

Camila Prado Cruz e Nascimento

“Redução Bacteriana via Terapia Fotodinâmica”

Araraquara

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

Camila Prado Cruz e Nascimento

“Redução Bacteriana via Terapia Fotodinâmica”

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau
de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora:

Carla Raquel Fontana Mendonça

Araraquara

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio incondicional ao longo destes anos.

Aos meus avós, que apesar da distância e da saudade sempre se orgulharam de mim.

À Adriana Midori Amamura, amiga e colega de turma que ficou em nossos corações.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora pela confiança e atenção.

À Profa. Dra. Márcia da Silva, ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista e ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto que contribuíram para minha formação tanto profissional como pessoal.

Aos meus amigos que sempre acreditaram em mim e compreenderam meus momentos de surtos: Dimitry Somoza Rosa, Fernanda Colombo, Gabriel Nascimento, Lucas Monteiro e Luís Fernando Macedo Di Cristofaro.

Às pessoas que sem saber fizeram a diferença na minha vida acadêmica: Érica Navarro, Fernando Craviée, Ricardo Lima e Vinicius Coimbra.

SUMÁRIO

1) Introdução	11
2) Terapia Fotodinâmica	12
2.1) Histórico	12
2.2) Mecanismo de ação	13
2.3) Fontes de Luz	18
2.4) Espécies Reativas de Oxigênio	19
2.5) Ação antimicrobiana	20
3) Infecções Bacterianas	21
3.1) Resistência Multi-Droga	21
3.2) Biofilmes	23
3.3) Ação da Terapia Fotodinâmica na Infecções Bacterianas	26
3.4) Resistência à Terapia Fotodinâmica	36
4) Discussão	37
5) Conclusão	38
6) Referências	38

RESUMO

Por muito tempo os antibióticos foram a única forma de combate a bactérias patogênicas. Com o aumento das infecções hospitalares a busca por uma alternativa inovadora e eficaz como medida defensiva para tais doenças foi se tornando necessária. A terapia fotodinâmica foi sempre muito utilizada na década de 1970 para neoplasias malignas, mas a inativação fotodinâmica foi transformada recentemente em uma descoberta antimicrobiana. O conceito de terapia fotodinâmica antimicrobiana, de maneira simplificada, envolve a associação de um fotossensibilizador e de uma fonte de luz num comprimento de onda específico. Após exposição microbiana à esta energia luminosa, ocorre a formação de moléculas responsáveis pela inativação da bactéria como, por exemplo, as espécies reativas de oxigênio. Esta é uma área de crescente interesse e poderia ser a chave para o controle de agentes patogênicos resistentes às terapias convencionais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi reunir artigos científicos coletados na base de dados PubMed de 2000 a 2012 que relatam a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: redução bacteriana, terapia fotodinâmica antimicrobiana.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo da TFD	15
Figura 2 – Representação da parede celular de bactéria Gram-positiva (+) e Gram-negativa (-)	21
Figura 3 - Estrutura molecular do corante azul de metileno.....	22
Figura 4 – Estrutura molecular do corante azul de toluidina O	23
Figura 5 - A formação de biofilme	24
Figura 6 – Estrutura molecular de clorina	30
Figura 7 - Estrutura molecular do corante rose bengal	31
Figura 8 – Estrutura molecular do corante eritrosina	31
Figura 9 – Estrutura molecular do corante Tri-Py ⁺ -Me-PF	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos de TFD antimicrobiana com bactérias planctônicas 17

Tabela 2: Estudos de TFD antimicrobiana em modelos de biofilmes e animais 17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
μM	micromols
ALA	ácido 5-aminolevulínico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, Acquired immunodeficiency syndrome)
cm²	centímetros quadrados
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid)
FDA	Food and Drug Administration
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HB: La³⁺	hipocrelina B com íons lantanídeos
HIV	vírus da imunodeficiência humana (do inglês, Human Immunodeficiency Virus)
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HSP	proteínas de choque térmico (do inglês, heat shock protein)
J	joules
kg	quilogramas
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MB	Azul de Metileno (do inglês, methylene blue)
mg	miligramas
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimols

nm	nanômetros
PBS	Tampão fosfato-alcalino (do inglês, phosphate buffered saline)
PS	Fotossensibilizador (do inglês, photosensitizer)
RB	Rosa Bengal
ROS	espécies reativas de oxigênio (do inglês, reactive oxygen species)
TBO	Azul de Toluidina O (do inglês, toluidine blue O)
TFD	Terapia Fotodinâmica
TMP	5, 10, 15,20-tetraquis (1-metil-piridina)-21H,23H-porfina de sal tetra-p-tosilato
TMPP	5, 10, 15, 20-tetraquis- (1-metil-piridina-4-il)-porfirina de tetra p-toluenossulfonato
Tri-Py⁺-Me-PF	5,10,15-tris-(1-metilpiridínio-4-il)-20-(pentafluorofenil) porfirina triiodeto
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
ZnPc	zinco 2, 9, 16, 23-tetraquis-(fenil-tio)-29H, 31H-ftalocianina

1) Introdução

Inovações no ramo da medicina e desenvolvimento de novos medicamentos vêm mostrando que o mundo está preocupado com a saúde. Apesar das evoluções médicas, um problema ainda persiste: o aumento das infecções bacterianas patogênicas (DENIS, 2011 a).

Por muito tempo os antimicrobianos foram as únicas formas de combate às infecções, porém algumas bactérias foram se tornando resistentes pelo uso indiscriminado dessa classe de medicamentos. Assim, a busca por uma alternativa inovadora e eficaz como medida defensiva para tais doenças foi se tornando necessária (KHARKWAL, 2011).

A preocupação agora é sobre como compreender, prevenir e eliminar se possível, a resistência à multidrogas em conjunto com a exploração de novas formas para matar bactérias patogênicas (DENIS, 2011 a).

A terapia fotodinâmica (TFD) foi sempre muito utilizada na década de 1970 para neoplasias malignas, mas tal terapia vem sendo cada vez mais abordada pelo seu potencial de ação antimicrobiano (DENIS, 2011 a).

O conceito de inativação bacteriana via terapia fotodinâmica, de maneira simplificada, envolve a associação de um corante sensível à luz, denominado fotossensibilizador (PS) e uma luz visível e não-ionizante num comprimento de onda específico. Após exposição microbiana a esta energia luminosa, o fotossensibilizador é energizado a um estado de excitação que pode provocar a formação de moléculas responsáveis pela inativação da bactéria como, por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (DENIS, 2011 a).

Diversas bactérias foram testadas e foram inativadas na utilização da TFD: *Staphylococcus spp* (KASHEF, 2011; MIYABE, 2011), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (BIEL, 2011; TANAKA, 2012), *Streptococcus mutans* (VAHABI, 2011), *Enterococcus faecalis* (DENIS, 2011 b), *Pseudomonas aeruginosa* (GARCEZ, 2007; BIEL, 2011; HUANG, 2010), *Vibrio fischeri* (TAVARES, 2010), *Escherichia coli* (TAVARES,

2010; KASHEF, 2012; DENIS, 2011 b), *Proteus mirabilis* (GARCEZ, 2007), *Helicobacter pylori* (HAMBLIN, 2005; GANZ, 2005) e outras. Não foram testadas somente bactérias em estado planctônico (livres, em suspensão), mas também aquelas capazes de formar o biofilme.

Biofilme é uma realidade hospitalar que dificulta muito o tratamento das infecções. Tal forma é elaborada pelas bactérias como um escudo de resistência; uma vez sozinhas são vulneráveis, já em conjunto adquirem uma capacidade de não serem atacadas pela química do antimicrobiano. Por isso a TFD precisou ser pesquisada também nesta forma (TARASZKIEWICZ, 2012).

A terapia fotodinâmica é uma área de crescente interesse e poderia ser a chave para o controle de agentes patogênicos dentro e fora dos hospitais (DENIS, 2011 a).

2) Terapia Fotodinâmica

2.1) Histórico

A história da terapia fotodinâmica (TFD) é datada da antiguidade tendo início na antiga Grécia, Egito e Índia, porém andou desaparecida até o século 20, onde foi redescoberta pelo mundo ocidental. O uso desta terapia luminosa foi relatado pela primeira vez por Niels Finsen, um médico dinamarquês que empregou o calor no tratamento de *Lupus vulgaris* com o uso de uma lâmpada curativa que recebeu o seu nome: Lâmpada de Finsen (RAJESH, 2012).

O emprego da TFD na morte celular induzida foi relatado por Oscar Raab, estudante que trabalhava com o Prof. Herman Von Tappeiner em Munique. Tal descoberta foi feita acidentalmente em 1900, quando notaram que o protozoário *Paramecium infusoria* em solução de laranja de acridina morreria após a exposição à luz. O laboratório de Von Tappeiner cunhou o termo “ação fotodinâmica” em trabalhos seguintes mostrando que além da luz, o oxigênio era essencial (VALENZENO, 1990).

O uso clínico foi feito muito tempo depois em Buffalo, Nova York no Instituto do Câncer Roswell Park. Thomas Dougherty et al (1992) publicaram resultados de que 113 tumores malignos cutâneos ou subcutâneos tratados, 111 apresentaram total ou parcial resolução.

Em 1999, o FDA aprovou a TFD para tratamento de lesões cutâneas pré-cancerosas de face ou couro cabeludo (LUI; ANDERSON, 1992).

A “ação fotodinâmica” aplicada no campo das doenças infecciosas sofreu um grande revés com a descoberta dos antimicrobianos na década de 1940, o que na época revolucionou o tratamento das mesmas (BAGNATO, 2008).

A partir de 1990, a aplicação antimicrobiana do fotossensibilizador foi impulsionada por dois eventos: a disseminação da AIDS devido ao HIV e o enorme crescimento das infecções hospitalares devido às multiplicações das bactérias resistentes aos fármacos (BAGNATO, 2008).

Verificou-se haver um benefício do uso da fototerapia com o UVB 311nm em doentes HIV com prurido intenso associado às dermatoses papulares ou às foliculites eosinofílicas, resistentes a outras terapêuticas (SCHOEFER; SACHS; OCHSENDORF, 2013).

2.2) Mecanismo de ação

A TFD envolve três componentes: luz, fotossensibilizador (PS) e oxigênio. Estes elementos combinados produzem potentes espécies oxidantes (DENIS, 2011 a). O PS é administrado no paciente e sobre radiação com luz de comprimento de onda específico, o PS sofre uma transição de um estado de baixa energia para um estado singlete excitado, estado este de curta duração. Isto é alcançado, pois no estado fundamental um PS está no estado singlete onde todos os seus elétrons estão com spins emparelhados em orbitais de baixa energia (RAJESH, 2012). Após a aplicação da luz correspondente ao pico de absorção do PS,

o elétron ocupando o mais alto orbital molecular HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) do PS é excitado para o mais baixo orbital molecular desocupado LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) chegando ao estado singleto excitado, o estado de interesse (DENIS, 2011 a).

Subsequentemente, o PS pode decair de volta ao seu estado fundamental com a emissão de fluorescência ou pode sofrer uma transição para um estado de tripleto de energia mais elevada. O estado tripleto pode reagir com biomoléculas, dentre elas o oxigênio que também é tripleto em seu estado molecular fundamental (RAJESH, 2012).

A reação com biomoléculas pode ser por duas vias: tipo I e tipo II. A reação do tipo I envolve a reação de elétrons, onde há reação direta entre o corante foto-excitável (PS) e o substrato orgânico, por abstração de hidrogênio ou transferência eletrônica, criando produtos radicais livres que são altamente reativos (BIEL, 2011) e interagindo com oxigênio molecular produzindo as espécies reativas de oxigênio, como superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Estas são prejudiciais à integridade da membrana celular biológica, causando danos irreparáveis (RAJESH, 2012). Já a do tipo II é uma reação direta entre o corante foto-excitável no estado tripleto e o oxigênio molecular, produzindo oxigênio singleto, um estado altamente reativo que por si só causa danos oxidativos nas membranas das células quando reagir com substratos orgânicos (BIEL, 2011). Como o estado singleto dura muito pouco, é utilizado em aplicações pontuais e localizadas, por isso é o tipo de reação mais aceito como via de dano às células microbianas (RAJESH, 2012).

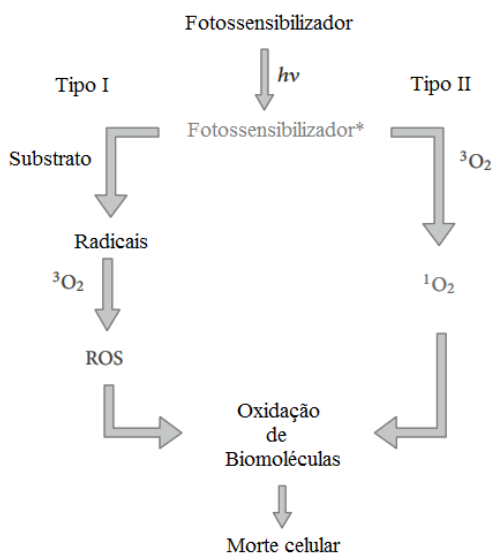


Figura 1 – Mecanismo da TFD
 Fonte: Adaptado de TARASZKIEWICZ, 2012, p. 3

A maioria dos fotossensibilizadores ativa-se pela luz no comprimento de onda entre 630 e 900nm, o que corresponde a uma profundidade de penetração de luz de 0,5 a 1,5cm, limitando a profundidade da necrose. A dose de luz total, as taxas de dose e a profundidade de destruição variam de acordo com o tecido tratado e o PS utilizado (SALVA, 2002; GRANT, 1997).

Parâmetros de luz, como dose total de luz, apesar da concentração do PS desempenham um papel importante na eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana. Em geral, a foto-inativação de células microbianas é dependente da dose de luz entregue na amostra, somados a presença do PS.

Por fim, os fotossensibilizadores são geralmente moléculas orgânicas aromáticas constituídas de um cromóforo central com ramos auxiliares que são responsáveis pelo deslocamento de mais elétrons do PS, alterando assim o espectro de absorção do mesmo. (DENIS, 2011 a).

Basicamente o mecanismo do fotossensibilizador é se ligar mais rapidamente aos microrganismos do que às células hospedeiras, permitindo uma sensibilidade temporal

favorável aos microrganismos. Dessa forma, se a luz é aplicada logo após a administração do PS, o dano colateral para o tecido hospedeiro será minimizado (DENIS, 2011 a).

Laranja de acridina foi o primeiro agente fotodinâmico usado no experimento com o *Paramecium infusoria* (RAJESH, 2012). A maioria dos fotossensibilizadores que têm sido empregados para o tratamento de feridas baseiam-se no núcleo tetra-pirrólico, com ênfase no uso de porfirinas, como hematoporfirina usada por Thomas Dougherty.

Na escolha do fotossensibilizador mais adequado na terapia fotodinâmica antimicrobiana deve-se respeitar os critérios do FDA: seletividade e alta afinidade por células malignas, substância com estrutura química definida, solubilidade e estabilidade em água, fotossensibilidade não prolongada, baixa toxicidade, metabolização rápida e elevado coeficiente de absorção no comprimento de onda superior a 600nm (MOAN; PENG, 2003).

Com a experiência na utilização da TFD, mostra-se que ao menos quatro parâmetros devem ser levados em consideração no desenvolvimento de novos agentes fototerapêuticos: toxidez, eficiência na geração de oxigênio singleto, capacidade de penetração na membrana celular e velocidade de eliminação pelo organismo após o tratamento (MACHADO, 2000).

Os fotossensibilizadores mais utilizados com ação antimicrobiana aprovados pelo FDA são azul de toluidina-O (TBO) e o azul de metileno (MB). Ambos têm características físico-químicas e químicas similares. TBO é uma solução de cor azul-violeta que cora grânulos dentro de mastócitos e proteoglicanos/glicosaminoglicanos nos tecidos conjuntivos. O MB é um indicador redox que é azul em ambiente oxidante e torna-se incolor após a redução. Sabe-se que o MB se liga ao DNA preferencialmente aos pares de bases guanina e citosina e foi assumido que é um composto heterocíclico tricíclico que intercala entre os pares de base do DNA. Outra ação é foto-oxidar vários aminoácidos, especialmente triptofano, tirosina, histidina, metionina e cisteína, podendo ocorrer por reação tipo I e II. Esses dois PS

são muito eficazes para a inativação de bactérias Gram positivas e Gram negativas periodontopatogênicas (BAGNATO, 2008).

Taraszkiewicz (2012) coletaram dados e elaboraram uma tabela com os principais fotossensibilizadores utilizados em tratamento de determinadas bactérias na Tabela 1 para planctônicas e na Tabela 2 para biofilmes.

Tabela 1: Estudos de TFD antimicrobiana com bactérias planctônicas

Microrganismo	Fotossensibilizador	Referências
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i>	Fulerenos catiônicos	Huang et al, 2010
Conídio de <i>Penicillium chrysogenum</i>	Porfirinas catiônicas	Gomes et al, 2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	MB	Lin et al, 2012
<i>Candida</i> spp.	MB	Queiroga et al, 2011
<i>Staphylococcus</i> spp.	MB	Miyabe et al, 2011
<i>Streptococcus mutans</i>	MB, TBO	Rolim et al, 2012
<i>Bacillus atrophaeus</i> , <i>MRSA</i> e <i>Escherichia coli</i>	TMPyP	Maisch et al, 2012

MB: azul de metileno, **TBO:** azul de toluidina-O, **TMPyP:** 5, 10, 15, 20-tetraquis- (1-metil-piridina-4-il)-porfina de tetra p-toluenossulfonato, **MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Fonte: TARASZKIEWICZ (2012, p. 4).

Tabela 2: Estudos recentes de TFD antimicrobiana em modelos de biofilmes e animais

Microrganismo	Fotossensibilizador	Modelo	Referências
<i>P.aeruginosa</i> , <i>MRSA</i>	MB	Biofilme	Biel et al, 2011
<i>P. aeruginosa</i>	TMP	Biofilme	Collins et al, 2010
<i>Candida</i> spp., <i>Trichosporon mucoides</i> e <i>Kodamaea ohmeri</i>	ZnPc	Biofilme	Junqueira et al, 2012
<i>Enterococcus faecalis</i>	MB	Biofilme	Meire et al, 2012
<i>Proteus mirabilis</i>	Fulerenos B6	Modelo Murino	Lu et al, 2010
<i>P. aeruginosa</i>	New MB	Modelo Murino	Dai et al, 2011
<i>C.albicans</i>	Clorina e6	Modelo Murino	Park et al, 2010
<i>S.aureus</i>	HB:La ³⁺	Modelo Murino	Hashimoto et al, 2012
<i>P.aeruginosa</i>	HB:La ³⁺	Modelo Murino	Hashimoto et al, 2012

MB: azul de metileno, **TMP:** 5, 10, 15,20-tetraquis (1-metil-piridina)-21H,23H-porfina de sal tetra-p-tosilato, **ZnPc:** zinco 2, 9, 16, 23-tetraquis-(fenil-tio)-29H, 31H-ftalocianina, **HB:La³⁺:** hipocrelina B com íons lantanídeos, **MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

Fonte: TARASZKIEWICZ (2012, p. 5)

2.3) Fontes de Luz

A TFD de maneira geral requer uma fonte de luz de baixa potência, geralmente situada na porção visível do espectro eletromagnético, porém o comprimento de onda escolhido estará diretamente relacionado ao espectro de absorção do fotossensibilizador utilizado (FELDMAN, 2009).

Três diferentes grupos de fontes de luz podem ser caracterizados para a TFD: lâmpadas de amplo espectro, lâmpadas de diodo (LED) e lasers. A ação destes aparelhos depende fundamentalmente do espectro de emissão, da irradiância, da distribuição espacial da luz e da potência do aparelho (TOREZAN; NIWA; NETO, 2009).

As primeiras fontes de luz utilizadas em TFD foram as lâmpadas convencionais, com uma luz não-coerente, policromática e com um forte componente térmico. Com a descoberta do laser, tornou-se possível utilizar uma luz homogênea de baixa intensidade para ativar a reação fotodinâmica (ACKROYD, 2001).

Com a descoberta e desenvolvimento dos lasers, que possuem características particulares, como monocromaticidade, coerência e colimação, esta fonte de luz provou ser mais eficiente para promover a terapia fotodinâmica do que outras fontes de luz (FELDMAN, 2009).

A mais recente alternativa são os LEDs (*Light Emmitting Diodes* – diodos emissores de luz), que também podem ser utilizados com sucesso como fonte de luz na terapia fotodinâmica, pois tem baixo custo, apresentam um baixo componente térmico e luz com estreito espectro eletromagnético (RIBEIRO, 2005).

A diferença entre LED e Laser não é na sua efetividade na terapia fotodinâmica antimicrobiana e sim no custo, sendo o primeiro mais barato que o segundo (FELDMAN, 2009).

2.4) Espécies Reativas de Oxigênio

Como apresentado anteriormente, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são a etapa crucial do processo de inativação bacteriana pela terapia fotodinâmica. Tais espécies são formadas a partir de reações do oxigênio com biomoléculas nas vias tipo I e II, já explicadas.

Além de produzidas, as ROS podem servir de “aditivo” à TFD. McCullagh e Robertson (2006) têm indicado que o uso de peróxido de hidrogênio associada à TFD proporcionou maior morte de microrganismos.

Um estudo de Garcez et al (2011) demonstrou os mecanismos antimicrobianos da terapia fotodinâmica na presença de peróxido de hidrogênio. Nele é relatado que os resultados da TFD utilizando MB como PS na presença de peróxido de hidrogênio para erradicar *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* aumentam potencialmente o efeito antimicrobiano. Todos os microrganismos examinados na TFD com presença de H₂O₂ em concentrações crescentes geraram morte microbiana aumentada de uma forma dependente da dose de peróxido de hidrogênio.

A primeira hipótese é baseada na reação via tipo II, por ser a mais aceita como predominante em um sistema oxigenado. A quantidade de oxigênio molecular numa solução de H₂O₂ (a 1M, usada como agente antimicrobiano) é aproximadamente 30% maior do que uma solução de PBS. Porém, os resultados demonstram que, sem dúvida, a produção de ROS em solução diminui ao invés de aumentar na presença de H₂O₂.

Logo, a possibilidade de um mecanismo relacionado com a via tipo I foi testada. Primeiro foi tentado explicar o aumento da redução bacteriana pela reação fotoquímica. A possibilidade é de que o azul de metileno (MB), uma vez excitado, reage diretamente com H₂O₂ em um processo via transferência de elétrons gerando tanto radicais hidroxila como hidroperóxidos. Tal hipótese foi apoiada pelo relatório de Gak, Nadtochenko e Kiwi (1998) que investigaram a extinção do tripleto excitado de MB por H₂O₂. Com o estudo de

McCullagh e Robertson (2006) ao investigarem o efeito fotodinâmico antimicrobiano de MB e H_2O_2 contra cianobactérias em um ambiente livre de oxigênio e confirmaram que há um aumento da atividade antimicrobiana do sistema MB/ H_2O_2 , porém continua-se observando a diminuição da produção de ROS em ambientes com peróxido de hidrogênio.

Baatout, De Boever e Mergeay (2006) mostraram que cepas bacterianas apresentaram diferentes sensibilidades para H_2O_2 exógena, porém em todas se observou um dano à permeabilidade da membrana.

O aumento da capacidade de penetrar a célula bacteriana foi provada por Garcez et al (2011) já que a quantidade de absorção de MB após incubação com H_2O_2 é maior ($5\mu M$ mais em comparação com solução PBS), facilitando a aproximação deste PS à regiões intracelulares sensíveis a danos da TFD e assim aumentando a redução bacteriana sem que haja aumento da produção de ROS.

2.5) Ação antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana, também conhecida como inativação fotodinâmica, fotossensibilização letal, desinfecção foto-ativada ou quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana representa uma alternativa no tratamento de infecções bacterianas.

A susceptibilidade diferencial à TFD surge devido às diferenças nas estruturas destes dois grupos de parede celular. Em bactérias Gram positivas (FIG.2), a membrana citoplasmática é rodeada por uma camada relativamente porosa de ácido lipoteicoico e peptidoglicano que permite que o PS atravesse. O envelope celular das bactérias Gram negativas (FIG.2) é constituído por uma membrana citoplasmática interna e uma membrana exterior, que são separados pelo peptidoglicano contendo periplasma. A membrana externa forma uma barreira eficaz contra a permeabilidade, restringindo a ligação e penetração de

muitos fotossensibilizadores. Para superar esta barreira de permeabilidade, várias abordagens têm sido aplicadas. Utilização de PS em combinação com um agente de permeabilização tal como polimixina nonapeptídeo ou EDTA fez o tratamento por TFD eficaz contra as bactérias Gram negativas. Transmitir carga positiva para o PS também pode produzir fotossensibilizador de amplo espectro que poderiam inativar todas as classes de microrganismos: bactéria Gram positivos, Gram negativos, fungos, vírus, parasitas e formas resistentes como esporos e cistos (KHARKWAL, 2011)

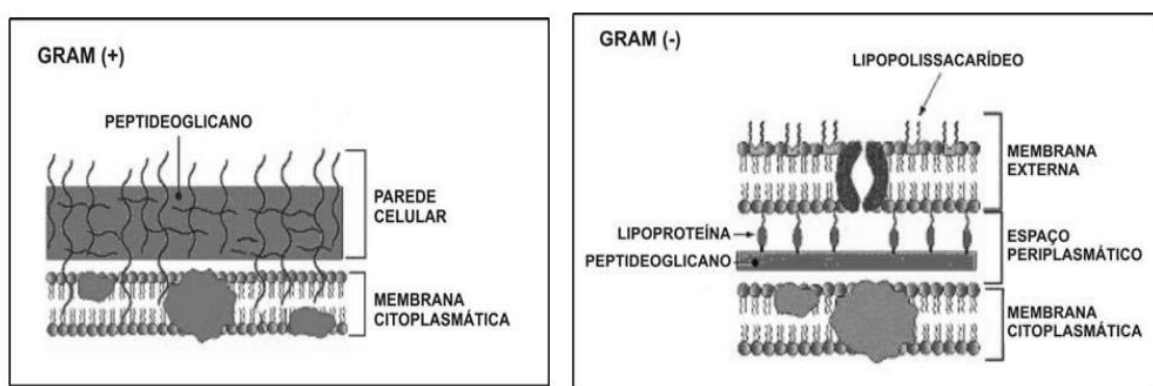


Figura 2 – Representação da parede celular de bactéria Gram-positiva (+) e Gram-negativa (-)

Fonte: Ferronato e Salmaso, 2010.

3) Infecções Bacterianas

3.1) Resistência Multi-droga

A resistência aos antimicrobianos vem sendo uma epidemia maior que a própria infecção. Os microrganismos se tornam resistentes devido ao uso indiscriminado ou excessivo de medicamentos, ou até por uma resistência já intrínseca a determinada classe medicamentosa.

O problema da resistência é a dificuldade do tratamento. Neste caso a terapia fotodinâmica é bem indicada, pois tal terapia apenas utiliza o mecanismo de estresse oxidativo das próprias células do hospedeiro para acabar com o microrganismo, sendo eficaz na redução bacteriana.

Alguns estudos mostram a ação do azul de metileno (FIG. 3) como sendo o PS de escolha no combate a bactérias patogênicas (KASHEF, 2011). Tal escolha é justificada, pois o MB atravessa facilmente as paredes bacterianas devido a sua carga catiônica que se liga à carga negativa dos lipopolissacarídeos das bactérias Gram negativas, possivelmente patogênicas.

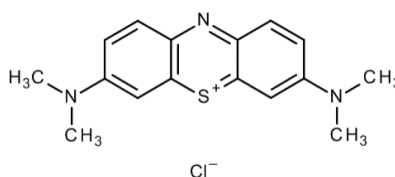


Figura 3 – Estrutura molecular do corante azul de metileno
Fonte: Merck Chemicals, 2013

Kashef et al (2011) afirmam em seu estudo feito em isolados de bactérias multi-droga resistentes de úlceras de pés diabéticos que não havia estudos provando a efetividade da TFD em bactérias resistentes. Porém no final do estudo, o resultado foi favorável ao MB. Os isolados de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* mostraram significativa redução desde a mínima concentração de azul de metileno, provando que a redução não foi dependente da dose de PS. No estudo, um dos determinantes para o efeito bactericida do MB foi o tempo de exposição à luz. No tempo de 5 minutos, *S. aureus* reduziu em 91,25%; *S. epidermitis*, 87,79% e *E. coli*, 71,02%. Já com o tempo de 20 minutos, a redução foi ainda maior, sendo de 99,03% para *S. aureus*, 98,95% para *S. epidermitis* e 92,23% para *E. coli*. Deve-se notar que sem o MB e na presença de luz não houve redução, provando que é uma ação conjunta desses dois elementos.

As bactérias resistentes mais preocupantes são a *Stahylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e a *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE). Para a TFD antimicrobiana de MRSA utilizou o azul de toluidina- O (FIG. 4) com laser HeNe (hélio-

neônio) em 632,8 nm, o que erradicou completamente a bactéria de acordo com Hajim, Salih e Rassam (2010). Outros fotossensibilizadores foram eficientes na redução de MRSA como Zn(II) ftalocianinas, THPTS e conjugado de poli-S-lisina porfirina (DENIS, 2011 a).

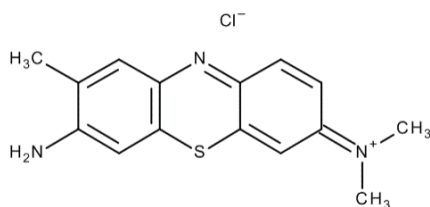


Figura 4 – Estrutura molecular do corante azul de toluidina O
Fonte: Merck Chemicals, 2013

Azul de metileno também se mostrou eficiente na redução de VRE no estudo de Wainwright et al (1999). Outro PS que se mostrou ideal foi um conjugado de vancomicina-porfirina que foi capaz de eliminar *in vitro* tanto *Enterococci* sensível como resistente à vancomicina, mostrado tanto neste estudo como também no de Xing et al (2011).

Bactérias Gram negativas multi-droga resistente (MDR) ou pan-droga resistente (PDR) também são preocupantes. Dijkshoorn, Nemec e Seifert (2007) estudaram que isolados de *Pseudomonas aeruginosas* MDR podem ser erradicados pelo uso da TFD com TBO, e não somente cepas resistentes como também cepas sensíveis foram afetadas pela terapia luminosa.

Portanto, a TFD mostrou ser um excelente caminho para a redução das infecções bacterianas multi-droga resistentes, uma grande evolução no ramo do tratamento de doenças.

3.2) Biofilmes

Além das infecções por organismos no estado planctônico, a maior preocupação atual são os biofilmes.

Um biofilme microbiano é definido como uma comunidade estruturada de células bacterianas fechadas em uma matriz polimérico auto-produzida, que é aderente a superfícies inertes ou vivas (FIG.5). A matriz contém polissacarídeos, proteínas e DNA microbiano

extracelular. Tal matriz protege das adversidades ambientais, como o sistema imunológico do hospedeiro (TARASZKIEWICZ, 2012).

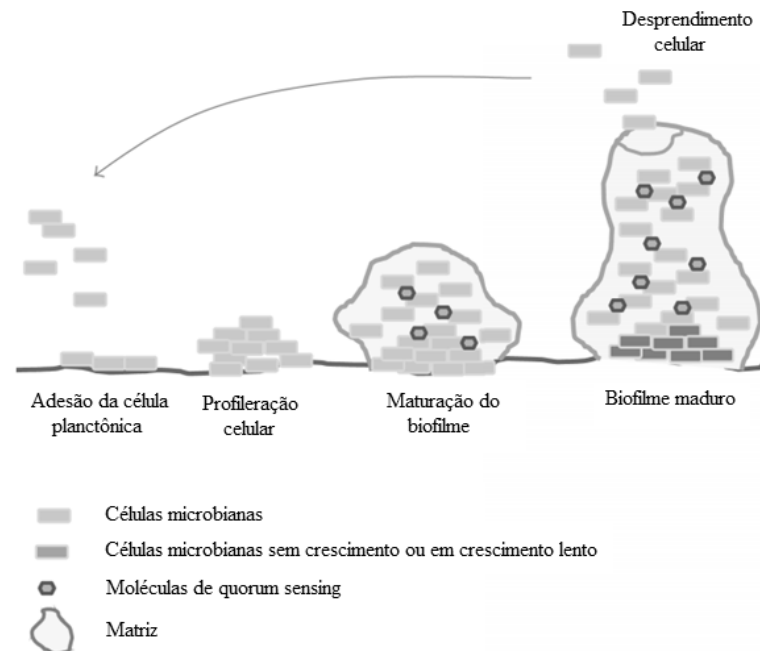


Figura 5 - A formação de biofilme.
Fonte: Adaptado de TARASZKIEWICZ, 2012, p.4

Um grande número de infecções bacterianas crônicas envolve o biofilme, tornando tais infecções muito mais difíceis de serem erradicadas pela terapia convencional antimicrobiana. Então, foram propostos alguns mecanismos de resistência do biofilme ao antimicrobiano.

O primeiro mecanismo proposto envolveu a matriz, o que representa uma barreira físico-química para o antimicrobiano. Høiby, Ciofu e Bjarnsholt (2010) demonstraram que a resistência do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* para o tratamento antimicrobiano está relacionada com muco. Biofilmes mucóides foram até 1000 vezes mais resistentes à tobramicina que biofilmes não-mucóides. Jefferson, Goldmann e Pier (2005) sugeriram que, embora a matriz não possa inibir a penetração do antimicrobiano, ela pode retardar a taxa de penetração suficiente para induzir a expressão de genes dentro do biofilme que levam a resistência.

Uma segunda hipótese para explicar a reduzida sensibilidade de biofilmes aos antimicrobianos refere-se ao estado metabólico dos microrganismos num biofilme. Algumas das células localizadas dentro da estrutura experimentam a limitação de nutrientes e, portanto, existem em um estado de crescimento lento ou morte (BROWN, ALLISON e GILBERT, 1988). Zonas com nutrientes esgotados dentro do biofilme podem resultar em uma fase estacionária do tipo de dormência que pode influenciar a resistência geral dos biofilmes aos antimicrobianos. Walters et al (2003) demonstraram que o oxigênio penetrou de 50 a 90 μ M em biofilmes de colônias formadas por *Pseudomonas aeruginosa* e que a ação antimicrobiana é focada perto da interface ar-biofilme. Este mesmo estudo mostrou que a limitação do oxigênio tem um papel de resistência ao antimicrobiano.

A terceira hipótese envolve a adaptação genética para diferentes condições. A frequência de mutação de um microrganismo no biofilme em crescimento é significativamente mais elevada do que a da sua forma planctônica; para *P. aeruginosa*, até um aumento de 105 vezes na mutabilidade é observado (DRIFFIELD, 2008).

Para que o tratamento seja efetivo é necessário identificar os fatores que perturbam a estrutura do biofilme ou afetam a sua formação.

Collins et al (2010) estudaram o efeito da TMP, uma porfirina catiônica, em biofilmes de *P. aeruginosa*. Uma diminuição significativa na densidade do biofilme foi observada, e a maioria das células no centro do biofilme não eram viáveis, quando foram utilizados 100 μ M de TMP por 10min de irradiação (lâmpada de vapor de mercúrio, 220-240 J/cm²) e ainda o uso de 225 μ M de TMP e a mesma dose de luz resultaram em perturbações e apuramento quase completo do biofilme estudado.

Para biofilmes, as concentrações de PS precisam ser mais elevadas para obter eficiência completa de morte comparada a culturas planctônicas. Estas concentrações mais elevadas podem ser potencialmente tóxicas para células eucarióticas. Assim, é de grande

importância propor uma estratégia para diminuir as concentrações dos fotossensibilizadores utilizados *in vivo* para facilitar ainda mais a aplicação de TFD antimicrobiana para o tratamento de infecções em seres humanos e animais (TARASZKIEWICZ, 2012).

Como foi dito anteriormente a dose de luz é crucial para uma redução significativa da concentração do fotossensibilizador, quanto maior a dose de luz, maior a sua eficácia. Portanto uma maneira de fazer uso da TFD em tratamento de biofilmes, de modo a amenizar a toxicidade do PS, seria substituir as altas concentrações pelo aumento da dose de luz dando a oportunidade de aumentar a seletividade da TFD antimicrobiana em potenciais aplicações clínicas.

Um PS que se mostrou eficaz foi o TBO que em biofilmes de origem estafilococal provocou diminuição do número de células, rompendo a arquitetura do biofilme e sugerindo um dano na membrana celular da bactéria (SHARMA, 2008). Tal PS demonstrou impacto em biofilmes de *Streptococcus mutans* em diferentes estágios de maturação como também em outras espécies: *S. sobrinus* e *S. sanguinis* (ZANIN e WOOD, 2006). Outro PS bastante utilizado foi o MB. Biel et al (2011) produziram redução do biofilme de *P. aeruginosa* e MRSA em tubos endotraqueais de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica e também no tratamento de biofilmes em sinusite crônica recorrente.

Pode-se dizer que a TFD antimicrobiana está ganhando espaço no tratamento de redução bacteriana também em biofilmes.

3.3) Ação da Terapia Fotodinâmica na Infecções Bacterianas

A erradicação de infecções bacterianas em feridas usando a Terapia Fotodinâmica tem sido reportada na literatura.

Huang et al (2010) descreveram a ação da TFD em células de microrganismos patogênicos *in vitro* e o tratamento pela mesma terapia em infecções localizadas em modelos

murinos. Nos experimentos *in vitro* utilizou-se azul de metileno como corante fotossensibilizador em culturas de *Staphylococcus aureus* (10 μ M) e *Pseudomonas aeruginosa* (1mM). Houve algumas variações deste experimento que os autores consideraram interessantes do ponto de vista científico. Primeiro a suspensão das células bacterianas e o MB dissolvido podem ser lavados ou não por centrifugação (1369 x g por 5min) e subsequentemente ressuspender na mesma proporção com PBS, o sedimento bacteriano fortemente ligado ao MB. Outra variação do experimento foi manter tanto a concentração do MB quanto a dose de luz constantes na mistura de incubação, sendo que para *P. aeruginosa*, a dose de luz foi maior devido a dificuldade de erradicar tal bactéria. Os resultados apresentados pelo estudo comprovaram o que já era sabido: bactérias Gram positivas são mais fáceis de matar que as Gram negativas. Quando a suspensão bacteriana de *S. aureus* era iluminada sem “lavagem”, as bactérias foram efetivamente eliminadas com concentração de MB menor que 10 μ M, combinado com a dose de luz de 10 J/cm² com comprimento de onda igual a 660nm. Porém ao ser lavada para retirar a solução de MB, a morte foi drasticamente reduzida até concentrações de 30 μ M de PS. A razão da diferença é provavelmente que as espécies reativas de oxigênio extracelulares produzidas também causam dano à bactéria e permite melhor penetração do MB.

Sendo *P. aeruginosa* uma das mais resistentes bactérias Gram negativas, concentrações inferiores a 1mM de MB foram ineficazes na ação da TFD em qualquer condição. Quando 1mM foi utilizado com “lavagem” por centrifugação e ressuspensão, obteve-se uma morte dependente da dose de luz, com fluência relativamente alta de 320 J/cm² levando a uma taxa de morte elevada, porém sem eliminação completa. Já quando a suspensão não foi lavada da solução de MB, a morte praticamente desapareceu. A explicação foi que o PS livre em solução atuou como um escudo óptico impedindo com que a luz alcançasse a bactéria e completa-se a morte. Em outras palavras, o melhor efeito de morte,

retirando a solução de MB, apenas se aplica a altas concentrações de fotossensibilizador. Nos experimentos *in vivo*, os camundongos foram submetidos a uma queimadura de 3º grau nas costas para que fosse inoculado 200µl provenientes de uma solução de PBS contendo 10^8 UFC/ml de *P. aeruginosa* bioluminescente. Após trinta minutos de incubação, 50µl da solução do azul de metileno em PBS (equivalente a 1mM de MB) foi vertida na queimadura e posteriormente sofreu tratamento fotodinâmico, com o murino anestesiado. Para observar o desenvolvimento da infecção foram obtidas fotografias, através de bioluminescência, do local da queimadura antes e após o tratamento e logo após a aplicação do PS, para testar sua toxicidade pura. O comprimento de onda utilizado foi de 660nm entregue por um diodo emissor de luz (LED). As alíquotas da dose de luz foram variáveis de 12 em 12 J/cm², sendo o local fotografado após cada dose. Não houve diferença visível entre qualquer das queimaduras na conclusão da iluminação ou mesmo a qualquer momento durante o processo de cura. Nos 2 a 5 dias seguintes, os camundongos foram anestesiados e fotografados sob as mesmas condições. O resultado foi o esperado, ou seja, a diminuição da luminescência foi aumentando conforme a progressão da dose de luz. Enquanto com 12 J/cm² a perda foi baixa e até 36 J/cm², a bioluminescência foi menos perceptível. Ao atingir a dose mais elevada, 240 J/cm², não existe praticamente nenhuma luminescência detectável (Huang, 2010).

Um estudo realizado por Miyabe et al (2010) testaram o efeito da TFD e do ciprofloxacino utilizando vinte cepas de *Staphylococcus* isolados da cavidade bucal humana. Cada uma foi suspensa (10^6 células/mL) e submetida ao tratamento fotodinâmico com MB e laser vermelho com dose de luz equivalente a 26,3 J/cm². O fotossensibilizador foi utilizado sob concentração de 3 mM que tem sua absorção máxima obtida no comprimento de onda igual a 660nm. Os resultados obtidos mostram uma significativa redução no grupo onde foi utilizado o PS e a luz comparada aos outros grupos. Uma pequena redução foi observada nos grupos onde só foi aplicado o PS sem luz, comparada ao grupo que não teve nem ação

luminosa nem fotossensibilizadora. Já o tratamento com antimicrobiano foi com 100% de redução, exceto em *S. schleiferi* que mostrou ser a cepa mais sensível a TFD indicando assim que o tratamento fotodinâmico pode ser uma alternativa a espécies resistentes a antimicrobianos. Após o experimento, registrou-se uma redução bacteriana mais significativa que em estudos semelhantes, citados pelo autor, levando a conclusão de que a TFD foi efetiva na redução do número viável de células de *Staphylococcus* spp isolados.

Vahabi et al (2010) realizaram um experimento *in vitro* com *Streptococcus mutans* realizado por foram utilizados dois fotossensibilizadores: um da classe dos fenotiazínicos, o TBO e um derivado de clorofila, o Radachlorin[®] iluminados respectivamente com diodo laser de 633nm e de 662nm. Foram utilizados como controle grupos com somente irradiação do laser, ou com somente o PS, ou sem PS nem laser. A dose de luz utilizada por 0,1% de Radachlorin[®] foi de 12 J/cm² e por 0,1% de TBO, 3 J/cm², ambos por 10min. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a TFD com o TBO foi mais bem sucedida em comparação ao Radachlorin[®] na redução bacteriana eficaz. Os achados em relação ao TBO estão de acordo com outros estudos que mostraram que é possível matar as bactérias periodontais usando baixa concentração do azul de toluidina-O e baixas densidades de energia.

Com relação ao Radachlorin[®], a redução foi inferior comparando ao TBO, porém superou as expectativas do grupo de pesquisa. Outro autor, Wainwright et al (1999), em um estudo onde utilizou o mesmo PS indicou que a alta densidade de energia e um curto período de tempo pode dar diferentes efeitos antimicrobianos em comparação com a menor densidade durante um longo tempo, mesmo sendo a mesma potência. É citado também por Wainwright et al (1999) que maiores concentrações de clorina e6 faz com que a distância percorrida pela luz possa ser reduzida devido a sua perda de intensidade. Em tal caso, as camadas superficiais

do corante absorvem o laser de forma muito eficiente, mas que impedem a sua penetração nas camadas mais profundas.

As clorinas (FIG. 6) são porfirinas reduzidas. A clorina e6 é uma forma derivada da clorofila que apresenta duas importantes propriedades: um maior rendimento quântico de formação de oxigênio singlete e uma intensa banda de absorção em comprimentos de onda maiores do que 650nm, com inconveniente da baixa solubilidade em meio aquoso. (BAGNATO, 2008)

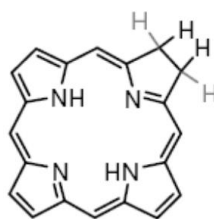


Figura 6 – Estrutura molecular de clorinas

Logo, com esse estudo de Vahabi et al (2010) pode-se concluir que exposições radiantes de um PS altamente concentrado pode ser subestimado, levando a redução da eficiência da terapia fotodinâmica.

Um outro estudo utilizando cepas clínicas e referência de *S. mutans* realizado por Costa et al (2010) utilizaram dois PS da classe dos xantenos: eritrosina e rose bengal (RB), ambos a 2µM usando diodo emissor de luz com comprimento de onda de 450nm. Xantenos são compostos cíclicos com três anéis aromáticos em arranjo linear, com um átomo de oxigênio no centro do anel, que absorvem luz na região do visível. Uma característica importante dos corantes xantenos é que não se ligam à membrana celular e localizam-se no citoplasma. Alguns exemplos de xantenos, além das já citadas, são eosina Y e fluoresceínas. Rose Bengal (FIG.7) é um haleto derivado da fluoresceína e como PS pode matar microrganismos tais como vírus, bactérias e protozoários, além de induzir efeitos fotodinâmicos *in vitro* em células vermelhas do sangue, cardiomiócitos (fibra muscular

cardíaca) e células epiteliais pigmentadas da retina. Em um ambiente aquoso contendo nucleotídeos, o mecanismo fotodinâmico do sensibilizador RB sob irradiação em 532nm é predominantemente do tipo II, gerando 80% de oxigênio singlete e 20% de ânion superóxido (BAGNATO, 2008). Eritrosina (FIG. 8) tem atividade antimicrobiana contra bactérias orais Gram positivas e negativas. Esse corante é usado para corar o agente etiológico das doenças orais mais comuns (placa dentária).

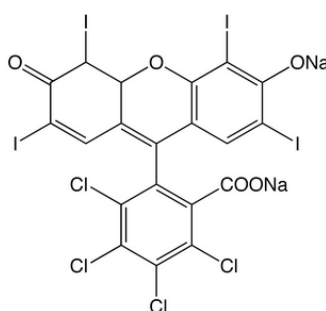


Figura 7 – Estrutura molecular do corante rose bengal
Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2013

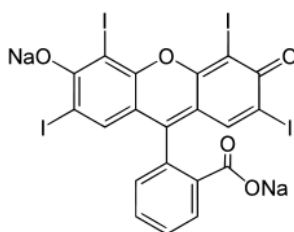


Figura 8 – Estrutura molecular do corante eritrosina
Fonte: Merck Chemicals, 2013

Foram testadas diferentes condições experimentais com as suspensões de 10^6 células/ml: rose bengal e luz, eritrosina e luz, apenas rose bengal, apenas eritrosina, apenas luz e o controle sem ambos. O resultado obtido indica que ambos os fotossensibilizadores foram efetivos na redução de todas as cepas utilizadas, sendo o Rose Bengal ligeiramente mais eficaz.

Kashef et al (2010) estudou a TFD com microrganismos resistentes isolados de úlceras de pés diabéticos. Tais microrganismos foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*. No experimento foi utilizado o azul de metileno como PS em concentrações diferentes como também diferentes doses de luz. Todas as espécies foram suscetíveis à morte por inativação fotodinâmica. O efeito bactericida não foi dependente da concentração de MB, mas foi dependente da dose de luz. Fotossensibilização com azul de metileno e irradiação com laser vermelho na dose de $109,2 \text{ J/cm}^2$ foi capaz de alcançar reduções de 99,03% e 98,95% nas contagens viáveis de *S. aureus* e *S. epidermidis* e para *E.coli*, 92,23%. Estes resultados sugerem que o MB em combinação com luz vermelha pode ser um meio eficaz de erradicar bactérias resistentes aos medicamentos em feridas.

Wilder-Smith et al (2002) num ensaio feito em humanos com úlcera péptica associada à infecção por *Helicobacter pylori* utilizou luz azul (410nm, 50 J/cm^2) ou luz branca endoscópica (10 J/cm^2) por 45min via oral após a adição do PS, neste caso o ALA (20mg/kg). O número de células foi grandemente reduzido nas biópsias dos tratados com ALA e luz branca ou azul, em comparação ao controle.

Hamblin et al (2005) mostraram que o *H. pylori* naturalmente acumula as porfirinas fotoativas, coproporfirinas, protoporfirinas e, é assim que as células bacterianas devem ser intrinsecamente sensíveis a fotoinativação por PS especialmente quando é aplicada a luz azul. Com base nesta hipótese, Ganz et al (2005) usou com sucesso a endoscopia com luz azul (405nm, 40 J/cm^2) para erradicar *H. pylori* do antro gástrico de dez pacientes. Alguns deles obtiveram reduções bacterianas de aproximadamente 99%.

Num estudo de Tavares et al (2010) uma porfirina tricatônica, a Tri-Py⁺-Me-PF (FIG. 9) foi utilizada para determinar se as células bacterianas podem recuperar a sua atividade após tratamento com terapia fotodinâmica e desenvolver resistência a ela após tratamentos repetidos. As cepas bacterianas utilizadas foram *Vibrio fischeri* e *E.coli* que possuem

capacidade de emissão de luz proporcional a sua atividade metabólica, podendo através dessa bioluminescência avaliar a recuperação após TFD. A eficiência da fotoinativação pela Tri-Py+-Me-PF contra ambas das linhagens não foi afetada durante as dez gerações de células fotossensibilizadas. Os resultados demonstram que *V. fischeri* e *E.coli* após essa TFD são incapazes de recuperar a atividade metabólica. Quando as amostras foram mantidas durante uma semana de escuro e sob condições de meio de crescimento, após os tratamentos fotodinâmicos, o sinal de bioluminescência foi o mesmo para as duas linhagens bacterianas, durante todo o período de incubação. De fato, nenhuma redução significativa da eficiência de fotossensibilização de *V. fischeri* e *E. coli* foi observada após dez sessões consecutivas de fotossensibilização de 25min com 5µM de PS com luz branca. Portanto nessas condições a TFD foi eficaz reduzindo em 99,9% o número de células viáveis em ambas das linhagens e não houve registro de resistência à terapia.

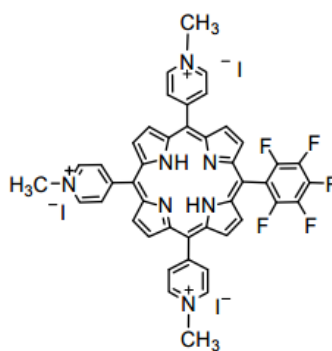


Figura 9 – Estrutura molecular do corante Tri-Py+-Me-PF
Fonte: TAVAREZ, 2010, p.4

A TFD é a via alternativa mais utilizada em tratamentos periodontais, como adjuvante ao tratamento de canal dentário. Um estudo realizado por Garcez et al (2006) estudou a TFD combinada e comparada com o tratamento endodôntico convencional para eliminar infecção de biofilme no canal radicular. Foram utilizadas cepas bacterianas Gram negativas

bioluminescentes: *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. O PS de escolha foi um conjugado de polietilenimina e clorina e6 combinada com a luz de um diodo laser de 660nm.

Como dito anteriormente a TFD foi comparada e combinada com o tratamento endodôntico tradicional que se refere ao debridamento mecânico e irrigação anti-séptica com 10ml de hipoclorito de sódio 2,5% seguido de 10ml de peróxido de hidrogênio 3%. Todos os tratamentos testados foram eficazes na redução da bioluminescência bacteriana no interior dos canais radiculares. A terapia fotodinâmica sozinha foi mais eficiente em matar as bactérias do que o tratamento endodôntico sozinho, embora os níveis de recontaminação ou rebrote após 24 horas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, mas ambos não foram inferiores a nenhum controle. Em conclusão, os resultados sugerem que o uso de TFD como um adjuvante para o tratamento endodôntico convencional conduz a uma redução estatisticamente significativa da carga bacteriana e em particular reduz a quantidade de novo crescimento bacteriano após 24 horas em comparação a qualquer outro tratamento sozinho (GARCEZ, 2006).

Como foi observado em diversos estudos, o MB é o fotossensibilizador mais utilizado junto com o TBO na terapia fotodinâmica. Isto ocorre porque ambos foram aprovados pelo FDA. Fora isso o MB é conhecido como o PS de melhor seletividade para bactérias preservando neutrófilos, e adicionalmente, tem um pico de absorbância de comprimento de onda longo (664nm), o que poderia contribuir para o tratamento de infecções profundas locais (KONIG, 1987).

Tanaka et al (2012) munidos da terapia fotodinâmica com MB utilizaram o potencial de acúmulo de neutrófilos no local infectado que leva a resolução da infecção, ou seja, indução de uma resposta imune inata. O experimento foi realizado em modelos murinos com artrite na articulação do joelho infectada por MRSA. Foi testado o efeito da TFD terapêutica e preventiva para fazer uso da sua capacidade de estimular os mecanismos de defesa do

hospedeiro. Para potencializar a visualização da redução bacteriana foi inoculado além da suspensão de 10^8 UFC/ml, micropartículas de resina na articulação do joelho.

Na TFD terapêutica, 24 horas depois da inoculação foi injetado 10ml de solução PBS contendo $100\mu\text{M}$ de MB seguido de irradiação por luz Xenon com 660nm e dose de luz variando de 5 a 160 J/cm^2 . Os murinos foram divididos em três grupos: com MB sem luz, sem MB com luz e sem ambos. A intensidade de bioluminescência, graças a adição de luciferase, foi observada logo após a TFD e dias depois a inoculação (TANAKA, 2012).

Já na TFD preventiva, a mesma solução de PBS com mesma concentração de MB foi adicionada 24 horas antes da inoculação da suspensão com micropartículas de resina e irradiado com a mesma luz Xenon só que com dose de luz, não variante, de 50 J/cm^2 . A intensidade da bioluminescência foi medida duas horas e dias após a inoculação (TANAKA, 2012).

Para observar o estímulo do neutrófilo foram injetados anticorpos anti-neutrófilos. Tal administração eliminou o efeito da TFD, exercendo o efeito desejado através da atração e acumulação de neutrófilos na região infectada. Tem sido relatado que a TFD com MB pode perturbar biofilmes (formados sob as micropartículas de resina), e isto pode permitir que os neutrófilos acumulados penetrem no biofilme e matem as bactérias. Estes resultados indicaram que as TFD com MB poderiam ativar fortemente os mecanismos de defesa imune inata contra infecção bacteriana (TANAKA, 2012).

Em conclusão, a TFD terapêutica usando azul de metileno exerceu um efeito terapêutico promissor em um modelo de artrite crônica com MRSA via acúmulo de neutrófilos e migração. TFD preventiva utilizada como um regime de pré-condicionamento antes da inoculação bacteriana suprimiu o crescimento de bactérias e inibiu o estabelecimento da infecção. Esta é a primeira demonstração de uma resposta imune inata protetora contra um agente patogênico microbiano ser induzida por TFD (TANAKA, 2012).

3.4) Resistência à Terapia Fotodinâmica

Os estudos e relatórios que discutem o potencial microbiano de desenvolver resistência a TFD são dispersos e até controversos.

Cassidy et al (2010) sugeriram que os microrganismos são incapazes de se desenvolver resistência à TFD devido a morte da bactéria non-situ específico pelo PS. Estudos anteriores tem tentado induzir a resistência à TFD, matando repetidamente e renovando amostras bacterianas. No entanto, é bem aceito que o mais provável é que as bactérias irão desenvolver resistência crescente, na presença de um estressor de baixo nível, bem exemplificado pelo surgimento de organismos resistentes aos antimicrobianos em animais alimentados (Holmberg, 1984).

Em um estudo biológico convencional de estresse de rotina, seguido de crescimento descrito por Tavares et al (2010), onde o PS usado foi Tri-Py⁺-Me-PF e as células modelos foram de *Vibrio fischeri* e *E. coli*, após 10 ciclos de inativação parcial seguido de recrescimento, nenhuma das bactérias desenvolveram resistência ao processo fotodinâmico.

Denis et al (2011 b) analisaram a resposta ao choque térmico bacteriano mediado por estresse oxidativo advindo da TFD. As proteínas de choque térmico (HSP) são um grupo de proteínas chaperonas ubíquas responsáveis pela redobragem, reparação e reciclagem de proteínas danificadas e estabilização das membranas lipídicas durante o estresse celular. Chaperonas são proteínas acessórias que irão atuar na recuperação da estrutura quaternária da proteína danificada ou impedindo que a proteína em questão perca tal estrutura. A função biológica das proteínas está diretamente ligada à sua estrutura tridimensional obtida através do processo de enovelamento proteico promovido pelas chaperonas. Proteínas denominadas genericamente de chaperonas moleculares desempenham um papel importante da homeostase proteica, pois auxiliam o enovelamento correto e o direcionamento de proteínas enoveladas incorretamente para serem degradadas pelo sistema proteassomo (RAMOS, 2013).

O proteoma de choque térmico tem sido caracterizado em *E. coli* e verificou-se duas grandes famílias: GroEL/GroES HSP e DnaK/DnaJ/GrpE que são os principais responsáveis para a proteção contra estresse, tanto em bacteriana Gram positivas quanto Gram negativas (DENIS, 2011 b).

As HSPs são reconhecidas como importantes alvos durante o estresse oxidativo e tem sido sugerido que o DnaK chaperona atua como “escudo” protegendo as proteínas contra este tipo estresse (LUNA, 2000). Anteriormente, demonstrou-se que as famílias de DnaK e GroEL conferem resistência a uma grande variedade de tensões, incluindo o estresse antimicrobiano (DENIS, 2011 b).

A relação entre as HSPs bacterianas e estresse mediado pela TFD em bactérias ainda tem que ser extensamente elucidado. O único relato pertence a Bolean (2010) que demonstraram que os níveis de GroEL se encontravam aumentadas após TFD mediada por Rosa Bengala da bactéria Gram positiva *S. mutans*.

Tudo isso só prova que novos estudos devem ser realizados para averiguar se há tal resistência à TFD ou se depende do PS utilizado ou, se ainda, qualquer tratamento prévio pode ou não favorecer a formação da resistência (DENIS, 2011 b).

4) Discussão

Desde os anos 1990, a TFD tem atraído considerável atenção como uma possível alternativa para a infecção microbiana local, e tem havido um número crescente de relatos de aplicações da TFD para infecções de bactérias multirresistentes, como descrito durante esse trabalho (DENIS, 2011 a).

Sabe-se que a TFD não é uma plataforma convencional de tratamento, pois depende dos três elementos essenciais para bem sucedida implantação (DENIS, 2011 a).

Antes dizia-se que a TFD era um processo exclusivamente localizado e para doenças muito infecciosas que poderiam continuar a precisar da terapia sistêmica, a menos que a TFD fosse desenvolvida a ponto de estimular o sistema imune do hospedeiro.

Com a evolução do estudo, já se sabe que os efeitos inflamatórios agudos da TFD produzem citocinas e quimiocinas que podem atrair e ativar neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Fora isso, os padrões de danos moleculares associados podem ser produzidos por dano de tecido mediado por TFD que pode produzir a ativação imunitária adicional. Ou seja, as evoluções dos estudos fizeram descobrir novas facetas dessa terapia (TANAKA, 2012).

Os numerosos estudos *in vitro* tem claramente demonstrado o efeito bactericida eficiente da TFD. Além disso, os estudos clínicos de longo prazo randomizados e meta-análises são necessários para demonstrar o efeito benéfico da TFD antimicrobiana, e em comparação com os métodos convencionais.

5) Conclusão

Podemos concluir que a TFD está se destacando no tratamento de infecções bacterianas e pode ser um campo promissor para erradicação das mesmas.

6) Referências

- ACKROYD, R. et al. **The history of photodetection and photodynamic therapy.** Photochem Photobiol, v. 74, p. 656-669, 2001.
- BAATOUT, S.; DE BOEVER, P.; MERGEAY, M.. **Physiological changes induced in four bacterial strains following oxidative stress.** Prikl Biokhim Mikrobiol. Bélgica. p. 418–427. 2006.
- BAGNATO, V. S.. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde.** São Paulo: Livraria da Física, 2008.
- BIEL, M. A. et al. **Antimicrobial Photodynamic Therapy Treatment of Chronic Recurrent Sinusitis Biofilms.** National Institutes Of Health, Minnesota, p. 329-334. set. 2011.

BOLEAN, M. et al. **Photodynamic therapy with rose Bengal induces GroEL expression in *Streptococcus mutans*.** Photomedicine and Laser Surgery. Ribeirão Preto. p.79–84.2010.

BROWN, M. R. W.; ALLISON, D. G.; GILBERT, P. **Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. p. 777-780. 1988.

CASSIDY, C.M.; DONNELLY, R.F.; TUNNEY, M.M. **Effect of sub-lethal challenge with Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) on the antibiotic susceptibility of clinical bacterial isolates.** Journal of Photochemistry and Photobiology B. p. 62-66. 2010.

COLLINS, T. L. et al. **The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.** Current Microbiology. p. 411–416. 2010.

COSTA, A. C. B. P. da et al. **Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode.** Microbiology, São José Dos Campos, p. 413-418. 06 ago. 2010.

DAI, T. et al. **Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 55, no. 12, p.5710–5717, 2011.

DENIS, T. G. St. et al. **All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease.** Landes Bioscience, Boston, p.509-520, nov. 2011. (a)

DENIS, T. G. St. et al. **Analysis of the Bacterial Heat Shock Response to Photodynamic Therapy-Mediated Oxidative Stress.** National Institutes Of Health, Boston, p. 707-713. maio 2011. (b)

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H.. **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** Nature Reviews Microbiology. 939-951. 2007.

DOUGHERLG, T. J.; MARCUS, S. L.. **Photodynamic therapy.** European Journal Of Cancer, p. 1734-1742. 1992.

DRIFFIELD, K. et al. **Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. p.1053–1056. 2008.

FELDMAN, Bianca Calil. **Avaliação Clínica dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no Tratamento não-cirúrgico da Periodontite Crônica.** 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Unigranrio, Duque de Caxias, 2009.

FERRONATO, G.R.; SALMASO, M.H.S. **Avaliação de atividade antimicrobiana de espécies de macrófitas aquáticas da região de Curitiba.** 2010. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Química Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

GAK, V.Y.; NADTOCHENKO, V.A.; KIWI, J.. **Triplet-excited dye molecules (eosine and methylene blue) quenching by H₂O₂ in aqueous solution.** Journal of Photochemistry and Photobiology: A. Rússia. p. 57–62.1998.

GANZ, R. A. et al. **Helicobacter pylori in patients can be killed by visible light.** Lasers in Surgery and Medicine. p. 260– 265. 2005.

GARCEZ, A. S. et al. **Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide.** National Institutes Of Health, São Paulo, p. 483-490. 30 abr. 2011.

GARCEZ, A. S. et al. **Antimicrobial Photodynamic Therapy Combined With Conventional Endodontic Treatment to Eliminate Root Canal Biofilm Infection.** National Insitutes Of Health, São Paulo, p. 59-66. jan. 2007.

GOMES, M.C. et al. **Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins.** Photochemical & Photobiological Sciences, vol.10, no.11, p.1735–1743, 2011.

GRANT, W.E. et al. **Photodynamic therapy, an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity.** Internacional Journal of Cancer. p. 937-942. 1997.

HAJIM, K.I.; SALIH, D.S.; RASSAM, Y.Z.. **Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*.** Journal of Lasers in Medical Science. p. 743-748. 2010.

HAMBLIN, M.R. et al. ***Helicobacter pylori* accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p. 2822- 2827. 2005.

HASHIMOTO, M. C. et al. **Antimicrobial photodynamic therapy on drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-induced infection. An in vivo study.** Photochemistry and Photobiology, vol.88, no.3, p. 590–595, 2012.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T.. ***Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis.** Future Microbiology. p.1663–1674. 2010.

HOLMBERG, S.D. et al. **Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials.** The New England Journal of Medicine. p. 617-622. 1984.

HUANG, L. et al. **Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections.** National Institutes Of Health, p. 155-173. jan. 2010.

JEFFERSON, K. K.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B.. **Use of confocal microscopy to analyze therate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms,** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p.2467–2473. 2005.

JUNQUEIRA, J.C. et al .**Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida spp.*, *Trichosporon mucoides* and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis (phenylthio) -29H, 31H- phthalocyanine(ZnPc).** Lasers in Medical Science.

KASHEF, N. et al. **Photodynamic inactivation of drug-resistant bacteria isolated from diabetic foot ulcers.** Iranian Journal Of Microbiology, Irã, p.36-41, mar. 2011.

KHARKWAL, G. B. et al. **Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications.** National Institutes Of Health, Boston, p. 755-767. set. 2011.

KONIG, K. et al. **Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer methylene blue using a krypton laser.** Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. p. 301–303. 1987.

LIN, S. L. et al. **Photodynamic inactivation of methylene blue and tungsten-halogen lamp light against food pathogen *Listeria monocytogenes*.** Photochemistry and Photobiology, vol.88, no.4, p.985–991, 2012.

LU, Z. et al. **Photodynamic therapy with a cationic functionalized fullerene rescues mice from fatal wound infections.** Nanomedicine, vol.5, no.10, p.1525–1533, 2010.

LUI, H; ANDERSON, R.R.. **Photodynamic therapy in dermatology: Shedding a different light on skin disease.** Archives Of Dermatology, p. 1631-1636. dez. 1992.

LUNA, M.C. et al. **Photodynamic therapy-mediated oxidative stress as a molecular switch for the temporal expression of genes ligated to the human heat shock promoter.** Cancer Research, Califórnia. p. 1637–1644. 2000.

MAISCH, T. et al. **Fast and effective: intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 39, no. 7, p. 1013–1021, 2012.

MACHADO, Antonio Eduardo da Hora. **Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas.** Química Nova, Uberlândia, p.237-243, 2000.

MCCULLAGH, C.; ROBERTSON, P.K.J.. **Photodestruction of *Chlorella vulgaris* by methylene blue or nuclear fast red combined with hydrogen peroxide under visible light irradiation.** Environmental Science & Technology. Inglaterra. p. 2421–2425. 2006.

MCCULLAGH, C.; ROBERTSON, P.K.J.. **Photodynamic biocidal action of methylene blue and hydrogen peroxide on the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* under visible light irradiation.** Journal of Photochemistry and Photobiology: B. Inglaterra. p.63-68. 2006.

MIYABE, M. et al. **Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp.** Microbiology, São José Dos Campos, p. 230-234. jun. 2011.

MEIRE, M. A. et al. **Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms.** International Endodontic Journal, vol.45, no.5, p.482–491, 2012.

MERCK CHEMICALS. Disponível em: <<http://www.merckmillipore.com.br/chemicals>>. Acesso em: 17 set. 2013.

MOAN, J.; PENG, Q. **Photodynamic Therapy**. European Society for Photobiology. P. 284. 2003.

PARK, J. H. et al. **Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorine6**. Lasers in Medical Science, vol.25, no.5, p.705–710, 2010.

QUEIROGA, A. S. et al. **In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. by different doses of low power laser light**. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, vol. 8, no.4, p.332–336, 2011.

RAJESH, S. et al. **Antimicrobial photodynamic therapy: An overview**. Journal Of Indian Society Of Periodontology, India, p. 323-327. 02 fev. 2012.

RAMOS, C. H. I. **Estudos sobre a estrutura e função de chaperonas moleculares de eucariotos**. Campinas: Fapesp, 2013.

RIBEIRO, M.S. et al. **Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Aplicações na Odontologia**. 23ºCIOSP, São Paulo, 2005.

ROLIM, J.P. et al. **The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers**. Journal of Photochemistry and Photobiology B, vol.106, p.40–46, 2012.

SALVA, K.A. **Photodynamic therapy: Unapproved uses, dosages or indications**. Clinics in Dermatology Journal. p. 571-581. 2002.

SHARMA, M. et al. **Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p. 299-305. 2008.

SCHOEFER, H.; SACHS, D.; OCHSENDORF, F.. **VIH – doenças da pele e mucocutâneas**. Disponível em: <http://hivmedicine.aidsportugal.com/html/20_dermo.html>. Acesso em: 12 out. 2013.

TANAKA, M. et al. **Photodynamic Therapy Can Induce a Protective Innate Immune Response against Murine Bacterial Arthritis via Neutrophil Accumulation**. PLoS One, Boston, p. 1-12. 26 jun. 2012.

TARASZKIEWICZ, A. et al. **Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance**. Biomed Research International, Polônia, p. 1-13. jan.2013.

TAVARES, A. et al. **Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment**. Marine Drugs, Portugal, p. 91-105. 20 jan. 2010.

TOREZAN, L.; NIWA, A.B.M.; NETO, C.F. **Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações**. Anais Brasileiros de Dermatologia. São Paulo, p. 445-449. Jun.2009.

VAHABI, S. et al. **The Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Radachlorin and Toluidine Blue on Streptococcus Mutans: An in Vitro Study.** *Journal Of Dentistry*, Irã, p. 48-54. fev. 2011.

VALENZENO, D. P.. **Photosensitization - What Stopped the Wiggling?** Disponível em: <<http://www.photobiology.info/HistPhotosens.html>>. Acesso em: 28 set. 2013.

WAINWRIGHT, M. et al. **Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. p. 823-825. 1999.

WALTERS III, M. C. et al. **Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p. 317–323. 2003.

WILDER-SMITH, C.H. et al. **Photoeradication of *Helicobacter pylori* using 5-aminolevulinic acid: Preliminary human studies.** *Lasers in Surgery and Medicine*. p. 18-22. 2002.

WOOD, S. et al. **Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. p. 680-684. 2006.

XING B, et al. **Multifunctional divalent vancomycin: the fluorescent imaging and photodynamic antimicrobial properties for drug resistant bacteria.** *Chemical Communications*. p. 1601-1603. 2011.

ZANIN, I.C. et al. **Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode.** *European Journal of Oral Science*. p. 64-69. 2006.

De acordo

Camila Prado Cruz e Nascimento
Autora

Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça
Coordenadora