Fosfato 0,1M	15
4.7 Salina Tampão Fosfato	15
4.8 Tampão PHEM	15
4.9 Triton X-100	16
4.10 Tripsina	16
4.11 Paraformaldeído	16
4.12 DAPI	16
4.13 N-propil-galato	16
4.14 Fotossensibilizante	17
4.15 GIEMSA	17
4.16 Cultivo da linhagem de Macrófago – J774	17
4.17 Cultivo de Yersinia enterocolitica	17
4.18 Curva de crescimento de Yersinia enterocolítica	18
4.19 Incubação e irradiação de Yersinia enterocolitica com AlPcS4	18
4.20 Interação de Yersinia enterocolitica- Macrófago J774 após Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com AlPcS4	19
4.21 Coloração GIEMSA	20
4.22 Microscopia de Fluorescência	20
4.23 Extração de DNA bacteriano	21
4.24 Eletroforese em Gel de Agarose	21
5 RESULTADOS	22
5.1 Curva de crescimento de Yersinia enterocolitica em um intervalo de tempo de 30 minutos no período de 12 horas	22
5.2 Contagem do número de bactérias após interação de Yersinia enterocolitica com Macrófago J774 após os períodos de incubação através da coloração de GIEMSA.	23
5.3 Análise da interação de Yersinia enterocolitica com Macrófago J774 após TFDA com diferentes tempos de incubação pela técnica de Microscopia de Fluorescência.	26
5.4 Extração de DNA bacteriano	29
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento alternativo para o câncer, no qual um agente fotossensibilizante é administrado seguido por exposição a luz com um comprimento de onda específico. A interação entre o fotossensibilizante e o oxigênio molecular produz o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), bem como outras espécies reativas de oxigênio (EROs). **(1, 2)**

Embora os efeitos bactericidas da terapia fotodinâmica sejam conhecidos a bastante tempo, apenas recentemente o interesse em seu uso prático vem aumentando. **(3)**

A TFD tem sido proposta como uma terapia antimicrobiana alternativa para combater ascensão mundial na resistência antibiótica de microorganismos patogênicos. **(4)**

O aumento da ocorrência da resistência microbiana aos antibióticos vêm conduzindo uma extensa procura aos métodos alternativos de destruição de patógenos e tratamentos de infecções. **(5)**

As bactérias Gram-negativas são significativamente resistentes à maioria dos fotossensibilizantes comumente utilizados na TFD de tumores, porém esta resistência é superada pela modificação da parede ou pela seleção de drogas fotossensibilizantes apropriadas. **(3, 6)** *Yersinia enterocolitica* é uma bactéria Gram-negativa, pleomorfa e anaeróbica facultativa. **(7)** Infecções clínicas humanas resultam da ingestão de comida ou água contaminada com *Yersinia enterocolitica* ou pela inoculação direta através de transfusão sanguínea. No trato gastrointestinal, *Yersinia enterocolitica* pode causar enterite aguda (especialmente em crianças), enterocolite, linfadenite mesentérica e doenças terminais. **(8)**

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo analisar a interação entre *Yersinia enterocolitica*, após a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA), com a linhagem celular J774.

2.2 Objetivo Específico

Verificar a perda de invasividade e sobrevivência de *Yersinia enterocolitica* após incubação com Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄) e tratamento Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

Desde o início do século, têm-se discutido o emprego de corantes como fármacos. Determinados corantes têm sido empregados como agentes terapêuticos, como é o caso do azul de metileno, que possui ações bacteriostáticas, violeta de genciana (cristal violeta), dentre muitos outros. Raab, em 1900, observou a morte de microorganismos quando expostos à luz solar e ao ar, na presença de certos corantes. O que Raab reportou é o princípio de uma nova modalidade clínica para o tratamento do câncer e de outras moléstias, a Terapia Fotodinâmica (TFD). **(9, 10)**

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica aplicada tanto para doenças neoplásicas quanto não neoplásicas, **(11)** que requer exposição de células ou tecidos a um fármaco fotossensibilizante não tóxico agindo sistemicamente ou localmente, **(12)** após irradiação com luz visível de comprimento de onda apropriado, geralmente na região vermelho ou infravermelho próximo e compatível com o espectro de absorção do fármaco que na presença de oxigênio irá gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), **(13, 14, 15, 16, 17, 18, 19)** como oxigênio singlete e superóxido que são tóxicos para a célula destruindo constituintes celulares como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando à morte celular.**(5)** Com a irradiação, o fotossensibilizante absorve energia suficiente para deixar o estado fundamental (S_{00}) e alcançar o estado excitado, denominado estado singlete (S_{nv}). A molécula se encontra em um estado com excesso de energia e se ela não sofrer nenhuma reação ou “degradação”, irá encontrar alguma forma de perder esta energia e retornar ao estado fundamental (S_{00}) **(20)**, geralmente emitindo luz ou calor, ou ainda podendo realizar um cruzamento intersistema, passando a um estado intermediário, denominado estado tripleto (T_{nv}), neste estado ocorre emissão de elétrons que reagem com o oxigênio formando EROs (Figura 1). Os EROs podem ser gerados por dois tipos de reações**(21)**, reações tipo I ou tipo II. Em uma reação tipo I típica, a transferência direta de elétron do fotossensibilizante para um substrato ocorre pela geração de diferentes tipos de espécies reativas, após são interceptados por produtos do oxigênio que geram oxidação, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical

superóxido ou radical hidroxila. Em um tipo II de reação, o fotossensibilizante excitado reage diretamente com o oxigênio molecular podendo então reagir com oxigênio tripleto normal para produzir o oxigênio singleto (1O_2) quando o fotossensibilizante retorna para seu estado fundamental, o estado singleto. Este oxigênio singleto altamente reativo inicia mais adiante reações oxidativas em um ambiente fechado, como a parede celular bacteriana, membrana lipídica, enzimas ou ácidos nucleicos. (22)

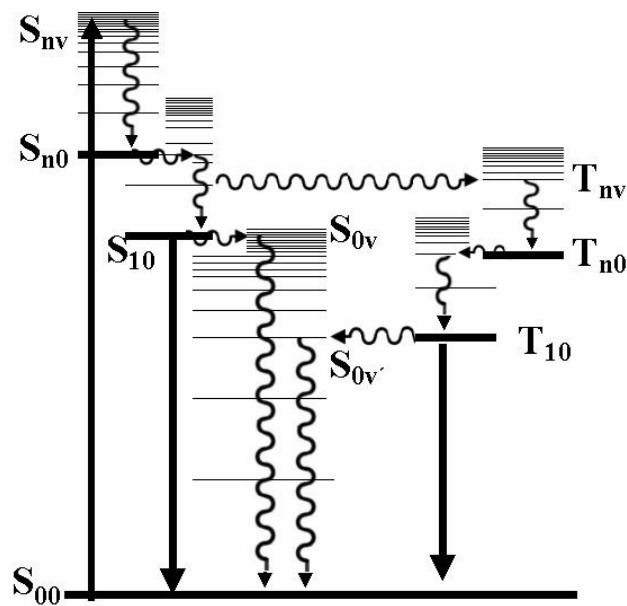


Figura 1: Diagrama de Jablonski. Os estados singletos e tripletos estão representados por S e T, respectivamente. (20)

A eficiência da TFD é afetada por vários fatores incluindo propriedades fotofísicas de sensibilizadores, comprimento de onda da luz de ativação, profundidade de penetração da luz em tecidos biológicos, resposta tecidual ao oxigênio singleto. (23) Embora a TFD tenha sido originalmente desenvolvida visando a terapia do câncer em suas diversas formas, tem ficado claro seu grande potencial no que concerne a outras moléstias, (5) como a psoríase, onde se tem atingido resultados bastante promissores, degeneração macular da retina, condições auto-imunes, arteriosclerose e restenose, remoção de verrugas na laringe, tratamento de micoses fungóides e destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos tradicionais à base de antibióticos. (9, 24) A resistência a antibióticos desenvolvida

por um crescente número de microorganismos é reconhecida como um problema de saúde mundial. **(24, 25)** Com a elevação mundial das taxas de resistências a antibióticos, pesquisadores estão se empenhando em desenvolver novas estratégias antibacterianas. **(22)**

Uma das aplicações da TFD é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA). Esta é uma técnica que segue princípios semelhantes ao da TFD, **(25, 26)** capaz de destruir patógenos microbianos no tratamento de infecções localizadas. Muitos fotossensibilizantes, como as porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas estão sob investigação para tratamento do câncer e outras doenças. Corantes que são propostos freqüentemente como fotossensibilizantes antimicrobianos como azul de toluidina, azul de metileno, entre outros, possuem diferentes ligações moleculares mostrando ser fototóxicos para bacilos Gram-negativos com irradiação de luz vermelha. **(4, 27)** Sabe-se que bactérias Gram-positivas são muito mais sensíveis a inativação fotodinâmica que as Gram-negativas e que o fotossensibilizante ideal para destruir bactérias deve possuir uma carga catiônica global e preferencialmente de múltiplas cargas catiônicas. **(18)**

Experimentos demonstraram a contribuição do oxigênio na destruição de bactérias sendo que, na sua ausência, os corantes fluorescentes não mostraram nenhuma atividade contra espécies anaeróbicas. Diferentes classes de compostos químicos com propriedades fotoativas têm sido testadas obtendo vários resultados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Fotoinativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são baseadas no conceito que certos fotossensibilizantes podem se acumular em uma quantidade significativa na membrana citoplasmática, local crítico para indução de um dano irreversível na bactéria após iluminação. **(4, 22, 27)**

O uso de fotossensibilizante para erradicação microbiana já era utilizado antes do desenvolvimento da técnica quimioterápica. O efeito antimicrobiano da TFD vem sendo fortemente reconhecido. As técnicas têm mostrado efeitos contra uma gama de patógenos e também contra bactérias resistentes a fármacos. A atividade de fatores de virulência de bactérias Gram-negativas também foram reduzidos com TFD. O uso da TFD para destruir microorganismos pode também ser limitado para localizar infecções devido a problemas sistêmicos de entrega de luz. Com o advento

da tecnologia de fibras ópticas, infecções profundas devem tornar-se tratáveis com a abordagem fotodinâmica. (27)

Vários tipos de fotossensibilizantes neutros e aniônicos exibem uma atividade fototóxica pronunciada contra bactérias Gram-positivas considerando que elas não mostram uma atividade citotóxica contra bactérias Gram-negativas a menos que a permeabilidade da membrana externa seja alterada pelo tratamento com agentes químicos ou biológicos, como EDTA (Ácido etilenodiamínicotetraacético) ou ácido policatiônico. (28) É provável que o envelope celular mais complexo e mais espesso de bactérias Gram-negativas quando comparado com as bactérias Gram-positivas previna uma ligação eficiente das moléculas de fotossensibilizante desativando as espécies reativas citotóxicas fotogeradas pelas moléculas fotossensibilizadas. Ao contrário, fotossensibilizantes carregados positivamente incluindo porfirinas e ftalocianinas promovem uma inativação eficiente de bactérias Gram-negativas sem precisar modificar a estrutura natural do envelope celular. (24, 29, 30)

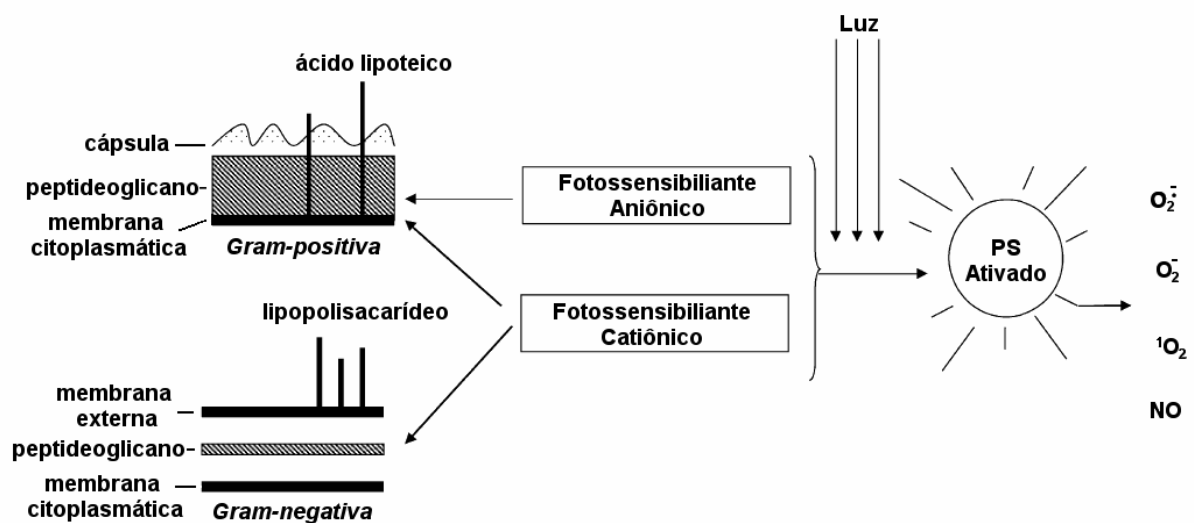


Figura 2: Representação esquemática da TFDA. O fotossensibilizante na presença de luz é excitado e produz espécie de oxigênio tóxico que danifica o DNA e/ou regiões de membrana. Fotossensibilizadores aniônicos são geralmente ativados apenas contra bactéria Gram-positiva pois não podem permear a membrana externa carregada negativamente da bactéria Gram-negativa. Fotossensibilizadores catiônicos e aniônicos ligados a polipeptídios catiônicos podem inativar microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos. (31)

3.2 Laser

Radiação laser representa uma ferramenta de grande valia para diferentes áreas onde é aplicada. Muitas vezes preenchendo lacunas onde ferramentas e técnicas convencionais não dão suporte. Com o surgimento de aplicações biomédicas, o laser, se tornou tema de grande destaque gerando grande volume de pesquisas científicas e consolidando-se como ferramenta indispensável em diversos tratamentos por possibilitar uma melhor qualidade de vida aos pacientes envolvidos.

Equipamentos laser produzem radiação altamente coerente e monocromática que pode ser eficientemente acoplada em fibras ópticas usadas como guias ópticos, **(10)** permitindo acesso, minimamente invasivo, às regiões intracorpóreas. Lasers são basicamente classificados na área da saúde como cirúrgicos (alta potência), geralmente utilizados para cortes de tecidos e processos onde é necessário remoção de material, e não cirúrgicos (baixa potência) para objetivos terapêuticos e de diagnóstico. **(32, 33)**

O protocolo de aplicação da radiação deve receber grande atenção quanto a seus parâmetros e viabilidade da aplicação.

O correto ajuste dos parâmetros do laser, tais como energia do pulso, frequência, potência óptica de saída, tempo de irradiação e comprimento de onda são decisivos para o efeito biológico do feixe de luz laser determinando sua absorção e interação com o tecido. **(34)** Um simples erro em qualquer dos parâmetros citados pode resultar em discrepâncias do efeito desejado, podendo gerar traumas irreversíveis ao paciente.

Tratamentos utilizando luz e compostos ativados por luz já são referenciados a muito tempo, onde eram usados para o tratamento de uma grande variedade de desordens e *moléstias*. **(17)** Uma das aplicações que vêm se destacando é o uso da luz laser associada a corantes fotossensíveis, técnica esta conhecida como Terapia Fotodinâmica. No passado, a ativação de corantes fotossensíveis era realizada por uma variedade de fontes de luz como lasers de corantes bombeados por laser de argônio, Nd:YAG (*Neodymium-Yttrium-Aluminium-Garnet*), vapor de ouro ou vapor de cobre. Mas todos estes sistemas lasers são de uso complexo e de alto custo. Hoje, sistemas baseados em lasers de diodo estão substituindo os sistemas antigos devido a sua facilidade de manuseio, portabilidade e baixo custo. **(35)**

3.3 Fotossensibilizantes

O fotossensibilizante deve ser não tóxico, seletivamente retido em tecido tumoral em altas concentrações, solúvel em água, metabolizado em um tempo razoável pelo corpo e rapidamente pela pele, para evitar reações fotossensíveis. **(10)**

Os fotossensibilizantes em TFD podem ser classificados pela estrutura química e se dividir em grandes famílias. A primeira família pesquisada é baseada em hematoporfirinas (Hp) e seus derivados. Após purificação e manipulação os derivados de hematoporfirinas (HpD) são transformados em vários produtos comerciais chamados Photofrin[®], Photosan, Photocan, etc. As porfirinas pertencem à primeira geração de fotossensibilizantes. **(17)** As ftalocianinas pertencem à segunda geração de fotossensibilizantes usados em TFD e podem ser facilmente conjugadas com uma variedade de diferentes grupos que alteram a sua carga molecular e a sua solubilidade. Estas características afetam a captação do fotossensibilizante pelas células tumorais. **(12)** A cinética de captação e a retenção celular são diferentes para ftalocianinas hidrofílicas e hidrofóbicas. **(15)** A maioria dos corantes é hidrofóbico sendo necessário agentes de entrega para uso clínico, como uma preparação lipossomal. A afinidade destes corantes para uma variedade de metais parece aumentar a sua eficácia. Alumínio, zinco, e silício oferecem uma melhor atividade fotodinâmica. Grande parte da atividade para fotossensibilizantes clínicos da família de corantes, vem das ftalocianinas e seus derivados, as naftocianinas. **(17)**

Tem-se que as ftalocianinas são melhores fotossensibilizantes para TFD que outros, como as porfirinas, naftalocianinas, etc. Elas exibem vantajosas propriedades fotofísicas para a TFD, como fotoestabilidade, bom efeito de penetração tecidual devido sua estabilidade química, atividade fotodinâmica, **(36)** alta absorção molecular na região vermelha do espectro do visível, **(37)** além de um longo tempo de vida do estado tripleto fotoexcitado para produzir eficientemente oxigênio singleto molecular $O_2(^1\Delta g)$. **(30)** Estas, constituem uma grande classe de combinações com altos coeficientes de excitação na região espectral do vermelho (630-750 nm), e têm-se descoberto excelentes propriedades de localização de tumor e alta eficiência fotossensibilizante. **(38)**

O uso de ftalocianinas para esterilização de contaminantes infecciosos em células vermelhas do sangue tem tido maior interesse devido a sua intensa absorção da luz vermelha onde a absorção da hemoglobina é mínima. **(30)**

3.4 *Yersinia Enterocolitica*

A primeira referência reconhecida para *Yersinia enterocolitica*, um cocobacilo Gram-negativo, foi feita nos Estados Unidos em 1934 por McIver e Pike. Bioquimicamente, o isolado não se parecia com outros bacilos já conhecidos, como *Pseudomonas mallei* ou até mesmo *P. pseudomallei*. Porém, os autores concluíram que a possibilidade de terem descoberto uma nova espécie era menos provável que o organismo descrito ser uma forma atípica ou uma variante de alguma espécie já conhecida. Em 1939, Schleifstein e Coleman, trabalhando no Departamento de Saúde do estado de Nova Iorque, chamaram atenção para o isolado descrito por McIver e Pike e para quatro outros isolados que se assemelhavam ao *Actinobacillus lignieri* e especialmente *Y. (Pasteurella) pseudotuberculosis*. Porém as características microbiológicas dos cinco isolados foram suficientemente diferentes dessas últimas duas espécies e também por três dos quatro isolados serem de conteúdos entéricos. Schleifstein e Coleman propuseram o nome *Bacteria enterocolitica*, para este “microorganismo não identificado”. **(8)** Historicamente, *Yersinia enterocolitica* é um patógeno anaeróbico facultativo do trato gastrointestinal que, sob certas condições do hospedeiro, apresenta uma forte tendência para expansão extra-intestinal. **(7, 39)**

Infecções clínicas em humanos com *Yersinia enterocolitica* é resultado da ingestão de microorganismos encontrados em comidas contaminadas, água ou por inoculação direta através de transfusão de sangue. **(8, 39, 40, 41)**

No trato gastrointestinal, *Yersinia enterocolitica* pode causar enterites aguda (especialmente em crianças), enterocolites, linfadenites mesentéricas e ileítes terminais. Por virulência *Yersinia enterocolitica* pode manifestar sua presença através de síndrome clínica, porém, deve existir um conjunto de características que capacite sua entrada com sucesso para infectar um hospedeiro humano, estes microorganismos devem primeiramente adaptar os antígenos de superfície ao

aumento de temperatura (37°C). **(8, 40)** A infecção por *Yersinia enterocolitica* pode ser operacionalmente dividida em duas fases: (i) invasão, adesão e translocação através do epitélio intestinal do íleo terminal, com multiplicação na Placa de Peyer (PP), e (ii) disseminação para tecidos profundos com o estabelecimento da infecção sistêmica. **(42)** A colonização do trato intestinal é o primeiro evento de sucesso do patógeno entérico. Para alcançar este estado, a bactéria deve atravessar o lúmen intestinal, ligando-se e penetrando a camada de muco sobre a mucosa das células epiteliais e finalmente aderindo-se às bordas da membrana das células intestinais. **(40, 8)** Quando o trato gastrointestinal é infectado, enterites aguda com febre e inflamação, ocasionalmente sangramento, diarreia é a ocorrência mais freqüente, especialmente em crianças, em adultos jovens, ileíte terminal aguda e linfadenites mesentéricas semelhante a apendicite parecendo ser uma síndrome clínica mais comum. Em casos mais prolongados de envolvimento de *Yersinia* no trato gastrointestinal pode ocorrer uma fatal necrose enterocolítica, tão bem como um “pseudo-tumor” na forma de uma adenite mesenterica, até mesmo em crianças.

Gastroenterites causada por *Yersinia enterocolitica* é uma doença que requer a expressão coordenada de diversos genes bacterianos para patogenicidade. Recentemente, tem ficado claro que genes virulentos podem ser regulados como parte da regulação flagelar indicando que esta regulação contribui para patogenicidade da *Yersinia enterocolitica*. **(43)** O diagnóstico clínico de gastroenterite em crianças é acompanhado por febre, vômito e diarreia, geralmente sangramento e dor abdominal. Enquanto a incidência é desconhecida, crianças com *Yersinia enterocolitica* podem exibir uma infecção bacteriana concomitante, **(8)** tal como um padrão sintomático não específico, comum em várias infecções entéricas. **(7)** *Yersinia* pode chegar a causar septicemia, alterando o estado de saúde do hospedeiro e pode ocorrer em hospedeiros normais e imunocomprometidos. O diagnóstico clínico para septicemia por *Yersinia enterocolitica* pode incluir formação de abscessos no fígado e baço, pneumonia, artrite séptica, osteomielites, meningite e panoftalmite, **(8)** síndrome de Reiter e anemia Hemolítica. **(7)** O diagnóstico microbiológico das infecções de *Yersinia enterocolitica* é melhor alcançado pelo isolamento de bactérias de espécimes clínicos representativos do processo infeccioso. Porém, isolamento e identificação bioquímica são funções impostas pelas

condições de cultivo e características das colônias de *Yersinia enterocolitica* em uma variedade de rotinas comumente usadas. **(8)**

Infecções intestinais por *Yersinia enterocolitica* em humanos são seguidas por seqüelas que incluem artrites reativas e outras doenças autoimunes. O desenvolvimento de artrites é mais freqüentemente determinado por susceptibilidade genética. Infecções clínicas de *Yersinia enterocolitica* são seguidas pelo desenvolvimento de anticorpos incluindo anticorpos contra músculos lisos, tecidos conjuntivo, epitélio renal e a membrana de células epiteliais da tiróide. Os mecanismos pelo qual patógenos artritogênicos interagem com o sistema imunológico humano para produzir artrite inflamatória não são entendidas completamente. Estes patógenos têm a capacidade de modular seletivamente a resposta imune do hospedeiro humano infectado e estimulação linfocitóide policlonal é um dos mecanismos imunomodulatórios usados por eles. **(44)**

Num total são onze espécies de *Yersinia* conhecidas, três delas patogênicas, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* e *Yersinia Enterocolitica*, **(39, 42)** sendo a última a mais prevalente em humanos. Estas três espécies exibem diferentes graus de virulência, mas tem em comum a capacidade para se multiplicar em tecidos linfáticos e derrotar a defesa imunológica primária do hospedeiro. **(45)** As oito espécies restantes (*Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. hercovieri*, *Y. mollaretti* e *Y. ruckeri*), não têm sido estudadas extensivamente, e devido à ausência de marcadores clássicos de virulência de *Yersinia*, ela tem sido geralmente considerada espécies não patogênicas e presentes no ambiente. Porém, um número crescente dessas espécies não patogênicas tem sido isolado de humanos doentes, levantando a questão da possibilidade de patogenicidade. É interessante notar que das onze espécies conhecidas de *Yersinia*, apenas quatro (*Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii*) são isoladas de fontes de água e esgoto no Brasil.

A bactéria pode invadir células epiteliais, ligando-se as bordas da membrana intestinal, onde ela penetra as células M e ganha acesso para se multiplicar em placas de Peyer (PP). Bactérias levadas até as células M são geralmente fagocitadas e destruídas por macrófagos das placas de Peyer, porém, *Yersinia enterocolitica* patogênica tem vários componentes de superfície que possibilitam uma resistência a fagocitose e evasão da morte. A proliferação bacteriana resulta

em uma reação inflamatória, que leva a formação de micro abscessos locais e ulceração do epitélio. Finalmente, a bactéria se espalha pelos linfonodos mesentéricos e entra na corrente sanguínea. (46)

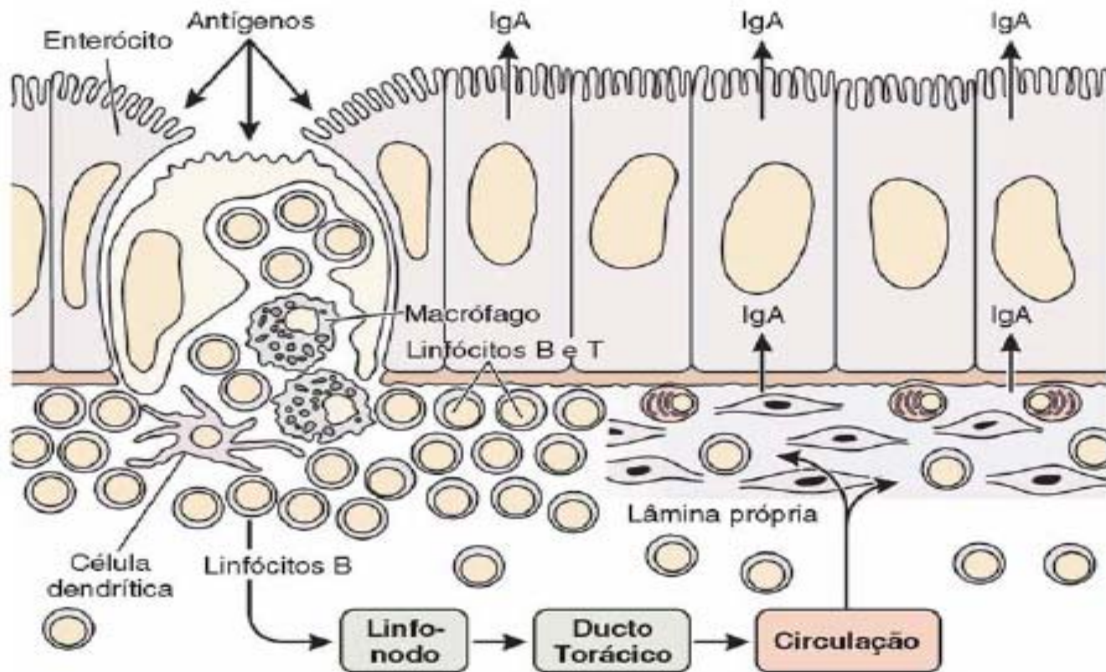


Figura 3: Atividade imunitária do intestino delgado. As células M das placas de Peyer capturam antígenos da luz intestinal e os transferem para os linfócitos, macrófagos e células dendríticas adjacentes. (47)

Yersinia enterocolitica pode gerar enterotoxinas responsáveis pela contaminação de alimentos, podendo ser isolada do solo, da água, de uma variedade de comestíveis e de seres humanos e animais que são seus hospedeiros, podendo ser encontrada em roedores, ovelhas, gado, cavalos, coelhos, cachorros e gatos. (7)

A patogenicidade da *Yersinia* é multifatorial na qual DNA cromossômico e genes plasmidiais atuam em conjunto na produção de infecção e patogenicidade. Todas as espécies de *Yersinia* patogênica abrigam uma virulência plasmidial relacionada que codifica diversos determinantes virulentos regulados de modo térmico. Estudos recentes mostraram que cepas patogênicas de *Yersinia enterocolitica* podem invadir células eucarióticas *in vitro* considerando que cepas não patogênicas não podem. (42)

O contágio através de transfusão de sangue teve seus riscos reduzidos dramaticamente pela implementação da seleção cuidadosa de doadores e testes sensíveis. A segurança dos produtos de células sanguíneas não é apenas desafiado por infecções virais emergentes, mas também por infecções de bactérias comuns, devido a concentração de células vermelhas (CCV) não ser habitualmente testada por contaminação bacteriana. A prevalência de transmissão bacteriana através de transfusão de CCV tem sido reportado pela rede *French Hemovigilance* chegando a 16% de incidências em transfusão imediata. Além disso, relatórios da *British Serious Hazards of Transmission* e a *US Food and Drugs Administration* (FDA) indicam que contaminação bacteriana de CCV, principalmente com *Yersinia enterocolitica* e *Pseudomonas ssp.*, é a maior causa de morbidade e mortalidade. Tecnologias para inativação de patógenos baseada no uso da luz ultravioleta (UV), como desenvolvida para plaquetas, são muito promissoras. Porém, esta tecnologia não é aplicada para CCV, como as tecnologias baseadas no uso de luz são impedidas pelo fato de que a hemoglobina absorve fortemente na região entre 300 e 600nm. Então, a tecnologia de inativação patogênica para CCV pode usar luz independente de combinações químicas ou combinações fotodinâmicas que podem ser ativados com luz de comprimentos de onda superiores a 600nm. A ação fotodinâmica depende do uso de luz associado com a absorção das moléculas, em ativação com luz de comprimento de onda apropriado, produzindo oxigênio singleto, causando dano oxidativo para as células de interesse. O dano resultante ocorre na proximidade do fotossensibilizante e pode levar a inativação do microorganismo. Diversos fotossensibilizantes têm sido investigados por sua capacidade de inativar patógenos em CCV; porém, a maioria causou um dano inaceitável nas células vermelhas. Recentemente, mostrou-se que Terapia Fotodinâmica (TFD) de CCV com a porfirina carregada positivamente, cloro porfirina mono-fenil-tri-(N-metil-4-piridil)(Tri-P(4)), resultou em uma redução do modelo viral, vírus estomatite vesicular (VSV), e apenas limitou o dano às células vermelhas no armazenamento subsequente. Finalmente, foi avaliado o efeito da dosagem para TFD, necessário para inativação patogênica ótima, em quantidade de células vermelhas *in vitro*. (48)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem celular

As células utilizadas nos experimentos são originárias de camundongo Balb-C, gentilmente cedidas pela Dra. Maria Angélica Gargione Cardoso – UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba.

Partindo-se inicialmente de uma ampola de congelamento contendo células estocadas em nitrogênio líquido, foi preparada uma garrafa de 25cm², contendo 1mL de cultura de células (~10⁶células/mL), mais 2mL de meio de cultura DMEM enriquecido com 5% de soro fetal bovino (Gibco BRL[®]). A garrafa foi então incubada em estufa com controle automático de temperatura (37°C) e pressão de CO₂ (5%) (Forma Scientific).

O crescimento celular foi devidamente acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Olympus CK40 e subcultivadas através de tripsinização, quando a densidade de células formava uma monocamada confluenta.

4.2 Cepa bacteriana

Foi utilizada cepa bacteriana da linhagem *Yersinia enterocolitica* (CT) ATCC 9610, gentilmente cedidas pelo Dr. Ivano de Filippis – da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde – INCQS – RJ.

4.3 Meio de cultura

Meio DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Media (GibcoBRL[®]) – É um meio como fonte de energia otimizada para produção de proteínas, metabolismo de ácido nucléico que limita a toxicidade da amônia produzida. Preparado conforme instruções do fabricante e conservado a 4°C na geladeira.

4.4 Meio de cultura para cepa *Yersinia enterocolitica*

Para o preparo de 1l desta solução foram diluídas 32 gramas de meio BHI(Brain and Heart Infusion, Gibco) em 1000ml de água destilada e deixado sob agitação até que formasse uma mistura homogênea. Posteriormente autoclavada para esterilização e estocada em garrafas de vidro de 500mL na geladeira a 4°C.

4.5 Tampão Fosfato 0,1M

Para o preparo da solução “A” foi adicionado 2,76g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific) em 100mL de água destilada e deixada sob agitação até que formasse uma mistura homogênea, o mesmo ocorreu com a solução “B”, onde foi adicionado 5,36g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific) em 100mL de água destilada.

A solução tampão é mistura entre as duas soluções “A” e “B” (33ml de solução A + 67ml de solução B) (pH 7,1).

4.6 Salina Tampão Fosfato

Para o preparo de 1l desta solução (PBS - pH 7,2) foi misturado 100ml de tampão fosfato 0,1M em 900ml de água destilada. Sob agitação adicionou-se 9g de NaCl (Merck®).

4.7 Tampão PHEM

Para o preparo desta solução 20,72g de Pipes (Sigma®), 6,50g de Hapes (Sigma®), 3,8g de EDTA (Merck®) e 0,54g de MgCl_2 (Merck®) foram dissolvidos em 1000mL de água destiladas (pH6,8).

4.8 Triton X-100

Solução contendo t-octilfenoxipoli-etoxietanol utilizada para permeabilizar a membrana externa das bactérias e assim facilitar a penetração do fotossensibilizante, diluído em PBS para obtenção da concentração desejada de 1%.(Sigma[®])

4.9 Tripsina

Para o preparo desta solução foram dissolvidos 0,1g de Tripsina (Gibco BRL[®]) e 0,05g de EDTA (Merck[®]) em 100ml de PBS.

4.10 Paraformaldeído

Para o preparo da solução tamponada de paraformaldeído (10%) foram aquecidos 80 ml de tampão fosfato (0,2M – pH 7,1) até 65°C, no início do aquecimento foi adicionado 10g de paraformaldeído (Sigma[®]), agitando-se continuamente, adicionou-se gotas de hidróxido de sódio 2M sob agitação até o clareamento da solução. Após o resfriamento, adicionou-se mais tampão fosfato 0,2M até completar 100ml.

4.11 DAPI

O marcador fluorescente DAPI (4',6'-diamidino, 2'-phenylindole – Molecular Probes[®]) foi diluído em DMSO estéril a uma concentração estoque de 3mM. A solução foi devidamente armazenada em freezer a -20°C ao abrigo de luz.

4.12 N-propil-galato

O n-propil-galato foi preparado a uma concentração de 0,02M. Foram dissolvidos 4,24g de n-propil-galato (Sigma®) em 10ml de PBS aquecido a 37°C. Após a dissolução foram adicionados 90ml de glicerina (Sigma®).

4.13 Fotossensibilizante

O fotossensibilizante utilizado foi alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AlPcS₄) (Porphyrin Products®, INC.), na concentração de 35µM obtida através da diluição estoque de AlPcS₄ de 1mM em PBS.

4.14 GIEMSA

O corante utilizado foi o GIEMSA (Merck®) na concentração de 1:10 diluído em etanol 100%.

4.15 Cultivo de *Yersinia enterocolitica*

Partindo-se inicialmente de uma cultura estoque, foram preparadas, através de repique, culturas estoques em tubos de vidro 18x18mm (Pyrex®), contendo 500µl de solução bacteriana e 10ml de caldo BHI estéril. A cultura foi então incubada em estufa (Fanem) a 37°C por um período de 24 horas.

4.16 Curva de crescimento de *Yersinia enterocolitica*

Repicou-se a cultura bacteriana em alíquota de 100µl em tubo de vidro contendo meio BHI estéril. Deste repique foram aliquotados 100µl e colocados em

poços de uma placa de 96 poços para leitura no leitor de elisa Spectracount (Packard, USA), configurado com um filtro de 570 nm. As leituras foram realizadas por um período de 12 horas num intervalo de 30 minutos para cada leitura.

4.17 Incubação e irradiação de *Yersinia enterocolitica* com AlPcS₄

A cultura bacteriana, após atingir a fase *log* de crescimento, foi incubada com 35µM de AlPcS₄ + 1% de Triton X-100, a 37°C, no escuro, por período de 1 hora.

Após o período de incubação com o fármaco, o conteúdo de cada poço foi transferido para *ependorffs* individuais e centrifugado a 14.000 xg por 5 minutos para a retirada do corante não captado. Em seguida descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 1ml de PBS. O conteúdo de cada *ependorff* contendo as células foi então recolocado nos seus respectivos poços de placa de 24 poços (Nunc). A irradiação foi realizada no escuro com laser semiconductor configurado conforme parâmetros descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros do laser

Parâmetros	Valores
Potência	30 mW
Densidade de Energia (DE)	4,5 J/cm ²
Comprimento de onda (λ)	660 nm
Tempo	7'53''
Área	3,1 cm ²

Barreiras opacas de cor preta foram colocadas entre os poços a fim de se evitar a luz espalhada durante a irradiação. Uma barreira com orifício do diâmetro do

poço foi sobreposta à placa irradiada também com o mesmo objetivo anteriormente descrito.

4.18 Interação de *Yersinia enterocolitica*- Linhagem celular J774 após Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com AIPcS₄

Os macrófagos da linhagem celular J774 plaqueados a uma concentração de 5×10^4 células/ml em poços alternados de uma placa de 24 poços (Nunc) foram incubados com 100µl da concentração da solução bacteriana submetida à TFDA. Após 1 hora de interação das células com a bactéria, foi retirado o meio e foi feita uma lavagem com meio DMEM contendo 1% de antibiótico (Solução estabilizada penicilina streptomycina – SIGMA) para retirada das bactérias não interiorizadas. Re-incubou-se durante 24 e 48 horas a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂.

4.19 Coloração GIEMSA

Após o processo de TFDA realizado em *Yersinia enterocolitica* e a sua posterior interação com a linhagem celular J774, foram realizadas a coloração de GIEMSA para a contagem das bactérias interiorizadas. As células foram lavadas com PBS e fixadas por 10 minutos com Paraformaldeído a 3% (diluído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2), lavadas com PBS e então coradas por 30 minutos com GIEMSA diluído em água a uma concentração de 1:10, lavadas com água destilada e desidratada com etanol 100% por 15 minutos. Após a coloração, as lamínulas contendo as células foram montadas sobre lâminas contendo Bálsamo do Canadá. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio Leica modelo DM-LB2 com objetiva de 100x de aumento acoplado a uma câmera CCD Leica modelo DFC280 com fator de ampliação de 17,5x.

4.20 Microscopia de Fluorescência

O DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride – Molecular Probes) é um marcador amplamente utilizado para técnicas fluorescentes corando núcleos especificamente, com pouca ou nula marcação de citoplasma (Molecular Probes).

Após o processo de TFDA em *Yersinia enterocolitica* e a sua posterior interação com a linhagem celular J774, foi realizada marcação para a observação dos resultados através da microscopia de fluorescência. As células foram lavadas com PBS, fixadas por 10 minutos com Paraformaldeído a 3% (diluído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2), lavadas com PBS e então marcadas por 10 minutos com DAPI a uma concentração de 300nM. Após a marcação, as lamínulas contendo as células foram lavadas com tampão PHEM e montadas sobre lâminas contendo n-propil-galato e vedadas com esmalte. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

4.21 Extração de DNA bacteriano

Para a extração do material genético, descartou-se o meio da cultura e adicionou-se PBS. Centrifugou-se a suspensão a 1000xg por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, conservando o pellet. Lisou-se as células ressuspendendo-as em 300µl de tampão TE/Triton. Incubou-se as suspensão celular por 10 minutos. Agitou-se o tubo ressuspendendo as células. Centrifugou-se as células lisadas a 13000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para tubos *ependorff* e adicionou-se 1,5µl de RNase (10mg/ml) com incubação por 1 hora a 37°C. Ao término deste período foi adicionada a solução 12,5µl de SDS 10% e 2µl de Proteinase K (20µg/ml) e incubada por 1 hora a 50°C. A seguir foram adicionados NaCl 5M e álcool isopropílico a -20°C, a amostra foi incubada por 10 minutos. Após incubação a amostra foi centrifugada a 13.000xg por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA sedimentado ressuspenso em 20µl de tampão TE.

4.24 Eletroforese em Gel de Agarose

Para análise do DNA de *Yersinia enterocolitica*, foram adicionados 4 μ l de tampão de amostra 6 vezes concentrado a 15 μ l de amostra de DNA para cada amostra analisada.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose na concentração de 0,8% contendo TAE 1X e 2,5mg/ml de brometo de etídeo. As amostras de DNA foram visualizadas por exposição à radiação ultra-violeta (UV) no transluminador (Transluminador UV 302nm – T26 – BioAgency) e os resultados foram registrados por fotodocumentador (Gel Logic 100 Imaging System, Kodak®).

5 RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento de *Yersinia enterocolitica* registrada em período de 12 horas com intervalos de tempo de 30 minutos entre leituras.

A curva de crescimento demonstra que por volta da 3ª hora, a cultura bacteriana *Yersinia enterocolitica* passa da fase *lag* para a fase logarítmica (ou exponencial) tendendo para a fase estacionária a partir da 7ª hora, como demonstra o gráfico a seguir:

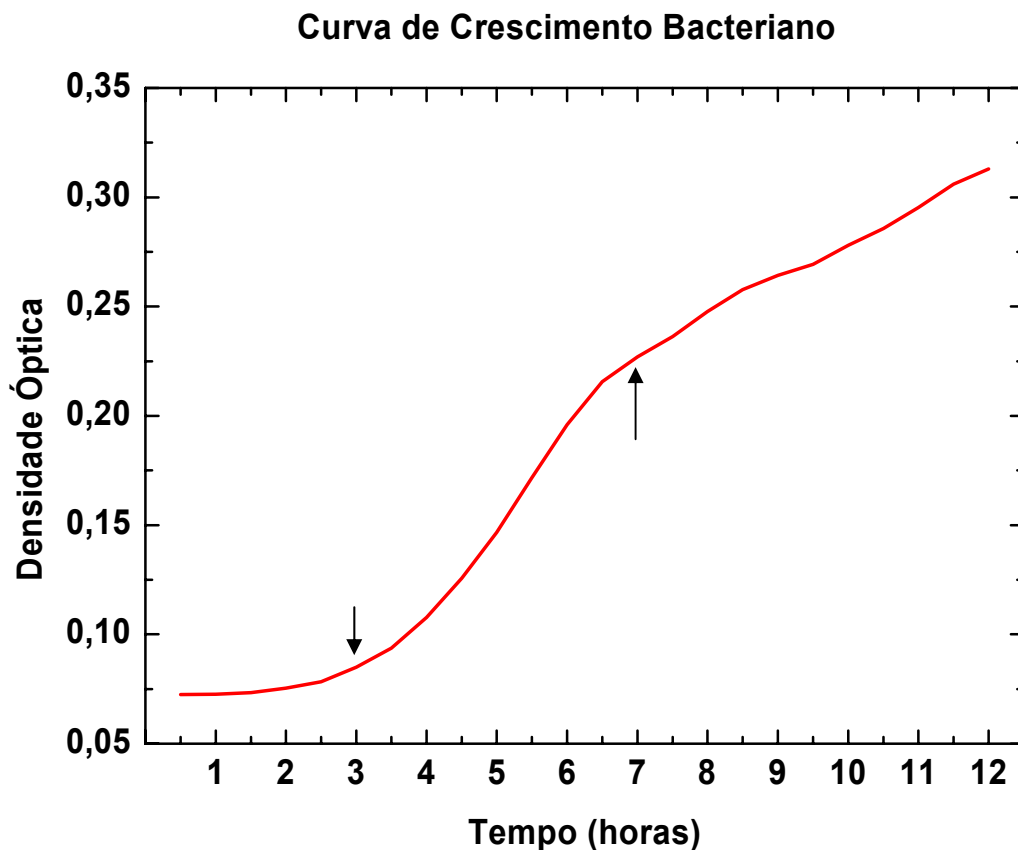


Gráfico 1: Curva de crescimento bacteriano, com indicação nas regiões de mudança de fase.

5.2 Contagem do número de bactérias após interação de *Yersinia enterocolitica* com a linhagem celular J774 após os períodos de incubação através da coloração de GIEMSA.

A coloração de GIEMSA realizada nas amostras de *Yersinia enterocolitica* incubadas com linhagem celular J774, 24 e 48 horas após TFDA, nos grupos analisados foram divididos em controle (*Yersinia enterocolitica* + linhagem celular J774), fotossensibilizante (*Yersinia enterocolitica* + AIPcS₄ + linhagem celular J774), laser (*Yersinia enterocolitica* + laser + linhagem celular J774) e TFDA (*Yersinia enterocolitica* + AIPcS₄ + laser + linhagem celular J774), utilizando como parâmetros a interiorização e a adesão das bactérias à membrana celular, para posterior contagem. Para a contagem das bactérias foi utilizado microscópio Leica modelo DM-LB2 acoplado a uma câmera CCD Leica modelo DFC280 com fator de ampliação de 17,5x, e recurso integrante do Software-Leica QWin Plus V.3.1.0, pelo qual a partir de uma imagem congelada na tela é quantificado o número de bactérias interiorizadas ou aderidas existentes no campo (Figura 4). Foram consideradas dez imagens para cada grupo estudado (n=10).

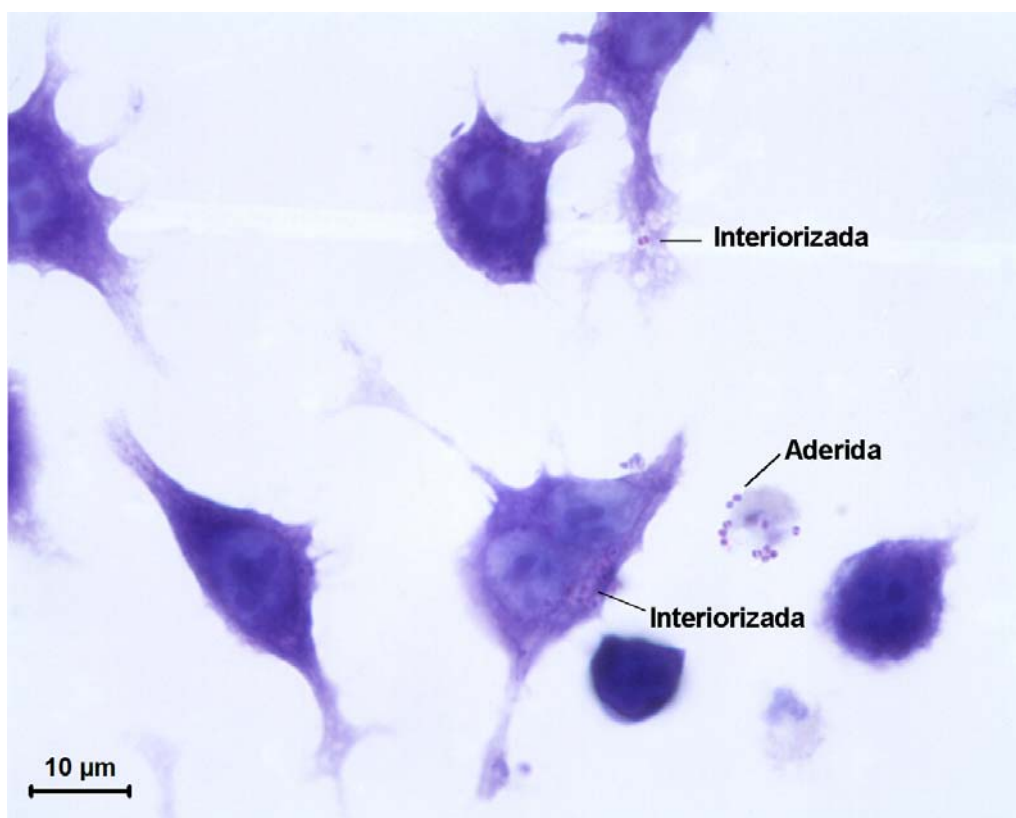


Figura 4: Imagem representativa do processo de contagem do número de bactérias.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar no Gráfico 2 (24 horas) um elevado número de bactérias interiorizadas nos grupos controle, laser e fotossensibilizante quando comparado com o grupo de TFDA que mostrou uma diferença estatística extremamente significativa ($p < 0,001$) através do teste Tukey Kramer. Pode-se observar ainda que no período de 24 horas há um pequeno número de bactérias aderidas devido a lavagem com meio DMEM contendo 1% de antibiótico realizada após 1 hora de interação para retirada das bactérias não interiorizadas.

No Gráfico 3 (48 horas) observa-se uma grande quantidade de bactérias interiorizadas nos grupos controle, laser, fotossensibilizante, sendo que o grupo laser apresentou um aumento ligeiramente maior que o grupo controle pois este apresenta efeito bioestimulante.

Observa-se no grupo fotossensibilizante uma diferença estatística significativa ($p < 0,01$) quando comparado com os grupos controle e laser.

O grupo TFDA demonstra uma diferença estatística extremamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado com os demais grupos.

Quando comparado os gráficos de 24 e 48 horas observa-se que no período de 24 horas houve um aumento do número de bactérias interiorizadas nos grupos controle, laser e fotossensibilizante, este resultado é devido às bactérias aderidas no período de 24 horas serem interiorizadas aumentando assim o número de bactérias interiorizadas no período de 48 horas.

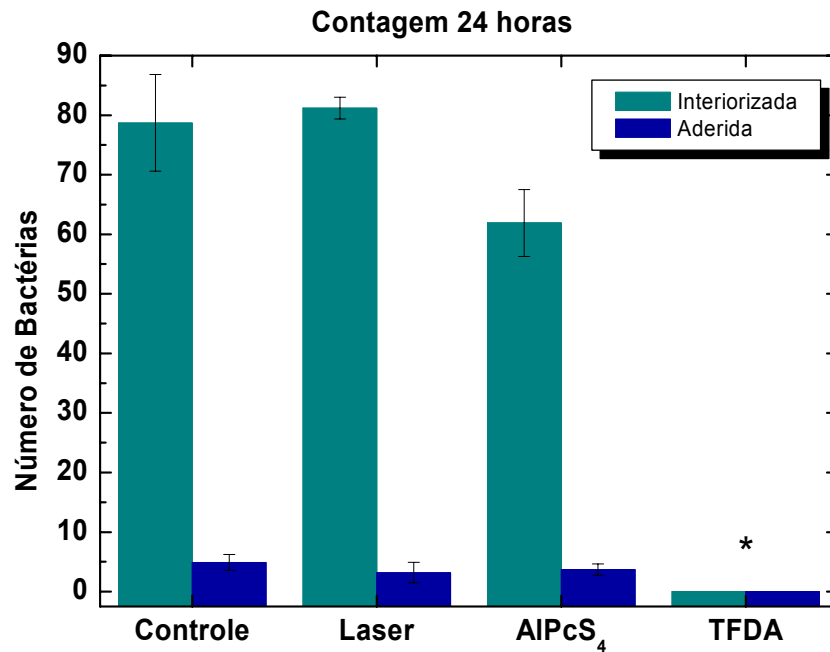


Gráfico 2: Média de bactérias para o tempo de 24 horas. Interiorizadas e aderidas na membrana das células. Pelo teste Tukey Kramer foi encontrado diferença estatisticamente significante quando comparado TFDA com os demais grupos ($p < 0,001$).

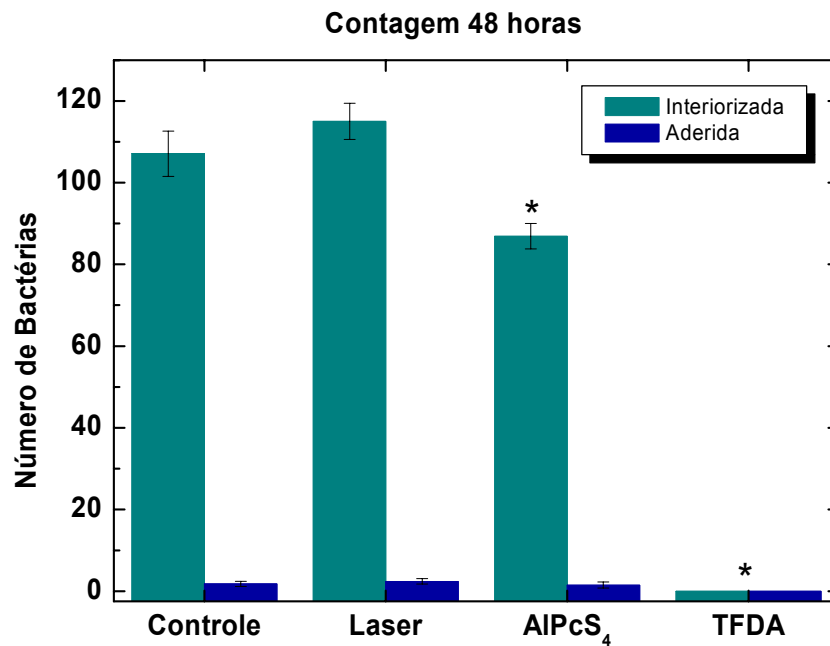


Gráfico 3: Média de bactérias para o tempo de 48 horas. Interiorizadas e aderidas na membrana das células. Pelo teste Tukey Kramer foi encontrado diferença estatisticamente significante quando comparado TFDA com os demais grupos ($p < 0,001$) e também encontrado diferença estatisticamente significante quando comparado AIPcS₄ com o grupo Controle.

5.3 Análise da interação de *Yersinia enterocolitica* com a linhagem celular J774 após TFDA com diferentes tempos de incubação pela técnica de Microscopia de Fluorescência.

A microscopia de fluorescência realizada nas amostras de *Yersinia enterocolitica* não submetidas a TFDA interagidas com a linhagem celular J774 foram marcadas para análise em microscopia de Epifluorescência com marcador fluorescente DAPI (4',6'-diamidino, 2'-phenylindole – Molecular Probes) (49). Desta forma, podemos observar a influência da TFDA no processo fagocítico de *Yersinia enterocolitica* na célula hospedeira, a linhagem celular J774. Os resultados mostraram que nos grupos controle (*Yersinia enterocolitica* + linhagem celular J774), fotossensibilizante (*Yersinia enterocolitica* + AIPcS₄ + linhagem celular J774) e laser (*Yersinia enterocolitica* + laser + linhagem celular J774), nos tempos de 24 e 48 horas, houve um grande número de bactérias interiorizadas em linhagem celular J774, bem como um grande número de macrófagos infectados como visualizado nas figuras 4 (A, B e C) e 5 (A, B e C).

No grupo TFDA (*Yersinia enterocolitica* + AIPcS₄ + laser + linhagem celular J774), após 24 e 48 horas de interação, verifica-se a ausência de células bacterianas interiorizadas quando comparada com os grupos controle, fotossensibilizante e laser, nos mesmos períodos de interação, como observado nas figuras 4 D e 5 D.

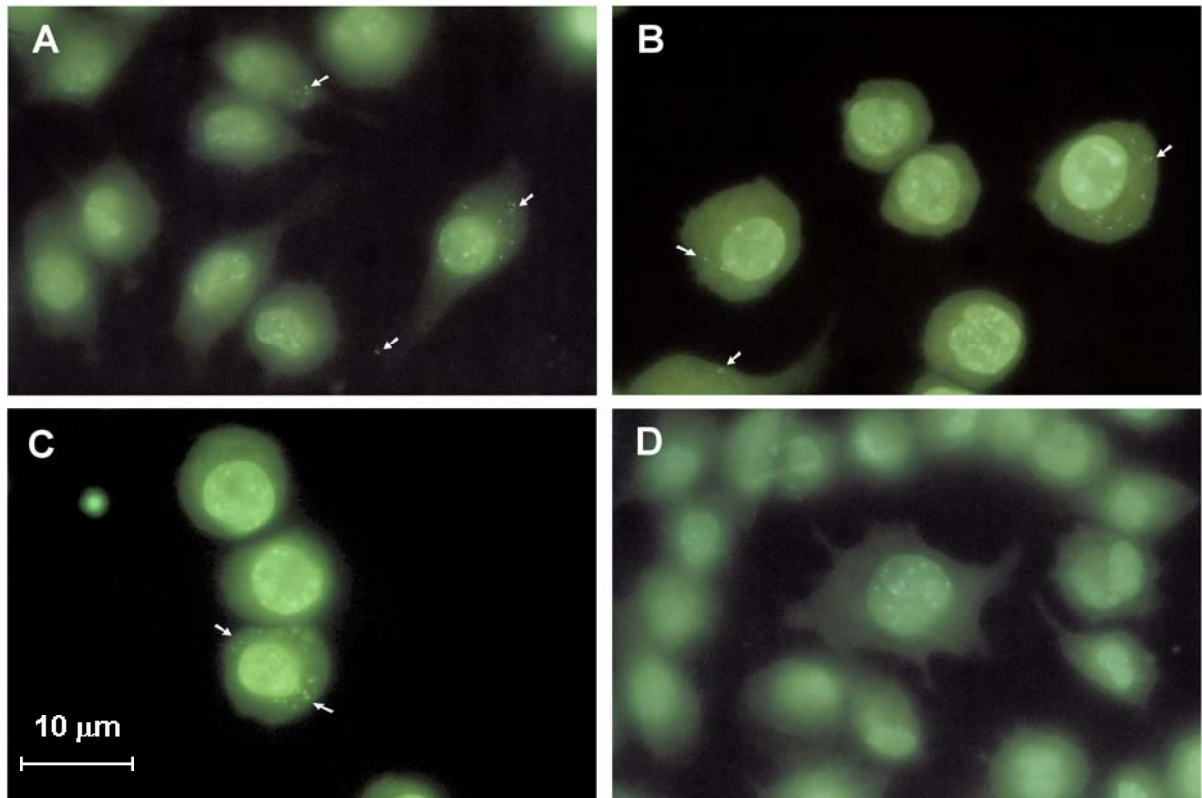


Figura 5: Fotomicrografias da interação *Yersinia enterocolitica* – linhagem celular J774 com marcador fluorescente DAPI dos grupos estudados para o tempo de 24 horas. A) Grupo controle (*Yersinia enterocolitica* + linhagem celular J774); B) Grupo Fotossensibilizante (*Yersinia enterocolitica* + AIPcS₄ + linhagem celular J774); C) Grupo Laser (*Yersinia enterocolitica* + laser + linhagem celular J774) e D) Grupo TFDA (*Yersinia enterocolitica* + AIPcS₄ + laser + linhagem celular J774). 1000x

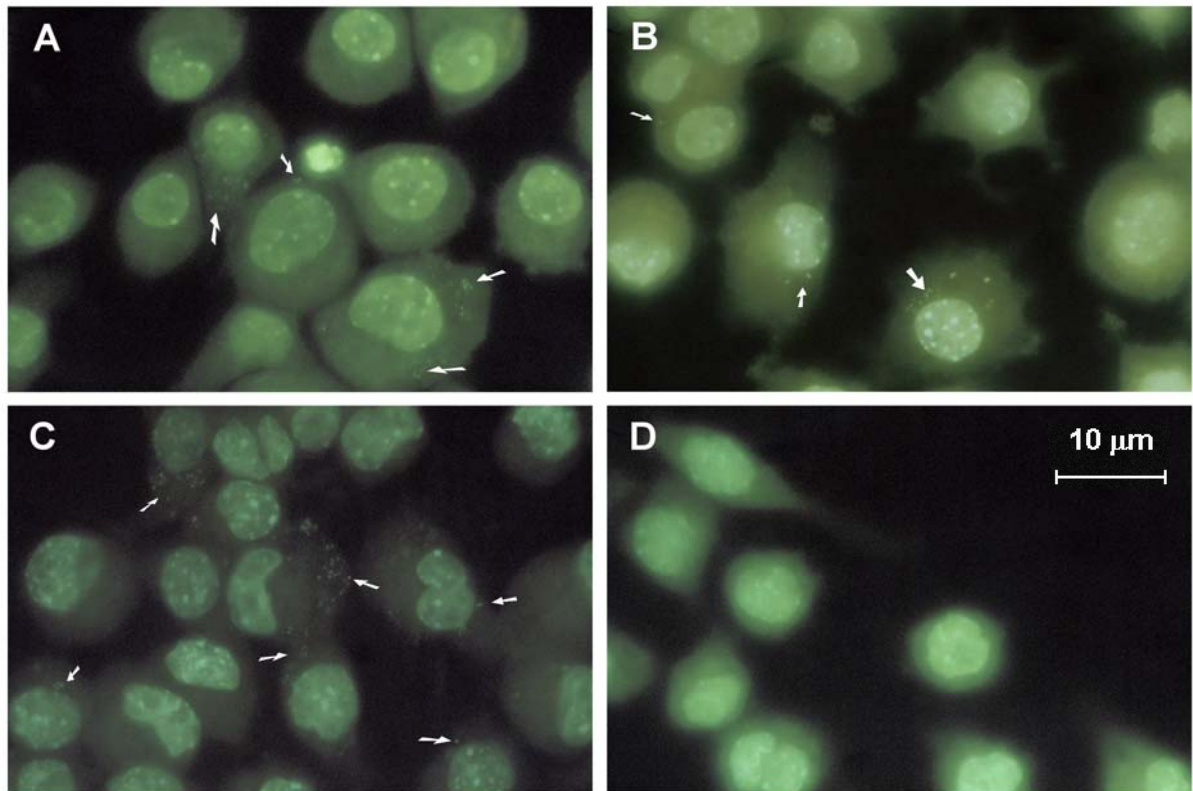


Figura 6: Fotomicrografias da interação *Yersinia enterocolitica* – linhagem celular J774 com marcador fluorescente DAPI dos grupos estudados para o tempo de 48 horas. A) Grupo controle (*Yersinia enterocolitica* + linhagem celular J774); B) Grupo Fotossensibilizante (*Yersinia enterocolitica* + AIPcS₄ + linhagem celular J774); C) Grupo Laser (*Yersinia enterocolitica* + laser + linhagem celular J774) e D) Grupo TFDA (*Yersinia enterocolitica* + AIPcS₄ + laser + linhagem celular J774). 1000x

5.4 Extração de DNA bacteriano

Objetivando analisar o efeito da Terapia Fotodinâmica sobre o DNA bacteriano, foi realizada a extração do mesmo, como descrito anteriormente. A análise do material demonstrou que o DNA bacteriano após a TFD apresenta-se íntegro, não sendo observado danos referentes a fragmentação do DNA, como demonstra a figura 5, na qual observa-se o DNA genômico (seta).

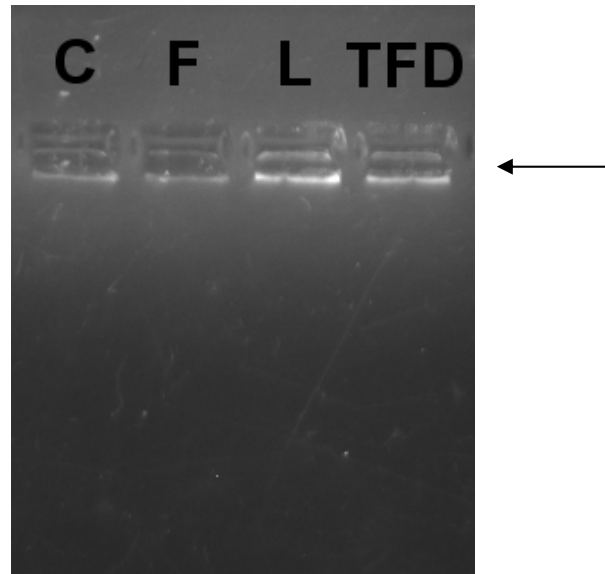


Figura 7: Eletroforese de gel de agarose com brometo de etídeo para extração do DNA total de *Yersinia enterocolitica* obtido por: (C) Bactéria, (F) Bactéria + Fotossensibilizante, (L) Bactéria + Laser, (TFD) Bactéria + Fotossensibilizante + Laser. Incubadas por 24 horas em meio BHI a 37° C.

6 DISCUSSÃO

O acelerado aumento da resistência antimicrobiana entre as bactérias patogênicas vem sendo considerado um dos principais motivos para encontrar terapias antimicrobianas alternativas. (25, 50) O tratamento de infecções microbianas por TFD parece apresentar um método alternativo valioso para a erradicação de bactérias. (24)

Diversos estudos correlacionados a TFD em agentes microbianos utilizando fontes de luz laser vêm sendo desenvolvidos, bem como os estudos de Wood et al., em 2006 (51) que observou o efeito da TFD utilizando-se Erythrosine e o Fotofrin em bactérias Gram-positivas orais *Streptococcus mutans*, o de Spesia et al. em 2005 (28) que comparou a eficiência da fotoinativação ocasionadas por porfirinas catiônicas em bactéria Gram-negativas *Escherichia coli* e Wong et. al. em 2005 (27) que avaliou o efeito da Terapia Fotodinâmica com azul de toluidina em bactérias Gram-negativa *Vibrio vulnificus*, ambas Gram-negativas.

Devido a este fato, foi estudado neste trabalho a TFDA sobre *Yersinia enterocolitica* visto que esta é uma bactéria bastante patogênica, apresentando resistência a imunidade, mediada por fagócitos e componentes do complemento, que representam a primeira linha de defesa contra muitos tipos de microorganismos invasores. Cepas virulentas de *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* replicam-se dentro de tecidos reticuloendoteliais e são predominantemente extracelulares, embora algumas bactérias possam ser englobadas por fagócitos e persistir dentro dessas células. (46) Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular J774, já que estas células são fundamentais à resistência às infecções por patógenos intracelulares, desempenhando vários papéis de efector microbicida. (46)

Estudos anteriores revelaram um grande número de corantes que podem ser usados como agentes fotossensibilizantes como ftalocianinas, porfirinas, entre outros (52, 26), e que possuem potente efeito citotóxico contra bactérias Gram-positivas (53). Por outro lado, as bactérias Gram-negativas são significativamente resistentes à muitos fotossensibilizantes utilizados na TFD de tumores (4). As bactérias Gram-negativas possuem duas membranas, a membrana citoplasmática e a membrana externa. A presença de lipopolissacarídeo (LPS) torna a membrana

externa carregada negativamente tornando-a impermeável a compostos aniônicos. Cerca de uma década atrás foi determinado que o fotossensibilizante aniônico pode ser efetivo se usado em combinação com agentes permeabilizantes de membrana como nonapeptídeo polymix e o EDTA. **(31)** Estes agentes aumentam a permeabilidade aos sensibilizantes (porfirinas, ftalocianinas) tornando as células fotosensíveis. **(52, 50)** Neste trabalho foi utilizado Triton X-100, um detergente permeabilizante para facilitar a penetração do fotossensibilizante.

Esta eficácia de morte bacteriana promovida por estes fotossensibilizantes tem sido confirmada como sendo significativamente diferente entre as duas espécies de bactérias. **(54)**

Através da análise da curva de crescimento de *Yersinia enterocolitica*, foi possível observar que a fase logarítmica inicia-se após 3 horas do repique sob incubação a 37°C, sendo este o período ideal para o tratamento com o fotossensibilizante AIPcS₄, uma vez que as células encontram-se em seu período ótimo de crescimento.

A análise da interação de *Yersinia enterocolitica*, após a TFDA, com a linhagem celular J774 demonstrou acentuada redução no número de bactérias interagidas com as células como demonstrado nos gráficos (2 e 4) e (3 e 5), quando comparado aos outros grupos. No grupo controle, encontramos um grande número de bactérias interiorizadas após 24 horas de interação, sendo que nas células não infectadas ocorreu a adesão de bactérias, provavelmente liberadas após a lise dos macrófagos infectados, uma vez que as bactérias não interiorizadas na primeira hora foram removidas pela lavagem com meio contendo 1% de antibiótico.

Em relação ao grupo fotossensibilizante-bactéria, observamos após 48 horas uma diminuição significativa das bactérias interiorizadas, sugerindo um efeito tóxico da AIPcS₄ sobre as células procariontes, como demonstradas por Muller 2006. **(55)** A ftalocianina sem ação da luz laser estaria ocasionando alterações na membrana, as quais favoreceriam a fagocitose efetiva destas células, entretanto os resultados aqui apresentados sinalizam para a necessidade de maiores estudos para uma melhor compreensão das alterações na expressão de proteínas de superfície bacteriana, antes e após a interação com AIPcS₄.

Para confirmação dos dados de interação, foi realizada a marcação com Dapi, como mencionado um corante específico para material genético. Os dados obtidos foram apresentados nas figuras 3 e 4, podendo ser visualizado um elevado número de bactérias interiorizadas nos grupos controle, fotossensibilizante e laser.

Para avaliar o efeito da TFDA sobre o material genético de *Yersinia enterocolitica* após a TFDA sem interação com as células, foi realizado a extração de DNA através da técnica de Eletroforese com gel de Agarose. Os resultados obtidos através desta técnica demonstraram que o DNA das bactérias apresentava-se intactos, demonstrando que não ocorreram danos aparentes ao DNA bacteriano conforme resultados obtidos por Estrada *et al.* 2006. Porém, são necessários testes específicos para detalhar algum possível dano ao material genético após a TFDA na cepa bacteriana estudada. **(56)**

O tratamento fotodinâmico contra microorganismos é considerado ser afetado pelo mecanismo da formação do oxigênio singleto que reage com várias moléculas celulares alvo, incluindo membranas lipídicas, enzimas citoplasmáticos e ácidos nucléicos. **(57)** Os dados sugerem alterações não no material genético, mas na alteração de proteínas de superfície, que favorecem o sucesso bacteriano na progressão da infecção, na qual a célula alvo do sistema imune é o macrófago.

O presente estudo está em concordância com estudos anteriores e confirma que o dano estrutural da membrana das bactérias Gram-negativas é induzido pela produção de oxigênio singleto na fotosensitização quando o fotossensibilizante reage com a membrana interna. O dano é o indicador principal da fotoinativação bacteriana. A inativação depende da capacidade de penetração do fotossensibilizante nas células bacterianas e o comprimento de onda da iluminação e não de sua resistência a antibióticos. **(54)**

Desde que PDT possa ser usada para fotoesterilização de água ou derivados do sangue e para o tratamento de infecções microbianas localizadas, é extremamente importante averiguar se as células com DNA danificado podem sobreviver ao fototratamento. **(52)**

7 CONCLUSÃO

Após a TFD, a interação entre *Yersinia enterocolitica* com a linhagem celular J774, foi possível concluir que:

- Em relação à capacidade invasiva de *Yersinia enterocolitica*, houve uma acentuada redução no número de bactérias no interior dos macrófagos da linhagem celular J774 após a TFDA com AlPcS₄, nos períodos de 24 e 48 horas. Esta redução está diretamente relacionada à sobrevivência das bactérias a atividade fotodinâmica.

- A ftalocianina no período de incubação de 48 horas mostrou uma diferença significativa resultando na redução no número de bactérias interiorizadas e aderidas a membrana celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- SILVA, N. S.; RIBEIRO, C. M.; MACHADO, A. H. A.; SOARES, C. P. Ultrastructural changes in *Tritrichomonas foetus* after treatments with AIPcS4 and photodynamic therapy. **Veterinary Parasitology**. v.146, p. 175-181, 2007.
- 2- THONG, P. S.; WATT, F.; REN, M. Q.; TAN, P. H.; SÔO, K. C.; OLIVO, M. Hypericin-photodynamic therapy (PDT) using an alternative treatment regime suitable for multi-fraction PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 82, p.1-8, 2006.
- 3- MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.79, p. 159-170, 2005.
- 4- GAD, F.; ZAHRA, T.; HASAN, T. HAMBLIN, M. Effects of Growth Phase and Extracellular Slime on Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Pathogenic Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n.6, p. 2173-2178, 2004.
- 5- DEMIDOVA, T.N.; GAD, F.; ZAHRA, T.; FRANCIS, K.P.; HAMBLIN, M.R. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.81, p.15–25, 2005.
- 6- HAMBLIN, M. R.; O'DONNELL, D.A.; MURTHY, N.; RAJAGOPALAN, K.; MICHAUD, N.; SHERWOOD, M.E.; HASAN, T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.49, p.941-951, 2002.
- 7- BERARDIS, B.; TORRESINI, G.; MAURIZIO, B.; MARINELLI, S.; MATTUCCI, S.; SCHIETROMA, M.; VECCHIO, L.; CARLEI, F. *Yersinia enterocolitica* intestinal infection with ileum perforation: report of a clinical observation. **Acta Bio Medica Ateneo Parmense**. v.75, p.77-81, 2004.
- 8- BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: The Charisma Continues. **Clinical Microbiology Reviews**. v.10, n.2, p. 257-276, 1997.
- 9- MACHADO, A.E.H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**. v. 23, n.2, p. 237-243, 2000.

- 10- MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of porphyrins and Phtalocianines**..v.5, p. 105-129,. 2001.
- 11- SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.33, p. 869-880, 2000.
- 12- TAMIETTI, B.F.P.; MACHADO, A.H.A., MAFTOUM-COSTA, M.; DA SILVA, N.S.; TEDESCO, A.C.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of Mitochondrial Activity Related to Cell Death after PDT with AIPcS4. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.25, n.3, p.175-179, 2007.
- 13- OLEINICK, N.L; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemistry and Photobiology Science**. v.1, p.1-21, 2002.
- 14- CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Review: Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.2, p. 1-23, 2005.
- 15- PAZOS, M. C.; SOARES, C.P.; DA SILVA, N. S.; DAMATTA, R.A.; PACHECO, M. T. T. Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. **Biocell**. v.27, n.3, p. 301-309, 2003.
- 16- TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J.H.M.; STEWART, F.A. **Photodynamic Therapy in Oncology**. The Oncologist. v.11, p. 1034-1044, 2006.
- 17- ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.1. p.27-42, 2004.
- 18- TEGOS, G.P.; HAMBLIN, M.R. Phenotiazinium Antimicrobial Photosensitizers Are Substrates of Bacterial Multidrug Reistance Pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, n.1, p. 196-203, 2006.
- 19- MACHADO, A.H.A.; BRAGA, F.M.P.; SOARES, C.P.; PELISSON, M.M.M.; JUNIOR, M.B.; DA SILVA, N.S. Photodynamic Therapy with a New Photosensitizing Agent. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.25, n.3, p.220-228, 2007.

- 20- GONÇALVES, P.J. **Estudos das características fotofísicas da porfirina mesotetrasulfonatofenil (TPPS4): efeitos da rotação interação com micelas de CTAB.** 2006. 140f. Tese (Doutorado -Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2006.
- 21- MACHADO, A.H.A. **Avaliação de um novo fotossensibilizante para Terapia Fotodinâmica.** 2006. 50f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2006.
- 22- MAISCH, T.; BOSL, C.; SZEIMIES, R.M.; LEHN, N.; ABELS, C. Photodynamic Effects of Novel XF Porphyrin Derivates on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.49, n. 4, p. 1542-1552, 2005.
- 23- KOLÁROVÁ, H.; MOSINGER, J.; LENOBEL, R. KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; STRNAD, M. In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. **Toxicology in Vitro.** v.17, p. 775-778, 2003.
- 24- REDDI, E.; CECCON, M.; VALDUGA, G.; JORI, G.; BOMMER, J. C.; ELISEI, F.; LATTERINI, L.; MAZZUCATO, U. Photophysical Properties and Antibacterial Activity of Meso-substituted Cationic Porphyrins. **Photochemistry and Photobiology.** v.75, n.5, p. 462-470, 2002.
- 25- ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W.M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology.** v. 144, p. 274-278, 2001.
- 26- WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 42, p. 13–28, 1998.
- 27- WONG, T.W.; WANG, Y.Y.; SHEU, H.M.; CHUANG, Y.C. Bactericidal Effects of Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Action on *Vibrio vulnificus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.49, n.3, p.895-902, 2005.
- 28- SPESIA, M.; LAZZERI, D.; PASCUAL, L.; ROVERA, M.; DURANTINI, E.N. Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges. **FEMS Immunology and Medical Microbiology.** v.44, p. 289–295, 2005.

- 29- MINNOCK, A.; VERNON, D.I.; SCHOFIELD, J.; GRIFFITHS, J.; PARISH, J.H.; BROWN, S.B. Mechanism of Uptake of a Cationic Water-Soluble Pyridinium Zinc Phthalocyanine across the Outer Membrane of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44, n.3, p.522-527, 2000.
- 30- SCALISE, I.; DURANTINI, E. N. Synthesis, properties, and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* using a cationic and a noncharged Zn(II) pyridyloxyphthalocyanine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 3037-3045, 2005.
- 31- O'RIORDAN K.; AKILOV, O. E.; HASAN, T. Review: The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.2, p. 247-262, 2005.
- 32- PEREIRA, A. N. et al. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Cell Growth and Procollagen Synthesis of Cultured Fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.31. p. 263-267, 2002.
- 33- VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemistry (Moscow)**.v. 69, n. 1, pp. 81-90, 2004.
- 34- KREISLER, M. et al. Effect of Diode Laser Irradiation on the Survival Rate of Gingival Fibroblast Cell Cultures. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.28. p. 445-450, 2001.
- 35- KUBLER, A.C. Photodynamic therapy. **Medical Laser Application**. v. 20, p. 37-45, 2005.
- 36- LIU, M. O. et al. Photodynamic applications of Phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.165, p. 131-136, 2004.
- 37- ODA, K.; OGURA, S.; OKURA, I. Preparation of a water-soluble fluorinated zinc phthalocyanine and its effect for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.59, p. 20-25, 2000.
- 38- FERREIRA, S.D.R.M. et al. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS₄. **Lasers in Medical Science**. v.18, p. 207-212, 2004.
- 39- FALCÃO, J.P.; BROCCHI, M.; PROENÇA-MÓDENA, J.L.; ACRANI, G.O.; CORRÊA, E.F.; FALCÃO, D.P. Virulence characteristics and epidemiology of

Yersinia enterocolitica and *Yersiniae* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. **Journal of Applied Microbiology**. v.96, p. 1230-1236, 2004.

- 40- RUCKDESCHEL, K.; ROGGENKAMP, A.; LAFONT, V.; MANGEAT, P.; HEESEMANN, J.; ROUOT, B. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with Macrophages Leads to Macrophage Cell Death through Apoptosis. **Infection and Immunity**. v.65, n.11, p. 4813-4821, 1997.
- 41- DARWIN, A. J; MILLER, V.L. Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. **Molecular Microbiology**. v.32, n.1, p. 51-62, 1999.
- 42- PEPE, J.C; MILLER, V.L. *Yersinia enterocolitica* invasin: A primary role in the initiation of infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Microbiology**. v.90, p. 6473-6477, 1993.
- 43- YOUNG, G.M.; BADGER, J.L.; MILLER, V.L. Motility Is Required To Initiate Host Cell Invasion By *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**. v.68, n.7, p. 4323-4326, 2000.
- 44- MEDEIROS, B.M.M.; COSTA, A.M.; ARAÚJO, P.M.F.; FALCÃO, D.P. Association between polyclonal B cell activation and the presence of antibodies in mice infected with *Yersinia enterocolitica* O:3. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.30, p.401-405, 1997.
- 45- GROSDENT, N.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; SORY, M.P; CORNELIS, G.R. Role of Yops and Adhesins in Resistance of *Yersinia enterocolitica* to Phagocytosis. **Infection and Immunity**. v.70, n.8, p. 4165-4176, 2002.
- 46- TUMITAN, A.R.P. **Influência da infecção por *Yersinia enterocolitica* na modulação de macrófagos M1 e M2 em camundongos suscetíveis e resistentes**. 2006. 91f. (tese para obtenção do título de doutor em Análises Clínicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara). 2006.
- 47- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2004. 540p.
- 48- TRANNOY, L.L.; TERPSTRA, F.G.; KORTE, D.; LAGERBERG, J.W.M.; VERHOEVEN, A.J.; BRAND, A.; ENGELENBURG, F.A.C. Differential sensitivities of pathogens in red cell concentrates to Tri-P(4)-photoinactivation. **Vox Sanguinis**. v.91, p. 111-118, 2006.

- 49- Molecular probes. Disponível em: <http://probes.invitrogen.com>. Acesso em: 10 junho 2007.
- 50- HAMBLIN, M.R; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemistry and Photobiology Sci.** v.3, p.436-450, 2004.
- 51- WOOD, S.; METCALF, D.; DVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 57, p. 680–684, 2006.
- 52- BERTOLONI, G., LAURO, F. M., CORTELLA G., MERCHAT M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1475, p. 169-174, 2000.
- 53- MINNOCK, A. VERNON, D.I., SCHOFIELD, J.; GRIFFITHS, J.; PARISH, J.H.; BROWN, S.B. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology.** v.32, p. 159-164, 1996.
- 54- NITZAN, Y.; ASHKENAZI, H. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* B by a Cationic Hydrophilic Porphyrin at Various Light Wavelengths. **Current Microbiology.** v. 42, p. 408–414, 2001.
- 55- MULLER, F. **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas: Estudo comparativo entre fotossensibilizantes.** 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2006.
- 56- ESTRADA, C. S. M. L.; VELÁZQUEZ, L. C.; GENARO, S.; GUZMÁN, A. M. S. Comparison of DNA extraction methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection from meat food by nested PCR. **Food Research International.** v.40, p. 637-642, 2007.
- 57- FIGUEIREDO, K.D. **Avaliação da interação *Yersinia enterocolitica* – Macrófago J774 após Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana.** 2003. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.