

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Valéria Abrahão

AÇÃO DA QUIMIOTERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA EM COLÔNIAS DE *Actinobacillus*
actinomycetemcomitans: estudo *in vitro*

São José dos Campos, S.P.

2005

Maria Valéria Abrahão

AÇÃO DA QUIMIOTERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA EM COLÔNIAS DE *Actinobacillus*
actinomycetemcomitans: estudo *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioengenharia da
Universidade do Vale do Paraíba, como
complementação dos créditos necessários
para obtenção do título de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora : Prof. Dra. Cristina Pacheco Soares
Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco

São José dos Campos, S.P.

2005

A139a

Abrahão, Maria Valéria

Ação da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana em colônias de *actinobacillus actinomycetemcomitans*: estudo *in vitro*/ Maria Valéria Abrahão. São José dos Campos: UniVap, 2005.

73f.: il.; 30cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

1. Fotoquimioterapia 2. Agentes fotossensibilizantes 3. Periodontia
I. Soares, Cristina Pacheco, Orient. II. Tedesco, Antonio Cláudio,
Co-Orient. III. Título

CDU:615.831

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura da aluna:



Data: 26 de setembro de 2005.

“AÇÃO DA QUIMIOTERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM COLÔNIAS DE *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: ESTUDO *IN VITRO*”

Maria Valéria Abrahão

Banca Examinadora:

Profa. Dra. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP) _____

Profa. Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **EDUARDO SABA CHUFFI** (UCCB) _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap
São José dos Campos, 26 de setembro de 2005.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Elias e Marisol.
Ao meu marido Ricardo e meu irmão Sérgio,
pelo apoio em todas as dificuldades
e estímulo a continuidade deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Grande Arquiteto do Universo**, por todas graças recebidas.

A minha orientadora **Prof^a. Dra. Cristina Pacheco Soares** pelo exemplo de mulher na área científica, mostrando sua competência, dedicação e compreensão.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Saba Chufji** que me fez admirar a Disciplina de Periodontia.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Tedesco** pela atenção e concessão da droga lipossomal.

Ao **Prof. Dr. Newton Soares** pela acolhida e apoio ao meu trabalho.

Ao **Prof. Dr. Egberto Munin** pela amizade, carinho e atenção dispensada.

A minha amiga **MSc Maria Walkíria S. L. Egoshi** por ser quem é.

Às minhas colegas do Laboratório de Cultura de Células, em especial **Sras. MSc. Zélia, Marta** e Srta. **Maíra Maftoum**, além das bolsistas e estagiárias por não pouparem esforços em me auxiliarem no experimento.

Ao apoio técnico do **Leandro Procópio Alves** do Laboratório de Ablação de Tecidos biológicos da Univap.

A Srta. **Andreza Simioni** da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Departamento de Química, pela contribuição com a preparação do lipossomo e por elucidar algumas dúvidas.

Ao colega **MSc Tércio Obara** pelo incentivo e exemplo de amizade a cada instante.

RESUMO

Esta claramente estabelecido que as bactérias são essenciais nas causas das doenças periodontais. Nas últimas décadas, as pesquisas têm confirmado uma relação entre doenças cardiovasculares e a doença periodontal. Com a intenção de parar a progressão da doença, tratamentos tradicionais têm objetivado minimizar a presença dos periodontopatógenos na região do sulco/bolsa periodontal, sem muito sucesso ou com sucesso limitado e alguns efeitos colaterais. A Terapia Fotodinâmica é uma técnica recente, não invasiva, usada *a priori* para doenças cancerígenas, mas que está sendo pesquisada também em outras enfermidades. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o crescimento *in vitro* do patógeno periodontal *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) quando da aplicação da Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (QTFDA), após tratamento com fotossensibilizador na forma de lipossomo, contendo cloro alumínio ftalocianina (ALPHCl) como fotossensibilizador, sob ação de um laser de diodo InGaAlP (fosfeto de índio gálio alumínio). O comprimento de onda utilizado foi de 685 nm, aplicado no modo contínuo, com densidade de energia de 2,6 J/cm², potência de 22 mW, cuja área irradiada foi de 0,785 cm², pelo tempo de 93 s. Os resultados obtidos foram as eliminações das colônias bacterianas de *A.a.* estudadas, em praticamente 100% dos testes realizados.

Palavras-Chave: Terapia fotodinâmica; Periodontia; *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*);

ABSTRACT

It is clearly established that bacteria are essential to cause periodontal diseases. In the last decades, researches have confirmed a relation between cardiovascular diseases and periodontal disease. With the purpose to stop the disease progression, traditional treatments have been used to minimize the presence of periodontal pathogens in the area of the periodontal pocket, without much success or with limited success and some collateral effects. The photodynamic therapy is a non invasive recent technique, used *a priori* in cancerigenous diseases, but is also being studied in other diseases. The aim of this work was to assess the *in vitro* growth of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*) during the application of Antimicrobial Photodynamic Chemiotherapy (QTFDA), whose drug carrier acted as liposome and contained aluminum phthalocyanine chloride (ALPHCl) as photosensitizer under the action of a diode laser InGaAlP (phosphate indium gallium aluminium). The wave length used was 685 nm, used in a continuous mode, with energy density of 2,6 J/cm², power of 22 mW, with an irradiation area of 0,785 cm² during 93 s. The results obtained were the elimination of the studied bacterial colonies of *A.a.*, in almost 100% of the cases.

Key words: PDT, Periodontology, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*)

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Fotomicrografia de uma colônia da *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Fonte: Lab. Microbiologia Oral e Anaerobiose do ICB/UFMG

Fig. 2. Fórmula estrutural do fotossensibilizador – AlPHCl – cloro alumínio ftalocianina.

Fig. 3. A) Ilustração de um lipossomo mostrando a bicamada unilamelar fosfolipídica e o centro aquoso; B) Seção transversal de um lipossomo

Fig. 4. Representação da Estrutura Química do Fosfolipídio de DL- α -Diestearoil Fosfatidilcolina (DSPC), Utilizado na Preparação de Lipossomos.

Fig. 5. Parede celular de bactéria Gram- negativa

Fig. 6. Diagrama de Jablonski simplificado

Fig. 7. Aparelho de laser de baixa intensidade. Disposição da placa para aplicação do laser

Fig. 8. Representação gráfica das médias e respectivos erros da média para os quatro grupos.

Fig. 9. Placa de Petri mostrando as colônias de *A.a.* do grupo controle.

Fig.10. Grupo QTFDA- Placas de Petri contendo de 1 a 2 colônias de *A. a.* ou absolutamente nenhuma, como na placa abaixo e a esquerda da foto, demonstrando morte de praticamente 100% dos microorganismos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de Unidades Formadoras de Colônia nos quatro grupos estudados.

Tabela 2 - Teste de Comparações Múltiplas

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>A. a.</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
AlPcS ₄	Ftalocianina Cloro-Alumínio Tetrasulfonada
AlPHCl	cloro alumínio ftalocianina
BHI	Infusão de Cérebro Coração
D.O.	Densidade óptica
DSPC	DL- α -Diestearoil Fosfatidilcolina
EROS	espécies reativas de oxigênio
FCG	fluido cervical gengival
InGaAlP	fosfeto de índio gálio alumínio
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LPS	lipopolissacardeo
PBS	solução tampão fosfato
<i>P. g.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PPC	Zinco Ftalocianina catônica
QTFDA	Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana
RBCCs	concentrado de células vermelhas do sangue- eritrócitos
TFD	Terapia Fotodinâmica.
TSA	Ágar Trípico de Soja
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

	pg
1.INTRODUÇÃO	01
1.1 Terapia Fotodinâmica	02
1.2 Fotossensibilizador	03
1.2.1 Ftalocianinas	05
1.3 Lipossomos	06
2. REVISÃO DA LITERATURA	09
2.1 <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans (A.a.)</i> e a periodontite	09
2.1.1 Interação de lipossomo com a parede celular bacteriana	21
2.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)	24
2.3 Fotossensibilizador	31
3. PROPOSIÇÃO	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Cepa Bacteriana	36
4.1.1 Soluções	36
4.2 Meio de Cultura Bacteriano	37
4.2.1. Incubação do <i>A.a.</i> com ALPHCl lipossomal	37

4.2.2. Preparação do fotossensibilizador ALPHCI lipossomal	38
4.2.3. Irradiação	38
4.2.4. Parâmetros da Irradiação	39
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	48
BIBLIOGRAFIA	49

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral é um meio ambiente especial do hospedeiro, que possui características próprias como temperatura, umidade, nutrientes da própria dieta, células epiteliais e componentes salivares, que facilitam o estabelecimento e crescimento de uma grande variedade de microorganismos da água, ar, alimentos e de outras fontes. Nesta “incubadora” que é a boca, pode desenvolver numerosas doenças, quando a harmonia do binômio, microorganismo e imunidade do hospedeiro, sofrer desequilíbrio (CARRANZA, 1992).

As periodontites são inflamações crônicas dos tecidos de suporte dos dentes que são osso alveolar propriamente dito, cemento e ligamento periodontal, causadas pela presença de microorganismos específicos da placa dental. Embora mais de 300 espécies de microorganismos tenham sido isolados das bolsas periodontais, só uma pequena porcentagem destes, são agentes etiológicos reais (MOORE; MOORE, 1994). A doença tem seu início e sua progressão associada às mudanças quantitativas e qualitativas que ocorrem na microbiota da placa bacteriana subgengival (DARVEAU et al., 1997; SALVI et al., 1997; GREENSTEIN, 1990). Um número limitado de microorganismos incluindo-se o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*), são principais periodontopatógenos por possuírem vários fatores de virulência, capacidade de evasão às defesas do hospedeiro e transmissão aos membros da família, através da saliva (SLOTS; GENCO, 1984).

A remoção mecânica do biofilme é um método costumeiro de tratamento. Antissépticos bucais e antibióticos são também usados, mas desenvolvem resistência ao

microorganismo alvo, ruptura da microflora oral e problemas associados com o uso de cada um desses agentes (SILVA, 1999).

A fig.1, mostra uma colônia com aspecto estrelado em que Blix e cols. em 1990 sugeriram ser projecções citoplasmáticas .

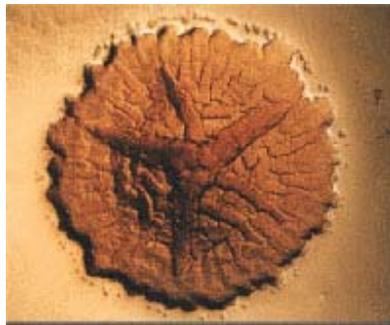


Fig.1 .Fotomicrografia de uma colônia da *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Lab. Microbiologia Oral e Anaerobiose do ICB/UFMG- http://www.periufmg.com.br/centrodeestudos_1_microbiologia.htm-25/09/03)

1.1. TERAPIA FOTODINÂMICA

Civilizações do antigo Egito e da Índia empregavam a terapia da luz solar em doenças da pele, em combinação com preparados de extratos de plantas. Só recentemente a comunidade científica resgatou essa idéia, que Oscar Raab teve entre o inverno de 1897 a 1898, quando era estudante na Faculdade de Farmácia da Universidade de Munique. Com seus relatos, demonstrou que o *Paramecium* era rapidamente morto pela luz visível na

presença de oxigênio, usando-se baixas concentrações de corantes, como acridina e eosina. A acridina é um composto com efeito inibidor seletivo sobre as bactérias, sendo mais eficiente contra espécies gram-positivas. Possui pouca ação antifúngica (TAPPEINER, 1903 apud MACHADO, 2000)

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento para a Oncologia já que as terapias convencionais apresentam efeitos colaterais que acabam danificando células não cancerosas junto com as dos tumores malignos e apresentam eficiência limitada. Apesar do seu maior enfoque ser nesta área, outras doenças como artrite reumatóide sistêmica, micoses fungóides (WOLF et al, 1994), verrugas, arteriosclerose, psoríase (WEINSTEIN, 1991, apud MACHADO, 2000), degeneração macular da retina, restenoses, SIDA, herpes simplex 1 e 2, varicela zoster e outras infecções bacterianas (VAN DER MEULEN et al., 1997) têm se beneficiado deste método.

A TFD é baseada numa reação fotoquímica citotóxica onde o oxigênio presente nas células, sofre uma reação com uma droga fotossensibilizadora, que é um corante, iniciada pela emissão de luz intensa, a qual é produzida por um laser (MACHADO, 2000).

1.2. FOTOSSENSIBILIZADOR

São substâncias corantes, orgânicas ou minerais, naturais ou sintéticas, caracterizadas por sua habilidade de absorver luz visível (400 a 700 nm). Um fotossensibilizador é uma substância que induz sensibilidade luminosa a processos

químicos e físicos, normalmente insensíveis à luz (WOEHRLE et al., 1995). A fotossensibilização é possível para todo o espectro da luz, desde o ultravioleta distante (UV-C) - 100 a 200 nm até o infravermelho distante - 8 a 14 μ m (MOSER, 1998). Com o uso do corante - fotossensibilizador - Oscar Raab, observou o aumento da toxicidade sobre os microorganismos, pelo aumento da intensidade luminosa. Em 1903, Hermann von Tappeineir, professor de Raab, e Jesionek, dermatologista, fizeram a primeira aplicação de outro fotossensibilizador, o corante eosina, no tratamento do câncer.

Um fotossensibilizador deve preencher os seguintes requisitos: 1) apresentar um produto final de composição conhecida; 2) gerar oxigênio singlete; 3) deve ter pouca ou nenhuma toxicidade na ausência de luz e ser termodinamicamente estável; 4) deve possuir larga banda de absorção, com um alto valor do coeficiente de extinção, chamada de banda Q na região final do vermelho do espectro visível, onde os tecidos têm baixo coeficiente de absorção; 5) hidrofobicidade, quanto mais hidrofóbico, maior a sua incorporação pelas células do tumor e melhor o efeito da TFD; 6) mostrar dificuldade para agregação, pois quando introduzida em um meio incompatível (hidrofílico/hidrofóbico), tende a se agregar através da formação de ligações entre si, criando uma proteção contra o meio em que estão dispersas e perdem o efeito fotodinâmico (MOSER, 1998).

1.2.1. FTALOCIANINAS

A porfirina é o esqueleto básico para uma ampla variedade de derivados sintetizados, como as benzoporfirinas, clorinas, ftalocianinas entre outras. A molécula de porfirina e suas variações são largamente encontradas nos seres vivos: são as unidades centrais em moléculas como a clorofila, hemoglobina e a vitamina B₁₂. As porfirinas de origem animal são completamente substituídas nas posições 1-8 e diferem uma das outras pela natureza dessas substituições. As hematoporfirinas e seus derivados, foram os primeiros fotossensibilizadores utilizados nos testes clínicos para a TFD do câncer. O Photofrin[®] (fotossensibilizante), foi liberado em 1994 pelo governo japonês na terapia do câncer de pulmão (Folha de São Paulo, 1995)

Em 1995, EUA autorizou a droga na terapia de câncer de esôfago (Folha de São Paulo, 29/12/1995) e em 1996, foi a vez do governo francês. Apesar de terem sido muito utilizados em ensaios clínicos, esta classe de compostos apresenta sérias desvantagens. Não são seletivos como se deseja e causam fotossensibilização à pele por várias semanas, após a aplicação. A banda de absorção é muito fraca ($\cong 630\text{nm}$) na região do vermelho (TEDESCO, 2003).

As ftalocianinas são porfirinas sintéticas, com uma porção pirrol condensada com um anel benzênico e ligadas por um átomo de nitrogênio. Elas constituem uma larga classe de componentes, com alto coeficiente de excitação, em região espectral do vermelho (630-800 nm), apresentando grande eficiência e excelentes propriedades para localização de tumor (BEN-HUR, 1992, apud LEZNOFF, 1993) permitindo doses pequena da droga injetada, em relação aos corantes de primeira geração de fotossensibilizador (JORI, 1996).

Especificamente a cloro alumínio ftalocianina (AlPHCl), que tem sua fórmula estrutural apresentada na fig. 2, destacando o íon de metal no centro do anel, apresenta um tempo de vida longo no estado singlete (= 3 a 8 ns) com um alto rendimento quântico (RÜCH, et al. 1996). Mas, infelizmente, a AlPHCl é insolúvel em água e solventes biológicos.

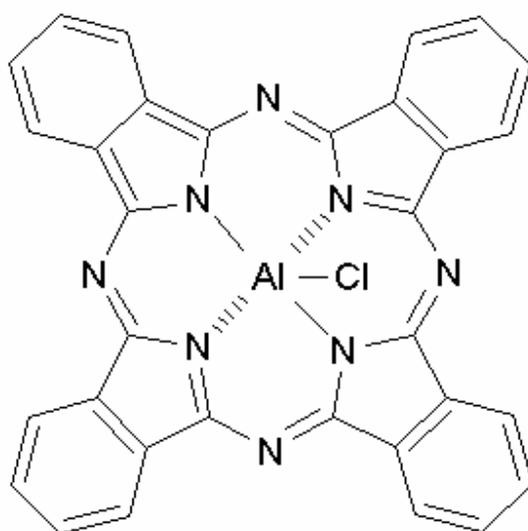


Fig. 2. Fórmula estrutural do fotossensibilizador – AlPHCl – cloro alumínio ftalocianina. .
(www.sigmaaldrich.com – 17/10/03)

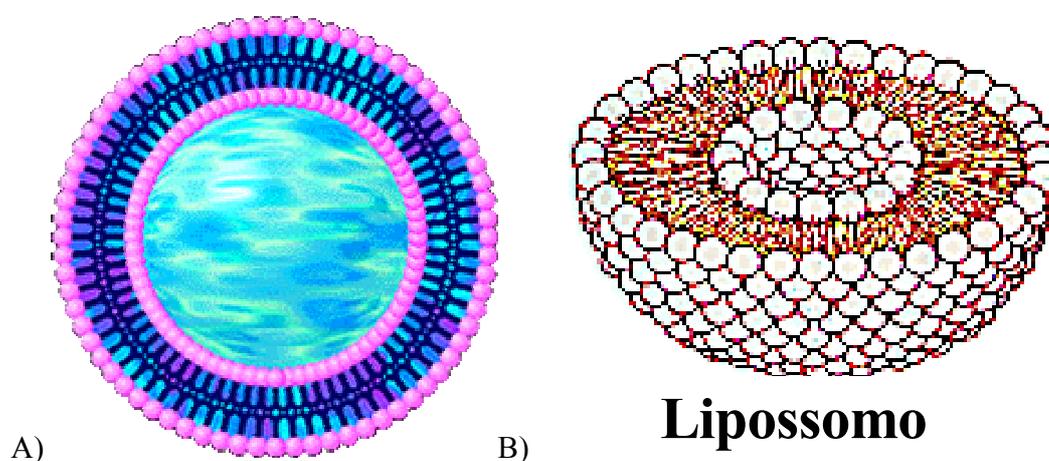
1.3 LIPOSSOMOS

Lipossomos, são vesículas microscópicas, constituídas de múltiplas bicamadas lipídicas concêntricas, formadas quando uma solução aquosa é adicionada a um filme lipídico seco (LOPEZ-BERESTEIN, 1987).

Foi demonstrado pela primeira vez por Alec Bangham et al.(1965) que a difusão de cátions e ânions monovalentes em cristais líquidos de lectina é destacadamente análoga à difusão destes íons, através de membranas biológicas. A habilidade dos lipossomos (como estes cristais mais tarde foram chamados) de incorporar solutos para os quais são seletivamente permeáveis, fez do sistema, um modelo para membranas celulares. Isto formou a base para o conceito de lipossomo carreador de drogas (BONVENTRE et al, 1978). O lipossomo, por sua semelhança com a estrutura de parede celular bacteriana, possibilita que um derivado de porfirina, faça o papel de um fotossensibilizador agindo como uma medicação, já que permite a entrada na célula patológica.

Essas moléculas lipídicas, normalmente fosfolipídeos, são lipídeos que contêm fosfato em sua molécula, além de ácidos graxos e um álcool. São naturalmente biodegradáveis e não tóxicos, como a fosfatidilcolina, formada naturalmente quando estes são dispersos em meio aquoso. Essas moléculas de fosfatidilcolinas, não são solúveis em água e em meio aquoso, alinham-se em bicamadas planas, para minimizar as interações desfavoráveis entre a fase aquosa e as longas cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos, que estão na cauda, voltada para o interior da membrana interna (fig. 4). Isso é eliminado quando as bicamadas dobram-se (sobre si mesmas), para formar uma vesícula fechada (NEW, 1994) mostrado na fig.3. A fluidez e carga das membranas lipossomais, podem ser alteradas para objetivos específicos, como no caso de reconhecimento dos macrófagos, nos quais, lipossomos carregados negativamente e com maior fluidez nas membranas, são preferencialmente fagocitados. Normalmente, a incorporação de esteróides na membrana, aumenta a rigidez e estabilidade biológica dos lipossomos (LOPEZ-BERESTEIN, 1987). Um lipossomo deve ser capaz de se manter eficientemente estável na circulação, tornando a

droga disponível para o alvo, protegendo assim a droga do metabolismo e da inativação do plasma. O tamanho do lipossomo ou vesículas, pode variar de dezenas de nanômetros a dezenas de micrômetros de diâmetro (NEW, 1994). O lipossomo preparado pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Tedesco da USP de Ribeirão Preto é convencional e tem 50 a 70 nm, numa concentração de 5,0 $\mu\text{M/ml}$.

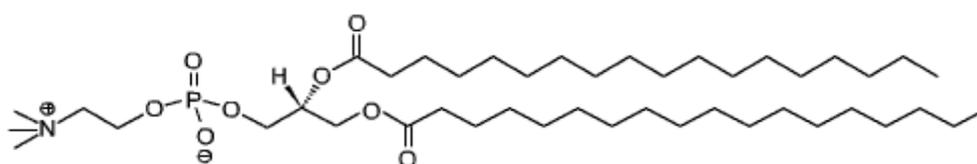


Lipossomo

Fig. 3: A) Ilustração de um lipossomo mostrando a bicamada unilamelar fosfolipídica e o centro aquoso;

B) Seção transversal de um lipossomo. STRYER, L. **Biochemistry**, 4. ed., New York : W.H. Freeman and Co., p.290, fig. 11-19, 1995.

1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DSPC)



©Avanti Polar Lipids

Fig. 4: 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine - Representação da estrutura química do fosfolipídio de DL- α -diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), utilizado na preparação de lipossomos. (www.sigmaaldrich.com 17/10/03)

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) e a periodontite.

O conceito de especificidade bacteriana, foi discutido por Lõesche em 1976 e certificada na década de 80 por Slots, Newman e Socranky e cols, que afirmaram que a espécie bacteriana é mais relevante para o desenvolvimento e perpetuação da periodontite do que simplesmente a quantidade de placa e o tempo de acúmulo da mesma (CARRANZA, 1992). Um limitado número de espécies de microorganismos, tais como; *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*) são alguns dos importantes periodontopatógenos na etiologia da periodontite, por possuírem vários fatores de virulência, capacidade de evasão às defesas do hospedeiro e transmissão através da saliva (AISIKAINEN et al. 1997, DENNISON ;VAN DYKE, 1997, SLOTS; GENCO, 1984). O *A.a.* é uma espécie classificada como membro da família *Pasteurellaceae*. É um cocobacilo Gram-negativo pequeno, anaeróbio facultativo, não esporulado, que necessita também de CO₂ para suas necessidades de crescimento. Não cresce em ágar sangue, pois é inibido por traços de metais tóxicos e por ácidos graxos encontrados no meio. *In vitro*, em isolamento primário, as colônias apresentam-se convexas, ligeiramente irregulares e com aspecto interno em forma de estrela, que Blix et al. (1990) sugerem corresponder às projeções citoplasmáticas. Tem 1mm de diâmetro característico da espécie. Com os repiques sucessivos das placas, essas projeções tendem a

se tornar mais tênues. No cultivo em meio líquido, mostram-se colônias com crescimento granular e aderida à parede do tubo, sem turvar o meio. Apresentam metabolismo fermentativo (KRIEG; HOLT, 1994). Estão associadas a infecções actinomicóticas, endocardite bacteriana subaguda, pericardite, infecções em próteses valvares, linfadenite cervical, infecções pulmonares, endoftalmite e pneumonia necrosante. Os principais fatores predisponentes para o desenvolvimento da endocardite de válvulas nativas ou de próteses valvares, são dentições precárias e manipulação dentária recente (KONEMAN, 2001). Está associada também a várias formas de periodontite, tais como: periodontite pré-puberal, juvenil, do adulto, agressivas e refratárias. Mas pode ser encontrada ainda em periodontos saudáveis, demonstrando que há variações em sua virulência e na resistência do hospedeiro (ALALUUSUA; ASIKAINEN, 1998, SLOTS; GENCO, 1984). Na bolsa periodontal, estas bactérias estão densamente aglomeradas. Esta área retentiva forma um ambiente relativamente estagnado, e os microorganismos que não aderem às superfícies duras, são os que povoam essa região. Esse ambiente apresenta baixo potencial de oxidação-redução, o que permite que apenas bactérias anaeróbicas restritas se estabeleçam. Saglie et al. (1977) afirmam que na porção apical da bolsa periodontal, os organismos filamentosos são pequenos em número e os depósitos bacterianos são dominados por bacilos Gram-negativos.

Os fatores de virulência do *A.a.* têm sido exaustivamente estudados. Seu potencial patogênico interfere nas defesas do hospedeiro, inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos pela produção de uma leucotoxina que também tem a capacidade de matar macrófagos (VAN DYKE et al., 1982), mostra citotoxicidade para os fibroblastos (SHENKER et al., 1982), e a inibição da produção de imunoglobulinas G e M por linfócitos B. Pesquisas mostram que

há uma grande população de células T no infiltrado inflamatório e essas são reguladoras da resposta imune; entretanto informações de como a célula T responde inicialmente e qual o componente da placa dental que modera esta resposta, ainda é crítico para o entendimento da patogenicidade da doença periodontal. O *A.a.* contém produtos protéticos que *in vitro* tem a habilidade de estimular a seletividade de células supressoras T e potencialmente suprimir a produção de imunoglobulinas (SLOTS, 1999). Produz enzimas e fatores tóxicos que tem a capacidade de destruição do tecido periodontal, como a epiteliotoxina, colagenase, bacteriocinas, invasinas e adesinas, e ainda a presença de um elemento extracromossômico, o plasmídeo, que explica o maior potencial patogênico de uma cepa em relação à outra do mesmo clone (KILEY; HOLT, 1980; ROBERTSON et al., 1982; KAMEN,1983). Através da fermentação de carboidratos e análise antigênica, o *A.a.* foi classificado em dez biótipos e cinco sorotipos, além de cepas não tipáveis. Os sorotipos a e b têm sido relacionados às infecções orais e o sorotipo c às infecções extra-orais. Diante de tantos mecanismos de agressões as células, os tratamentos periodontais como: tratamento mecânico, antibioticoterapia e colutórios, têm-se mostrado incipiente, como relata Gaetti-Jardim et al .(1998) quando usou Listerine® associado à remoção mecânica da placa bacteriana, e verificou apenas moderada atividade antimicrobiana, sendo incapaz de diminuir a frequência dos periodontopatógenos.

Koneman (2001) descreveu que o *A.a.* inclui cepas inicialmente designadas como grupos HB-3 e HB-4. Esse microorganismo compartilha com numerosas características de cultivo e bioquímica ao gênero *Haemophilus*. O *A. a.* forma parte da microbiota normal da cavidade oral, principalmente nas dobras gengivais e supra-gengivais, existindo anticorpos monoclonais tipo-específicos para os cinco sorotipos a, b, c, d, e. O *A.a.* é um cocobacilo

Gram-negativo pequeno, associado à infecções actinomicóticas, endocardites, bacteremia, infecções de feridas e dentárias. Com frequência, esse microorganismo foi isolado junto com espécies de *Actinomyces*, a partir de abscessos actinomicóticos. O nome deriva do isolamento concomitante com espécies desse gênero. Entretanto, o *A. a.* também foi isolado de lesões similares, na ausência do actinomiceto anaeróbico. O crescimento em caldo é escasso e as colônias aderem às paredes do tubo. A coloração com Gram mostra cocobacilos Gram-negativos pálidos. Após repetidos subcultivos, podem ser observadas células mais longas nos esfregaços corados.

Para Zambon et al (1985) a patogenia das lesões periodontais é em parte dependente da virulência bacteriana, tal como da presença e concentração dos microorganismos capazes de produzir a virulência. Pelo menos três características dos microorganismos periodontais foram identificadas como contribuintes da sua capacidade de agir como patogênicos: 1) a capacidade de colonizar a área; 2) a habilidade de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro; 3) e a habilidade de produzir substâncias que possam iniciar diretamente a destruição dos tecidos. Torna-se agora aparente, que dentro de uma gama de espécies bacterianas, apenas determinadas espécies sejam patogênicas, como o *A. a.* ou as *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*). Por exemplo, dados recentes indicam que colônias de *A.a.* em pacientes jovens, com periodontite juvenil localizada, diferem daquelas em pacientes mais idosos com doença periodontal ativa ou previamente existente, em relação à capacidade de produzir leucotoxinas, que se pensa ser uma característica de virulência importante desta espécie. As bactérias possuem a habilidade de sobreviver e de se propagar nas bolsas periodontais, e no complexo ecossistema da placa bacteriana.

Alguns exemplos de fatores foram identificados como promotores importantes das patogenias periodontais.

Para Hamada et al. (1991) os microorganismos virulentos podem mostrar fimbrias ou moléculas tais como as adesinas, que promovem sua associação com os tecidos. Além disso, a virulência pode ser realçada pela presença de um polissacarídeo capsular, como no caso das *P. g.*, o qual fornece resistência às defesas dos hospedeiros como os anticorpos e complementos. Alguns microorganismos são capazes de invadir e se manter dentro nos tecidos hospedeiros, assim como atravessá-los, criando um meio ambiente adaptado para sua proteção, e ganhando acesso mais direto a tecidos mais suscetíveis dos hospedeiros. Duas cepas patogênicas periodontais principais, como o *A.a.* e as *P.g.*, tem capacidade para invadir estes tecidos. O *A.a.* pode passar através das células epiteliais e chegar até os tecidos conjuntivos subjacentes, enquanto que as *P.g.* podem invadir e parasitar a célula epitelial. É possível que a invasão desse tecido por estes microorganismos possa explicar a dificuldade na erradicação do *A.a.* pela raspagem mecânica da raiz, e possa também explicar as relativas e altas concentrações no soro do hospedeiro, de anticorpos reativos para estas duas espécies estudadas em comparação com outras bactérias da placa bacteriana dental. Outro dado importante é que quase todos os microorganismos patogênicos, possuem a habilidade de “enganar” os mecanismos de defesa do hospedeiro, que de um modo geral, controlariam tais infecções e evitariam a doença. Além disso, entre estes mecanismos de defesa no periodonto, tem-se a limpeza das bactérias pelos neutrófilos, com a assistência de anticorpos e proteínas do sistema de complemento. Na saúde, os neutrófilos formam uma barreira na interface placa bacteriana/tecido, controlando o número de bactérias e evitando

o ingresso das mesmas ou dos seus produtos. O sistema imunológico assiste de um modo especial o organismo do hospedeiro, com os neutrófilos produzindo anticorpos que opsonizam as bactérias; estes anticorpos por si só ou em conjunto com o sistema complemento, permitem aos neutrófilos reconhecerem, ingerirem e degradarem as bactérias. O repositório local de tais anticorpos é o fluido cervical gengival (FCG), uma secreção inflamatória modificada, que flui através do epitélio juncional e sulcular para dentro da bolsa gengival e com uma certa pressão sobre a gengiva, drenam para a boca, misturando-se à saliva. Entre uma grande variedade de outros fluidos, o FCG contém componentes do soro, tais como anticorpos que podem ser produzidos também localmente e outras substâncias tais como os constituintes enzimáticos dos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos, que podem refletir a imunologia local e os processos inflamatórios. Os anticorpos antibacterianos podem proporcionar muitas funções protetoras. Os anticorpos opsonizantes promovem a fagocitose através de interações com os receptores Fc da fagocitose. Em alguns casos, os anticorpos podem ativar o sistema complemento, uma cascata de proteínas antibacterianas, que pode depositar opsoninas suplementares na superfície das bactérias, liberar mediadores químicos que recrutam neutrófilos adicionais e depositar complexos macromoleculares na superfície bacteriana, que irão lisar e matar certas bactérias. Anticorpos também são produzidos de modo específico, para neutralizar toxinas e enzimas bacterianas, ou interromper a colonização bacteriana, evitando a aderência ao dente ou à superfície epitelial de outras bactérias. Pouco é conhecido acerca da seqüência dos acontecimentos que levam à ruptura inicial desta barreira de defesa e subsequente início da periodontite. No entanto, sabe-se bastante acerca dos mecanismos utilizados por algumas bactérias periodontais para ultrapassarem este mecanismo protetor.

Alguns microorganismos, tais como acúmulos de *A.a.* e *Campilobacter rectus*, produzem leucotoxinas, que podem matar os neutrófilos, interrompendo desta maneira, o mecanismo de defesa antibacteriano primário no sulco gengival. Em segundo lugar, algumas bactérias tais como *P.g.*, produzem enzimas proteolíticas, que degradam diretamente anticorpos e proteínas do sistema complemento no soro circundante ou no FCG, ou ainda, evitam o acúmulo destas moléculas na superfície bacteriana. Esta atividade evita o acúmulo de fatores quimiotáticos do sistema complemento, cujos derivados, de um modo geral, recrutam numerosos neutrófilos adicionais para o local da infecção, que ajudam a atrasar os mecanismos patogênicos das bactérias proteolíticas, por si só, existentes na região. Terceiro, algumas bactérias, tais como *A.a.*, produzem fatores que impedem a respostas imunológicas sobre si mesmas e sobre outras bactérias, diminuindo a produção do que seriam os anticorpos protetores. Finalmente, como mencionado, algumas bactérias podem invadir as células e evitar o contacto destas com os neutrófilos, assim como com as moléculas do sistema complemento. Por isso, a bactéria patogênica parece ter conseguido um grande número de maneiras pelas quais conseguem fugir do controle dos neutrófilos, que é a primeira linha de defesa do hospedeiro, seja diminuindo diretamente o seu número ou destruindo os seus mecanismos de defesa, que promovem a opsonização, fagocitose e destruição bacteriana. As interações entre neutrófilos, anticorpos e complementos, fornecem a proteção primária contra os efeitos nocivos dos patógenos periodontais. Em geral, níveis elevados de anticorpos não aparecem no soro do paciente ou no FCG até algum tempo depois de iniciado o processo de doença. Altos níveis de anticorpos reativos aos fatores de virulência bacteriana tais como a leucotoxina do *A. a.*, as proteases das *P. g.* e as preparações dos antígenos bacterianos, ocorrem relativamente tarde no processo da

doença e, provavelmente, não têm papel importante na prevenção do início da mesma. Contudo, parece que no caso da resposta dos anticorpos ao *A.a.* e *P.g.* nos pacientes com início de periodontite, a dimensão e gravidade da doença é menor nos pacientes com os títulos mais elevados de anticorpos no soro e localmente; assim, algumas respostas dos anticorpos às doenças periodontais podem em último caso evitar ou atrasar a progressão da doença já existente. As respostas de proteção à evolução das doenças periodontais podem ser ultrapassadas de diversas maneiras como foi salientado antes, e a concentração de patógenos na placa subgingival pode alcançar o nível crítico necessário para o início ou progressão da destruição do tecido. Apesar de se ter mostrado que pelo menos duas bactérias patogênicas invadem as camadas superficiais dos tecidos periodontais, é facilmente visível pela observação histológica que os efeitos patológicos no tecido conjuntivo e osso alveolar ocorrem em locais mais profundos da bolsa periodontal e da placa subgingival. Por esta razão, além dos possíveis efeitos patológicos diretos das bactérias nos tecidos periodontais, é claro que o dano no periodonto de inserção também pode acontecer por meios indiretos. Os produtos bacterianos podem ter acesso aos constituintes celulares dos tecidos periodontais e ativar processos celulares que sejam destrutivos para o tecido conjuntivo do ligamento periodontal e do osso alveolar.

Araújo et al. (1998) trabalharam com dois grupos de pacientes, um submetido à raspagem e outro à raspagem e tratamento com doxiciclina. Os resultados permitiram concluir que os antibióticos estudados foram incapazes de eliminar totalmente o *A.a.*

Há vários antibióticos testados como: eritromicina (PAPPAS, 1987; GORDON et al., 1993); tetraciclina (LISTGARTEN et al., 1978; KORNMAN, 1982; LINDHE, 1984 SANDOR; UFFEN, 1987; NOVAK et al., 1991) clindamicina (WALKER et al., 1981;

BARTLETT et al., 1981; GILL ; PALLASCH, 1981; GROSS, 1985) metronidazol (GOLOMB, 1984; MITCHELL, 1984; DESCOTES et al., 1984; LARSEN, 2002) que apresentaram melhores resultados associados à raspagem, mas normalmente tem resultados negativos se utilizados sózinhos. Mas todos esses antibióticos tem efeitos colaterais e alguns exigem uma concentração muito alta do fármaco, no fluido gengival, para que haja eficácia, tornando-se nefrotóxico e hepatotóxico. Outros autores também demonstraram em seus trabalhos a resistência do patógeno ao antibiótico depois de determinado tempo de uso (RÖE et al., 1995; SLOTS, 1999 ; KONEMAN, 2001).

Ratka-Krüger et al. (2005) trabalharam em três centros (dois na Alemanha e um na Noruega), com 111 pacientes, entre 23 a 71 anos que tinham moderada a avançada periodontite. Foi excluído tratamento com antibiótico nos últimos 6 meses e cirurgias por 1 ano. Foram propostos três tratamentos. Primeiro, só raspagem e alisamento radicular. Segundo, adicionaria um gel placebo e o terceiro, RAR (raspagem e alisamento radicular) mais um gel de 14% de doxiciclina. As placas subgengivais eram analisadas logo após, depois de 3 meses e 6 meses para *A.a*, *Tannerella forsythensis* (*T.f.*), *P.g.* and *Treponema denticola* (*T.d.*) usando sonda de RNA. Os pacientes eram testados para resistência contra doxiciclina, amoxicilina, ácido clavulânico, cefoxitina, clindamicina e metronidazol. Cada paciente tinha um dente tratado por cada modalidade. A aplicação local do antibiótico não apresentava efeitos colaterais devido ter baixa concentração no dente, apenas 15 mg. Em contra partida as doses sistêmicas são de 100 a 200 mg. Como conclusão, o estudo demonstrou-se que a aplicação subgengival de 14% de doxiciclina gel na bolsa periodontal aliada à raspagem mais alisamento radicular, resultou numa pronunciada redução do

patógeno periodontal depois de 3 meses e estabilizando até os 6 meses e a resistência a doxiciclina não foi observada.

O trabalho de Silva (1999) sobre os fatores de virulência e aspectos relevantes da transmissibilidade do *A. a.* em periodontites tem revolucionado os tratamentos periodontais nas últimas duas décadas, devido ao conhecimento da microbiota associada às áreas periodontais doentes. O surgimento de novas técnicas microbiológicas propiciou o estudo e o descobrimento destas, contra os mecanismos de virulência dos patógenos periodontais. Mais recentemente, com a padronização da biologia molecular, está sendo possível diferenciar, numa mesma espécie, possíveis clones mais associados com as patologias periodontais, bem como tornar mais eficiente a identificação destes microorganismos.

Para Schenkein (1999) está largamente aceito que o início e a progressão da periodontite são dependentes da presença de microorganismos capazes de causar a doença. Apesar de mais de 300 espécies de microorganismos terem sido isoladas das bolsas periodontais, pensa-se que somente uma pequena porcentagem destes agentes sejam realmente fatores etiológicos da doença. Entre as características que tornam um microorganismo ou um grupo de microorganismos agentes etiológicos das doenças periodontais, estão os fatores de virulência bacteriana. Estes são constituintes bacterianos ou metabólitos capazes de causar interrupção dos mecanismos homeostáticos ou protetores da defesa do hospedeiro, para causar progressão ou o início da doença. Se tais características de virulência bacteriana contribuem verdadeiramente para a patogenia da

doença, a modificação de tais fatores deve resultar na melhoria da condição clínica de acordo com o autor.

Para Gasparetto et al (2000) o *A.a.* é considerado um importante patógeno na doença periodontal, particularmente na periodontite juvenil localizada. O mecanismo de adesão bacteriana às células epiteliais bucais, aos dentes e a outras bactérias, constitui-se no passo inicial na colonização e patogênese nos quadros de gengivite e periodontite. Neste estudo avaliou-se a aderência do *A. a.* às células epiteliais, a sua variabilidade e os aspectos ultra-estruturais de 21 culturas isoladas e de uma cepa de referência de *A. a.*, quando submetidos a repiques sucessivos. Todos os isolados testados aderiram às células epiteliais e os repiques sucessivos determinaram variações nas taxas de aderência de cada grupo de bactérias. Os isolados que apresentaram alto índice de aderência também mostraram grande quantidade de componentes extracelulares, fímbrias, vesículas e ou material amorfo extracelular. O aspecto morfológico da colônia de *A. a.*, que se mostra estrelado está provavelmente relacionado ao tipo de interação intercelular bacteriana. A formação de grumos quando a bactéria é cultivada em meio líquido, sugere uma relação entre a proliferação celular e a forma da colônia recém-isolada, estrelada ou em grumos. O acúmulo de produtos extracelulares sugere a formação de septos e sua conseqüente divisão, característica não relatada na literatura. Os autores concluíram :

- que os isolados de *A. a.* testados mostraram capacidade variável de adesão às células epiteliais;
- que a variabilidade na capacidade de aderência foi influenciada pelos repiques sucessivos;

- que os isolados de *A. a.* que formaram grumos no isolamento inicial não se prestaram adequadamente aos testes de aderência pelo método empregado;
- que os isolados que apresentaram elevados índices de aderência mostraram abundante quantidade de componentes celulares, os quais estavam diretamente relacionados ao mecanismo de adesão.

Ximenez-Fyvie et al. (2000) compararam e relacionaram as composições microbianas da placa supra e sub-gengival na periodontite, em 23 indivíduos adultos, com idade média de 51 ± 14 anos. Foram coletadas 1.170 amostras de placa supra e sub-gengival, da área mesial de cada dente, até conseguirem 28 amostras supra e 28 amostras sub-gengivais de placa bacteriana de cada indivíduo. Usando-se sondas de DNA genômico total e hibridização *in situ*, foram avaliadas a presença de 40 espécies bacterianas. Avaliações clínicas, incluindo-se medições da intensidade da cor vermelha da gengiva, sangramento das bolsas periodontais durante as sondagens, quantidade de placa e supuração, assim como medições em duplicata da profundidade da bolsa e nível de união do tecido gengival ao dente, em 6 locais de cada dente. As contagens bacterianas, a porcentagem de DNA e dos locais colonizados, a prevalência de cada espécie separadamente na placa supra e sub-gengival, foram computadas para cada indivíduo. Diferenças significativas foram obtidas entre a placa supra e sub-gengival para cada espécie, usando-se o teste de níveis de Wilcoxon ajustado para comparações múltiplas. Os resultados mostraram que 40 espécies foram detectadas tanto na placa supra como sub-gengival. As espécies *Actinomyces* foram as mais prevalentes em ambos *habitats*. Setenta e cinco a 100% dos locais das placas supra-gengivais e 62 a 100% dos locais das placas sub-gengivais, estavam colonizadas pelo menos com uma das 5 espécies de *Actinomyces*. As

amostras supra-gengivais mostraram contagens significativamente superiores de *Actinomyces naeslundii* genoespécie 1, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Neisseria mucosa*, *Streptococcus gordonii*, *Capnocytophaga ochracea* e *Capnocytophaga sputigena*, quando comparadas com as médias de contagem de amostras sub-gengivais recolhidas das superfícies dos mesmos dentes. As amostras de placa sub-gengival mostraram contagens significativamente superiores de *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* e *P. g.* As amostras sub-gengivais mostraram uma proporção significativamente superior das espécies “vermelha” e “complexo laranja”, enquanto que a placa supra-gengival mostrou proporções superiores das espécies do complexo “verde” e “roxo” assim como das espécies de *Actinomyces*. Concluí-se que a placa supra-gengival pode albergar patógenos periodontais putativos, sugerindo a possibilidade deste meio ambiente servir como reservatório de tais espécies para desenvolvimento e re-infecção das bolsas periodontais inativas.

2.1.1. INTERAÇÃO DE LIPOSSOMO COM A PAREDE CELULAR BACTERIANA

A superfície das células dos microorganismos, na maioria são aniônicas, devido à prevalência de fosfato carregado negativamente, carboxilato e grupos sulfato na parede celular (lipopolissacarídeos e proteínas em bactérias Gram-negativas e polímeros aniônicos, como ácidos teicóicos em bactéria Gram-positiva). Componentes de superfície que contribuem para a hidrofobicidade das células, incluem proteínas da camada S ou de superfície, polímeros anfipáticos ou lipídios. As cápsulas e fimbrias são consideradas

provas potenciais de ligação de bactérias a superfícies (DOYLE; ROSENBERG, 1990; SKVARIA, 1993).

A bactéria pode ser considerada como um colóide, por causa do seu tamanho na faixa de 1-2 μ m a 500nm (TRABULSI, 1996). A adesão passiva pode ser determinada por fatores coloidais (DOYLE; ROSENBERG, 1990; SKVARIA, 1993). A membrana externa contém fosfolípidos, proteínas e lipopolissacarídeo (LPS), sendo este último, responsável pela carga negativa da superfície bacteriana, devido à presença de grupo fosfato ligado aos açúcares (STRYER, 1995). O polissacarídeo do LPS constitui-se de duas porções: o core, que é a parte mais interna e o polissacarídeo O, que tem propriedades antigênicas, designado como antígeno O. A estrutura do polissacarídeo O pode tornar a superfície da célula escorregadia, impedindo ou dificultando a fagocitose da bactéria pelo macrófago. Algumas bactérias Gram-negativas apresentam toxinas solúveis, geralmente proteicas. Todas têm uma endotoxina constituída pela porção lipídica do LPS, liberada em grande quantidade, quando a célula é lisada. O caráter hidrofóbico dos fosfolípidos e do LPS torna a membrana externa impermeável a várias substâncias (BARBOSA; TORRES, 1998). Essa membrana apresenta proteínas porinas, que permitem a passagem de moléculas hidrofílicas. De um modo geral, o tamanho do poro seleciona a molécula que pode passar. A entrada de íons na célula depende de sua carga e a da superfície externa do poro. Quando as cargas são opostas, a interação e permeabilidade são possíveis. Há porinas específicas para o transporte de nucleosídeos, compostos aniônicos e de macromoléculas, como oligossacarídeos e peptídeos; a maioria destas proteínas parecem ser bastante inespecíficas. A membrana externa não é permeável a enzimas; estas ficam confinadas no espaço periplasmático (TRABULSI, 1996)

Outra importante proteína da membrana externa é a Omp A . Diferente das porinas, é mais provável que OmpA exista como um monômero. É uma das principais funções da OmpA fornece estabilidade estrutural para a célula e também participar da mediação da conjugação bacteriana, funcionando como receptor para vários bacteriófagos (RODIONOVA, 1995; ARORA, 2000). O peptidoglicano das bactérias Gram-negativas está firmemente ancorado à camada mais externa da parede através de pequenas lipoproteínas, que podem representar um suporte para a membrana externa (BARBOSA; TORRES, 1998) como pode ser observado na fig. 5 . O espaço periplasmático dá acesso a proteína da face interna da membrana externa e da face externa da membrana citoplasmática, que contém um número considerável de enzimas (SCHLEGEL,1993). Essa região constitui uma zona de tampão osmótico, que atenua grandes diferenças de pressão osmótica entre o meio ambiente e o citoplasma (BARBOSA; TORRES,1998).

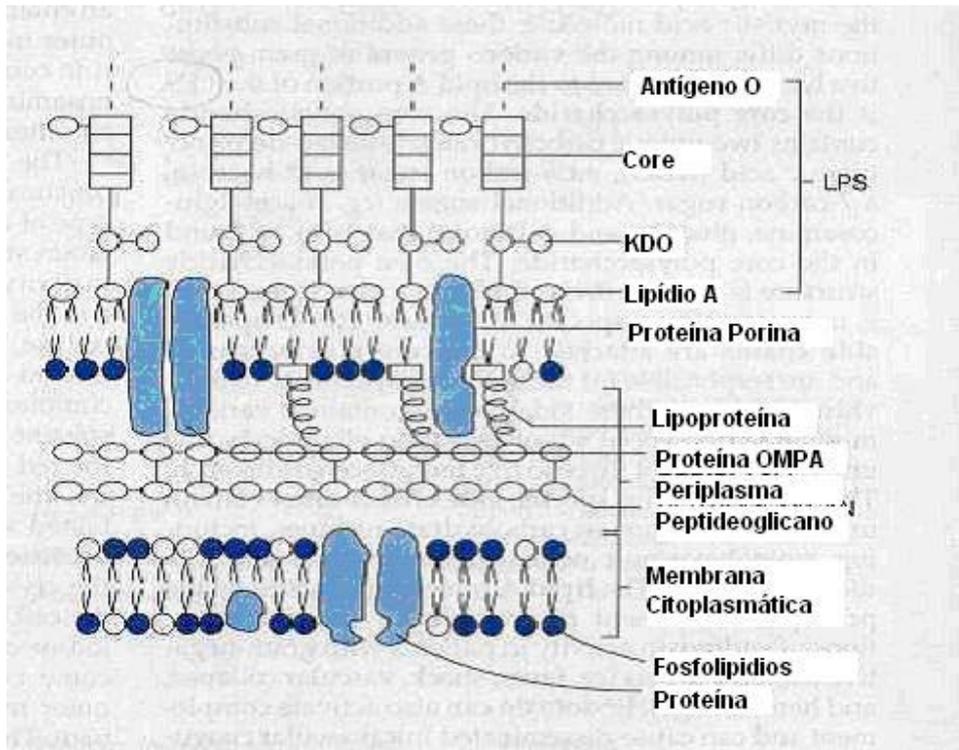


Fig 5 – Parede celular de bactéria Gram- negativa (KONEMAN, 2001.)

2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

A TFD surgiu na década de 70, no Canadá, onde começou a ser usada clinicamente. Depois, passou a ser utilizada na Europa, Japão e EUA. No Brasil, seu primeiro uso foi em câncer de pele (TEDESCO, 2003).

Esta terapia se baseia no uso de uma droga, um corante, mais o emprego de luz no local. É um processo no qual a ativação dos compostos é fotoreativa, são sensibilizados pela luz, resultando na produção de oxigênio singlete e radicais livres, que são citotóxicos para a célula e capazes de provocar morte ou apoptose celular. Neste processo fotofísico, o comprimento de onda necessário à foto-excitação do composto, tem que ocorrer na mesma faixa de absorção do tecido que está sendo irradiado. A maioria dos compostos de interesse

biológico é diamagnética, ou seja, não possui elétrons desemparelhados, mas segundo a Teoria do Orbital Molecular, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental, possui dois elétrons desemparelhados (paramagnéticos), nas orbitais moleculares degeneradas (orbitais diferentes, mas com a mesma energia). Por essa razão, o estado fundamental do oxigênio molecular é um tripleto. O estado excitado do fotossensibilizador é o tripleto e do oxigênio é o singleto. O corante se impregna nas células alvos, que passam a se comportar como cromóforos, isto é, um grupo insaturado covalente responsável pela absorção eletrônica. Estes tornam-se excitados com a luz incidente, passando de seu estado fundamental para o estado excitado. Fluorescem, isto é, perdem energia e retornam ao estado fundamental. Ou, sofrem o processo não radiativo de conversão entre sistemas, levando-o a um estado tripleto do sensibilizador com geração de oxigênio singleto – Reação tipo II. Esse tempo de vida é longo, o suficiente para permitir a supressão da energia do sensibilizador, gerando assim oxigênio singleto. Este estado do oxigênio é quimicamente muito ativo e pode induzir várias reações em cadeia, com componentes da célula, tais como: DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, ácidos graxos insaturados, e com substratos biológicos, como oxidação e ciclo-adição, principalmente com substâncias de elevada densidade eletrônica (caráter eletrofílico do oxigênio singleto), tais como: colesterol, triptofano, guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídios insaturados. (STERNBERG , 1998 apud SIMPLICIO, 2002; MACHADO, 2000).

No estado tripleto, perde-se a energia adicional, ou por fosforescência, que é o decaimento radioativo para o estado fundamental, ou por colisão, ou pelo processo radiativo na troca do spin, com outra molécula, que esteja igualmente no estado tripleto.

Outro caminho é a Reação do tipo I, que inclui as reações de transferência de elétrons, entre moléculas do sensibilizador no seu estado excitado e as moléculas do ambiente. Mas devido ao curto tempo de vida da reação, a participação deste processo não ultrapassa 10% do efeito total do processo.

O tempo de vida do oxigênio singlete, em solução, é profundamente influenciado pela natureza do solvente. Em água é de cerca de 4,0 μs (WILKINSON, 1995 apud MACHADO, 2000). Em sistemas biológicos, o oxigênio singlete apresenta tempo de vida extremamente baixo, inferiores a 0,04 μs . Em função disso, seu raio de ação é reduzido aproximadamente $<0,02\mu\text{m}$ (OCHSNER, 1997 ; DOUGHERTY et al. 1998). O processo fotoquímico inicial, ocorre num diâmetro de aproximadamente 10 a 50nm (MOAN, 1990, JORI, 1996). Então, esse é o processo que acontece para levar a “célula alvo” à apoptose ou morte celular. Para que esse conjunto entre em ação, têm-se que preencher vários requisitos quanto à droga a ser utilizada, e como entregar essa droga na região que se quer tratar. Verificar qual o melhor comprimento de onda a ser aplicada, em relação ao tecido envolvido, ou os microorganismos “alvos”.

O diagrama de Jablonski, na fig. 6, mostra a seqüência dos processos pelos níveis de energia. Será explicado por partes conforme a seqüência apresentada:

1) O grupo cromóforo é composto por grupos de substâncias insaturadas covalentes responsáveis pela absorção eletrônica, isto é, moléculas que absorvem luz como a hemoglobina, melanina, clorofila. A fluorescência serve para o diagnóstico do local da lesão. Para que esse processo ocorra, há desativação do estado singlete do oxigênio, ou seja, o elétron sai do seu estado fundamental e passa para o estado excitado, que é o

singlete, aí muda de camada e perde um fóton, que emite luz, finalizando a fluorescência. É uma excitação visível. A fosforescência é outro processo que ocorre no estado tripleto. O elétron sai do estado fundamental, muda para o estado excitado e volta para o estado fundamental, mudando o sentido de rotação do spin. O oxigênio é uma das poucas moléculas que é tripleto e que para reagir tem que tornar-se singlete. O oxigênio singlete atua na respiração celular, nos processos oxidativos celulares e sobre a membrana lipídica e nesta fase produz um radical livre. EROS, corresponde a algumas espécies reativas de oxigênio, ânions superóxidos, peróxidos de oxigênio e radicais hidroxilas.

2) Os compostos fotossensibilizadores são cromóforos, que absorvem a luz em um comprimento de onda específico, isto é, um corante ou fármaco, que quando distribuído pelo organismo, sofrerá uma retenção seletiva. A seletividade da droga é um fator importante e esta, deve acumular-se mais no tecido tumoral, do que no tecido normal. A combinação da luz, com o fotossensibilizador, produz uma série de espécies excitadas e altamente reativas, que causam destruição celular pela geração de oxigênio singlete;

3) Na fotossensibilização do tipo 1, o produto final é um radical livre, altamente reativo, que geralmente reage com oxigênio tipo EROS (espécies reativas de oxigênio) e termina, por meio de um processo oxidativo em cadeia. É eficiente em sub e baixa concentração de oxigênio, com formação de processos não covalentes;

4) Na fotossensibilidade tipo 2, ocorre a formação do oxigênio singlete, mas não requer mudança de *spin*, é um processo mais eletrofílico, que o estado fundamental. Reage mais rapidamente e seletivamente com centros ricos em elétrons, formando espécies oxidadas e reações, que envolvem muitos passos intermediários;

5) Para as técnicas fotodinâmicas, houve síntese de novas drogas mais sinérgicas, com determinadas características fotoquímicas e fotofísicas. Uso de sistemas carregadores, como veículos de liberação do produto, lipossomos, microesferas e colesterol (LDL). A biodistribuição nesses casos, corresponde ao carregamento da droga para a organela celular, para a qual é endereçada. Estudos farmacocinéticos mostram efeitos colaterais nesse processo, e estudos fotobiológicos *in vivo* e *in vitro* são processos induzidos pela ação de radiação ionizante.

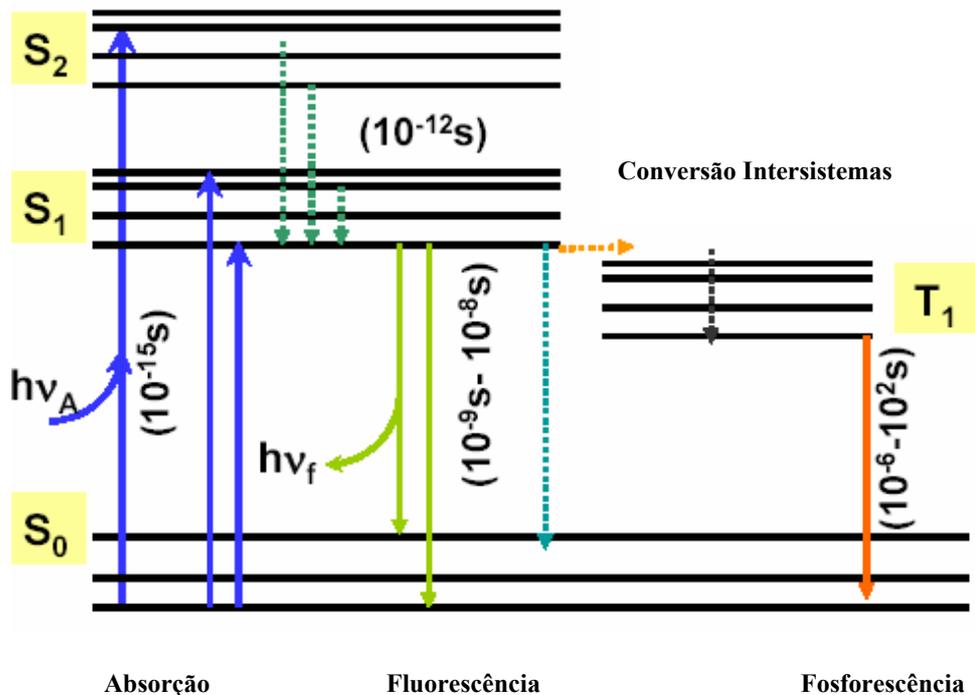


Fig. 6 –Diagrama de Jablonsky <http://www.oaq.uba.ar/pdf>. (30/10/03)

Segundo Sternberg et al. em 1998 (apud Simplicio, 2002) relatam o uso da hematoporfirina por Meyer-Betz em 1913, e o estudo de Policard em 1925 com porfirinas, substâncias que são encontradas em altas taxas em tumores malignos. Embora atóxicas, na

presença de luz visível e oxigênio, elas se tornam altamente tóxicas ao tecido celular. Sternberg cita também um trabalho de Schwartz, da década de 50, que analisou o trabalho de Meyer-Betz, e observou que não era a hematoporfirina e sim uma mistura de oligômeros provenientes do método original de síntese e isolamento da mesma que mostrava atividade.

Para Wainwright (1998) a combinação da importância econômica do sangue como recurso terapêutico e com o advento da epidemia de SIDA, levaram à necessidade de técnicas melhoradas na seleção do sangue doado. Contudo, devido aos períodos “janela”, ou seja de incubação, em que agentes infecciosos não podem ser detectados, a capacidade de desinfetar o sangue e seus derivados como o plasma, plaquetas e concentrados de células vermelhas, assumiu uma grande importância. Enquanto, técnicas convencionais de desinfecção, tais como: tratamento com solventes, detergentes ou irradiação com raios ultravioleta, possam ser usadas no plasma ou em concentrados de proteína, o dano colateral associado a tais tratamentos, não permite o seu uso com frações celulares. De muitas formas, a seletividade patogênica necessária neste caso, pede uma quimioterapia antimicrobiana, devido à necessidade da atividade contra todo um leque de microorganismos, como: vírus, bactérias, fungos e protozoários. Vários novos enfoques de desinfecção microbiana, tem sido propostos por acadêmicos e “indústrias de sangue”, como a quimioterapia dirigida, fotoquimioterapia e quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica (QFTDA).

Na TFD a combinação de uma droga fotossensibilizadora, mais a luz, provocam a produção de espécies reativas ao oxigênio no ambiente do tumor, originando a morte do mesmo, quer seja por necrose, quer seja por apoptose celular. O uso desta técnica versus colonização patogênica, antecede ao TFD, a qual, ficou relativamente inexplorada, devido

ao fácil acesso aos antibióticos. Contudo, na era das bactérias resistentes às drogas, a SIDA e conseqüentemente o aumento generalizado de certas doenças, a QFTDA, encontrou um nicho de mercado ideal e potencial na descontaminação local, o qual logicamente, estende também o seu uso para produtos do sangue. O uso opcional da QFTDA na clínica, pode ser limitada às infecções localizadas devido aos problemas sistêmicos de fornecimento de luz, mas a desinfecção dos produtos do sangue é, por definição, um tratamento localizado, e o fornecimento superficial de luz, numa bolsa de sangue, é normal. Todavia, o tratamento local, em termos de adição, de um fotossensibilizador e subseqüente, iluminação de uma bolsa de sangue, ainda carece de estudos, pois, pode alterar todo o volume de sangue e pode criar danos colaterais aos constituintes do mesmo, ou toxicidade nos recipientes de transfusão subseqüentes. Por isso os protocolos de fotodestruição devem ser executados com a menor concentração possível de fotossensibilizador, igual na quimioterapia padrão, mas a quantidade e qualidade da luz usada, também são importantes. A “densidade de potência” de uma fonte de luz, é normalmente dada em mW/cm^2 , enquanto que a “dose de luz”, fornece a energia recebida, por analogia, para uma bolsa de sangue, calcula-se como produto da densidade de potência do laser, pelo tempo de iluminação, em seg. A densidade de potência ou o tempo de iluminação, podem portanto, ser variados para a mesma dose de luz (J/cm^2). Não obstante, para uma dada concentração de fotossensibilizador, uma densidade de potência elevada num curto período de tempo, pode dar resultados diferentes, em termos de morte microbiana, e causar danos colaterais, no caso de fraca densidade de potência, num longo espaço de tempo, mesmo que, a dose de luz seja a mesma, em ambos os casos. Assim, por conseguinte, o dano colateral de células vermelhas durante o tratamento de RBCCs (concentrado de células vermelhas do sangue-eritrócitos)

contaminado com vírus, pode ser minimizado, se houver, um conhecimento profundo das características de absorção da luz do fotossensibilizador proposto, e do seu meio ambiente alvo. O dano fotodinâmico microbiano, ao nível molecular, está, em muitos casos, bem estabilizado. O dano tipo I, causado pela luz, devido à abstração de elétrons ou do hidrogênio pelo fotossensibilizador, podem produzir subseqüentes reações de óxido-redução e produtos de oxigenação, se assentam na proximidade do fotossensibilizador e do alvo biomolecular. Os procedimentos do tipo II são geralmente aceitos, como os maiores indicadores dos danos de células microbianas fotooxidantes.

2.3. FOTOSSENSIBILIZADOR

Geralmente aceita-se que as porfirinas, localizam-se em tecidos proliferativos, assim como, no sistema retículo endoplasmático. Os mecanismos pelo quais as ftalocianinas são captadas e impregnam no tecido, ainda não é bem entendido. O fato de ser um composto bem caracterizado quimicamente, por propriedades químicas de manipulação da base estrutural, traz uma chance de elucidar a correlação entre “uptake” celular, localização, toxicidade e entendimento das razões químicas.

Para Rovaldi (2000) a TFD tem sido usada historicamente como uma maneira de se tratar tumores cancerígenos, mas recentemente, tem sido usada para destruir células bacterianas através do uso de fotossensibilizadores dirigidos. A TFD é um acessório potencial no planejamento da raspagem e alisamento radicular no tratamento das doenças periodontais. Contudo, a eficácia dos derivados da porfirina contra os microorganismos tem

sido limitada, pois algumas bactérias Gram-negativas são refratárias a TFD com estes agentes. Os autores desenvolveram um derivado conjugado da porfirina, com uma metade da pentalisina, que fornece à molécula uma atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A porfirina e o cloro 6, também mostraram atividade *in vitro* contra um espectro limitado de bactérias. O cloro 6 conjugado com pentalisina mostrou atividade *in vitro* contra todos os microorganismos testados, incluindo-se as *P. g.*, *A. a.*, *Bacteróides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* subespécie *polymorphum*, *Actinomyces viscosus* e para os estreptococos em geral. A atividade antimicrobiana forte (≥ 5 log-de unidades de redução nos números de UFC por ml) foi obtida na presença de até 25% do sangue total de ovelhas. O uso de agentes seletivos fortes, tais como esta conjugação cloro 6–pentalisina, foi mais efetiva na redução das bactérias patogênicas da bolsa periodontal, e pode ser uma ferramenta significativa no tratamento das doenças periodontais.

Para Machado (2000) a TFD foi mostrada no princípio dos anos 80, como uma nova e promissora modalidade de tratamento para o câncer e outras doenças. São usadas com sucesso no tratamento de uma variedade de tumores, e tentativas continuam a ser feitas para se estender esta modalidade de tratamento a outras condições clínicas, por exemplo, na inativação de vírus no sangue e componentes sanguíneos. Isto pode, em parte, ser atribuído ao atrativo conceito básico da TFD, a combinação da luz com uma droga fotossensibilizadora, que separadamente são relativamente pouco eficazes, mas quando combinadas e na presença de oxigênio causam em última análise uma maior ou menor destruição do tumor.

Chan e Lai (2003) tentaram esclarecer se os efeitos bactericidas da TFD são dependentes do comprimento de onda e da dose de laser. Também tentaram criar um protocolo bactericida apropriado para algumas espécies bacterianas, baseados no tipo de luz, para eliminar patógenos periodontais. Culturas de *A.a.*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. g.*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguis*, foram expostas ao laser de He-Ne, com 632,8 nm de comprimento de onda, com 30 mW de potência de saída; um laser de diodo de 100 mW a 665 nm; e um laser de diodo de 100 mW, com 830 nm de comprimento de onda, na presença ou na ausência de azul de metileno como fotossensibilizador. Também foi usado um grupo controle com exposição somente ao azul de metileno e sem exposição ao laser. As culturas foram analisadas por contagens do número de colônias sobreviventes. Os resultados indicaram que as bactérias expostas à luz de laser com 100 mW, foram em média eliminadas em até 40%. Em particular, a destruição mais efetiva ocorreu com a exposição da luz do laser em combinação com o azul de metileno como fotossensibilizador. Os resultados desses estudos cinéticos indicaram que a melhor taxa de resposta do TFD foi alcançada com uma exposição de 60 segundos (densidade de energia de 21,2 J/cm²) com o laser de diodo com comprimento de onda de 665 nm na presença do fotossensibilizador. Nestas condições foram eliminadas aproximadamente 95% de *A.a.* e *Fusobacterium nucleatum* e 99 a 100% das bactérias produtoras de pigmentos negros (*P. gingivales*, *P. intermédia*) e *Streptococcus sanguis*. Estes resultados mostraram que tanto o comprimento de onda como a densidade de energia são fatores importantes para a TFD, e que um laser de baixa potência com ótimo comprimento de onda e dosagem, em combinação com um fotossensibilizador apropriado, é uma forma prática de se destruir bactérias. Os autores

concluíram que usando um laser de diodo com potência e comprimento de onda apropriado, com uma irradiação de 60 s., ele pode ser um auxiliar útil juntamente com a raspagem mecânica do dente, na prevenção da recolonização das lesões subgengivais por microorganismos patogênicos nos tratamentos periodontais.

Kömerik et al (2003) trabalhou com 6 ratos inoculando 25µl *Porphyromonas gingivalis* nos molares inferiores. Para isso antes aplicou por 5 dias ampicilina 30mg/ml intraperitoneal, tendo 2 dias de intervalo antes da terapia . Como fotossensibilizador usou-se azul de toluidina , irradiado em 630nm com energia de 48J por 8 min. A inviabilidade bacteriana, isto é, menos que 10 ufc, foi detectada com 1mg/ml. Não observaram efeitos danosos nos tecidos adjacentes. Depois de 90 dias os grupos foram sacrificados. A perda óssea no grupo que sofreu o tratamento era menor do que no grupo controle que possuía também 6 espécimes. Esse estudo mostrou a possibilidade do uso da terapia fotodinâmica como uma alternativa para tratamento antimicrobiano periodontal.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o crescimento *in vitro* do patógeno periodontal *A.a.* quando da aplicação da Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (QTFDA) com o fotossensibilizador cloro alumínio ftalocianina (AIPHCl) na forma de lipossomo, sob ação de um laser de diodo InGaAlP (fosfeto de índio gálio alumínio).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Células do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP. Trabalhou-se em Câmara de fluxo laminar (VECO), obedecendo todas as regras de biossegurança. Foram manipuladas 32 placas de cultura no total, realizando dois experimentos para confirmação. Cada experimento continha quatro grupos e cada grupo era feito em quadruplicata. Fez-se uma média da contagem das colônias dos dois experimentos.

4.1 CEPA BACTERIANA: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo b (ATCC 29522), isolado de Abscesso mandibular. Foi fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ –Laboratório de Materiais de Referência, através do Dr. Ivano de Filippis.

4.1.1 SOLUÇÕES:

Cloro Alumínio Ftalocianina (Sigma 362530) doada pela USP-R.P. através do Prof. Antônio Cláudio Tedesco.

Corantes de Gram – violeta genciana, lugol, fucsina básica..

Solução Salina estéril-Solução A: 2,76g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para 100ml de H_2O destilada.

-Solução B: 5,36g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou 7,17 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ou
2,84g de Na_2HPO_4 para 100ml de H_2O destilada.

33ml de solução A + 67ml de solução B= pH 7,1.

4.2 MEIO DE CULTURA BACTERIANO - Foi utilizado caldo BHI- Infusão de Cérebro Coração (Difco 237500) acrescido de 1,8% de extrato de levedura (Difco 212750), completado com 1000 ml de água ultra pura. Para cultura em ágar usou-se TSA- Ágar Tríplico de Soja (Difco 236950), acrescido de 2,5% de extrato de levedura, completado com 1000 ml de água ultra pura.

4.2.1 INCUBAÇÃO DO *A. a.* COM ALPHCl LIPOSSOMAL - A cultura bacteriana foi incubada por 48 horas e realizada a leitura da densidade óptica (D.O. 0,09)(Spectra CountTM, Parckard) para padronização da população bacteriana em relação à concentração de ftalocianina.

Trabalhando-se com uma placa de 96 poços, fez-se o experimento em quadruplicata, tendo em cada poço de 200 µl, 100µl da suspensão bacteriana e 100µl de solução tampão salina pH 7,0. Passou-se este material para o tubo eppendorff o qual foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 4° C. Observou-se a formação de um sobrenadante. Retirou-se todo sobrenadante ressuspensando com 200µl ALPHCl lipossomal em eppendorf. Esses eppendorfs eram cobertos externamente com papel alumínio para proteção da luz. Após 2 h de incubação em estufa de CO₂ (Forma Scientific), promovia-se uma nova centrifugação nos mesmos padrões. Observou-se então a formação de um sedimento azul claro (pellet). Trocou-se todo o fotossensibilizador por 200µl de solução tampão salina. Ressuspendeu-se a solução junto com o sedimento. Passando para uma placa de 96 poços, na qual se colocou-se 100µl de BHI enriquecido e 100 µl dessa suspensão .

4.2.2 PREPARAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR ALPHCI LIPOSSOMAL. A preparação desse material foi feita pela USP-RP, Departamento de Química, pela aluna Andreza Simioni através do Prof. Antonio Cláudio Tedesco. Para a preparação do lipossomo com cloro alumínio ftalocianina, foi utilizado o método de injeção de etanol descrito por Kremer et al. (1977). Uma solução etanólica de 380 μl contendo o lipídeo DL - α -diestearil-fosfatidilcolina (DSPC – Sigma P8180), na concentração de 0,7 mM e corante cloro alumínio ftalocianina na concentração necessária para se obter uma solução de 5,0 μM no volume final, foram injetados por uma bomba peristáltica de adição controlada sobre uma solução tampão composta por fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico de sódio, 10 mM, pH 7,4 (volume total 5000,0 μl) contida em uma jaqueta termostatizada¹.

A solução tampão estava contida em recipiente cilíndrico de 1,5 cm de diâmetro e a injeção foi realizada aproximadamente, 2,5 cm abaixo da superfície líquida. A temperatura da injeção foi de 55⁰C sob agitação magnética e a uma velocidade constante de 1,0 $\mu\text{l s}^{-1}$ (360 $\mu\text{l/h}$ bomba). A suspensão lipídica obtida foi posteriormente submetida à diálise por 24 h para remoção de qualquer traço de composto orgânico.

4.2.3 IRRADIAÇÃO - O equipamento de laser utilizado foi um semiconductor com meio ativo de fosfeto de índio gálio alumínio - InGaAlP (Thera lase-DMC), que opera com comprimento de onda de emissão de 685 nm, localizado na faixa de luz visível, região do vermelho do espectro eletromagnético. A fibra óptica utilizada apresentava abertura numérica de $0,39 \pm 0,01$ e diâmetro de núcleo de $600 \pm 5 \mu\text{m}$, a área do feixe 2mm^2 .

¹ (recipiente onde se prepara o lipossoma. É como se fosse um becker, mas as paredes são "duplas", o que permite que o aquecimento seja feito, uma vez que se tem uma circulação constante de água).

A distância entre a fibra e o experimento foi de 3 cm, observado na fig. 7.

Para aplicação da TFD, foi necessário um ambiente escuro e proteção para a placa de 96 poços, para que a irradiação não vazasse para a cavidade vizinha . Usou-se papelão preto entre os poços (barreira interna) e também uma outra folha, na superfície da placa com abertura no diâmetro do poço.

4.2.4 PARÂMETROS DA IRRADIAÇÃO

Comprimento de onda – 685nm

Modo - contínuo

Densidade de Energia - 2,6 J/cm²

Potência - 22 mW

Área irradiada – 0,785 cm²

Tempo – 93 s.

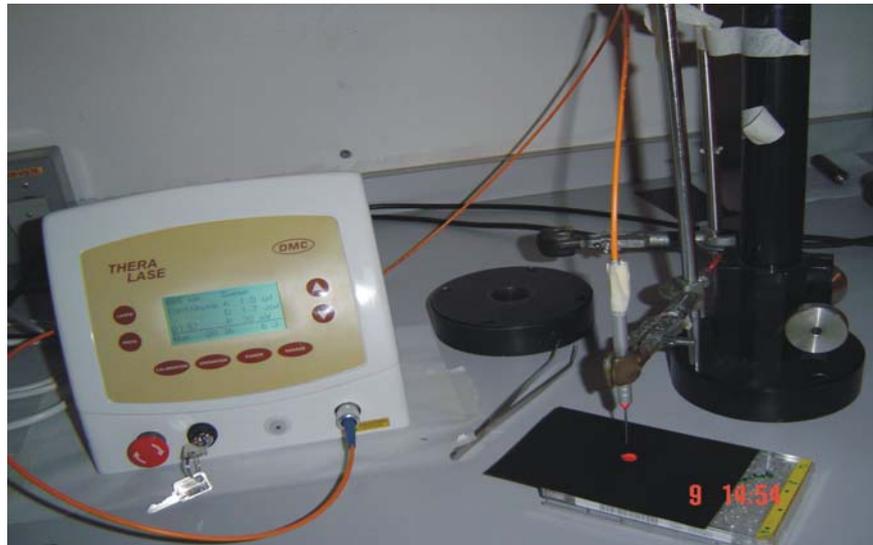


Fig. 7 Aparelho de laser de baixa intensidade. Disposição da placa para aplicação do laser

Eram quatro grupos com quatro poços cada. O 1º grupo era o controle. O 2º grupo só recebeu o fotossensibilizador, mas não participou da irradiação. O 3º grupo recebia apenas a aplicação do laser InGaAlP. O 4º grupo apresentou-se com fotossensibilizador AlPHCl e foi irradiado, isto é, foi realizada a QTFDA. Em seguida 10 µl de cada suspensão foi semeada na superfície de uma placa de Petri contendo TSA enriquecido. Espalhou-se 0,1ml de suspensão em cada meio de cultura, usando-se uma alça de Drigalsky esterilizada para semeadura. Os meios de cultura foram incubados por 72h em estufa de CO₂ e se realizou a contagem das unidades formadoras de colônias (ufc) manualmente.

5. RESULTADOS

Foi testada a normalidade da variável número de unidade formadora de colônia na cultura, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e o resultado do teste ($Z=1,064$; $P=0,207$) mostrou que ela segue a distribuição normal, e portanto, foram utilizados testes paramétricos nas análises estatísticas.

A tabela 1 mostra as médias, desvios padrão e valores máximos, mínimos e coeficiente de variação para cada um dos quatro grupos estudados.

A análise de variância realizada entre os quatro grupos produziu um resultado $F = 1046,15$; $P < 0,001$, mostrando que as médias dos grupos não são iguais. A seguir, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Bonferroni, que compara cada dois grupos entre si, cujos resultados se encontram na Tabela 2. Esse teste mostrou que os quatro grupos têm médias significativamente diferentes entre si, pois todas as seis comparações foram significativas ($P < 0,001$).

A figura 8 ilustra a distribuição das médias dos quatro grupos.

Tabela 1 - Número de Unidades Formadoras de Colônias nos quatro grupos estudados.

	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variação
QTFDA	8	0,75	0,886	0	2	1,181
685nm	8	352,00	23,934	318	396	0,068
AIPHCl	8	497,25	30,955	466	562	0,062
Controle	8	625,50	26,311	581	663	0,042

Tabela 2 - Teste de Comparações Múltiplas

	(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferença média (I-J)	Significância
Teste de Bonferroni	QTFDA	685nm	-351,25(*)	0,000
		AIPHCl	-496,50(*)	0,000
		Controle	-624,75(*)	0,000
	685nm	AIPHCl	-145,25(*)	0,000
		Controle	-273,50(*)	0,000
	AIPHCl	Controle	-128,25(*)	0,000

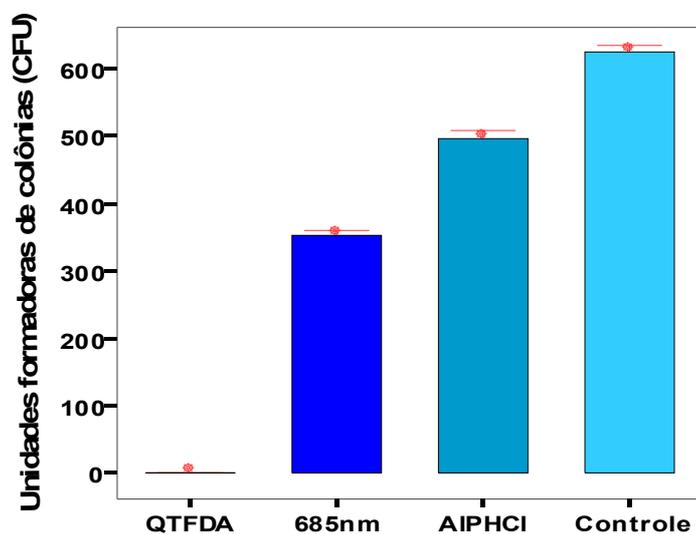


Fig. 8 – Representação gráfica das médias e respectivos erros da média para os quatro grupos.

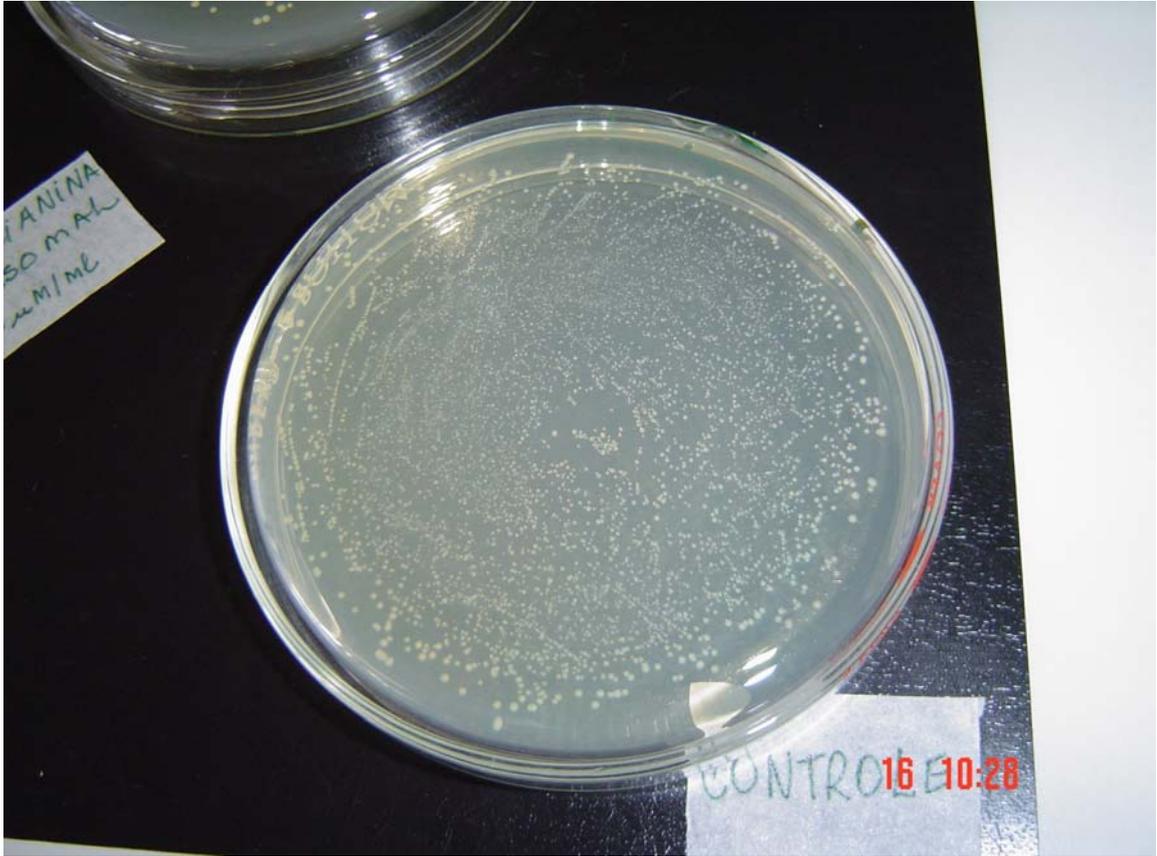


Fig. 9. Placa de Petri mostrando as colônias de *A.a.* do grupo controle.



Fig. 10. Grupo QTFDA- Placas de Petri contendo de 1 a 2 colônias de *A. a* . ou absolutamente nenhuma como na placa abaixo e a esquerda da foto, demonstrando morte de praticamente 100% dos microorganismos. As setas indicam as colônias.

6. DISCUSSÃO

O êxito da terapia periodontal é poder erradicar o microorganismo patogênico. Essa erradicação consegue-se utilizando lasers de alta potência, mas os autores (SPENCER et al., 1998; OYSTER et al., 1995; MIDDA e RENTON-HARPER,1991) relatam danos térmicos aos tecidos periodontais. Além do equipamento apresentar grandes dimensões, o manuseio é dificultado pelo tamanho da caneta que aloja a terminação da fibra óptica.

Trabalhos com só o uso de laser de baixa potência oferecem operações simplificadas e fácil manuseio, embora a redução bacteriana não seja 100%.

Chan e Lai (2003) trabalhando com cultura de *A.a.*, *P.g.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermédia*, and *Streptococcus sanguis* irradiado com laser diodo (635nm) numa potência de 100mW eliminou em média 40% das bactéria. Neste trabalho, usando laser InGaAlP(685nm) com potência de 22mW teve uma redução de *A.a.* de 56% com apenas a aplicação do laser.

Para a TFD, eles usaram azul de metileno, irradiando por 60s. (densidade de energia 21.2 J/cm²) com resultados de 99 a 100% para *P.g.*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguis*. Para *A.a.* e *Fusobacterium nucleatum* apresentou morte bacteriana de 95% e 96% respectivamente corroborando com os dados deste trabalho que embora usando outro tipo de fotossensibilizador (ALPHCl) e outra densidade de energia (2,6 J/cm²) teve redução de 100%. As ftalocianinas, por apresentar uma elevada absorvidade molar na região espectral correspondente à cor vermelha, resulta em elevada resposta fototerapêutica, com administração ao paciente de dose menores que as usuais (JORI, 1996)

SOUKOS (1998) sugeriu que essa mortalidade bacteriana pode ser devido à atração eletrostática entre o fotossensibilizador e a carga negativa da membrana bacteriana.

A capacidade do lipossomo de adentrar a droga através da sua semelhança com a estrutura de parede celular bacteriana é que proporcionou à este derivado de porfirina poder fazer o papel de um fotossensibilizador. Já que trabalhos anteriores demonstram que alguns fotossensibilizantes não apresentam efeito letal em bactérias Gram negativas pela dificuldade de penetração da parede bacteriana (KÖMERIK,2000; PFITZNER,2004).

Experimentos realizados por Figueiredo (2003), utilizando dois tipos de fotossensibilizantes, uma ftalocianina aniônica, Ftalocianina Cloro-Alumínio Tetrasulfonada (AlPcS₄) e um derivado de hematoporfirina catiônico, Poly-Hematoporfirina Liofilizada (Photosan[®]-3), demonstraram que o fotossensibilizante catiônico Photosan[®]-3, apresentou melhores resultados na inativação da bactéria Gram-negativa *Yersinia enterocolitica*, do que os experimentos realizados com a ftalocianina.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a possibilidade de que um novo fotossensibilizador para a QTFDA, pode se transformar em uma técnica de tratamento periodontal adjuvante com resultados mais expressivos do que as técnicas convencionais com antibióticos, que podem criar resistência bacteriana. Devido a utilização de um carreador da ALPHCl, na forma lipossomal, verificou-se que o mesmo favorece uma melhor ação do fotossensibilizante na eliminação de bactérias Gram-negativas, pela facilidade de adentrar a membrana bacteriana como evidenciado pelo número de colônias de *A. a.* (figura 1) e pelo gráfico 8. O efeito da QTFDA na eliminação de *A.a* foi 100% *in vitro*.

Na era das bactérias resistentes às drogas, à SIDA e conseqüentemente o aumento generalizado de certas doenças, a QTFDA encontrou um nicho de mercado ideal e potencial na descontaminação local, o qual logicamente estende também a outros usos.

7. CONCLUSÃO

Diante do trabalho realizado *in vitro* pode-se concluir que:

- o crescimento do patógeno periodontal *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) após a aplicação da Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (QTFDA), com carregador da droga na forma de lipossomo e contendo cloro alumínio ftalocianina (ALPHCl) como fotossensibilizador, sob ação de um laser de diodo InGaAlP (fosfeto de índio gálio alumínio) com comprimento de onda de 685nm, foi efetiva para a inviabilização do crescimento das colônias de *A.a.*, em praticamente 100% dos casos, para culturas de ágar padrão em laboratório como mostra o gráfico.

BIBLIOGRAFIA

ALALUUSUA, A.; ASIKAINEN, S. Detection and distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in primary dentition. **J. Periodontol.**, v.59, p.504-507, 1998.

ASIKANEN, S.; CHEN, C.; ALALUUSUA, S.; SLOTS, J. Can one acquire periodontal bacteria and periodontitis from a family member? **J. Am. Dent. Assoc.**, v.9, p.1263-71, 1997.

ARAÚJO, V. M.; CAMPOS JÚNIOR, A.; ROSA, O. P .S.; ROCHA, R. S. S. Avaliação clínica e microbiológica da utilização da doxiciclina no tratamento de pacientes com periodontite juvenil. **Rev. Fac. Odont. Bauru.**, v.6 ,n.1, p.13-21,1998.

ARORA, I. M.; SCHWARTZMAN, G. Amphotericin B..Analytical profiles of drug substances. **Academic Press**, In: Florey,K. v.6, p.1-42, New York, 1977.

AVELINE, B .M.; HASAN, T.; REDMOND, R. W. The effects of aggregation, protein binding and cellular incorporation on the photophysical properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPDMA) . **J. Photochem. Photobiol.**, ,v. B30, p. 161- 169, 1995.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; MILLER, N. Cation permeability of phospholipids model membranes: effect of narcotics. **Nature**, v.208, n.5017, p.1295-1297, London ,1965.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**, São Paulo, Ed. Atheneu, 1998. 196 p.

BARTLETT ,R. C. **Medical Microbiology: quality cost and clinical relevance**. New York, Ed. Wiley , 1981.

BEN-HUR, E.; ROSENTHAL, I. Phthalocyanines in Photobiology . In **Phthalocyanines, Properties and Applications**. Leznoff, C. C.; Lever, A, B. P., VCH Publishers, New York, 1993, cap. 6.

BLIX, I. J. S.; PREUS, H. R.; OLSEN, I. Invasive growth of *A.a* . on solid medium (TSBV), **Acta odontol. Scand.**, v.48, n.2, p.313-318, Jun. 1990.

BONVENTRE, P. F.; GREGORIADIS, G. Killing of intraphagocytic *Staphylococcus aureus* by dihydrostreptomycin entrapped within liposomes. **Antimicrob Agents Chemother.**,v.13, n.6, p.1049-1051, 1978.

CARRANZA, A. F. Jr. **Periodontia clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, 1992, 270 p.

CHAN Y.; LAI C-H. Bacterial effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med Sci.**, v. 18, p. 51-55, 2003.

DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; PAGE, C. R. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontology 2000**,v.14, p.12-32,1997.

DENNISON, D. K.; VAN DYKE, T. E. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. **Periodontology 2000**, v.14, p.54-78, 1997.

DESCOTES, J.; PONCHON, A. C.; LOUPI E.; EVREUX, J. C. Side effects of metronidazole. **Lyon Medical**, v. 251, n.7, p. 283-286, 1984.

DOUGHERTY, T .J., et al. Review : Photodynamic Therapy. **J. of the Natio. Cancer Inst.** ,v.90, p.889, 1998.

DOYLE ,R. J.; ROSENBERG, M. **Microbial cell surface hydrophobicity.** Washington (DC): American Association for Microbiology, 1990. p. 425.

FIGUEIREDO, K. D. **Avaliação da interação *Yersinia enterocolitica* – Macrófago J774 após Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana.** 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

FOLHA DE SÃO PAULO, São Paulo, S.P. caderno Mundo, ano 75, nº 24.376, p.2-9, 29/12/1995.

FOOTE, C. S. Active oxygen in chemistry London. **Blackie Academic; Professional**, New York ,1995

Facultad de Ciências Exactas y Naturales - UBA
<http://www.oaq.uba.ar/CIQyP/LED-Taller1-2005.ppt#257,9,Slide%209> pdf. 30 out. 2003.

GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E . et al. Eficácia do Listerine sobre a placa: seu efeito associado à remoção mecânica de placa sobre a prevalência de periodontopatógenos *in vivo*. **RGO.** , v.46, n.2, p.70-74,77-78,1998.

GASPARETTO, A.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; AVILA-CAMPOS, M. J. Aderência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* às células epiteliais bucais: estabilidade e aspectos ultra-estruturais. **Pesqui Odontol Bras.**, v.14, n. 4, p. 311-318, Out/Dez 2000.

GILL, C. J.; PALLASCH, T. J. Clindamycin associated pseudomembranous colitis: a potentially fatal adverse drug reaction. **J Am Dental Assoc.**, v.102, p.507-509, 1981.

GOLOMB, G. et al. Sustained release device-containing metronidazole for periodontal use. **J. Dent. Res.**, v.63, p.1149-1153, 1984.

GORDON, J. M.; WALTER C. B. Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal-disease. **J. Periodontology**, v.64, n.8, p. 760-71, Aug., 1993.

GREENSTEIN, G .Advances in periodontal diseases diagnosis. **Int. J. Periodont.Rest. Dent.**, v.10, p.351-375, 1990.

GROSS, M. H. Management of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. **Clinical Pharmacy**, v.4, n.3, p.304-310, 1985.

HAMADA S.; HOLT, S. C.; Mc GHEE, J. R. **Periodontal disease**: pathogens; host immune responses. [s.l.]: Quintessence Pub. Co. 1991.

Indústria multinacional de produtos químicos Sigma Aldrich Corporation.
www.sigmaaldrich.com - Acesso em:17 out.2003.

JORI, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol.**, B, v. 36 , n.2, p.87-93, Nov . 1996 .

KAMEN, P .R. Inhibition of keratinocyte proliferation by extracts of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.** v.42 , p.1191-1194, 1983.

KILEY, P.; HOLT, S. C. Caracterizacion of the lipopolyssaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. **Infect. Immun.**,v.30, p.862-873,1980.

KÖMERIK N. et al. *In vivo* killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.47, n.3, p. 932–940, March, 2003.

KÖMERIK N. ; WILSON, M.; POOLE, S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram- negative bacteria. **Photochem. Photobiol.**, v.72, p.676-680, 2000.

KONEMAN,E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro:Médica e Científica, 2001.p.409-411.

KORNMAN, K. S.; KARL, E. H. The effect of long-term, low-dose tetracycline therapy on the subgingival microflora in refractory adult periodontitis. **J. Periodontol.**, n.53, p.604-610, 1982.

KREMER, J. M.; ESKER, M. W; PATHMAMANO HARAN, C.; WIERSEMA, P. H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. **Biochemistry**, v.16, n.17, p.3932-3925, Aug. 1977 .

KRIEG, P. H. A; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**, 9^oed., Baltimore, Williams e Williams, 1994.

Laboratório Microbiologia Oral e Anaerobiose do ICB/UFMG-
http://www.perioufmg.com.br/centrodeestudos_1_microbiologia.htm- Acesso em 25 set 2003.

LARSEN, T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. **Oral Microbiology and Immunology**, v.17, n.5, p.267-271, Oct., 2002.

LINDHE, J.; LILJENBERG, B. Treatment of localized juvenile periodontitis. Result after 5 years. **J.Clin. Periodontol.**, v.11, p.399-410, 1984.

LISGARTEN, M.A.; LINDHE, J.; HELLDEN, L.B. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. Clinical, microbiological and histopathological observations. **J. Clin. Periodontol.** v.5, p.246- 271, 1978.

LÖESCH, W. J. Chemotherapy of dental plaque infections. **Oral Sci. Rev.**, v.9, p.65-107, 1976.

LOPEZ-BERESTEIN, G. Liposomes as carriers of microbial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.31, n.5, p. 675-678, Washington, 1987.

MACHADO, A. E. H.. Terapia fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e perspectivas . **Quim. Nova** , v.23, n.2, p.237-243, 2000.

MARGALIT, R.; SHAKLAI, N.; COHEN, S. Fluorimetric studies on the dimerization equilibrium of protoporphyrin IX and its haemato derivative. **Biochem J.**, v. 209, n.2, p.547-552, 1983 .

MIDDA, M.; RENTON-HARPER, P. Lasers in dentistry. **Br. Dent. J.**, v.170, p.343-346, 1991.

MINNOCK, A, et al. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **J. Photochem. and Photobiol.**, v.32, p.159-164, 1996.

MITCHELL, D. A. Metronidazol its use in clinical dentistry. **J. Clin. Periodontol.**, v.11, p.145 -158, 1984.

MOAN, J. Properties for optimal PDT sensitizers. **J. Photochem. Photobiol. B**, v.5, n.3-4, p.521-524, 1990.

MOORE, W. E. C; MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontology 2000**. v.5, p.66-77, 1994.

MOSER, J. G. Definitions and general properties of 2nd and 3rd generation photosensitizers. **Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd Generation Photosensitizers**. Clive: Harwood Academia Publishers. p. 3-6, 1998.

NEW, R R .C. Preparation of liposomes . In New, R.R.C., ed. **Liposomes: a practical approach**. IRL PRESS, p. 33-104, Oxford, 1994.

NOVAK, M. J.; STAMATELAKYS, C.; ADAIR, S. M. Resolution of early lesions of juvenile periodontitis tetracycline therapy alone: Long-term observations of 4 cases **J. Periodontol.**,v.62, n.10, p. 628-633, Oct, 1991.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological process in the photodynamic therapy of tumors. **J. Photochem. Photobiol.**, v.B39, n.1, p.1-18, 1997.

OYSTER, D.K.; PARKER, W.B.; GHER, M.E. CO₂ lasers and temperature changes of titanium implants. **J. Periodontol.**, v. 66, p. 1017-1024, 1995.

PAPPAS, J .D.; WALKER, C. B. Gingival crevicular fluid levels of erythromycin and the *in vitro* effect on periodontal bacteria. **J. Dental Research** ., v.66, p.154-157 , Mar.,1987.

PASTERNAK, R. et al. **J. Am. Chem. Soc.**, n . 94 , p. 4511. 1972.

PFITZNER, A. et al. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. **J. Periodontol.**, v.75, n. 10, p.1343-1349, Oct., 2004.

RAAB, O. Ueber die wirkung fluorescirender stoffe auf infosurien **Z.Biol.**, v.39, p.524-526, 1900.

RATKA-KRÜGER, PETRA et al. Non – Surgical Periodontal Therapy with adjunctive topical doxyciclina: a double – masked, randomized, controlled multicenter study. II. Microbiological results.**J. Periodontol.**, v.76, n.I, p.66-74, Jan., 2005.

ROBERTSON, P .B. et al. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* .**J. Periodontal Res.**, v.17, p. 275-83,1982.

RODIONOVA, N. A.; TATULIAN, S. A.; JÄHNIG, F.; TAMM, L. K. Characterization of two membrane- bound forms of OmpA. **Biochemistry**, v.34, n.6, p.1921-1929 , 1995.

ROE, D.E. et al. Characterization of tetracycline resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral microbial. Immunol.**, v.10, p.227-232, 1995

ROVALDI C .R.. et al. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n.12, p. 3364-3367. Dec. 2000 .

RÜCH, A. et al Dynamic fluorescence changes during photodynamic therapy *in vivo* and *in vitro* of hydrophilic Al(III) phthalocyanine tetrasulphonate and lipophilic Zn (II) phthalocyanine administered in liposomes. **J Photochem Photobiol** v. 36, p. 127-134, Nov. 1996

SAGLIE, R.; NEWMAN, M. G.; CARRANZA, F. A. Jr. A scanning electron microscopic study of relationship between the most apically localized subgingival plaque and the epithelial attachment. **J. Periodontology**, v.42, p.105, 1977.

SAGLIE, R., et al. Identificacion of tissue invading bacteria in human periodontal disease. **J. Periodontal.Res.**, v.17, n.5, p.452-55, 1982.

SALVI, G.E.; LAWRENCE,H. P; OFFENBACHER,S; BECKER,J. D. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology** 2000,v. 14, p.173-201,1997.

SANDOR, G. K. B.; UFFEN, K. F. Antibiotic administration and oral contraceptive failure. A drug interaction to note. **Journal of the Canadian Dental Association** ,v. 53, p.775-777, 1987.

SCHENKEIN. H. The pathogenesis of periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 70, p. 457-470, Apr. 1999.

SCHLEGEL, H.G. **General Microbiology**. 7 ed. Cambridge: University Press, p. 655,1993

SHENKER,B.J.; KUSHNER,M.E.; TSAI, C.C. Inhibition of fibroblast proliferation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.**Infect. Immun.** v.38, p.986-992, 1982.

SILVA, I .L. R. **Fatores de virulência e aspectos relevantes da transmissibilidade do *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em periodontopatias**. 1999. 40f. Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia da Fundação para o desenvolvimento científico e tecnológico da Odontologia .USP. São Paulo.

SIMPLICIO, I. F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodimâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v.25, n.5, p.801-807, 2002

SKVARIA, J. A physico-chemical model of microbial adhesion. **J. Chem. Soc. Faraday Trans**, v. 89, n.15, p. 2913-2921, 1993.

SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. **Periodontology** 2000. v.20, p.7-13, 1999.

SLOTS , J.; GENCO, R. Black pigmented *Bacteroides species*, *Capnocytophaga species*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. **J Dent Res** , v. 63, p.412-421, 1984 .

SOCRANSKY, S. S. et al. New concepts of destructive periodontal disease . **J. Clin. Periodontol.**, v.11, p.21-32, 1984.

SOUKOS, N.S. et al. Targeted Antimicrobial Photochemotherapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, n.10, p.2595-2601,1998.

SPENCER, P. et al. Change in temperature of subjacent bone during soft tissue laser ablation. **J. Periodontol.**, v. 69, p. 1278-1282, 1998.

STRYER, L. **Biochemistry**, 4. ed., New Cork : W .H. Freeman and Co., 1995. p. 1064.

TAPPEINER, H. V.; JESIONEK A. Therapeutische versuche mit fluorescierenden stoffen, **Muench. Med. Wochenschr**, v.50, p.72-76, 1903.

TEDESCO, A. C . Terapia fotodinâmica,a nova arma da medicina moderna. **Info laser** p.29-32, 2003

TRABULSI, L. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Rev Microbiol**, v.27, p.1-6, 1996.

VAN DER MUELEN ,F .W. et al. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins. **J.Photochem. Photobiol**, v.40, n.3, p.191-326, Oct ,1997.

VAN DYKE, T. E. et al. Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. **J. Periodontology**, v.53, p.502-508, 1982.

WAINWRIGHT , M.. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob Chemother.** v.42, p.13-28, 1998.

WALKER, C .B. et al. Gingival crevicular fluid levels of clindamycin compared with its minimal inhibitory concentrations for periodontal bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.19, n.5, p.867-871, 1981

WOEHRLE. D.,et al. Phtalocyanines and related macrocycles for multi-electron transfer in catalysis. **Polymer Adv. Technol.**,v.6, p.118-130, 1995.

WOLF, P.; FINK-PUCHES. R.; CERRONI, L.; KERL, H. Photodynamic therapy for mycosis fungoides after topical photosensitization with 5-aminolevulinic acid. **J Am Acad Dermatol.**, v. 31, n.4, p.678-680, 1994 .

XIMENEZ-FYVIE, L. .A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY S. S. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. **J Clin Periodontol.**, v. 27 , p. 722-732, 2000.

ZAMBON, J. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.12 ,n.1, p.1-20, 1985.