



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**



***FLÁVIA ZARDO TRINDADE***

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA ASSOCIADA AO LED E AO PHOTOGEM® SOBRE A  
MUCOSA BUCAL DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Prótese.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara  
2009

Trindade, Flávia Zardo

Avaliação do efeito citotóxico da terapia fotodinâmica associada ao LED e ao Photogem® sobre a mucosa bucal de rato / Flávia Zardo Trindade . – Araraquara: [s.n.], 2009.

127 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

1. Fotoquimioterapia 2. Hematoporfirinas 3. Microscopia de fluorescência 4. Derivado da Hematoporfirina - Toxicidade 5. Mucosa bucal 6. Ratos I. Título

**FLÁVIA ZARDO TRINDADE**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA ASSOCIADA AO LED E AO PHOTOGEM® SOBRE A  
MUCOSA BUCAL DE RATO**

**COMISSÃO JULGADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

3º Examinador: Profa. Dra. Cristina Kuraschi

**DADOS CURRICULARES**  
**FLÁVIA ZARDO TRINDADE**

NASCIMENTO	13.7.1982 – NOVA VENÉCIA/ES
FILIAÇÃO	Silas Sebastião Trindade Maria Margarete Ventorim Zardo Trindade
2001/2005	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Espírito Santo
2006/2007	Especialização em Prótese Dentária, Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas Regional de Araraquara – APCD
2007/2009	Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Prótese), nível de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2008	Estágio Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

***À Deus***

*Por estar sempre presente em minha vida, permitindo que meus sonhos se tornem realidade.*

*“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta”. (Chico Xavier)*

***Aos meus pais,***

*Exemplo vivo de pessoas lutadoras e incansáveis, detentores de características que marcam qualquer filho. Agradeço-lhes pelos exemplos demonstrados ao longo da vida de como deve ser um verdadeiro caráter e por todos os valores que só se adquirem com uma boa educação. O meu muito obrigada por tudo aquilo que me têm transmitido e que ainda continuam a transmitir, pelo apoio e amor irrestritos em todos os momentos da minha vida.*

***Às minhas irmãs,***

*Que sempre me apoiaram em tudo e que são e serão sempre as minhas melhores amigas.*

*“Durante a realização de nossos trabalhos, a confiança em nós mesmos aumenta quando aliada à confiança em todos os que, em nosso redor, procuram apoiar-nos.”*  
*(Geraldo Lapenda)*

## *Agradecimentos Especiais*

À minha orientadora **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cláudia Pavarina**, exemplo de determinação e otimismo, cuja orientação me auxiliou na condução deste trabalho. Agradeço-lhe pela amizade, pelas palavras de incentivo e pelo apoio ao longo do curso.

*“Em toda amizade deve-se cultivar o respeito, principalmente se essa amizade nos honra e nos é sã e agradável.” (Carlos Bernardo González Pecotche)*

Ao meu co-orientador o **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, exemplo de pesquisador, íntegro e de caráter, cuja sabedoria e competência contribuíram imensamente para a realização deste trabalho. Agradeço-lhe pela sua disponibilidade, estando sempre disposto a responder aos nossos diversos questionamentos e a contribuir não só para o nosso aprimoramento científico como também para engrandecimento pessoal. Muito obrigada pelas oportunidades!

*“Um professor influi para a eternidade; nunca se pode dizer até onde vai sua influencia.” (Henry B. Adams)*

Aos professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Machado**, **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eunice Teresina Giampaolo** e **Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani**, meu agradecimento pela confiança depositada e pelo apoio com que me auxiliaram ao longo do curso de mestrado.

*“Não foi de um salto que os grandes homens chegaram às culminâncias do êxito; mas, sim, trabalhando e velando enquanto os outros dormiam.” (James Allen)*

À amiga **Ana Paula Dias Ribeiro** pela sua contribuição para a realização deste trabalho. Seu companheirismo e amizade, demonstrados ao longo de nossa grande

convivência, foram imprescindíveis para que os encargos inerentes a esta pesquisa se tornassem menores.

*“A amizade duplica as alegrias e divide as tristezas.” (Francis Bacon)*

À **Juliana Pirola** pela amizade e disponibilidade para o auxílio na execução deste trabalho.

Ao meu melhor amigo e namorado **Vinícius Pimenta**, cujo companheirismo, compreensão e incentivo me foram essenciais.

*“As mais lindas palavras de amor são ditas no silêncio de um olhar.”*

*(Leonardo da Vinci)*

À amiga **Roberta Battitucci**, a primeira pessoa com quem dividi a alegria de ter sido aprovada no mestrado e com quem compartilhei muitos momentos da minha vida em Araraquara. Obrigada por todo seu apoio e por você sempre ter torcido por mim.

*“A amizade é uma predisposição recíproca que torna dois seres igualmente ciosos da felicidade um do outro.”*

*(Platão)*

Às queridas amigas de Araraquara, **Nancy, Ana Paula, Yeon, Fernanda, Andreza, Juliana, Diana, Carol e Camilinha**. Sou muito grata e feliz por ter tido a oportunidade de tê-las conhecido e de termos nos tornado amigas, compartilhando os bons e os maus momentos nessa fase da minha vida. Muito obrigada! Adoro vocês!

*“Eterno é tudo aquilo que acontece em uma fração de segundos, mas com tamanha intensidade que se petrifica e nenhuma força consegue destruir.”*

*(Carlos Drummond de Andrade) “...Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.” (Fernando Pessoa)*

A todos os **meus familiares** que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida.

*“A vida boa, a vida verdadeiramente humana, não está baseada em alguns poucos momentos, mas em muitos pequenos momentos.” (Harold Kushner)*

## *Agradecimentos*

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. José Claudio Martins Segalla** e sua Vice-Diretora, **Profa. Dra. Andreia Affonso Barreto Montandon**.

Ao Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representados pela Chefe de Departamento **Profa. Dra. Regina Helena Barbosa Tavares da Silva** e pela Vice-Chefe **Profa. Dra. Renata Garcia Fonseca**.

À Coordenação da Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representadas pelo coordenador **Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani** e pelo Vice-coordenador **Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, pela bolsa e auxílio financeiro concedidos, propiciando o bom andamento desta pesquisa.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, pela valiosa participação em meu crescimento profissional.

Aos colegas de pós-graduação do atual curso de doutorado **Daniela Garcia, Ewerton Mima e Lívia Dovigo**. Agradeço pela atenção, apoio e grande colaboração de vocês para a execução desta pesquisa.

Ao Instituto de Física de São Carlos, representado pelo **Prof. Dr. Vanderlei Bagnato**, em especial ao grupo de Biofotônica, **Cristina, Carla, Didi, Ruy, Emery e Clóvis** por toda contribuição dada a este trabalho.

Ao engenheiro **Orlando Guimarães**, do Laboratório de Apoio Tecnológico do IFSC – USP, pela prontidão para a manutenção do protótipo de LED.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Tânia de Fátima Salvini**, responsável pelo Laboratório de Plasticidade Muscular (Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos), onde foi realizada parte da fase experimental desta pesquisa.

Ao colega **Thiago Russo**, pela disponibilidade em contribuir com essa pesquisa.

A **Tereza**, técnica do Laboratório de Plasticidade Muscular do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

Aos colegas do curso de mestrado **Ana Lúcia, Ana Paula, André, Ângela, Antônio, Camilinha, Carol, Cadu, Cristiane, Fernanda, Flávia, Fabi, Tati, Paty e Rodrigo** pelos momentos de alegria vividos ao longo do mestrado.

*“Sentimos saudade de certos momentos da nossa vida e de certos momentos de pessoas que passaram por ela.” (Carlos Drummond de Andrade)*

Aos meus companheiros do laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais **Adriano Augusto M. de Mendonça, Ana Paula Dias Ribeiro, Andreza Almeida, Andreza Maria Fabio Aranha, Camila Fávero de Oliveira, Cármen Regina Coldebella, Diana Soares, Fernanda da Silveira Vargas, Indri Nogueira, João F. Kina, Juliana Pirola Garcia, Marcela Tagliani, Maria da Glória Vieira Celli, Nancy Tomoko Sacono, Rafaela e Joyce** pelos momentos que vivemos no laboratório e pelo prazer de aprendermos juntos.

Ao funcionário **José Antônio**, do Departamento de Patologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela contribuição na execução deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, pelos serviços prestados durante todo o curso.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial aos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pela acolhida e alegre convivência.

***“O sonho é o primeiro passo da realização de um projeto.”***

*(Lucian Rodrigues Cardoso)*

---

## *SUMÁRIO*

Resumo.....	12
Abstract.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3 PROPOSIÇÃO.....	78
4 MATERIAL E MÉTODO .....	80
5 RESULTADO.....	93
6 DISCUSSÃO.....	105
7 CONCLUSÃO.....	114
8 REFERÊNCIAS.....	116
9 APÊNDICE.....	126



# ***RESUMO***



Trindade FZ. Avaliação do efeito citotóxico da terapia fotodinâmica associada ao LED e ao Photogem<sup>®</sup> sobre mucosa bucal de rato. [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

## Resumo

A utilização da PDT para tratamento de diferentes tipos de infecções, tal como a candidose bucal, tem sido estudada. Entretanto, poucos são os dados científicos que relatam os possíveis efeitos tóxicos dessa terapia. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da irradiação na mucosa bucal de ratos com LED azul (de 460 nm e potência de 200 mW/cm<sup>2</sup>) em presença do fotossensibilizador (FS) Photogem<sup>®</sup>, em duas diferentes concentrações (500 mg/L e 1000 mg/L). Para isso, foram utilizados 101 ratos (*Rattus Norvegicus Albinus Holtzman*) distribuídos em 6 grupos, de acordo com os seguintes tratamentos: Grupo 1 – controle; Grupo 2 – aplicação do FS (500 mg/L); Grupo 3 – aplicação do FS (500 mg/L) e irradiação com LED; Grupo 4 - aplicação do FS (1000 mg/L); Grupo 5 – aplicação do FS (1000 mg/L) e irradiação com LED; e Grupo 6 – irradiação com LED. O FS foi aplicado por 30 minutos (tempo de pré-incubação) e o tempo de irradiação da mucosa foi de 20 minutos (dose de 144 J/cm<sup>2</sup>). Decorridos os 4 períodos de avaliação propostos (0 dia, 1 dia, 3 dias e 7 dias), os animais tiveram a mucosa palatina fotografada para análise macroscópica, sendo então imediatamente sacrificados para remoção cirúrgica do palato e posterior análise em microscopia de luz e de fluorescência. Um mapeamento térmico foi realizado a fim de avaliar a variação de temperatura ocorrida no tecido durante a irradiação com LED. Macroscopicamente, em todos os grupos experimentais e para todos os períodos de avaliação propostos na presente pesquisa, observou-se que a mucosa apresentava-se intacta, com aspecto de normalidade semelhante ao do Grupo 1 (controle). Microscopicamente, alterações teciduais, caracterizadas especialmente por discreta inflamação, puderam ser observadas na mucosa palatina de apenas 4 de um total de 80 animais submetidos a PDT. A penetração do fotossensibilizador na mucosa tratada pôde ser observada por meio da emissão de fluorescência do Photogem<sup>®</sup>, tendo este FS se mantido presente apenas no tecido epitelial. O mapeamento térmico revelou que a temperatura aumentou de

35°C para 41°C durante 20 minutos de irradiação. Dentro das condições experimentais avaliadas, foi possível concluir que a PDT, utilizando Photogem<sup>®</sup> nas concentrações de 500 mg/L e 1000 mg/L associado ou não à irradiação com LED (dose de 144 J/cm<sup>2</sup>), não foi tóxica para a mucosa palatina de ratos.

Palavras-chave: fotoquimioterapia; hematoporfirinas; microscopia de fluorescência; derivado da hematoporfirina - toxicidade; mucosa bucal; ratos.



# ***ABSTRACT***

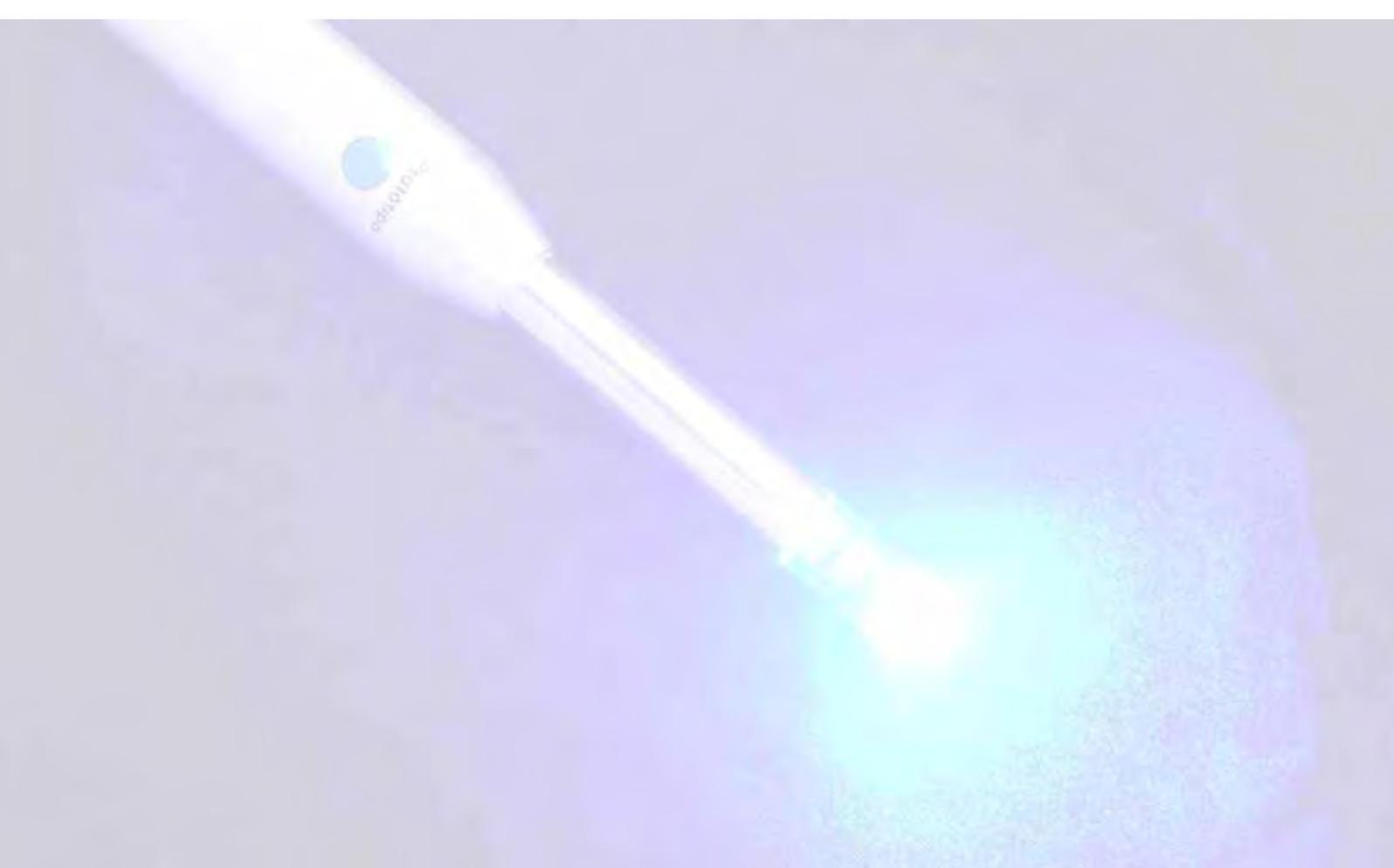


Trindade FZ. Toxicity of the Photodynamic Therapy with LED Associated to Photogem<sup>®</sup>: An *in vivo* Study. [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

#### Abstract

The use of PDT has been investigated for the treatment of different types of infection, like oral candidosis. There are, however, few research-based data that report the possible toxic effects of this therapy. Therefore, this study evaluated the effects of irradiating the palatal mucosa of rats with blue LED (460 nm; 200 mW/cm<sup>2</sup>) in the presence of the photosensitizer Photogem<sup>®</sup> at two concentrations (500 and 1000 mg/L). Then, 101 rats (*Rattus norvegicus albinus Holtzman*) were randomly distributed in six groups, according to the treatment performed on the palatal mucosa: Group 1: control; Group 2: Photogem<sup>®</sup> (500 mg/L); Group 3: Photogem<sup>®</sup> (500 mg/L) + blue LED; Group 4 - Photogem<sup>®</sup> (1000 mg/L); Group 5: (1000 mg/L) + blue LED; and Group 6: blue LED. The exposure times to the photosensitizing agent and to the light source were 30 min (pre-incubation time) and 20 min (144 J/cm<sup>2</sup> energy density), respectively. At 0, 1, 3 and 7 days posttreatment, the animals had their palatal mucosa photographed for macroscopic analysis and were immediately sacrificed. The palate was removed for further analysis by light and fluorescence microscopy. Thermal mapping was made to evaluate the temperature change occurred in the tissue during LED irradiation. In all experimental groups and periods, the macroscopic analysis revealed intact mucosa with normal aspect similar to that of Group 1 (control). Tissue alterations, characterized primarily by a mild inflammation, were observed microscopically on the mucosa of only 4 out of 80 animals subjected to PDT. Photosensitizer penetration into the treated mucosa was identified by the fluorescence emitted by Photogem<sup>®</sup> and was limited to the epithelial layer. The thermal mapping revealed a temperature increase from 35 to 41°C during the 20-min irradiation. In conclusion, under the tested conditions, PDT using Photogem<sup>®</sup> at 500 and 1000 mg/L concentrations associated or not to LED irradiation (144 J/cm<sup>2</sup>) was not toxic to the rat palatal mucosa.

**Keywords:** Photodynamic therapy, toxicity, rats, oral mucosa, fluorescence microscopy, photosensitizing agents



# ***INTRODUÇÃO***



## ***1 Introdução***

A infecção da cavidade bucal por *Candida spp.*, denominada candidose bucal, é a infecção fúngica mais comum entre humanos<sup>3,69</sup>. É considerada uma doença oportunista de alta incidência em pacientes que fazem uso de medicamentos imunossupressores e nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)<sup>62,66</sup>. Além disso, a utilização de próteses dentais removíveis tem sido associada à manifestação de uma forma de candidose que afeta frequentemente o palato de aproximadamente 65% dos pacientes portadores de próteses<sup>20</sup>, conhecida como estomatite protética. O uso contínuo da prótese associado a uma higienização inadequada promovem condições favoráveis para a proliferação de diversos microrganismos, principalmente espécies do gênero *Candida*<sup>14,70</sup>.

O tratamento para a candidose oral deve ser instituído com o objetivo de aliviar o desconforto causado pela inflamação e também de evitar a disseminação da infecção. Para isso, podem ser utilizados terapia antifúngica tópica<sup>9,19,20</sup>, medicação antifúngica sistêmica<sup>15,45</sup> e procedimentos de higienização e desinfecção das próteses<sup>9,18,61</sup>. Os medicamentos de uso tópico, como a nistatina e o miconazol, são normalmente aplicados nos primeiros episódios de candidose de um paciente e se mostram efetivos para aliviar os sinais e sintomas clínicos da infecção associada à *Candida spp.*<sup>9,36</sup>. No entanto, esses medicamentos apresentam resultados efêmeros, pois não eliminam completamente esses microrganismos<sup>15,44</sup>. Essa deficiência ocorre em consequência da diminuição da concentração do agente tópico nos tecidos infectados associada aos efeitos diluentes da saliva e aos movimentos da língua<sup>9</sup>. Como consequência da reduzida ação do agente antifúngico tópico, a recolonização do microrganismo é frequente após o tratamento, o que leva a uma recidiva da infecção<sup>52</sup>. A medicação sistêmica é outra opção de tratamento, a qual é usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecções recorrentes<sup>62</sup>. Nesses casos, medicamentos como fluconazol, itraconazol e

anfotericina B podem ser utilizados, porém tem sido relatado que a utilização de antifúngicos sistêmicos, particularmente a anfotericina B, pode promover efeitos hepatotóxicos e nefrototóxicos<sup>50</sup>.

Um aspecto importante a ser analisado na terapia com antifúngicos tópicos ou sistêmicos se refere à resistência que as espécies de *Candida* podem apresentar a esses medicamentos. Apesar de a *C. albicans* ser considerada, na maioria dos casos, susceptível aos medicamentos do tipo azol, a persistência ou a recorrência da candidose após o tratamento com esses agentes não é incomum<sup>15</sup>. Diante das dificuldades impostas pelo surgimento dessa resistência microbiana, muitas pesquisas vêm sendo conduzidas buscando terapias alternativas para o tratamento de infecções como a candidose. Uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de microrganismos patogênicos, principalmente os resistentes aos tratamentos convencionais, é a Terapia Fotodinâmica (do inglês, Photodynamic Therapy ou PDT)<sup>26,30,31,69,72</sup>.

A PDT é uma técnica terapêutica que envolve aplicação tópica ou sistêmica de um fotossensibilizador (FS) que é ativado por exposição a uma luz visível com comprimento de onda adequado, em presença de oxigênio. Essa exposição do FS à luz resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio singleto e radicais livres, causando dano ou morte celular<sup>24,39</sup>. A primeira investigação do efeito antimicrobiano da PDT foi realizada em 1900 em um estudo *in vitro*. Entretanto, seu potencial antimicrobiano ficou por muitos anos inexplorado e a descoberta das propriedades de um derivado da hematoporfirina como agente fotossensibilizador, em 1970, despertou um novo interesse clínico para a PDT<sup>24</sup>.

Os compostos derivados da hematoporfirina (do inglês, haematoporphyrin derivative ou HpD) consistem de uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros e são produzidos, de acordo com a tecnologia original de desfibrilação do sangue de animais e de humanos, a partir da hematoporfirina IX existente na circulação sanguínea. Dentre esses FSs destacam-se o Photofrin®, o Photogem® e o Photosan®<sup>24,48</sup> que foram pioneiramente utilizados na PDT para o tratamento do câncer. Entretanto, alguns estudos *in vitro* têm demonstrado que a

utilização desses FSs pode ser efetiva também na fotoinativação de bactérias e fungos<sup>10,11,17,31,46</sup>. Recentemente, estudos têm demonstrado o potencial da PDT na inativação microbiana, não só de bactérias e fungos, mas também de alguns tipos de vírus<sup>41,51,69</sup>.

O desenvolvimento de resistência pelos microrganismos contra essa terapia parece ser improvável, pois o oxigênio singlete e os demais radicais livres gerados interagem em diversas estruturas celulares por diferentes mecanismos<sup>43</sup>. O mecanismo da fotossensibilização tem início quando as moléculas do FS são irradiadas com luz visível e os fótons são absorvidos pelo FS. Com isso, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singlete. Esse elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou passar para o estado triplete. O FS no estado triplete possui um tempo de vida relativamente longo, o que permite um aumento do número de colisões, ainda em estado excitado, com outras moléculas (por exemplo, com o oxigênio). Essa interação com moléculas vizinhas pode ocorrer por meio de dois principais mecanismos. Os produtos da reação tipo I são radicais livres que podem gerar vários produtos oxidados. Entretanto, são as reações do mecanismo tipo II as principais envolvidas no processo da inativação celular. O FS no estado triplete transfere energia ao oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ), produzindo o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), e o FS retorna ao seu estado fundamental. A espécie  $^1\text{O}_2$  é altamente reativa no sistema biológico e pode interagir com proteínas e lipídeos promovendo a inativação celular<sup>24,34,51</sup>. Além disso, essa terapia oferece outras vantagens para o tratamento de infecções, tais como um amplo espectro de ação, promovendo citotoxicidade contra uma grande variedade de microrganismos, além de baixo potencial mutagênico nas células expostas<sup>39</sup>. Dessa forma, a PDT antimicrobiana representa uma alternativa para tratamento antibacteriano, antifúngico e antiviral, principalmente para organismos resistentes aos tratamentos convencionais.

A PDT tem sido empregada recentemente na Odontologia para o controle de patógenos periodontais<sup>5</sup>, desinfecção de canais radiculares<sup>31</sup> e tratamento de algumas infecções bucais, tal como a estomatite protética. Algumas combinações de fotossensibilizadores e fontes de luz têm sido testadas para a

inativação de microorganismos, especialmente a *Candida spp.*<sup>10,11,17,46,69</sup>. Estudos relataram a utilização de variadas fontes de luz, entre elas o laser, os LED e a luz halógena, tendo cada uma delas sua indicação apropriada<sup>4</sup>. O LED apresenta uma emissão de luz espontânea, não coerente e com certo espalhamento, possui um custo do aparelho menor e tecnologia mais simples comparada com a do laser<sup>13</sup>. Além disso, fontes de luz não-coerentes poderiam atingir efeitos mais superficiais em relação ao laser, em razão do maior espalhamento da luz no tecido biológico<sup>4</sup>, o que reduz a quantidade de luz absorvida. Embora a maioria dos estudos in vitro de PDT utilize lasers com emissão de luz no espectro vermelho (em torno de 630 nm), estudos clínicos têm relatado o aparecimento de eritema, sangramento e edema após o tratamento de lesões superficiais, como neoplasmas cutâneos e acne. Esses efeitos colaterais são atribuídos à penetração da luz vermelha no tecido biológico, uma vez que o comprimento de onda e a penetrabilidade da luz no tecido são diretamente proporcionais<sup>4</sup>. Assim, a aplicação de uma luz de comprimento de onda inferior, como, por exemplo, a azul (460 nm), poderia estar mais bem indicada para o tratamento de lesões superficiais, como é o caso da candidose, pois a luz azul penetra superficialmente no tecido onde a infecção está instalada. Para isso, o agente FS empregado deve absorver luz em comprimentos de onda curtos, o que parece ser uma importante vantagem dos compostos derivados da hematoporfirina<sup>40</sup>, visto que sua maior banda de absorção está em torno de 350 nm-400 nm<sup>29</sup>.

Devido às suas propriedades antimicrobianas e à facilidade em sua aplicação, no que se refere tanto ao emprego do FS quanto à facilidade de iluminação da cavidade oral, acredita-se que essa terapia possua bom potencial para o tratamento de infecções bucais<sup>43</sup>. Entretanto, para que a PDT possa ser considerada para o tratamento dessas infecções é importante que ela não cause efeitos adversos aos tecidos da cavidade bucal. Um aspecto importante é o fato de que maiores concentrações de fotossensibilizador e dose de luz são necessárias para a inativação da *Candida*, quando comparadas com bactérias, em razão do maior tamanho celular e das características estruturais desses microorganismos, o que exige maior quantidade de oxigênio singleto para que a inativação celular

ocorra<sup>39</sup>. Segundo Chu<sup>23</sup> (2006), uma concentração alta da droga (FS) pode causar citotoxicidade às células tratadas. Os autores observaram danos ao DNA dos linfócitos após incubação das células com 0,75 mM de ALA (ácido aminolevulínico) sem aplicação de luz. Dessa forma, além do potencial microbiano da PDT seria importante avaliar o efeito citotóxico dessa modalidade de tratamento sobre os tecidos bucais. Apesar de estudos *in vitro* terem demonstrado que PDT antimicrobiana possui efeitos citotóxicos<sup>23,47,76</sup>, resultados obtidos em estudos *in vitro* não podem ser diretamente extrapolados para situações *in vivo*<sup>42</sup>.

Assim, considerando que não há na literatura estudos *in vivo* relatando os efeitos da PDT utilizando o Photogem<sup>®</sup> associado à irradiação com LED azul, este estudo teve por objetivo avaliar o possível efeito tóxico deste tipo específico de PDT em mucosa palatina de rato.



# ***REVISÃO DE LITERATURA***



## ***2 Revisão de literatura***

### *2.1 PDT no tratamento do câncer e de outras doenças*

A fim de entender os mecanismos pelos quais a PDT, utilizando ácido aminolevulínico (ALA) como fotossensibilizador, poderia ser tão efetiva quanto o Photofrin® no tratamento de tumores, Hua et al.<sup>35</sup>, em 1995, realizaram um estudo utilizando ratos Fisher com tumores transplantados na região abdominal. Soluções de ALA foram preparadas na concentração de 50 mg/kg - 600 mg/kg e foram administradas nos tumores transplantados, enquanto o Photofrin® foi administrado na concentração de 5 mg/kg. A concentração de ALA nos tecidos foi determinada pela medida da fluorescência do tecido após a administração do fotossensibilizador. Para isso, os animais foram sacrificados, e amostras da região tratada com o fotossensibilizador foram removidas e excitadas a 400 nm para detecção de fluorescência da porfirina nos tecidos. Fluorescência máxima foi detectada a 605 nm e este pico foi mensurado para demonstrar a existência de uma relação linear entre a concentração do fotossensibilizador e a intensidade da fluorescência. Sendo assim, os níveis de porfirina sintetizados em vários tecidos após a administração sistêmica de ALA (50-600 mg/kg) foram diferentes, e o seu acúmulo nos tecidos tumorais dependeu da concentração e do tempo decorrido após a administração do fotossensibilizador. Já a efetividade do ALA foi mensurada pela medida do tempo (dias) necessário para o aumento de volume do tumor. Tumores tratados foram comparados a tumores não tratados, sendo os resultados comparados aos dados obtidos em estudo prévio de tratamento de tumores com Photofrin®. O ALA foi administrado em várias concentrações (40 mg/kg a 600 mg/kg), 3 horas e 1 hora e meia antes da irradiação (laser de argônio de 630 nm). A fluência total foi de 180 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> ou 360 J/cm<sup>2</sup> e a luz também foi empregada de forma fracionada, 100 mW/cm<sup>2</sup> em intervalos de 30 segundos com iluminação e 30 segundos sem iluminação, por uma ou 2 horas, equivalendo a 180 J/cm<sup>2</sup> ou 360 J/cm<sup>2</sup>. Os

tumores foram medidos antes da irradiação e após atingirem o dobro do volume inicial, quando os animais foram, então, sacrificados. A efetividade do ALA como fotossensibilizador na PDT foi determinado pelo controle do crescimento do tumor após o tratamento. Os grupos controles consistiam de tumores que receberam somente irradiação ( $360 \text{ J/cm}^2$ ) ou de tumores que receberam apenas aplicação de fotossensibilizador (ALA). Como resultado, os autores observaram que, quando a concentração mais baixa ( $40 \text{ mg/Kg ALA}$ ) associada à irradiação de  $630 \text{ nm}$  e  $180 \text{ J/cm}^2$  foi aplicada, o crescimento do tumor não foi retardado. Além disso, todos os outros tratamentos promoveram um atraso significativo no crescimento do tumor. A administração de  $50 \text{ mg/kg}$  versus  $300 \text{ mg/kg}$  de fotossensibilizador 3 horas antes da irradiação com  $630 \text{ nm}$  resultou em um tempo médio para aumento do tumor de 7,5 versus 9 dias, respectivamente, o que não foi estatisticamente significativo. A irradiação com  $630 \text{ nm}$ ,  $180 \text{ J/cm}^2$  e fluência de  $25 \text{ mW/cm}^2$  contínua ou fracionada com  $100 \text{ mW/cm}^2$  resultou em um significativo período mais longo para o aumento de volume do tumor, sendo ele de 13 dias e 18 dias respectivamente. As tentativas em aumentar a eficácia da PDT com aumento da concentração do ALA ou aumento da fluência total para  $270 \text{ J/cm}^2$  resultou na morte de 90% dos animais dentro de 48 horas após a irradiação. Necropsia demonstrou a ocorrência de extensos danos causados pela PDT, como severa inflamação no local irradiado. No grupo tratado com  $300 \text{ mg/kg}$  de ALA associado a uma luz de  $610 \text{ nm}$ ,  $100 \text{ mW/cm}^2$  e  $360 \text{ J/cm}^2$ , também resultou em um tempo mais longo para crescimento do tumor (18 dias). Entretanto, um tempo significativamente maior de crescimento do tumor (25 dias) foi atingido quando fotossensibilizador foi administrado a  $300 \text{ mg/kg}$ , em intervalos de 1 hora e meia e  $360 \text{ J/cm}^2$  de irradiação e fluência de  $100 \text{ mW/cm}^2$ . Os resultados foram favoráveis em relação ao tratamento com Photofrin®, já que não houve atraso no crescimento de tumores após a sua administração ( $5 \text{ mg/kg}$ ) 24 horas antes da irradiação fracionada com laser de  $610 \text{ nm}$ . Baseados nesses resultados, os autores concluíram que o ALA sistêmico promoveu uma fotossensibilização efetiva, sendo a PDT com ALA uma alternativa eficaz para tratamentos que usam como protocolo a administração de fotossensibilizadores exógenos.

Os princípios básicos de ação da PDT contra o câncer, e alguns fotossensibilizadores, foram revisados por Colussi et al.<sup>24</sup>, em 1996. Segundo os autores, a PDT é um processo fototerápico que ocorre com o auxílio de um agente químico estranho ao organismo. A primeira investigação *in vitro* do efeito fotodinâmico foi realizada em 1900, quando foi observada a ação tóxica da luz em *Paramecium* sensibilizado por acridina laranja na presença de oxigênio. A descoberta das propriedades de um derivado da hematoporfirina, em 1970, despertou um novo interesse clínico para a PDT, que atualmente vem sendo aplicada no tratamento de alguns tipos de neoplasias. Para que a inativação celular ocorra, é necessária a aplicação de um fotossensibilizador e de luz. Essa associação, na presença de oxigênio, promove a formação de espécies altamente reativas, como o oxigênio singlete, que pode interagir com moléculas biológicas, levando à morte celular. Um composto químico, para ser aplicado em PDT como fotossensibilizador, deve apresentar propriedades específicas, tais como solubilidade e estabilidade em solução aquosa, habilidade para transporte ativo ou passivo, alto rendimento quântico e biocompatibilidade. Na terapia contra o câncer, os derivados da hematoporfirina são frequentemente utilizados, pois agem simultaneamente como localizadores ópticos e fotossensibilizadores destrutivos e com seletividade as células tumorais. Esse tipo de FS já foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para utilização clínica em pacientes. Os lasers são os sistemas ópticos mais indicados para a fotossensibilização, devido a suas propriedades de monocromaticidade, coerência e alta intensidade. Além disso, a luz de laser pode ser aplicada em regiões de difícil acesso, por meio de fibras ópticas. No entanto, o tratamento de lesões superficiais pode ser realizado com sucesso por meio de irradiação com fontes de luz mais simples. Foi concluído que o desenvolvimento de sistemas ópticos com tecnologia simplificada poderá aumentar a aceitação e a viabilidade da utilização da PDT entre os clínicos em geral.

O objetivo de Levy, Obochi<sup>48</sup> ao escrever este artigo de 1996, foi o de explorar o potencial da Terapia Fotodinâmica (PDT) como uma nova

modalidade de tratamento de doenças. Os autores relataram que a origem da PDT ocorreu a partir de observações feitas há várias décadas, em que moléculas como a hematoporfirina e seus derivados foram absorvidas por células tumorais e que subsequente exposição destas células à luz visível causou a morte celular. A primeira aprovação da PDT como modalidade terapêutica legítima foi na oncologia. Além disso, na década passada, foram realizados avanços consideráveis no entendimento dos mecanismos pelos quais a PDT atua para a eliminação de tecidos tumorais poupando o tecido normal ao redor. Essa seletividade vista em muitos fotossensibilizadores tem sido atribuída a duas características farmacocinéticas: a capacidade de o fotossensibilizador ser absorvido por uma grande quantidade de células hiperproliferativas em comparação com as demais células e a característica de ser rapidamente absorvido pelas células endoteliais neovasculares. Tumores sólidos exibem essas características, e a maioria dos fotossensibilizadores testados clinicamente exerce um efeito tumoricida direto bem como apresenta uma capacidade de obliteração vascular. Pesquisas com Photofrin® têm mostrado claramente que essas propriedades são importantes para o efeito antitumoral deste fotossensibilizador. Além disso, sugere-se que qualquer condição que envolva hiperproliferação celular e neovascularização possa ser candidata a PDT. Atualmente, parece que o futuro das aplicações não-oncológicas da PDT está em duas áreas gerais: modalidades de tratamento bem sucedidas, que removem tecidos doentes envolvendo hiperplasia ou neovascularização, e em comportamento de modulação celular, sem causar remoção tecidual ou morte celular. Existe um número considerável de doenças em que a remoção de tecido anormal é o objetivo final desejado, e há uma quantidade considerável de pesquisas, principalmente pré-clínicas, em PDT explorando essas possibilidades. Doenças cardiovasculares, hiperplasia de próstata benigna, artrite reumatóide, disfunção uterina e degeneração macular são exemplos de doenças que têm sido alvo de pesquisas para o tratamento com PDT.

Fotossensibilizadores tais com o Photofrin® podem fluorescer quando estimulados por uma luz de comprimento de onda apropriado. Essa fluorescência pode ser usada para detectar tumores em pacientes tratados por PDT. Fotodeteccção usando fluorescência foi estudada, em 1997, por Nauta et al.<sup>57</sup>, em diferentes estágios de lesões pré-malignas e carcinoma de células escamosas induzidas quimicamente em mucosa de palato de 24 ratos Wistar (n = 4). Após a indução do tumor por administração do carcinógeno 4NQO por 26 semanas, a PDT foi instituída utilizando o Photofrin® como agente fotossensibilizador (2,5 mg/mL). Para a excitação do fotossensibilizador e a observação da fluorescência, luz azul e luz verde com comprimentos de onda de aproximadamente 460 nm e 500 nm, respectivamente, foram utilizadas. A autofluorescência do palato de cada animal foi registrada previamente e a irradiação foi realizada 24 e 48 horas após a injeção do fotossensibilizador por, no máximo, 10 minutos, sendo a fluência total da luz de excitação de 60 J/cm<sup>2</sup>. Imediatamente após a última imagem de fluorescência ter sido registrada, os animais foram sacrificados e, em seguida, o palato foi dissecado e fotografado de forma padronizada para registro do aspecto macroscópico da mucosa do palato e dos tecidos ao redor. Os espécimes foram processados para confecção de lâminas histológicas (7µm) e posterior análise microscópica. Na análise macroscópica, observou-se alteração na cor da mucosa do palato, aumento da ceratinização, leve espessamento da mucosa e alteração na topografia da rugosidade do palato. Além disso, lesões epiteliais foram encontradas após 26 semanas. Já na análise microscópica, o índice de atipia epitelial aumentou gradualmente após a aplicação do 4NQO por um período de 26 semanas. A fluorescência foi diretamente proporcional à duração da aplicação do carcinógeno em todos os casos. Além disso, uma correlação positiva foi observada entre o índice de atipia epitelial e a intensidade de fluorescência nos três períodos de avaliação (antes da injeção do fotossensibilizador, após 24 horas e após 48 horas). Não houve diferença significativa entre a fluorescência obtida 24 e 48 horas após a injeção do Photofrin®. Os autores concluíram que a fotodeteccção com o Photofrin® tem um potencial de distinguir carcinoma de

células escamosas e lesões pré-malignas induzidas quimicamente na mucosa do palato normal de ratos.

Jayasree et al.<sup>37</sup>, em 2001, teve como objetivo estudar a influência dos fotossensibilizadores ALA e derivado da hematoporfirina quando associados aos lasers He-Ne (3 J/cm<sup>2</sup>) e Nd:YAG (30 J/cm<sup>2</sup>) sobre a cicatrização de feridas em ratos. Esse estudo foi importante para entender o processo de cicatrização envolvido após a PDT. Para isso, ratos Wistar de ambos os sexos foram utilizados, sendo divididos em sete grupos (n=6): Grupo 1 (controle), os animais não receberam nenhum tratamento; Grupo 2, os animais receberam aplicação de ALA somente; Grupo 3, os animais receberam apenas aplicação do derivado da hematoporfirina; Grupo 4, os animais foram tratados com ALA associado ao laser He-Ne; Grupo 5, os animais foram tratados com ALA associado aos dois tipos de laser (He-Ne e ND:YAG); Grupo 6, os animais foram tratados com o derivado da hematoporfirina associado ao laser He-Ne e, por fim, no Grupo 7, os animais foram tratados com o derivado da hematoporfirina associado aos dois tipos de laser (He-Ne e ND:YAG). Em todos os grupos, exceto no controle, os fotossensibilizadores foram administrados 24 horas antes da realização da ferida nos animais. O ALA foi administrado intraperitonealmente, e o derivado da hematoporfirina foi administrado oralmente, ambos na concentração de 5 mg/kg do animal, em animais que pesavam 160-200 gramas. Os animais foram anestesiados e uma ferida de 2 cm x 2 cm foi provocada dorsalmente nos dois lados da coluna vertical. Posteriormente, os animais receberam os respectivos tratamentos, sendo a fonte de luz posicionada a 1 mm de distância da pele por 1 hora. Após o tratamento, os animais foram examinados todos os dias para verificação de sua saúde, sendo pesados em dias alternados. Além disso, a área das feridas era medida diariamente e fotografadas periodicamente. No 5º, 8º, 15º e 25º dias, animais de todos os grupos tiveram a área correspondente à ferida removida para posterior análise histológica. Como resultado, os autores observaram que, no grupo tratado com ALA e He-Ne, as feridas cicatrizaram mais rapidamente, com seu completo fechamento em torno do dia 13 ± 1. Já no grupo 5 (ALA + He-Ne + Nd:YAG), o completo fechamento da ferida ocorreu no dia 17 ±

1, enquanto no grupo controle os animais apresentaram completa cicatrização no 19º dia. Entre os animais tratados com o derivado de hematoporfirina, os que apresentaram cicatrização mais rápida ( $14 \pm 1$  dias) foram aqueles tratados com a combinação dos lasers, tendo aqueles tratados somente com o He-Ne apresentado cura no  $16 \pm 2$  dias. Os animais dos Grupos 2 e 3 apresentaram completa cicatrização nos  $20 \pm 1$  dia e  $18 \pm 2$  dias respectivamente. Os achados histopatológicos foram similares em todas as amostras no 15º dia, apresentando necrose e inflamação da epiderme e na derme. No 18º dia, as imagens estavam semelhantes às do 15º dia, porém com menor grau de necrose e inflamação. Todos os grupos, exceto o que foi tratado apenas com ALA, apresentaram completa reepitelização no 15º dia; entretanto, uma leve necrose subepitelial e inflamação estavam presentes. Além disso, deposição de colágeno em todos os grupos também foi observada. No 21º dia, os estudos histopatológicos demonstraram completa cicatrização de todos os grupos com densa cicatriz colágena. Somente no Grupo 7 (derivado da hematoporfirina + He-Ne + Nd:Yad) foi observada maturação parcial do colágeno, enquanto nos outros grupos esse colágeno apresentava-se imaturo, promovendo uma maior redução na extensão da ferida. Baseados nesses resultados, os autores concluíram que a terapia fotodinâmica acelera o processo de cicatrização das feridas em ratos. O tratamento associando ALA ao laser He-Ne foi adequado para a cicatrização, e o tratamento com derivado de hematoporfirina em combinação com os dois tipos de laser também se mostrou promissor.

Dougherty <sup>28</sup>, em 2002, relatou, em uma revisão de literatura, que muitos autores têm considerado a Terapia Fotodinâmica como um tratamento alternativo para o câncer e para outras doenças. No tratamento do câncer, o protocolo utilizado é a injeção prévia (2 dias) do fotossensibilizador Photofrin® (2 mg/Kg) associado à irradiação com uma fonte de luz de 630 nm, variando apenas a dose utilizada. Além disso, o autor relatou que as situações clínicas não oncológicas em que a PDT tem sido empregada de forma favorável são as queratoses actínicas e a degeneração macular relacionada à idade. Muitos fotossensibilizadores têm sido pesquisados, principalmente para o tratamento de

doenças, tais como doenças das artérias coronárias e câncer de cabeça e pescoço. Quanto ao mecanismo de ação da PDT, sabe-se a morte celular é mediada pelo oxigênio singleto e por outras espécies reativas de oxigênio e que o dano vascular é o responsável pela destruição do tumor. Entretanto, a importância das respostas inflamatórias e imunes tem sido considerada recentemente. Imunidade específica após a PDT vem sendo demonstrada em vários estudos em animais; no entanto, desconhece-se a ocorrência de processos semelhantes em pacientes submetidos à PDT, sendo provável que os mecanismos experimentais em animais e seres humanos sejam semelhantes.

A Terapia Fotodinâmica com o fotossensibilizador Verteporfin tem sido demonstrada como uma terapia promissora para o tratamento de neovascularização coroidal (CNV) resultante de doenças como a degeneração macular e miopia. Zacks et al.<sup>74</sup>, em 2002, avaliaram tratamento de neovascularização coroidal (CNV) induzida com PDT utilizando o Verteporfin como fotossensibilizador. Verteporfin (3 e 6 mg/m<sup>2</sup>) associado a quatro doses de luz de laser (10, 25, 50 e 100 J/cm<sup>2</sup>) de 685 nm e irradiância constante de 600 mW/cm<sup>2</sup> foi aplicado sobre as lesões. O tempo de incubação do fotossensibilizador foi de 15-20 minutos, e os tempos de irradiação foram 7, 42, 83 ou 166 segundos. Angiografia foi realizada 24 horas e 7 dias após o tratamento para análise do acúmulo do fotossensibilizador nos vasos. Em seguida, após a angiografia e seguindo os períodos de avaliação (24 horas e 7 dias), os olhos dos animais foram removidos para realização de análise histológica, sendo os efeitos da PDT com Verteporfin avaliados de acordo com uma tabela de classificação histopatológica. Os autores observaram que as taxas de acúmulo das CNVs variaram em função da concentração de verteporfin e da dose de luz. Após 24 horas, constataram que, com ambas as concentrações de fotossensibilizador, houve uma penetração mínima na CNV, quando uma dose de luz de 10 J/cm<sup>2</sup> foi utilizada. Porém, as doses de 25 J/cm<sup>2</sup>, 50 J/cm<sup>2</sup> e 100 J/cm<sup>2</sup> permitiram maior penetração das CNVs. No período de 7 dias após a aplicação de PDT, maior diferença foi observada entre as concentrações do fotossensibilizador. Os animais que receberam aplicação de Verteporfin na concentração de 3 mg/m<sup>2</sup> não

apresentaram uma penetração substancial na CNV, exceto quando a maior dose de luz foi aplicada. Em contraste, a taxa de penetração com a concentração de 6 mg/m<sup>2</sup> aumentou de forma dose de luz-dependente. Na análise histológica, 24 horas após a PDT e com fotossensibilizador na concentração de 6 mg/m<sup>2</sup> associado a dose de luz de 25 J/cm<sup>2</sup>, observaram um colapso e o fechamento de canais vasculares no complexo da CNV, bem como na coronóide subjacente. Além disso, observaram fibrina nos espaços extravasculares, danos nas paredes dos vasos, macrófagos migrando para o interior do complexo de neovascularização coroidal e vacuolização das células endoteliais. Já no período de 7 dias após a PDT, observaram organização do complexo da CNV com tendência para cicatrização e proliferação do tecido fibroso no seu interior, a retina das lesões subjacentes. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a PDT utilizando Verterporfin como fotossensibilizador foi eficaz no tratamento da CNV em animais, podendo ser válido e efetivo em humanos também.

Moan et al.<sup>55</sup>, em 2003, relataram, por meio de uma revisão de literatura, os aspectos históricos da PDT. Os autores escreveram que a primeira evidência experimental do potencial da fotossensibilização nas ciências da saúde foi obtida em 1898 na Universidade de Munique, na Alemanha, quando da observação de que a letalidade do alaranjado de acridina para o protozoário *Paramecium* era mais dependente da exposição à luz ambiente do que da concentração do corante. Posteriormente, em 1904, Von Tappeiner e Jodlbauer consideraram que a dinâmica das reações fotobiológicas era dependente da presença de oxigênio, distinguindo-a do processo de fotossensibilização observado na revelação de filmes fotográficos por certos cromóforos. Com base nessa hipótese, criaram o termo ação fotodinâmica (*photodynamic wirkung*). Além disso, afirmaram que, a partir dos resultados obtidos em estudos realizados por Dougherty e colaboradores, a pesquisa com terapia fotodinâmica se estendeu para os mais diferentes campos da Medicina, com resultados pouco eficazes em razão de limitações técnicas e metodológicas dos estudos conduzidos. Entretanto, hoje a PDT utilizando o Photofrin® como fotossensibilizador é aprovada nos

Estados Unidos da América, Canadá e Japão para o tratamento de alguns tipos precoces de neoplasias (bexiga, câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas), de lesões pré-neoplásicas (Esôfago de Barrett) e para a degeneração macular associada à idade.

Ahn et al.<sup>2</sup>, em 2004, realizaram um estudo para avaliação do efeito antitumoral da PDT com o fotossensibilizador Photogem® e laser de diodo em quatro linhagens celulares de câncer de útero (CaSki, HT3, HeLa, e SKOV-3) e em tumores induzidos em camundongos. As células foram expostas a soluções de Photogem® (1,25; 2,5 e 5,0 µg/mL) e irradiadas por um laser de diodo equipado com luz halógena (630 nm; 2 J/cm<sup>2</sup>). Após um período de 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas, as células foram observadas em microscópio óptico para determinação das alterações morfológicas induzidas pela PDT em relação ao grupo não submetido à irradiação. A avaliação do metabolismo celular foi realizada pelo teste MTT após 24 e 48 horas da PDT. Para a realização da citometria de fluxo, as células foram incubadas com Anexina-V e Iodeto de Propídeo com o intuito de identificar o tipo de morte celular causada pela PDT com Photogem®, apoptose ou necrose, respectivamente. Os resultados mostraram que a inibição do crescimento celular nas 48 horas após PDT em qualquer concentração de Photogem® foi dependente do tipo celular quando comparado ao grupo controle. Além disso, a curva de sobrevivência de cada tipo celular foi diretamente proporcional ao tempo e à dose utilizados. Os resultados também demonstraram que o dano causado pela PDT às células tumorais foi praticamente limitado à necrose no tempo inicial. A irradiação do tipo celular CaSki na presença do Photogem® induziu o rompimento da membrana plasmática e a redução do tamanho da célula, indicando que a membrana plasmática foi o alvo principal do FS. No estudo in vivo, os animais foram divididos em quatro grupos (n=10): I (controle) – nenhum tratamento foi estabelecido; II – aplicação apenas de Photogem®; III- aplicação somente de luz e IV- aplicação de Photogem® associado à luz. A resposta ao tratamento foi determinada por meio da taxa de sobrevivência dos animais e pelo tamanho dos tumores. Photogem® foi injetado (5 mg/kg), sendo os tumores, posteriormente (24 de incubação), irradiados com um laser (630 nm e potência de

400 mW/cm<sup>2</sup>) por 250 segundos. O tamanho dos tumores foi avaliado a cada 2 dias durante as 4 semanas seguintes ao tratamento. Como resultado, os autores observaram uma taxa de sobrevivência de 50% dos animais do grupo controle em 12 dias. Já no grupo onde se estabeleceu a PDT, a maioria dos animais sobreviveu após 30 dias. Para os animais que receberam apenas aplicação de fotossensibilizador, a taxa de sobrevivência foi também de 50%; entretanto, tal fato foi observado após 15 dias. E finalmente, no grupo dos animais que sofreram apenas irradiação, foi observada uma sobrevivência de 50% dos animais após 25 dias. Quanto ao tamanho dos tumores após o tratamento, observaram um aumento de tamanho de forma similar no grupo controle e no grupo que recebeu apenas aplicação do Photogem®, indicando nenhuma citotoxicidade desse FS quando aplicado isoladamente. Entretanto, no grupo em que a PDT foi realizada, os tumores apresentaram uma redução de tamanho imediatamente após. Esse decréscimo de tamanho se estabilizou após 8-14 dias e um leve aumento voltou a ocorrer até o término do período de avaliação (30 dias). No grupo que recebeu apenas aplicação de laser, houve um leve atraso no crescimento do tumor. Os resultados desse estudo indicaram que o Photogem® possui afinidade tumoral e causou morte celular por necrose em consequência do dano na membrana plasmática, sendo esse o principal mecanismo do efeito antitumoral da PDT associada ao Photogem®. Além disso, considerando a rápida absorção do FS e a excelente permeabilidade do tecido ao laser de diodo, a PDT utilizando o Photogem® exerceu alta atividade antitumoral em relação aos demais fotossensibilizadores, levando as células tumorais à necrose com reduzidos efeitos adversos.

Babilas et al.<sup>6</sup>, em 2005, relataram em uma revisão de literatura que a primeira evidência clínica da eficácia da PDT foi obtida em 1903 por Dreyer, em Copenhague, e Jesionek e Von Tappeiner, em Munique, quando aplicaram eosina ou eritrosina tópica, seguido de exposição à luz, em pacientes portadores de pitíriase versicolor, psoríase, carcinoma basocelular, lúpus vulgar, sífilis, condiloma acuminado e molusco contagioso. As pesquisas prosseguiram até 1905, com a experimentação de novos fotossensibilizadores como dicloroantraceno e o

vermelho madalena de Grubler. Apesar dos pesquisadores terem obtido alguns desfechos clínicos favoráveis, falhas metodológicas relacionadas ao acompanhamento dos pacientes, a ocorrência de efeitos adversos importantes e os resultados favoráveis advindos do uso de radiação ionizante no tratamento de neoplasias determinaram a suspensão desses experimentos pioneiros.

Chang et al.<sup>21</sup>, em 2005, tiveram por objetivo avaliar a PDT como um novo procedimento diagnóstico para detecção de neoplasmas em tecido oral de animal por meio de fluorescência induzida por protoporphirina IX. Photofrin® (2,5 mg/mL) foi aplicado topicamente em neoplasmas orais de 14 hamsters machos (Golden Syrian) por 3 horas. Posteriormente, o fotossensibilizador foi removido, e imagens dos neoplasmas tratados foram realizadas sob iluminação com luz azul (lâmpada Xenon, 380 nm - 420 nm), 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação do FS. A absorção do FS pelo tecido alvo e sua posterior excitação quando exposto à fonte de luz diferenciou macroscopicamente as regiões patológicas. A análise microscópica foi realizada por meio da microscopia de luz e de fluorescência. Quatro amostras de cada bochecha foram tiradas de cada um dos 14 animais e submetidas à coloração com H&E para realização da análise histológica. A quantificação das alterações presentes nos tecidos foi realizada com o auxílio de uma tabela de escores numéricos, e análise estatística foi utilizada para medir as diferentes intensidades de fluorescência. Subsequente comparação entre a quantificação de características fluorescentes no tecido e o histológico foi realizada. Como resultado, os autores observaram que, dos 14 hamsters (28 biopsias), 4 (14,3%) exibiram hiperplasia escamosa e 24 (85,7%) apresentaram carcinoma de células escamosas. Os neoplasmas presentes na bochecha dos animais puderam ser claramente distinguidos da mucosa sadia subjacente sob iluminação fluorescente. Essa diferença de fluorescência entre o tecido saudável e as lesões foi estatisticamente significativa. Além disso, a microscopia fluorescente revelou que a fluorescência foi uniformemente localizada na camada epitelial 3 horas após a aplicação do Photofrin®. Baseados nesses resultados, os autores concluíram que a detecção por fluorescência

promove uma técnica sensível e não-invasiva de identificação precoce de neoplasmas malignos na cavidade oral.

As opções de tratamento para o líquen plano são numerosas, incluindo agentes tópicos e sistêmicos. Aghahosseini et al.<sup>1</sup>, em 2006, relataram os resultados do tratamento de 2 casos de líquen plano com PDT mediado por azul de metileno (0,05 g/100cc). Dez minutos antes da irradiação com laser diodo de 620 nm, os pacientes bochecharam a solução por 5 minutos e, a seguir, as lesões foram iluminadas com uma dose de 100 J/cm<sup>2</sup>. Os pacientes foram acompanhados após 3, 7, 15 dias, 1 e 9 meses após a PDT. As lesões foram mensuradas e fotografadas antes da PDT e nas sessões de acompanhamento. No paciente 1, uma semana após uma única sessão de PDT, as lesões desapareceram completamente, e os resultados permaneceram estáveis pelos nove meses seguintes. No paciente 2, uma semana após o tratamento foi observada uma redução no tamanho das lesões. Por outro lado, lesões na língua não mostraram nenhuma resposta. Segundo os autores a PDT pode ser efetiva no tratamento de líquen plano oral, entretanto estudos clínicos são necessários para confirmar a eficácia da PDT no tratamento dessa doença.

Alexiades-Armenakas<sup>4</sup>, em 2006, avaliaram, por meio de uma revisão de literatura, a aplicabilidade da PDT no tratamento de lesões dermatológicas superficiais. Segundo o autor, os primeiros FSs utilizados foram os derivados da hematoporfirina. Em associação, fontes de luz como lâmpadas halógenas, luzes não coerentes e lâmpadas de amplo espectro de emissão luminosa foram empregadas. A escolha do comprimento de onda emitido pela fonte de luz deve levar em consideração o espectro de absorção do FS utilizado. No caso das porfirinas, a luz azul é mais bem absorvida, pois apresenta um pico de absorção por volta dos 400 nm. No entanto, fontes de luz com emissão vermelha também são utilizadas. Embora não possuam alto poder de absorção pelas porfirinas, são profundamente absorvidas pelo tecido por causa do alto poder de penetração tecidual, a utilização de luzes vermelhas provoca o surgimento de efeitos colaterais nos tecidos próximos à lesão tratada. Dessa forma, estudos recentes têm sido conduzidos com o objetivo de tornar a PDT uma

modalidade terapêutica segura para o tratamento de infecções superficiais, minimizando o surgimento de desconfortos, eritema e sangramentos após sua aplicação. A utilização da luz azul possui uma penetração inferior no tecido biológico, portanto, a chance de ocasionar danos aos tecidos subjacentes é menor. Além disso, os lasers pulsados de corantes têm sido avaliados para o tratamento de enfermidades como queratose actínica, queilite actínica, hiperplasia sebácea, líquen esclerótico e, mais recentemente, para o tratamento de acne. O autor concluiu que o desenvolvimento de novas fontes de luz e de FSs tem promovido a aplicação da PDT em dermatologia, com menores riscos de efeitos colaterais e com alta eficiência no tratamento de alguns tipos de lesões.

Babilas et al.<sup>8</sup>, em 2006, avaliaram a eficácia da Terapia Fotodinâmica utilizando o ALA como fotossensibilizador e dois tipos de fontes de luz no tratamento de queratose actínica *in vitro* e *in vivo*. Queratinócitos de epiderme humana foram incubados com ALA (100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{mol/L}$ ) por 24 horas, sendo irradiadas por luz halógena (580–750 nm, potência de 40  $\text{mW/cm}^2$  e dose de 24  $\text{J/cm}^2$ ) ou por LED ( $633 \pm 3$  nm, potência de 40  $\text{mW/cm}^2$  e doses de 3, 6, 12 e 24  $\text{J/cm}^2$ ). Os resultados mostraram que a viabilidade celular dos queratinócitos foi significativamente reduzida pelo ALA associado às fontes de luz (LED e luz halógena), e que não houve diferença entre as fontes de iluminação. A irradiação por si só não afetou a atividade metabólica celular; entretanto, os controles em que somente o ALA foi aplicado apresentaram uma redução progressiva na viabilidade celular após a incubação que variou entre 20% a 1% nas concentrações de 300  $\mu\text{mol/L}$  -500  $\mu\text{mol/L}$ . No estudo *in vivo*, pacientes ( $n=40$ ) com diagnóstico clínico de queratose actínica foram submetidos à PDT. ALA (pomada contendo 20% de FS) foi aplicado sobre todas as lesões, abrangendo 5 mm do tecido normal ao redor, e, após 4 horas, metade do número total de lesões foi irradiada com uma fonte de luz halógena vermelha (dose de 100  $\text{J/cm}^2$  e intensidade de 160  $\text{mW/cm}^2$ ) e a outra metade foi iluminada por um LED (dose de 40  $\text{J/cm}^2$  e intensidade de 80  $\text{mW/cm}^2$ ). Após o tratamento, os pacientes foram acompanhados por 6 semanas, 3 e 6 meses, sendo a resposta das lesões ao tratamento classificada em: remissão completa e não remissão da lesão. Além

disso, foram realizadas fotografias, e a satisfação dos pacientes também foi avaliada. Efeitos adversos envolvendo as reações de fototoxicidade que normalmente ocorrem após a PDT (dor e vermelhidão) foram registrados antes e após a irradiação. Os autores não observaram diferença estatisticamente significativa entre as duas fontes de luz no tratamento da queratose actínica in vivo. Ambos os tratamentos, após 6 semanas, obtiveram índices de remissão completa de 84,3% para o LED e de 82,8% para luz halógena. Reações adversas, tais como sensação dolorosa de queimação, foram observadas em todos os pacientes durante e após a irradiação com as duas fontes de luz. Entretanto, nenhum paciente desistiu do tratamento em razão desse desconforto. Baseados nos resultados, os autores puderam concluir que a eficácia do tratamento da queratose actínica com PDT utilizando ALA foi similar para ambas as fontes de luz, tanto no estudo in vitro quanto no in vivo.

Konopka, Golinski<sup>43</sup>, em 2007, abordaram, em uma revisão de literatura, as diversas aplicações da PDT na Odontologia em diferentes áreas como: tratamento de câncer bucal, terapia para infecções bacteriana e fúngicas e diagnóstico fotodinâmico de lesões bucais potencialmente malignas. As vantagens da PDT sobre as demais terapias antitumorais foram a característica não invasiva da PDT, os efeitos adversos moderados, a seletividade para a área alvo sem causar danos aos tecidos subjacentes saudáveis, os excelentes resultados estéticos, entre outras. Os autores acreditavam que a PDT pudesse se tornar o tratamento de escolha para o câncer de cabeça e pescoço, incluindo tanto as lesões pré-malignas quanto lesões primárias, recorrentes e metástases. A PDT como terapia antimicrobiana foi inicializada há mais de um século; no entanto, com a descoberta dos antibióticos, seu desenvolvimento ficou restrito. Com a emergência de várias cepas microbianas resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, a PDT voltou a ser considerada como possível tratamento. O desenvolvimento de resistência contra a PDT parece ser improvável, pois o oxigênio singlete e os demais radicais livres gerados interagem em diversas estruturas celulares por diferentes mecanismos. A PDT tem sido utilizada no controle de biofilmes, pois atua tanto nos microrganismos quanto na matriz

extracelular, promovendo a desorganização do biofilme. Além disso, tem sido empregada no controle de agentes patógenos periodontais, na desinfecção de canais radiculares e no tratamento da estomatite protética. Os estudos recentes se baseiam na descoberta de fotossensibilizadores específicos para que atuem nos patógenos selecionados e não promovam uma intensa destruição microbiana, deixando o paciente susceptível a infecções oportunistas. Pela facilidade de iluminação da cavidade oral, a PDT se torna uma terapia com potencial para ser aplicado clinicamente tanto no tratamento de infecções bucais como tratamento de câncer bucal e lesões com displasia epitelial. Segundo os autores, o futuro da terapia fotodinâmica depende das interações entre sua aplicação clínica e o desenvolvimento de inovações tecnológicas.

A localização dos fotossensibilizadores nas organelas citoplasmáticas durante a PDT representa um papel importante na destruição celular. Dessa forma, Saczko et al.<sup>65</sup>, em 2007, se propuseram investigar a localização do fotossensibilizador Photofrin® (Ph) em linhagens celulares malignas (A549, MCF-7, Me45) e células endoteliais normais (HUV-EC-C). As células foram incubadas com Ph na concentração de 30 µg/mL por diferentes períodos: 1, 2, 3 e 4 horas. Posteriormente, os grupos experimentais foram avaliados por microscopia de fluorescência e confocal para visualização do Ph nas células normais e malignas. Em duas linhagens malignas, a máxima concentração citoplasmática do Ph foi observada somente no período de 4 horas e a fluorescência mais intensa ocorreu ao redor da membrana nuclear. Na linhagem Me45, o Ph penetrou nas mitocôndrias. Na linhagem normal, o Ph se difundiu pelo citoplasma e se acumulou ao redor do núcleo. Entretanto, nesse tipo celular, não houve diferença entre os diferentes períodos de incubação. Os resultados obtidos, baseando-se na localização mitocondrial do Photofrin®, demonstraram que a PDT pode contribuir para eliminação das células malignas pela indução de apoptose.

O objetivo do estudo de Almeida et al.<sup>5</sup>, em 2008, foi avaliar a influência da terapia fotodinâmica em ratos com doença periodontal induzida.

Para isso, 120 ratos Wistar machos receberam uma ligadura de algodão subgingival do 1º molar inferior para indução da doença periodontal. Após dois dias, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=30): grupo controle, animais com ligadura somente; grupo MB, animais com ligadura que recebeu 1 mL de fotossensibilizador (azul de metileno a 100 µg/mL); grupo LLLT (low-level laser therapy), animais com ligadura que receberam aplicação de laser de baixa potência, e grupo PDT, animais com ligadura que foram submetidos a irrigação com 1 mL de fotossensibilizador seguido por 1 minuto de irradiação com laser de baixa potência. O laser utilizado possuía comprimento de onda de 685 nm, com potência de 0,05 W, densidade de potência de 0,037 W/cm<sup>2</sup>, sendo a dose de 4,5 J/cm<sup>2</sup>. Nos grupos MB e PDT, o 1º molar foi irrigado com 1 mL de fotossensibilizador, e, após 1 minuto, o grupo PDT recebeu tratamento com laser, permanecendo este em leve contato com a face vestibular do dente a ser tratado. Os animais foram sacrificados 7, 15 e 30 dias após a colocação da ligadura, e suas mandíbulas foram removidas e processadas para posterior análise histométrica e histológica. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, onde a perda óssea e as características do ligamento periodontal na região de furca do 1º molar foram estabelecidas. Na análise histométrica intragrupo, observaram que, no grupo controle, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos dos diferentes períodos de análise. Já no grupo MB, houve menor perda óssea no período de avaliação de 25 dias, enquanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de todos os períodos analisados. No grupo LLLT, menor perda óssea ocorreu no período de avaliação de 7 dias, ainda que não houvesse diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos de todos os períodos avaliados. Por fim, no grupo PDT, observaram diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos. A análise estatística revelou menor perda óssea no período de 15 dias comparado ao de 7 dias e maior perda óssea no período de 30 dias. Na análise intergrupos, testes paramétricos não revelaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, MB e LLLT no período de 7 dias. O grupo PDT apresentou menor perda óssea quando comparado aos outros grupos no período de avaliação de 7 dias. No período de 15 dias, este grupo

demonstrou menor óssea quando comparado ao grupo controle e LLLT, e não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois últimos grupos. A análise estatística não demonstrou diferença de perda óssea entre todos os grupos no período de 30 dias; entretanto o grupo LLLT demonstrou menor perda óssea. Na análise histológica, a maioria dos espécimes avaliados no período de 7 dias demonstrou tecido ósseo com trabeculado ósseo fino, com inserção de finas fibras colágenas e osteoblastos ativos. Nos espécimes dos grupos PDT e LLLT, o trabeculado ósseo estava espesso e sem sinais de reabsorção, com alta densidade de inserção de fibras colágenas no grupo PDT.

## 2.2 PDT antimicrobiana

Bertoloni et al.<sup>10</sup>, em 1989, avaliaram a influência de diversos parâmetros na foto-inativação de *C. albicans* sensibilizadas por um derivado de hematoporfirina. O microrganismo foi cultivado aerobicamente a 37°C em meios de Sabourarud Broth e Brain Heart Infusion, os quais foram modificados ou não, a fim de se verificar a influência da composição do meio na fotoinativação celular. Após a obtenção de suspensões celulares em solução salina, as amostras foram incubadas no escuro com porfirina nas concentrações de 0,1 a 1000 mg/L por 6 ou 30 minutos. Para irradiação, foram utilizadas quatro lâmpadas de tungstênio de 250 W, numa fluência de 6 mW/cm<sup>2</sup>, e a suspensão celular foi mantida em diversas temperaturas, que variaram entre 2 e 42°C. Em seguida, as amostras foram analisadas em microscopia de luz e eletrônica. A ligação entre a porfirina e a célula foi estimada, e também foram avaliadas as atividades enzimáticas de ATPase e citocromo-*c*-oxidase, as quais indicam as propriedades funcionais da membrana citoplasmática e da mitocôndria celular, respectivamente. Foi observado que a redução da viabilidade celular foi dependente do tempo de iluminação, e que apenas concentrações acima de 1 mg/L de porfirina foram efetivas para foto-inativação celular. Uma redução significativa da atividade da

enzima citocromo-*c*-oxidase foi verificada após 5 minutos de irradiação, enquanto que a atividade da ATPase apresentou redução após 1 minuto de irradiação e não foi afetada por tempos mais prolongados. Também foi verificado que, quando temperaturas maiores de irradiação foram utilizadas, a inativação celular foi maior e a fluorescência das células foi menor, indicando mobilidade da porfirina ligada à célula. A sobrevivência das amostras cultivadas em Sabouraud foi maior do que a sobrevivência das amostras cultivadas em Brain Heart Infusion. Adicionalmente, a modificação dos meios não alterou a capacidade das células em se ligar à porfirina. A adição de glicose e a ausência de sais e fosfato aumentaram a sobrevivência do microrganismo no meio de cultivo, enquanto que a variação de pH não alterou a viabilidade celular. Quando suspensões sensibilizadas pela porfirina foram lavadas três vezes, foram necessários maiores tempos de irradiação para diminuir a viabilidade do microrganismo, que apresentou maior permeabilidade celular. A microscopia eletrônica demonstrou que as amostras irradiadas por 10 minutos apresentaram células com alterações morfológicas, e que as células irradiadas por tempos maiores apresentaram rompimento da membrana citoplasmática e organelas. Também foi verificado que, quando tempos de 10 e 30 minutos foram utilizados para irradiação das amostras, a fluorescência do DNA diminuiu, indicando dano à membrana nuclear. Os autores concluíram que a fotossensibilização de *C. albicans* pela porfirina causa um dano inicial na membrana citoplasmática, o qual permite a penetração das moléculas do fotossensibilizador para dentro do citoplasma, danificando componentes vitais para célula.

Com base em dados científicos publicados na literatura, Wainwright<sup>71</sup>, em 1998, apresentou os fotossensibilizadores disponíveis para a realização da PDT antimicrobiana. De acordo com o autor, a utilização das porfirinas, que são um tipo de FSs macrocíclicos, é decorrente do seu emprego no tratamento fotodinâmico de câncer. Os derivados de hematoporfirina são uma combinação de fotossensibilizadores oligoméricos derivados do sangue, e foram os primeiros agentes a receberem aprovação do FDA (Food and Drug Administration) para aplicação clínica da PDT. As porfirinas aniônicas são

efetivas para a foto-inativação de bactérias Gram-positivas. Entretanto, as bactérias Gram-negativas, por apresentarem uma parede celular mais complexa, somente são sensibilizadas quando a porfirina aniônica é utilizada em associação a um derivado nonapeptídeo de colistina, que promove abertura de canais na membrana bacteriana. As porfirinas também têm se mostrado efetivas para inativação de vírus *in vitro*, causando aparentemente um dano ao envelope viral. Segundo o autor, as pesquisas realizadas até o momento ainda não indicam a PDT como uma forma de tratamento em substituição as drogas antimicrobianas, mas sim como uma forma de se aprimorar o tratamento de infecções locais devido ao menor custo e à maior agilidade que pode ser obtida.

Carré et al.<sup>16</sup>, em 1999, apresentaram um estudo da atividade fotodinâmica de 5 porfirinas sintéticas modificadas por meio de associações de açúcares e meso-carbonos. Todas as soluções foram preparadas com um derivado de hematoporfirina, o qual também teve sua capacidade fotossensibilizadora avaliada. Após a obtenção dos FSs, foram realizados testes para a determinação da capacidade formadora de oxigênio singlete de cada um deles. Suspensões celulares do fungo *Saccharomyces cerevisie* foram colocadas no interior de tubos de ensaio, e foram incubadas com as soluções de porfirina na concentração de  $10^{-5}$ M. A iluminação das amostras foi realizada com uma lâmpada de tungstênio ( $500 \text{ W/m}^2$ ). Suspensões controle foram tratadas com os FSs e mantidas no escuro. Adicionalmente, foram realizados testes para a verificação da presença de clonogenicidade e permeabilidade de membrana. Foi observado que as porfirinas mais efetivas na inativação do fungo foram a monoglucozilporfirina e a cis-diglucozilporfirina. As análises de presença de clonogenicidade e fragmentação de DNA evidenciaram que a atividade fotodinâmica desses compostos resultou em dano intracelular nas células fúngicas. Os autores concluíram que a habilidade dos FSs em atingir o interior da célula esteve diretamente relacionada ao potencial antifúngico das porfirinas avaliadas.

Machado<sup>51</sup>, em 2000, apresentou uma revisão da literatura a respeito dos princípios e potenciais aplicações da PDT. De acordo com o autor, essa modalidade terapêutica tem sido aplicada com sucesso no tratamento de

tumores, por meio da inativação celular do tecido neoplásico. Alguns estudos têm avaliado a possibilidade da sua aplicação em outras condições clínicas, como a inativação de microrganismos patogênicos. A inviabilização celular promovida pela PDT é resultado de uma reação que decorre primariamente da excitação eletrônica do FS pela luz, seguida da formação de espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete). A primeira geração de agentes FS, baseada em misturas de derivados porfirínicos, tem sido efetiva no tratamento de diversos tipos de tumores. Outra classe de FSs são os endógenos, baseados na administração por via oral ou mesmo uso tópico do ácido  $\delta$ -aminolevulínico. Esse ácido é um precursor metabólico da protoporfirina IX, um composto fotodinamicamente ativo. Em vários países, o emprego da PDT como terapia anti-câncer já foi autorizado, como os Estados Unidos, França, Holanda, Canadá e Japão. No entanto, a PDT tem mostrado o seu grande potencial no que concerne a outras moléstias, como a psoríase, arteriosclerose, degeneração macular da retina e remoção de verrugas na laringe. Além disso, também vem sendo obtida a destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos convencionais e descontaminação de sangue. O autor concluiu que as pesquisas na área de PDT estão promovendo um acentuado desenvolvimento dessa nova modalidade terapêutica em outras áreas médicas, tornando-a uma prática segura e viável.

Chandra et al.<sup>19</sup>, em 2001, verificaram a formação de biofilmes de *C. albicans* e de *Saccharomyces cerevisiae* sobre corpos de prova de metilmetacrilato e de silicone. Para isso, foram utilizadas cepas padrão e isoladas da cavidade bucal de pacientes, as quais foram inoculadas nesses corpos de prova. Foram utilizadas técnicas para verificação do número de células pela redução de tetrazolium e pelo peso seco dos materiais. Além disso, foi avaliada a atividade metabólica, por meio de corantes fluorescentes e microscopia confocal a laser. Os autores também avaliaram a susceptibilidade dos microrganismos a diferentes concentrações (0,5 a 256 mg/mL) de fluconazol, anfotericina B, nistatina e clorexidina. Os autores observaram que as leveduras aderidas são transformadas em comunidades celulares bem definidas, inseridas em uma matriz de polissacarídeos. Os biofilmes constituíram um nicho de proteção contra a terapia

com antifúngicos, podendo criar uma fonte para infecções refratárias. Além disso, a observação de biofilmes por microscopia de fluorescência e confocal de varredura a laser demonstrou que os biofilmes de *C. albicans* são altamente heterogêneos, sendo compostos de elementos celulares e não celulares. Em ambos os modelos, a resistência antifúngica das células aumentou com o desenvolvimento do biofilme. O biofilme formado sobre o silicone apresentou camadas internas formadas por densos aglomerados de leveduras, das quais partiram prolongamentos miceliais (hifas) que atravessaram um revestimento externo de polissacarídeos. Com a remoção mecânica do biofilme, por meio de enxágüe ou raspagem, ainda permaneceram as células basais leveduriformes aderidas ao material de substrato. Ao contrário da *C. albicans*, *S. cerevisiae* não apresentou capacidade de formar biofilme maduro, embora também tenha aderido às superfícies protéticas. Segundo os autores, os resultados obtidos permitiram a identificação de bases para investigações dos mecanismos moleculares da biologia de biofilmes de *C. albicans*, envolvidos na resistência antifúngica, e forneceram meios para o desenvolvimento de novas terapias para infecções provocadas por biofilmes.

Em 2001, Chandra et al.<sup>20</sup> desenvolveram um modelo reproduzível de biofilme de *C. albicans* em prótese para determinar a susceptibilidade de isolados do microrganismo a quatro agentes antifúngicos (nistatina, anfotericina, fluconazol, clorexidina). Inicialmente foi obtida uma suspensão celular de dois isolados de *C. albicans*, sendo um de paciente com estomatite protética e um de paciente HIV-positivo com candidose orofaríngea. Para a formação do biofilme, uma alíquota da suspensão celular foi aplicada nas superfícies de um corpo-de-prova de resina acrílica. A susceptibilidade da *C. albicans* presente no biofilme foi comparada à de células planctônicas desse microrganismo. Houve 50% de redução da atividade metabólica do biofilme quando os antifúngicos nistatina, anfotericina, clorexidina e fluconazol foram aplicados nas concentrações de 8 µg/mL, 16 µg/mL, 128 µg/mL e superior a 64 µg/mL, respectivamente. Entretanto, as células planctônicas de *C. albicans* foram susceptíveis aos agentes antifúngicos, com 50% de redução da atividade metabólica para as concentrações

de 0,25 µg/mL, 1 µg/mL, 4 µg/mL e 0,5 µg/mL dos antifúngicos nistatina, anfotericina B, clorexidina e fluconazol, respectivamente. Os autores concluíram que, comparadas às células planctônicas, as células de *C. albicans* associadas ao modelo de biofilme em prótese apresentaram resistência aos antifúngicos mais frequentemente utilizados para o tratamento da estomatite protética.

A fotoinativação de microrganismos cutâneos foi objeto de estudo de Zeina et al.<sup>76</sup>, em 2001. Suspensões celulares de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* e *C. albicans*, foram pipetadas em placas de Petri para a realização dos experimentos. A fotossensibilização das amostras foi realizada com 1 mL do corante azul de metileno, a 100 mg/L. Um projetor de slides foi utilizado como fonte de luz policromática, e a iluminação das amostras foi realizada sob intensidades de luz que variaram de 1,6 a 42 mW/cm<sup>2</sup>, dependendo da distância entre o aparelho de luz e a amostra iluminada. A aplicação da luz foi realizada durante períodos de 10 a 60 minutos, sendo que a cada 10 minutos transcorridos, uma alíquota de 1 mL foi removida da placa de Petri, diluída e plaqueada em meio de cultura específico. A análise de regressão foi utilizada para o cálculo da quantidade de redução de todas as espécies testadas. Além disso, foram obtidos “valores-D”, correspondentes ao tempo mínimo de exposição necessário para promover uma redução na contagem de colônias viáveis. Foi demonstrado que os valores-D obtidos para cada microrganismo eram distintos e que a *C. albicans* mostrou o maior valor em comparação com as bactérias (a iluminação por 660 segundos reduziu apenas 0,09 log ufc/mL). Tal fato foi atribuído ao maior tamanho/volume da célula da *C. albicans*, que é cerca de 25-50 vezes maior do que as células das bactérias testadas. Além disso, a presença da membrana nuclear nos seres eucariontes, como os fungos, pode representar uma barreira adicional a penetração do FS, tornando a *C. albicans* mais resistente a PDT em relação às bactérias.

A inativação de *C. albicans* in vivo foi avaliada no estudo conduzido por Teichert et al.<sup>69</sup>, em 2002. Os autores verificaram a susceptibilidade de *C. albicans* presente em línguas de camundongos pela

utilização do azul de metileno como FS. Setenta e cinco camundongos com severa imunodeficiência receberam inoculação durante quatro semanas de uma cepa clínica de *C. albicans* azul-resistente. Previamente a aplicação da PDT, os animais foram anestesiados e foi realizada uma coleta, por meio de *swab*, para a determinação do número de ufc/mL presentes na língua dos animais. Em seguida, os animais foram divididos em grupos de acordo com a concentração de FS aplicado topicamente (250, 275, 300, 350, 400, 450 ou 500 mg/L). Após 10 minutos de incubação, a língua foi exposta à luz de um aparelho de laser diodo (664 nm), durante 684,5 segundos, o que correspondeu a uma dose de 275 J/cm<sup>2</sup>. Ao final da iluminação, foi realizada uma nova coleta da língua e os animais foram sacrificados. Os grupos controle corresponderam a animais não inoculados que foram expostos ao laser e animais inoculados com *C. albicans* que não receberam nenhum tratamento, além de animais inoculados que receberam somente o FS ou somente luz. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os quatro grupos controle. Nos grupos experimentais, foi observada, independente da concentração de FS utilizada, uma diminuição no número de colônias viáveis por mL, após a exposição à luz do laser. Apesar disso, somente as concentrações de 450 e 500 mg/L eliminaram totalmente o microrganismo da cavidade bucal dos animais após a ativação por luz.

O objetivo do estudo de Komerik et al.<sup>42</sup>, em 2003, foi avaliar a efetividade da PDT contra o *Porphyromonas gingivalis* em cavidade oral de ratos, resultando na redução da perda óssea característica da periodontite. Os molares superiores dos animais foram inoculados com esse microorganismo e, posteriormente, expostos à irradiação com laser diodo (630 nm, 0,1 mW e 48 J), em presença de azul de toluidina (0,01, 0,1 e 1mg/mL), durante 2, 4 e 8 minutos. Após a PDT, o número de bactérias viáveis foi determinado e, após 3 dias, amostras das estruturas periodontais foram removidas e avaliadas por meio de análise histológica para verificação da presença de possíveis danos. Além disso, a distribuição do fotossensibilizador nos tecidos foi verificada por meio de microscopia de fluorescência. Como resultado, os autores observaram ausência de bactérias viáveis após a realização do tratamento, quando azul de toluidina 0,1

mg/mL e irradiação com laser durante 8 minutos foram empregadas. Na análise histológica, nenhum efeito adverso nos tecidos adjacentes foi observado. Na microscopia de fluorescência, observaram que o azul de toluidina penetrou apenas o epitélio, apresentando-se mais concentrado na camada de queratina por causa da presença de maior fluorescência nessa região. Os autores concluíram que a PDT com azul de toluidina associado ao laser promoveu a inativação *in vivo* de *Porphyromonas gingivalis*, resultando na diminuição da perda óssea. Além disso, sugeriram que a terapia fotodinâmica pode ser uma terapia alternativa para tratamento antimicrobiano da periodontite.

Bliss et al.<sup>11</sup>, em 2003, foi avaliar a efetividade da PDT contra o *Porphyromonas gingivalis* em cavidade oral de ratos, resultando na redução da perda óssea característica da periodontite. Os molares superiores dos animais foram inoculados com esse microorganismo e, posteriormente, expostos à irradiação com laser diodo (630 nm, 0,1 mW e 48 J), em presença de azul de toluidina (0,01, 0,1 e 1mg/mL), durante 2, 4 e 8 minutos. Após a PDT, o número de bactérias viáveis foi determinado e, após 3 dias, amostras das estruturas periodontais foram removidas e avaliadas por meio de análise histológica para verificação da presença de possíveis danos. Além disso, a distribuição do fotossensibilizador nos tecidos foi verificada por meio de microscopia de fluorescência. Como resultado, os autores observaram ausência de bactérias viáveis após a realização do tratamento, quando azul de toluidina 0,1 mg/mL e irradiação com laser durante 8 minutos foram empregadas. Na análise histológica, nenhum efeito adverso nos tecidos adjacentes foi observado. Na microscopia de fluorescência, observaram que o azul de toluidina penetrou apenas o epitélio, apresentando-se mais concentrado na camada de queratina por causa da presença de maior fluorescência nessa região. Os autores concluíram que a PDT com azul de toluidina associado ao laser promoveu a inativação *in vivo* de *Porphyromonas gingivalis*, resultando na diminuição da perda óssea. Além disso, sugeriram que a terapia fotodinâmica pode ser uma terapia alternativa para tratamento antimicrobiano da periodontite.

Chabrier-Roselló et al.<sup>17</sup>, em 2005, avaliaram parâmetros da ação fotodinâmica mediada pelo Photofrin<sup>®</sup> em *C. albicans*. O cultivo de *C. albicans* foi realizado em tubo germinativo e em biofilmes de 24 horas. As amostras foram incubadas com Photofrin<sup>®</sup> 10 mg/L por 1 e 5 minutos e, em seguida, irradiadas com uma lâmpada de mercúrio de 400 a 700 nm, numa fluência de 15 mW/cm<sup>2</sup> (0,9 J/cm<sup>2</sup> por minuto de irradiação). Amostras deixadas no escuro (não irradiadas) foram utilizadas como controle. A atividade metabólica do microrganismo foi avaliada pelo teste XTT. Tubos germinativos de *C. albicans* foram observados em microscopia de fluorescência a fim de se avaliar a captação do Photofrin<sup>®</sup> pela célula. Para avaliar a resposta adaptativa do microrganismo a injúria oxidativa, tubos germinativos foram submetidos repetidamente a tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (primeiramente numa concentração subletal de 1 mM e posteriormente em concentrações tóxicas variadas entre 50 e 100 mM), PDT (Photofrin<sup>®</sup> em uma concentração subtóxica de 0,5 mg/L associada à irradiação de 9 J/cm<sup>2</sup>, seguida por novas irradiações com concentrações do fotossensibilizador entre 1 e 10 mg/L) ou associação de ambos os tratamentos. Adicionalmente, amostras de biofilmes submetidas à PDT (10 mg/L de Photofrin<sup>®</sup>, seguida por 30 minutos de incubação e irradiação de 18 J/cm<sup>2</sup>) foram comparadas com amostras tratadas com anfotericina B 10 mg/L. Todos os procedimentos foram realizados em duplicatas e repetidos três vezes. A análise estatística foi realizada com o teste *t* student. Os resultados obtidos com as amostras de tubo germinativo demonstraram que a PDT utilizando ambos os tempos de incubação de 1 e 5 minutos com o FS promoveu a completa eliminação da atividade metabólica do microrganismo. A microscopia de fluorescência revelou captura uniforme de Photofrin<sup>®</sup> pelos organismos após 5 minutos. Foi verificada resistência na resposta adaptativa do microrganismo tratado repetidamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, não houve resistência quando amostras foram submetidas repetidamente à PDT ou quando essa foi associada ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Com relação às amostras em biofilme, a irradiação das amostras sensibilizadas pelo Photofrin<sup>®</sup> resultou em redução significativa da atividade metabólica de *C. albicans*. Além disso, a diminuição da atividade metabólica do microrganismo submetido à

fototerapia foi significativa em relação às amostras tratadas com anfotericina B. Os autores concluíram que a PDT é uma alternativa segura como modalidade terapêutica para a inativação microbiana, pois o desenvolvimento de resistência aos efeitos fotodinâmicos é improvável.

Lambrechts et al.<sup>46</sup>, em 2005, realizaram um estudo para a avaliação dos mecanismos de inativação celular da PDT mediada por uma porfirina catiônica. Foram obtidas suspensões celulares de *C. albicans* nas concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  células/mL. Em seguida, essas suspensões foram incubadas com a porfirina catiônica TriP [4], na concentração de 25  $\mu$ M, durante 1, 15 ou 30 minutos. Alíquotas de 1 mL das suspensões foram transferidas para um placa de orifícios e iluminadas com uma lâmpada halógena de intensidade de 30 mW/cm<sup>2</sup>. Suspensões incubadas durante 30 minutos também foram lavadas duas vezes e em seguida iluminadas, para que fosse possível a distinção entre o efeito da porfirina em solução, e o efeito causado pela porfirina que ficou ligada às células. A sobrevivência do fungo foi verificada pelo método da contagem de colônias viáveis, e foi expressa como uma porcentagem relativa ao observado em suspensões controles. Os resultados demonstraram que a sobrevivência do fungo foi reduzida gradativamente com o aumento da dose de luz. A aplicação de 12,6 J/cm<sup>2</sup> promoveu a completa eliminação do microrganismo. As análises realizadas para a avaliação do mecanismo de ação da porfirina catiônica foram: análise do espectro de absorção do FS, microscopia de fluorescência, microscopia confocal e técnica de fratura por congelamento associada à microscopia eletrônica. Essas análises demonstraram que, após a incubação das suspensões com o FS, esse foi capaz de se ligar a parede celular da *C. albicans*, previamente a exposição luminosa. Durante a iluminação, ocorreram danos na membrana celular, que se tornou mais permeável a entrada do FS. Após o influxo do FS para o interior da célula, organelas intracelulares também foram atingidas pelos processos fotodinâmicos. O aumento no tempo de incubação não alterou a quantidade de FS que entrou na célula previamente a iluminação, tampouco a efetividade da PDT. Os autores concluíram que a *C. albicans* pôde ser inativada pela porfirina

catiônica, e a membrana citoplasmática foi a principal organela atingida no processo de inativação celular.

O estudo de Zanin et al.<sup>75</sup>, em 2005, teve por objetivo avaliar o efeito da associação do azul de orto-toluidina – TBO (100 mg/L) a uma luz LED vermelha (620-660 nm) ou a um laser de He-Ne (632,8 nm) sobre biofilmes de *S. mutans* crescidos em um fermentador de espessura e fluxo contínuos (CFFF). A utilização do CFFF possibilitou a simulação da formação da película adquirida e o crescimento dos biofilmes, a partir de culturas simples de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita (HA), em local constantemente banhado por saliva artificial. Os biofilmes foram crescidos sob suplementação de 2% de sacarose. Na aplicação da PDT, os discos de HA contendo os biofilmes foram removidos do CFFF após 3, 7 e 10 dias, e 25 µL de TBO foi adicionado em cada biofilme e deixado no escuro durante 5 min. Após este período, os biofilmes foram expostos por 5, 15 e 30 minutos ao laser He-Ne ou à luz do LED, sendo a mesma potência de 32 mW utilizada por ambos aparelhos, e a dose de energia para os diferentes tempos de irradiação correspondeu a 49, 147 e 294 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Os resultados deste estudo demonstraram redução significativa nas contagens das bactérias presentes em biofilmes de *S. mutans* após a realização da PDT. Não foram observadas diferenças significativas no efeito antimicrobiano promovido quando o laser de He-Ne ou a luz LED foram utilizados. Em ambos os casos, o FS utilizado foi o TBO na concentração de 100 mg/L, e, tanto a sensibilização dos biofilmes na ausência da luz, como a irradiação dos biofilmes na ausência do corante, não demonstraram efeito antimicrobiano sobre os biofilmes testados. Além disso, a microscopia confocal demonstrou que a inativação das bactérias promovida pela PDT ocorreu predominantemente nas camadas externas dos biofilmes e que os biofilmes mais velhos foram menos susceptíveis à essa terapia. Outro ponto importante a se ressaltar é que a luz LED vermelha apresentou efeito antimicrobiano semelhante ao obtido pelo laser de He-Ne. Assim, considerando o surgimento crescente de bactérias resistentes aos antibióticos, a PDT surge como uma terapia antimicrobiana alternativa para o tratamento e/ou prevenção de doenças como cárie dental.

Jori et al.<sup>39</sup> publicaram em 2006, uma revisão de literatura baseada nos princípios de ação e aplicações da PDT na inativação microbiológica. Segundo os autores, apesar da PDT ser atualmente empregada no tratamento de neoplasias, o primeiro relato da utilização desta terapia foi na área microbiológica, em 1900. No entanto, o potencial da PDT no tratamento de infecções ficou por muitos anos, inexplorado. Atualmente, com a emergência de doenças infecciosas resistentes aos tratamentos convencionais, muitos estudos têm buscado o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para a inativação de microrganismos patogênicos. A PDT parece oferecer muitas vantagens para o tratamento de infecções originadas por microrganismos, tais como um amplo espectro de ação, a inativação de microrganismos resistentes e o baixo potencial mutagênico nas células expostas. A PDT tem se mostrado capaz de promover atividades citotóxicas contra uma grande variedade de bactérias, fungos e protozoários. No entanto, a foto-inativação de fungos parece ser mais difícil de ser atingida, devido ao maior tamanho celular desses microrganismos, que exige uma maior quantidade de oxigênio singlete para que a inativação celular ocorra, em comparação com bactérias. Particularmente no caso da candidose, a aplicação tópica de FS associada a luz para a inativação microbiológica parece oferecer um importante avanço para o tratamento de pacientes imunodebilitados, como os HIV positivos. A utilização de porfirinas tem se mostrado efetiva para a fotossensibilização da *C. albicans*, e promove a inativação do fungo após a iluminação com luz visível. A PDT também representa uma modalidade terapêutica potencialmente aplicável para o tratamento de doenças periodontais e cáries. No entanto, são encontrados poucos estudos *in vivo* que utilizam esse método terapêutico para o tratamento de infecções e assim, a aplicação clínica da PDT antimicrobiana ainda está em desenvolvimento.

Donnelly et al.<sup>27</sup>, em 2008, realizaram um trabalho de revisão de literatura sobre a terapia fotodinâmica como tratamento antifúngico. Em comparação com a terapia antibacteriana, a terapia antifúngica é limitada a um pequeno número de drogas. Além disso, o tratamento é longo e efeitos adversos e interações medicamentosas estão presentes. Com o aumento da expectativa de

vida dos pacientes HIV positivos e imunossuprimidos, houve maior incidência de fungos resistentes às drogas disponíveis. Dessa forma, a terapia fotodinâmica tornou-se um tratamento alternativo para controle das infecções fúngicas pela facilidade de seu mecanismo de ação (droga, luz e oxigênio) e pela impossibilidade do fungo de desenvolver resistência a essa terapia. De acordo com a revisão, a localização do fotossensibilizador e sua seletividade para o microrganismo são fatores imprescindíveis para o sucesso da PDT. Alguns estudos observaram que a *Candida albicans*, como outras leveduras, foram mais difíceis de serem inativadas pela PDT quando comparadas a bactérias gram-positivas. Essa dificuldade resultou na utilização de uma maior concentração de fotossensibilizador e em um aumento da dose de luz. Os autores justificaram que isso ocorreu pela presença da membrana nuclear, pelo maior tamanho da célula e pela redução do número de alvos para o oxigênio singleto por unidade de volume da célula. Além disso, a similaridade da célula fúngica com a célula de mamíferos torna mais difícil a seleção do agente fotossensibilizante. Inúmeros fotossensibilizadores foram testados para tratamento antifúngico, entre eles fenotiazínicos, porfirinas, ácido aminolevulínico-5 e ftalocianinas. Todos eles apresentaram sucesso na inativação de fungos, com mecanismos de ação específicos de cada família. Segundo os autores, a seletividade desses fotossensibilizadores pelas células fúngicas e a ausência de relatos científicos de resistência fúngica à PDT, assim como de efeitos genotóxicos ou mutagênicos, sugerem o sucesso dessa terapia contra fungos. Ainda, sugerem ser necessário que as empresas farmacêuticas e agências de fomento invistam recursos para o desenvolvimento de fotossensibilizadores específicos para células fúngicas e de um sistema de distribuição da droga que lhe permita atuar unicamente em seu sítio de ação.

O objetivo do estudo de Giusti et al.<sup>31</sup>, em 2008, foi avaliar dois diferentes fotossensibilizadores ativados por uma luz vermelha emitida por um LED em descontaminação de dentina bovina cariada. Espécimes de dentina com cárie induzida por *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus mutans* foram

imersos por 60 segundos em uma solução de Photogem® (1 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL) ou em azul de toluidina (0,025 mg/mL e 0,1 mg/mL) e, posteriormente, irradiados por um LED de luz vermelha (630 nm, irradiância de 400 mW/cm<sup>2</sup> e potência de 200 mW), durante 60 segundos (dose = 24 J/cm<sup>2</sup>) ou 120 segundos (dose = 48 J/cm<sup>2</sup>). Os fragmentos de dentina foram divididos nos seguintes grupos (n=3): grupo controle, onde nenhum tratamento foi estabelecido; grupos onde somente aplicou-se o fotossensibilizador (Photogem® ou TBO); grupos em que somente se submeteu os espécimes a irradiação, nas duas diferentes doses e grupos em que se estabeleceu a PDT. Posteriormente ao tratamento, os espécimes foram colocados individualmente em tubos e estes foram agitados por 60 segundos. Da solução presente nos tubos, foram coletadas alíquotas que foram semeadas em placas Petri, contendo o meio de cultura BHI. Após 48 h, o número de colônias viáveis foi contado com o auxílio de um contador digital. Os resultados indicaram que o TBO, quando aplicado sozinho, apresentou-se mais tóxico aos microorganismos que o Photogem®. Além disso, com a exposição à luz na dose de 24 J/cm<sup>2</sup>, a taxa de sobrevivência desses microorganismos foi menor do que quando a dose de 48 J/cm<sup>2</sup> foi utilizada. Quando o fotossensibilizador foi associado a luz de LED, o TBO apresentou maior fototoxicidade do que o Photogem®, sendo que o maior efeito tóxico da PDT foi obtido com o TBO na concentração de 0,1 mg/mL associado a dose de luz de 48 J/cm<sup>2</sup>. Baseado nesses resultados, os autores concluíram que o LED em associação tanto com o Photogem® quanto com o TBO foi efetivo na redução bacteriana de *S. mutans* e *L. acidophilus*, presentes na dentina cariada, entretanto, o TBO apresentou-se mais eficaz do que o Photogem® na eliminação dos microorganismos.

Mima et al.<sup>54</sup>, em 2008, avaliou a efetividade da Terapia Fotodinâmica (PDT) na inativação de *C. albicans* de lesões em língua de camundongos, sendo a candidose induzida em 30 camundongos fêmeas. Cada animal foi imunossuprimido com 2 injeções subcutâneas de prednisolona 100 mg/Kg. Tetraciclina 0,83 mg/mL foi administrada na água de beber. Após 24 horas a 37°C, uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 60193) foi centrifugada,

lavada e ressuspensa (4,5x10<sup>7</sup> ufc/mL). Os animais foram anestesiados com 2 mg/mL de cloridrato de clorpromazina e inoculados com esfregaço na cavidade bucal de um swab embebido na suspensão fúngica. Após 4 dias da inoculação, 50 µL de Photogem® (OS) 400 ou 500 mg/L foi pipetado na cavidade bucal e, após 30 minutos, o dorso lingual foi iluminado por um LED azul (306 J/cm<sup>2</sup>) (PDT). Animais adicionais foram tratados apenas com LED (P-L+), com uma das concentrações de PS (P+L-) ou não receberam nenhum tratamento (P-L-) (n=5 cada). Em seguida, um swab foi esfregado no dorso da língua de cada animal e alíquotas foram cultivadas em Agar Sabouraud Dextrose. Após 48 h a 37°C, as colônias foram contadas e os dados (ufc/mL) analisados por ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) e Holm-Sidak. A PDT resultou em redução significativa de *C. albicans* em relação aos grupos P-L-, P+L- e P-L+, os quais não diferiram entre si. Também não foi verificada diferença significativa entre os grupos PDT (400 e 500 mg/L de PS). A PDT foi efetiva na redução de *C. albicans* de lesões em línguas de camundongos.

### 2.3 Citotoxicidade da PDT

Henderson, Dougherty<sup>34</sup>, em 1992, relataram, em uma revisão de literatura, os efeitos causados pela PDT sobre as células e em nível tecidual. Segundo os autores, a terapia fotodinâmica é baseada na fotooxidação de matéria biológica no tecido alvo. Para isso, requer-se a presença de uma substância sensibilizadora no tecido a ser tratado, associada à exposição a uma fonte de luz com comprimento de onda adequado. Dessa forma, por meio de vários fenômenos fotofísicos envolvendo oxigênio molecular, produtos oxigenados nocivos à função celular, eventual destruição celular é promovida. Os autores também relataram sobre os mecanismos relevantes relacionados à resposta da PDT in vivo, passando por aspectos em nível molecular. Sabe-se que a maioria dos fotossensibilizadores estudados até o momento é distribuída e retida tanto pelos tecidos normais quanto pelos neoplásicos. Todavia, alguma seletividade é observada e ela parece ser mais pronunciada em certas condições neoplásicas. Apesar de as razões para essa

seletividade parcial não serem totalmente entendidas, sugere-se que ela seja devido ao grau de concentração do fotossensibilizador diferente entre os tecidos neoplásicos e o tecido sadio ao redor. Enquanto a absorção de fotossensibilizadores pelo tecido tem sido amplamente estudada, a sua distribuição no interior do tecido ainda não está bem definida. Quanto ao mecanismo de acúmulo e retenção dos fotossensibilizadores, a explicação mais comum para esse fator deve-se à vascularização do tumor e à pobre drenagem linfática no mesmo. Os autores também sugerem que a absorção da luz pelo fotossensibilizador pode limitar a penetração da luz no tecido e que muitos fotossensibilizadores são propensos a fotodestruição durante a exposição à luz, em um processo chamado fotocclareamento. Se o fotocclareamento ocorrer antes de o limiar de necrose ser atingido, nenhum dano tecidual ocorrerá, o que é uma situação desejável para os tecidos normais expostos à terapia com a luz e uma situação não desejável para que o tumor seja tratado. Existem muitas evidências que sugerem ser o oxigênio singlete o maior responsável pelos danos da PDT, mas alguns estudos indicaram que o íon superóxido pode estar envolvido em alguns aspectos dos danos causados pela PDT. Sendo assim, é evidente que os efeitos da PDT são oxigênio-dependente. Quanto aos efeitos da PDT nas células e nos tecidos, os autores afirmaram que o tempo de vida do oxigênio singlete e sua difusão a distância, no ambiente celular, são limitados pela sua ávida reatividade com os componentes celulares. Além disso, o dano celular mediado pelo oxigênio singlete ocorre próximo ao seu sítio de geração, o que pode afetar todos os componentes celulares, principalmente a membrana. Enquanto a inibição de enzimas mitocondriais tem sido frequentemente considerada a causa da letabilidade das células pela PDT, existem evidências de que a inativação dos sistemas de transporte das membranas, a despolarização da membrana plasmática e a inibição de enzimas reparadoras de DNA podem preceder a inativação mitocondrial e de enzimas lisossomais. Associado a este dano na membrana celular, há liberação de mediadores inflamatórios e de imunidade que são vasoativas (constritora ou dilatadora) e agem rapidamente. Tal evidência sugere que essas substâncias estejam envolvidas no desenvolvimento dos danos

vasculares causados pela PDT. Além disso, os efeitos agudos, diretos e letais sobre as células tumorais dependem da localização do fotossensibilizador sobre ou dentro das células, da eficácia do fotossensibilizador no seu local de acúmulo, da dose de luz que atinge a célula e da cinética de oclusão vascular e do suprimento de oxigênio. Os efeitos da PDT in vivo mais rapidamente detectáveis são de natureza vascular. O fator determinante para a fotossensibilidade vascular parece ser o nível de fotossensibilizador circulante. As consequências do dano vascular para os tumores são severas, tal como redução na velocidade de circulação sanguínea e indução de hipóxia nas células tumorais após minutos de iluminação. Ambos os efeitos aumentam com o tempo, durante e após o tratamento. A indução de hipóxia no tumor é altamente dependente da concentração da droga injetada e pouco dependente da dose de luz. A hipóxia pode ser reversível, dependendo da dose utilizada no tratamento. Os autores abordam também os efeitos tardios da PDT, sendo eles eritema e edema agudos, necrose nos casos mais severos, além de fotossensibilidade prolongada da pele. Outro aspecto da PDT que deveria ser considerado como efeito tardio é a natureza de cicatrização do tecido após o dano induzido pela PDT. A infiltração com linfócitos, plasma celular e histiócitos observada nos tecidos tratados com PDT sugere uma resposta imune. Finalmente, a possibilidade de ocorrência de eventos mutagênicos e carcinogênicos deve ser considerada.

A eficácia da PDT foi investigada por Nauta et al.<sup>57</sup>, em 1997, em um estudo em que avaliou dois diferentes comprimentos de onda de ativação para o tratamento de lesões epiteliais pré-malignas e carcinoma de células escamosas (SCC) da mucosa oral. Lesões pré-malignas e SCC foram induzidas quimicamente com 4-NQO no palato de ratos machos Wistar. Cada rato foi fotossensibilizado com 2,5 mg/Kg de Photofrin®, administrado por injeção intravenosa. Após 24 horas, cada animal foi irradiado com laser em dois comprimentos de onda de ativação (514,5 nm e 625 nm), com dose de 100 J/cm<sup>2</sup> e uma irradiância de 60 mW/cm<sup>2</sup>. Para a avaliação dos efeitos em curto prazo, metade dos animais de cada grupo tratado (n=4) foram sacrificados 48 horas após a PDT e o restante após 2 meses (avaliação a longo prazo). As alterações

macroscópicas presentes no palato 2 dias após a PDT foram quantificadas por meio de escores numéricos: 0 = nenhum efeito clínico, 1 = eritema leve, 2 = eritema marcante, 3 = ulceração ou necrose (localizada), 4 = ulceração ou necrose em toda a área tratada, 5 = osso exposto. As alterações macroscópicas observadas no palato 2 meses após a PDT foram quantificadas pelos seguintes escores: 0 = nenhum efeito clínico, 1 = epitélio intacto, cicatriz tecidual (local), 2 = epitélio intacto, cicatriz tecidual em toda a área tratada, 3 = ulceração ou necrose, 4 = osso exposto (local), 5 = osso exposto em toda a área tratada, 6 = evidência de tumor. Já as alterações microscópicas foram avaliadas separadamente na mucosa, no osso do palato e nas estruturas adjacentes de acordo com o período de avaliação (48 h e 2 meses). No estudo a curto prazo, a maioria dos animais apresentou, macroscopicamente, eritema pronunciado em toda a região do palato em combinação com sinais de ulceração ou necrose do epitélio. Microscopicamente, todos os animais apresentaram edema, hemorragia e necrose do epitélio na área intermolar. A maioria dos animais apresentou uma necrose parcial do epitélio e somente alguns animais apresentaram necrose completa. Houve danos aos vasos sanguíneos em quase todos os casos, independente do comprimento de onda utilizado. Nas estruturas adjacentes ao palato, observaram que o efeito da PDT com a luz de 625 nm foi maior do que quando utilizada a luz com 514,5 nm, sendo as alterações compostas predominantemente por danos ao epitélio, à glândula lacrimal e à polpa dental. A longo prazo, diferentes aspectos macroscópicos de danos ao epitélio da área intermolar foram encontrados. Um epitélio intacto com evidência de cicatriz tecidual em toda a área tratada foi observado. Além disso, estavam presentes pontos de osso exposto no palato circundado por um epitélio intacto com cicatriz tecidual e evidência de tumor na área intermolar tratada com PDT, bem como a área adjacente (mucosa não tratada). Microscopicamente, os achados mais pronunciados foram: distribuição irregular do epitélio, cistos epiteliais na submucosa e formação de densa cicatriz tecidual na submucosa. Danos irreversíveis também ocorreram frequentemente, para ambos os comprimentos de onda, tais como perda óssea no palato, reabsorção radicular de dentes adjacentes, formação de dentina irregular e

anquilose. Além disso, como resultado do tratamento da displasia com a PDT, nenhuma evidência de doença foi encontrada em 6 dos 20 animais do grupo tratado com a luz de 514,5 nm e em 2 dos 20 animais tratados com 625 nm. Comparando os dois tratamentos, melhores resultados foram obtidos no grupo tratado com a luz de 514,5 nm, pois esta causou menor dano ao tecido normal. Segundo os autores, a aplicação da PDT para tratamento de carcinoma de células escamosas na cavidade oral é discutível.

A terapia fotodinâmica (PDT) induz danos a membrana celular e alterações na adesividade de células cancerígenas. Um parâmetro importante na metástase do câncer. Estas alterações resultam da sensibilidade celular à fotossensibilizadores e a distribuição de fotossensibilizadores nas células. A eficácia dos fotossensibilizadores depende da sua proximidade com o alvo e de sua farmacocinética no nível celular. Rousset et al.<sup>64</sup>, em 2000, estudaram, por meio de microscopia confocal, a distribuição celular dos fotossensibilizadores através da análise da fluorescência emitida por um derivado da Benzoporfirina (DBP-MA) e pelo Photofrin®. Duas linhagens de células cancerígenas, com diferentes propriedades metastáticas, foram utilizadas: Prob (progressiva), e REGb (regressivo). Para DBP-MA (1,75 mg/mL), intensidade máxima de fluorescência (8300 cts) foi alcançada depois de 2 horas para Prob e após 1 h (4.900 cts) para REGb. Para Photofrin® (10 mg/mL), intensidade máxima de fluorescência (467 cts) foi alcançada após 5 h para Prob e após 3 horas (404 cts) para REGb. Estudos intracelulares revelaram maior fluorescência citoplasmática do que nuclear para tanto para DBP quanto para Photofrin®. Ambos os fotossensibilizadores induziram uma fototoxicidade dose-dependente; a dose do fotossensibilizador capaz de induzir 50% de morte (LD<sub>50</sub>) com DBP foi de 93,3 ng/mL para Prob e 71,1 ng/mL para REGb, sob uma irradiação de 10 J/cm<sup>2</sup>. Com Photofrin®, LD<sub>50</sub> foi de 1.270 ng/mL para Prob e 1200 ng/mL para REGb sob uma irradiação de 25 J/cm<sup>2</sup>. O efeito do fotossensibilizador sobre as células cancerosas Prob e REGb foi avaliado por incorporação cinética e testes de toxicidade. A concentração intracelular do agente fotossensibilizador foi um fator importante para a efetividade da PDT, mas não foi o único a contribuir para o

efeito fotodinâmico. Em conclusão, os autores observaram que houve uma clara diferença entre captação e fototoxicidade do fotossensibilizador, mesmo em células cancerosas de mesma origem, o que poderia induzir heterogeneidade na morte celular em situações clínicas.

Existem poucos estudos sobre o mecanismo de ação exato da PDT em tecido normal e neoplásico de bexiga. Além disso, poucos dados estão disponíveis sobre a dose de luz e de fotossensibilizadores usados clinicamente. Sendo assim, Grönlund-Pakkanen et al.<sup>33</sup>, em 2000, tiveram por objetivo determinar a fluência de luz ótima para induzir remoção seletiva da mucosa da bexiga durante a terapia fotodinâmica como tratamento de câncer da bexiga. Além disso, objetivaram avaliar as alterações morfológicas ocorridas após a PDT. Para isso, 64 ratos Wistar fêmeas tiveram a bexiga tratada com PDT utilizando um laser de argônio (638-650 nm) associado ao ALA (300 mg/kg), administrado intravenosamente. Após 4 horas, a bexiga dos animais foi irradiada com o laser de potência de 150 mW por 4,82; 9,63 e 19,27 minutos, atingindo uma fluência total de 20, 40 e 80 J/cm<sup>2</sup> respectivamente. Animais do grupo controle (n=16), que não receberam aplicação de nenhum fotossensibilizador, sofreram irradiação somente na dose de 20 J/cm<sup>2</sup>. Nos três demais grupos experimentais (16 ratos em cada), todos os animais receberam ALA (300 mg/kg) intravenosamente e foram irradiados em diferentes fluências. Os animais foram sacrificados 1, 3, 7 e 21 dias após a PDT, e amostras da bexiga foram removidas para posterior análise histológica. Os achados observados nessa análise foram classificados por meio dos seguintes escores: grau 0 – tecido normal; I – inflamação, edema e hemorragia visível na mucosa e submucosa e injúria epitelial < 50%; grau II, a inflamação e a necrose se estendem pela parede (incluindo a camada de músculo) e injúria epitelial > 50%. Os espécimes também foram analisados por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os autores não observaram diferença macroscópica no tecido da bexiga entre o grupo controle e os grupos tratados com 20 J/cm<sup>2</sup> e 40 J/cm<sup>2</sup>. Após a irradiação com 80 J/cm<sup>2</sup>, 2 de 16 animais morreram, e o peritônio adjacente à bexiga necrótica apresentava-se purulento, não havendo, entretanto, danos aos órgãos adjacentes. Em mais 2 animais desse mesmo grupo,

as bexigas encontravam-se flácidas e edemaciadas. Já no grupo irradiado com  $40 \text{ J/cm}^2$ , 3 animais morreram poucas horas após o tratamento e mais 2 animais desse mesmo grupo morreram 2 semanas após o tratamento, sem causa aparente de morte. De maneira similar, no grupo controle, um animal morreu 13 dias após a irradiação. Na análise por MEV,  $20 \text{ J/cm}^2$  sem associação com fotossensibilizador não causou nenhuma alteração nos tecidos. No histológico, observaram apenas três casos de destruição tecidual superficial neste grupo. A presença de maior número de lesões causadas pela PDT foi observada durante os períodos de avaliação de 1-3 dias após a irradiação. Após o tratamento com ALA e laser ( $20 \text{ J/cm}^2$ ), os danos aos tecidos foram transitórios e, após 1 semana, não foi observada nenhuma destruição na camada muscular. Após tratamento com laser a  $40 \text{ J/cm}^2$ , em todos os animais a fase aguda da destruição atingiu a musculatura da bexiga; este dano se estendeu por 7 dias em todos os animais e, após 3 semanas, não havia nenhuma necrose na musculatura ou fibrose em quaisquer dos animais. Nos animais tratados com o laser a  $80 \text{ J/cm}^2$ , a destruição da camada muscular aumentou durante os 3 primeiros dias e, após 3 semanas da realização da terapia, o dano ainda estava presente em metade desses animais. Em ambas as análises, MEV e microscopia de luz, houve uma diferença significativa entre as lesões da bexiga causadas pela PDT (fluência de  $20 \text{ J/cm}^2$ ,  $40 \text{ J/cm}^2$  e  $80 \text{ J/cm}^2$  associada ao ALA) quando comparado ao grupo controle. A correlação entre os achados das duas análises também foi significativa. Baseados nesses resultados, os autores concluíram que a PDT pode ser usada para induzir de maneira segura uma remoção parcial da mucosa da bexiga sem causar efeitos fibróticos na musculatura, quando fluência ( $40 \text{ J/cm}^2$ ) e dose do fotossensibilizador ( $300 \text{ mg/kg}$ ) forem adequados. Estes achados suportam o uso da PDT para tratamento de câncer superficial de bexiga.

Komerik et al.<sup>41</sup>, em 2002, avaliaram os efeitos produzidos pela irradiação de tecidos normais da mucosa bucal de ratos em presença de azul de toluidina (TBO). A biodistribuição do fotossensibilizador (TBO) também foi estudada por meio da microscopia de fluorescência. Ratos Wistar fêmeas foram utilizados, sendo distribuídos em grupos experimentais de 3 animais em cada. Na

PDT foram utilizadas várias concentrações do TBO (25, 50 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ) e luz de laser de 633 nm ( $110 \text{ J/cm}^2$ ,  $170 \text{ J/cm}^2$  e  $340 \text{ J/cm}^2$ ), sendo o tempo de irradiação de 5, 8 e 16 minutos, respectivamente. A potência utilizada foi de 100 mW. Para a fotossensibilização, 60  $\mu\text{l}$  de solução de TBO foi aplicada topicamente na mucosa jugal do lado esquerdo, sendo o lado oposto, não tratado, utilizado como controle. O efeito da luz e do fotossensibilizador também foram estudados isoladamente em animais que não receberam aplicação de TBO, mas foram irradiados pela luz de laser a  $340 \text{ J/cm}^2$  (controle da luz) ou receberam 200  $\mu\text{g/mL}$  de TBO (16 min) sem irradiação (controle do fotossensibilizador). Em outro grupo, os animais não foram irradiados e nem fotossensibilizados, constituindo o grupo controle negativo. Após a PDT, a área tratada foi observada diariamente por avaliação visual durante 3 dias. Posteriormente, os animais foram sacrificados, e espécimes de toda a mucosa jugal foram retirados e processados para avaliação histológica. Na avaliação macroscópica, nenhum dos animais apresentou qualquer alteração na mucosa. Na avaliação microscópica, todas as fibras musculares, tecido conjuntivo e epitelial permaneceram sem alterações em todos os grupos. Nenhum dano aos vasos sanguíneos foi detectado e nenhuma necrose ou inflamação foi observada. Para a realização da microscopia de fluorescência, foi aplicado o TBO na mucosa, nas concentrações já citadas, sem a irradiação do tecido. Após 1 ou 10 minutos da aplicação do TBO (incubação), os animais foram sacrificados e as amostras removidas. A seguir, foram congeladas por meio de banho em isopentano colocado em nitrogênio líquido. Secções de 10  $\mu\text{m}$  foram realizadas por um criostato e armazenadas a  $-70^\circ$ . As lâminas foram então analisadas por meio de um microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera fotográfica. A fluorescência do azul de toluidina foi detectada na banda de 660 nm -700 nm. A autofluorescência dos tecidos também foi avaliada em cortes histológicos do grupo controle. Pelos resultados, foi observado que, após 10 minutos da aplicação de 200  $\mu\text{g/mL}$  do TBO, a fluorescência foi detectada apenas na camada epitelial. No tecido conjuntivo, sinais de fluorescência foram detectados em níveis comparáveis aos do controle. Por outro lado, quando o TBO foi aplicado por 1 minuto, a fluorescência foi detectada apenas na camada de queratina. Sendo

assim, a penetração do fotossensibilizador no tecido depende do tempo de pré-incubação. Além disso, a intensidade da fluorescência observada na mucosa foi dose-dependente, tendo sido maior na concentração de 200 µg/mL, seguida pela concentração de 50 µg/mL e 25 µg/mL. O trabalho concluiu que, apesar de ter sido observada penetração do fotossensibilizador na mucosa, ela não causou nenhum efeito adverso aos tecidos. Isto sugere que a PDT mediada por TBO para tratamento de infecções bucais localizadas é segura.

Wong et al.<sup>73</sup>, em 2003, avaliaram a aplicação tópica do fotossensibilizador clorina e6 mono-L-aspartyl (NeP6) na eliminação de células cancerosas *in vitro* e *in vivo*. Camundongos foram divididos em três grupos experimentais e tratados com 0,1, 1 e 10 mg/kg de fotossensibilizador por diferentes períodos de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 8 e 24 horas). Para a realização dos testes, os animais foram anestesiados, a parede torácica foi depilada e o fotossensibilizador foi aplicado com um algodão embebido em 300 µl. A região foi coberta com uma membrana adesiva de poliuretano, permeável ao ar, e por uma lâmina de alumínio para evitar a exposição à luz e a evaporação do agente. De acordo com os diferentes tempos de avaliação, os animais foram sacrificados e a pele tratada foi removida para posterior análise histológica e de fluorescência. Para estudar a penetração do fotossensibilizador, os músculos adjacentes à pele tratada foram removidos e processados para análise em microscópio de fluorescência. Além disso, três animais adicionais com camada córnea intacta foram tratados com 10 mg/mL de NPe6 por uma hora para testar a influência da integridade dessa camada na absorção tópica. Na análise histológica, as secções da pele do animal confirmaram a ausência da camada córnea após a remoção dos pelos. Além disso, todas as amostras apresentaram nenhuma ou um mínimo de células inflamatórias infiltradas. Já na microscopia de fluorescência, no período de zero hora, as amostras tratadas com diferentes concentrações de fotossensibilizador apresentaram uma fluorescência laranja-avermelhada na epiderme e nos apêndices da pele. A intensidade da fluorescência foi diretamente proporcional à concentração de fotossensibilizador, tornando-se vermelha quando a concentração mais alta foi utilizada. No período de uma hora após a aplicação,

fluorescência laranja-avermelhada brilhante foi detectada em toda a camada da epiderme e da derme. A fluorescência vermelha somente foi detectada nos músculos adjacentes à pele tratada quando a concentração mais alta de fotossensibilizador foi aplicada. A intensidade da fluorescência foi estatisticamente maior quando a camada córnea não estava intacta. Finalmente, segundo os autores, o estudo demonstrou sucesso na aplicação tópica de NPe6 em pele de rato. Além disso, demonstrou que a droga pôde penetrar camadas mais profundas da derme e até mesmo a camada muscular quando a concentração maior de fotossensibilizador foi aplicada. Esses resultados sugerem que a aplicação tópica do NPe6 é possível, pois esta demonstrou ser rápida e ter penetração profunda na pele de camundongo. Isso implica na utilização tópica do NPe6 como um fotossensibilizador na PDT para o tratamento de câncer de pele.

O efeito da PDT em células humanas foi objeto de estudo de Lambrechts et al.<sup>47</sup>, em 2005. Os autores avaliaram a citotoxicidade do tratamento fotodinâmico em fibroblastos humanos por meio da utilização de parâmetros predefinidos em estudos anteriores, os quais demonstraram eficiência para a completa inativação de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. As culturas de fibroblastos dérmicos foram obtidas de tecido humano descartado em cirurgias e tratadas com uma porfirina catiônica em 11 diferentes concentrações, que variaram entre 0,05 µM e 50 µM. Em seguida, as células foram expostas a uma fonte de luz halógena (27 J/cm<sup>2</sup>), lavadas duas vezes e incubadas a 37°C com o meio de cultura específico. A sobrevivência das células foi avaliada por meio do teste de viabilidade colorimétrico MTT após 0, 6 e 18 horas da exposição à PDT. Esses resultados foram comparados com os valores de MTT obtidos com as mesmas células humanas previamente à terapia. Foi demonstrado que a utilização da mesma concentração de porfirina catiônica, que causou inativação de *S. aureus* em estudo anterior, foi suficiente para promover a inativação de 79% dos fibroblastos. No entanto, a inclusão de soro fetal bovino no meio de cultura resultou em uma menor redução da fotoinativação dos fibroblastos. As concentrações do fotossensibilizador necessárias para a inativação de *C. albicans* e *P. aeruginosa* também resultaram na inativação de fibroblastos. Assim, os

autores concluíram que os fibroblastos foram menos susceptíveis à PDT em relação ao *S. aureus*, o que parece sugerir a seletividade dessa terapia em fotoinativar a bactéria. Além disso, concluíram que a utilização da porfirina catiônica como fotossensibilizador para a inativação de *C. albicans* e *C. glabrata* não é indicada em virtude do dano substancial ocorrido nos fibroblastos.

O objetivo do estudo de Paulino et al.<sup>60</sup>, em 2005, foi avaliar o efeito da PDT sobre cepas de *S. mutans* e fibroblastos utilizando diferentes concentrações do FS rose bengal (0-50  $\mu\text{L}$ ), associando um fotopolimerizador (HHP) com diferentes tempos de exposição à luz (0-40 segundos). Segundo os autores, o HHP apresentava as seguintes características: 350-500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  e 400-500 nm. Após a realização dos procedimentos relativos ao cultivo para obtenção do crescimento tanto do *S. mutans* como dos fibroblastos, foram, então, verificados os efeitos citotóxicos da PDT sobre essas células na presença e na ausência de luz. Os resultados microbiológicos foram obtidos pela contagem das colônias (ufc/mL). A viabilidade celular dos fibroblastos foi avaliada em câmara de Neubauer pelo teste de exclusão Trypan Blue. Pelos resultados, foi observado que a aplicação isolada da luz não promoveu efeitos tóxicos, mas o FS demonstrou toxicidade para as células testadas em concentrações acima de 2,5  $\mu\text{M}$ . Sob a exposição de luz e concentrações do fotossensibilizante acima de 0,5  $\mu\text{M}$ , houve completa eliminação de *S. mutans*, e essa mesma condição experimental não ocasionou qualquer efeito citotóxico sobre os fibroblastos. Dessa forma, os autores afirmaram que a fotoativação do FS Rose bengal pelo uso de HHP inativou a bactéria selecionada para esse estudo sem afetar a viabilidade de fibroblastos.

Terapia fotodinâmica (PDT) e diagnóstico por fluorescência de carcinoma de bexiga humana foram estudados por Chin et al.<sup>22</sup>, em 2006, com o objetivo de: avaliar qualitativamente o acúmulo de fluorescência em tumor de bexiga, determinar a distribuição de fluorescência do fotossensibilizador Ce6-PVP, comparar a distribuição da fluorescência do Ce6, Ce6-PVP e Photofrin® e investigar a toxicidade causada pela PDT, de acordo com vários parâmetros (intervalo droga-luz, dose da droga, taxa de fluência da irradiação e fluência total

da irradiação). Para isso, camundongos machos inoculados com células cancerosas foram utilizados no experimento. Uma dose de 5 mg/kg de fotossensibilizador foi administrada intravenosamente e, então, os animais foram anestesiados e o tumor foi exposto para que um sistema de endoscopia fluorescente fosse usado para captação da imagem macroscópica fluorescente do mesmo. Para a análise da distribuição fluorescente na pele dos animais, os três fotossensibilizadores foram injetados na concentração de 5 mg/kg. Imagens fluorescentes foram tiradas da pele dorsal dos camundongos em três diferentes pontos por 42 horas. Para a análise da distribuição do Photofrin®, um método de extração química foi utilizado, pois o endoscópio de fluorescência não era adequado para detectar a fluorescência do Photofrin®. Amostras de tecido da pele dos animais foram colocadas em um solubilizador tecidual e armazenadas a -50°C por 16 horas no escuro. O nível de fluorescência das amostras foi medido por um espectrofluorômetro. Para a realização da PDT, um laser de diodo portátil (665 nm  $\pm$  3 nm) foi usado para irradiação seguindo vários parâmetros (intervalo droga-luz, dose da droga, taxa de fluência da irradiação e fluência total da irradiação) para cada droga. O acúmulo de fotossensibilizador nos tecidos foi observado por meio da sua fluorescência caracterizada por cor vermelha. Quando comparado a imagens de tecido normal, nenhuma fluorescência foi detectada. Quanto à análise da distribuição do fotossensibilizador por meio da imagem fluorescente, foi observado um acúmulo maior da substância nos tecidos tumorais do que nos tecidos normais. Também foi observado que o pico de fotossensibilização ocorreu uma hora após a administração da droga, e que a sua intensidade diminuiu nas 6 horas seguintes. Após 24-42 horas, nenhuma fluorescência do Ce6-PVP foi detectada. Para o Ce6, similar distribuição e detecção de fluorescência foram observadas. Em contraste, o nível de fluorescência do Photofrin® apresentou-se aumentado e detectável 72 horas após a sua administração. Quanto aos efeitos tóxicos, os autores observaram que o Ce6 foi altamente mais tóxico nas doses de luz maiores que 50 J/cm<sup>2</sup> durante uma e 3 horas de iluminação. Em contraste, o Ce6-PVP foi tóxico somente no intervalo de uma hora de iluminação, sendo sua toxicidade atribuída à combinação de alta dose

de luz ( $200 \text{ J/cm}^2$ ) e alta concentração da droga ( $5 \text{ mg/kg}$ ). Houve uma correlação positiva entre o aumento da dose de luz e da droga com a toxicidade no intervalo de uma hora de irradiação. Quando estes dois fotossensibilizadores foram comparados neste intervalo de tempo, o Ce6 demonstrou ser muito mais tóxico que o Ce6-PVP. Concluindo, os autores observaram que o acúmulo do Ce6-PVP foi seletivo, tendo um potencial para detecção de câncer de bexiga por meio da endoscopia fluorescente. Imagem fluorescente foi capaz de identificar a progressão e a margem do tumor em tempo real, provendo uma ferramenta mais sensível e específica de câncer de bexiga.

Ferreira et al.<sup>29</sup>, em 2007, relataram a fotodegradação de três diferentes fotossensibilizadores derivados da hematoporfirina. Neste trabalho utilizou-se o termo fototransformação para descrever o processo de fotodegradação ou fotocclareamento. Esta fotodegradação altera a fluorescência durante a iluminação. A taxa de variação de fluorescência foi normalizada para a absorção da solução e energia do fóton, resultando na determinação do número de fótons necessários para serem absorvidos para induzir a fototransformação do fotossensibilizador. O parâmetro para a taxa de degradação das moléculas, a taxa de fluência do fóton e as propriedades ópticas da solução, nos permitem determinar a estabilidade do fotossensibilizador em solução durante iluminação. Os resultados mostraram que a ordem de susceptibilidade para a taxa de fototransformação foi semelhante entre o Photofrin® e o Photogem®, mas inferior à do Photosan®. Esta diferença na taxa de fototransformação para o Photosan® pode ser explicada pela alta proporção de agregados em solução que inibem o processo de foto-oxidativo que impedem a formação do oxigênio singleto. Os autores admitem a hipótese de que exista uma correlação entre taxa de fototransformação e a eficácia fotodinâmica que é regida pela formação de oxigênio singleto responsável pelas reações mais relevantes para a indução fotodinâmica de morte celular.

Como a luz vermelha pode causar danos térmicos aos tecidos subjacentes e circundantes, Bouillaguet et al.<sup>12</sup>, em 2008, testaram a hipótese de que a luz azul ( $380 \text{ nm}$ - $500 \text{ nm}$ ) pode também induzir a formação de espécies

reativas de oxigênio sem, no entanto, causar danos às células dos mamíferos. Para isso, monócitos THP1 foram expostos à concentração de 10  $\mu\text{M}$  de quatro fotossensibilizadores (clorina e6, pheophorbide-a, pheophorbide-a-PLL, e riboflavina), por 30 minutos, antes da ativação pela luz azul na intensidade de 27  $\text{J}/\text{cm}^2$  por 60 segundos. Após a irradiação, a quantidade de espécies reativas de oxigênio foi mensurada usando a técnica diacetato de dihidrofluoresceína, e a citotoxicidade foi determinada pela atividade mitocondrial avaliada pelo teste de MTT. Os autores observaram que todos os fotossensibilizadores produziram níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), que foram dependentes tanto da presença do fotossensibilizador quanto da exposição à luz. A riboflavina e a pheophorbide-a- PLL produziram os maiores níveis de EROs. Todos os fotossensibilizadores, exceto a riboflavina, exibiram citotoxicidade na concentração acima de 10  $\mu\text{M}$  e todos, exceto a pheophorbide-a-PLL, foram mais tóxicos após a exposição à luz azul. Esse estudo demonstra a possibilidade de uso da luz azul com fotossensibilizadores para produzir espécies reativas de oxigênio e, dessa forma, ser usada na desinfecção endodôntica.

O papel desenvolvido pelo oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) na terapia fotodinâmica não está totalmente elucidado. No estudo de Jiménez-Banzo et al.<sup>38</sup>, em 2008, foram relatadas a cinética da formação, a difusão e a decomposição do  $^1\text{O}_2$  dentro de fibroblastos de derme humana. O efeito dos fotossensibilizadores (TMPyP e TPPS) na ausência de luz foi verificado pelo teste MTT. As células foram semeadas em placas de 96 compartimentos contendo concentrações crescentes dos FSs (1  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ) por diferentes períodos de incubação (20 minutos a 24 horas). A quantificação dos FSs no interior da célula foi realizada por meio da espectrofotometria de fluorescência e a imagem do sítio celular onde se encontravam por meio da microscopia de fluorescência. A concentração de 100  $\mu\text{m}$  dos FSs com um período de incubação de 16 horas foi o melhor parâmetro entre a viabilidade celular e a concentração do fotossensibilizante no meio de cultivo. A localização intracelular de cada FS dependeu do tipo celular, tendo o TMPyP localizado-se preferencialmente no núcleo e o TPPS no lisossomo. Ao evidenciar a fluorescência emitida pelo  $^1\text{O}_2$  e de seu precursor em estado tripleto,

os autores encontraram que a cinética da formação do  $^1\text{O}_2$  e sua deterioração são extremamente dependentes do sítio celular que o gerou. O  $^1\text{O}_2$  fotossintetizado no núcleo foi capaz de sair do interior das células por causa da sua proximidade com a membrana citoplasmática. Já o  $^1\text{O}_2$  gerado no lisossomo se limitou ao interior da célula. Além disso, ambos os  $^1\text{O}_2$  formados apresentaram tempo de vida em microssegundos e sofreram diversas interações biomoleculares dentro das organelas que os produzem. Os autores concluíram que o dano produzido pelo oxigênio singlete foi altamente localizado e que seu curto tempo de vida foi suficiente para que se difundisse por longas distâncias entre as células.

Morton et al.<sup>56</sup>, em 2008, relatou, em uma revisão de literatura, os possíveis efeitos adversos causados pela PDT. Segundo aos autores, o efeito agudo mais comum e desconfortante para os pacientes é a sensação dolorosa de queimação que normalmente ocorre durante a exposição à luz, podendo persistir após a exposição. Eles também afirmaram que a dor é restrita à região iluminada graças à estimulação de nervos ou danos aos tecidos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROS), podendo ser agravada pela hipertermia. Além da dor, relataram que a PDT tem uma baixa morbidade e que poucos efeitos adversos agudos são gerados. Uma resposta inflamatória aguda pode ser observada, seguida, algumas vezes, de erosão e formação de crosta. Entretanto, foi observado que a remissão desses efeitos normalmente ocorre após 2 semanas e ocasionalmente em 6 semanas. Pesquisas recentes têm demonstrado que o eritema e o edema observados imediatamente após a irradiação são atribuídos à resposta na forma de urticária relacionada à dose e mediadas por histamina, podendo ocorrer em algum grau em todos os pacientes. Estudos in vivo sobre o efeito da PDT mediada pela hematoporfirina em pele de camundongo mostraram que a produção de uma resposta fibrosa parece não ocorrer por causa da exposição à hematoporfirina, mas sim da exposição à luz, responsável por causar uma hipertermia. Além disso, os autores relataram a ocorrência de uma hipo ou hiperpigmentação após a PDT, sendo a hiperpigmentação dependente da dose de fotossensibilizador, ocorrendo após 48-72 horas e aumentando durante as 2 semanas seguintes ao tratamento. Em tratamentos dermatológicos de lesões de

pele, pode-se observar como efeito colateral a queda de cabelo. Os autores também relataram que o risco carcinogênico da PDT é baixo. Outro aspecto abordado refere-se à utilização de luz azul na PDT, pois esta possui potencial para causar danos irreversíveis aos neurotransmissores da mácula, ao contrário da luz vermelha, que não é fototóxica à retina. Finalmente, os autores concluíram que a dor causada pela PDT é comum durante a exposição à luz, o que é bem tolerado, ocorrendo poucos efeitos adversos agudos sérios.

#### *2.4 PDT e fontes de luz*

A crescente utilização de lasers de baixa intensidade em terapias no ramo da medicina e de outras especialidades tem gerado uma necessidade de avaliação da propagação da luz, em seus diversos comprimentos de onda, nos tecidos biológicos. Por isso, Melo et al.<sup>53</sup>, em 2001, realizaram um estudo cujo objetivo foi determinar as propriedades ópticas de diferentes tecidos de rato, considerando a variação da intensidade da luz e sua distribuição. A luz do laser é normalmente transmitida por meio de fibras, e o feixe de luz chega aos tecidos sem divergências. Uma vez em contato com o tecido, dois mecanismos principais ocorrem: absorção e espalhamento. A absorção depende da constituição do tecido e aumenta com a frequência da luz convergindo em energia para a vibração e rotação molecular. Espalhamento está, normalmente, relacionado a geometria, tamanho das moléculas e não-homogeneidade dos tecidos. Pode ser um tipo de difusão da luz, como a penetração do produto ao longo do tecido. Além disso, o espalhamento tem a propriedade de destruir o feixe de luz, criando zonas de iluminação espalhadas isotropicamente no tecido. Nesse estudo, os autores não identificaram separadamente o mecanismo de absorção e espalhamento, mas caracterizaram, por meio de imagem, as regiões do tecido iluminadas, descritas como zonas de igual intensidade. Nesta imagem, eles definiram um coeficiente efetivo que permite descrever a redução da intensidade e a função da penetração profunda. Para isso, um pedaço de tecido de rato, com 3,5 mm de espessura e 25

mm X 25 mm, foi colocado entre duas lâminas microscópicas. As amostras de tecido foram provenientes de rim, fígado sadio, fígado cirrótico, musculatura abdominal e parede abdominal de rato. E um laser de argônio com comprimento de onda desejado (630 nm e 514 nm), com feixe colimado através de espelhos, irradiou sobre o tecido entre as duas placas de vidro. Uma câmera CCD colocada no tecido registrou a imagem formada pelo espalhamento da luz. A intensidade da luz também foi registrada. Todos os tecidos observados apresentaram espalhamento isotrópico da luz em todas as direções. Observaram que a intensidade da luz irradiada se distribuiu isotropicamente e criou zonas de igual intensidade. Considerando a aplicação da luz com comprimento de onda de 630 nm, a penetração mais alta foi obtida na amostra proveniente da parede abdominal (17 mm), demonstrando que a aplicação do laser pode realizada externamente, principalmente se o laser estiver próximo ao abdômen. Esses resultados são úteis para muitas aplicações do laser desde a bioestimulação à fototerapia.

O objetivo do estudo de Fontana et al.<sup>30</sup>, em 2004, foi avaliar a variação da temperatura induzida por um laser de diodo em tecido periodontal, determinando os parâmetros térmicos seguros da aplicação do laser de diodo em bolsas periodontais para prevenir danos irreversíveis aos tecidos orais. Inicialmente, foi realizado um estudo in vitro e, posteriormente, um estudo in vivo utilizando os mesmos parâmetros. No estudo in vitro, amostras de tecido mole oral de ratos Wistar foram usadas para a investigação. O tecido da bochecha foi removido e fatias de 1 mm, 2 mm e 3 mm foram obtidas. Uma camada de mucosa jugal contendo 10 mm de espessura foi fixada em uma placa de acrílico, previamente preparada e posicionada em frente a um termistor, que estava conectado a um computador. A irradiação do laser foi realizada em quatro diferentes potências (600, 800, 1000, 1200 mW), com o feixe de luz incidindo o tecido perpendicularmente durante 3 segundos. O experimento foi repetido 20 vezes para cada potência empregada. Os autores observaram que a temperatura aumentou com a potência do laser em todas as amostras estudadas, até 800 mW ou depois que uma saturação ocorreu, existindo um equilíbrio entre a energia empregada e a dissipação térmica no tecido. Como se esperava, o aumento da

temperatura observado para as amostras mais finas de tecido foi maior do que o observado nas amostras mais espessas. Entretanto, os valores de variação de temperatura obtidos a partir das amostras mais finas não foram suficientes para induzir danos irreversíveis ao tecido dentário ao redor. Além disso, os resultados demonstraram que, para tecidos mais espessos que 1,3 mm, a variação de temperatura deverá estar abaixo dos valores críticos para qualquer potência, quando injúrias aos tecidos forem consideradas. Para a realização do estudo in vivo, cinco ratos machos Wistar foram utilizados. Para a avaliação da temperatura no tecido ósseo, um termistor foi colocado em uma cavidade preparada no osso alveolar da mandíbula. E, para avaliar a variação de temperatura na bolsa periodontal, outro termistor foi colocado paralelo ao primeiro molar. Neste estudo in vivo, para a aplicação do laser, foram utilizados os mesmos parâmetros do estudo in vitro. Entretanto, foram utilizados dois diferentes tempos de irradiação, 3 e 9 segundos. A fibra do laser foi posicionada no interior do sulco periodontal, o mais próximo possível do termistor. Os dados foram obtidos a partir de 15 repetições do experimento. Os autores observaram que a temperatura mais alta foi registrada quando potência de 1.200 mW por 9 segundos foi utilizada, aumentando aproximadamente 11°C. Entretanto, os autores afirmaram que esse aumento de temperatura ainda é considerado seguro, estando próximo ao limite térmico passível de causar danos. Os resultados da variação térmica do osso foram similares ao anterior, em que o valor mais crítico de temperatura atingida ocorreu quando uma potência de 1200 mW por 9 segundos foi aplicada. Porém, nenhuma injúria também ocorreu, visto que, para isso, seria necessário um aumento de temperatura maior do que 10°C. Portanto, baseados nesses resultados, os autores puderam afirmar que o tempo e a potência testados nesse estudo não foram capazes de induzir danos ao tecido periodontal e ao osso. Dessa forma, esse estudo contribuiu para estabelecer parâmetros seguros de aplicação de laser em bolsas periodontais para redução bacteriana, sem causar danos irreversíveis aos tecidos.

Novas fontes de luz têm sido estudadas para sua utilização na PDT. O LED, por apresentar inúmeras vantagens, tem sido uma delas. Para comprovar a

eficácia desse sistema de luz na PDT para tratamento de queratose actínica, Babilas et al.<sup>7</sup>, em 2008, realizaram um estudo comparando-a com uma outra fonte de luz (lâmpada de alta pressão), cuja eficácia já foi estabelecida. Além disso, os autores avaliaram a taxa de remissão da queratose actínica, presença ou não de dor, satisfação do paciente e a cosmética. Para a realização desse estudo, 17 pacientes, entre eles homens e mulheres de 47-88 anos apresentando queratose actínica foram selecionados. Todas elas localizavam-se na face e apresentavam o mesmo grau de severidade. Previamente ao tratamento, as lesões foram classificadas em escores, fotografadas e curetadas para remoção de crostas. Posteriormente, o fotossensibilizador MAL foi aplicado na forma de pomada sobre as lesões, abrangendo 5 mm do tecido normal ao redor. Após o tempo de incubação de  $187 \pm 14$  minutos, o fotossensibilizador foi removido, a região tratada foi irradiada com a lâmpada de alta pressão, com dose de  $100 \text{ J/cm}^2$  e intensidade de  $120 \text{ mW/cm}^2$ , e as lesões contralaterais foram iluminadas pelo LED, com dose de  $40 \text{ J/cm}^2$  e intensidade de  $120 \text{ mW/cm}^2$ . Acompanhamento foi realizado durante 2 semanas, 3 meses e 6 meses após a PDT, sendo as lesões fotografadas e a resposta ao tratamento avaliada em cura total, parcial ou ausência de alterações na lesão. Efeitos colaterais, como reação local a fototoxicidade, que possam ter sido causados pela PDT, ou dor, edema, eritema sensação de queimação, prurido, formação de crostas, infecção local, erosão, hiper e hipopigmentação foram registrados após a terapia com luz e em cada sessão de acompanhamento. A pele sadia ao redor das lesões, também submetida o tratamento, foi examinada antes da irradiação e após 3 e 6 meses. Após a PDT e após 3 e 6 meses de acompanhamento, a infiltração da queratose actínica foi reduzida, e nenhuma lesão apresentou-se com infiltração ou queratose espessas. A taxa de remissão das lesões após o tratamento, após 3 meses, foi de 81,8% para os pacientes tratados com lâmpada de alta pressão e de 80% para aqueles tratados com LED. O grau de infiltração da queratose actínica foi semelhante para ambas as fontes de luz, não havendo diferença estatística significativa. A PDT causou efeitos colaterais em todos os pacientes com o emprego de ambas as fontes de luz. Todos os pacientes relataram sensação de queimação durante e após a irradiação.

Eritema e formação de crostas foram observadas 2-4 dias após a PDT em todas as regiões tratadas com ambas as fontes de luz. Após 3 e 6 meses, leve eritema, hiper ou hipopigmentação puderam ser observados nas regiões tratadas, mas nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada. Também não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as duas fontes de luz quanto ao aspecto da pele sadia ao redor das lesões, quanto à cosmética e à satisfação dos pacientes em todos os períodos de avaliação (3 e 6 meses). Dessa forma, os autores concluíram com o presente estudo que a PDT, utilizando o MAL associado ao LED ou à lâmpada de alta pressão, apresentou eficácia equivalente no tratamento da queratose actínica. Além disso, ambos os tratamentos apresentaram sensação dolorosa similar. Sendo assim, a PDT com LED é uma alternativa eficaz no tratamento dessa doença, já que as taxas de remissão das lesões e os resultados cosméticos não foram inferiores aos da PDT utilizando a lâmpada de alta pressão.

Tem sido proposto que a produção de EROs após irradiação com baixa dose de luz é o primeiro passo para a fotobiomodulação. Entretanto, altos níveis de EROs são tóxicos tanto para células quanto para bactérias. Por isso, Lipovsky et al.<sup>49</sup>, em 2008, avaliaram a fototoxicidade de luz visível de comprimento de onda entre 400 nm-800 nm e uma dose de luz de 120 J/cm<sup>2</sup> na sobrevivência de diversas bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, e *Serratia marcescens*. Essas bactérias foram escolhidas por causa da sua alta prevalência em feridas infectadas. Após 24 horas, 1 mL de suspensão bacteriana foi exposto à iluminação com a fonte de luz branca (400 mW/cm<sup>2</sup>) durante 5 minutos (120 J/cm<sup>2</sup>). Suspensões bacterianas não expostas à luz serviram de controle negativo. A sobrevivência das células bacterianas foi monitorada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias antes e depois da irradiação. Além disso, foi realizada a detecção de EROs pela espectroscopia de ressonância magnética, e a variação da temperatura durante a iluminação foi mensurada por um termistor. A irradiação com luz branca em uma dose de 120 J/cm<sup>2</sup> causou redução na viabilidade bacteriana de 62%, 83%, e 56% para *E. coli*, *S. aureus* e *S. marcescens*,

respectivamente. Entretanto, nenhuma redução na contagem de colônias da *P. aeruginosa* foi observada. A redução na viabilidade das células bacterianas estava diretamente relacionada à formação de EROs pelas mesmas. A máxima elevação de temperatura foi de 4°C sob uma dose de 240 J/cm<sup>2</sup>. Esses resultados sugeriram que a redução na viabilidade durante a iluminação não foi resultante do aquecimento do meio de cultura e sim do efeito fototóxico gerado pela presença das espécies reativas de oxigênio. Os autores concluíram que a luz visível em altas intensidades pode causar morte bacteriana. Dessa forma, a iluminação de ferimentos infectados, com alta fluência e alta intensidade, pode reduzir o risco de infecção, previamente à iluminação, com baixas doses utilizadas para estimular o processo de cicatrização.

Gritsch et al.<sup>32</sup>, em 2008, avaliaram os efeitos biológicos da luz azul emitida por duas fontes de luz (arco de plasma e LED) utilizadas na fotoativação de materiais odontológicos sobre cultura de fibroblastos gengivais. As células foram obtidas de biopsia de tecidos gengivais saudáveis e cultivadas em placas de 24 compartimentos para a realização do estudo. Antes da irradiação, a intensidade da luz e o aumento de temperatura foram respectivamente mensurados com um radiômetro e um termistor. As células foram expostas à irradiação pelas duas fontes de luz por um tempo estimado para polimerização do adesivo e para fotoativação de três camadas de resina composta a 9 mm de distância. A irradiação com o arco de plasma (1500 mW/cm<sup>2</sup>) durou 15 segundos, sendo 3 segundos para a polimerização do adesivo e os demais 12 segundos para a polimerização da resina. O tempo de irradiação com o LED (650 a 1100 mW/cm<sup>2</sup>) foi de 100 segundos, sendo 20 segundos para o adesivo e os demais para a resina. A resposta celular após iluminação com luz azul foi verificada pela avaliação das alterações morfológicas por meio da microscopia eletrônica de varredura e pela avaliação da atividade mitocondrial por meio do teste de MTT. O teste de MTT foi realizado 2, 24, 48 e 72 horas após a irradiação. A intensidade de luz que chegou a cultura celular foi de 488±42 mW/cm<sup>2</sup> para o arco de plasma e de 61±5 to 140±16 mW/cm<sup>2</sup> para o LED. O maior aumento de temperatura medido pelo termistor foi de 0,5° e 3,5°C para o arco de plasma e o LED respectivamente. Os

resultados não mostraram nenhuma diferença na morfologia das células irradiadas quando comparadas às não irradiadas. Entretanto, as células expostas à luz azul apresentaram um aumento na atividade mitocondrial quando comparadas ao controle. O arco de plasma aumentou a atividade mitocondrial em 45%, enquanto o LED em apenas 9% após 72 horas da irradiação. Os autores concluíram que a viabilidade celular foi mais estimulada por uma fonte de luz de alta intensidade por um curto período de irradiação do que uma fonte de luz de baixa intensidade por longo período de irradiação. Além disso, o possível mecanismo para esse aumento da viabilidade celular foi decorrente da estimulação da função mitocondrial em virtude do estresse oxidativo provocado pela exposição à luz azul.

Taoufik et al.<sup>68</sup>, em 2008, investigaram o efeito da exposição à luz azul proveniente de diferentes fontes de luz (luz halógena, LED e arco de plasma) na proliferação de fibroblastos gengivais. As células obtidas de cultura primária foram semeadas em placas de 48 compartimentos. Após um período de 24 horas, o meio foi aspirado, uma solução tampão fosfatada foi colocada e as células submetidas à irradiação. Os fibroblastos foram expostos à luz halógena ( $750 \text{ mW/cm}^2$ ) por 240 segundos, ao LED ( $900 \text{ mW/cm}^2$ ) por 180 segundos e ao arco de plasma ( $2.000 \text{ mW/cm}^2$ ) por 120 segundos. Esses tempos simulavam o tempo clínico necessário para a adesão de um braquete ortodôntico. O efeito da luz azul na síntese de DNA e na proliferação celular foi estimado pela incorporação da 3H-timidina e pela contagem celular direta respectivamente. Além disso, o possível envolvimento do estresse oxidativo no efeito da irradiação com luz azul foi avaliado utilizando o N-acetil-cisteína. E, finalmente, quebras na dupla fita do DNA foram avaliadas por imunofluorescência. O efeito imediato da irradiação na proliferação dos fibroblastos foi avaliado pela síntese de DNA, a qual não apresentou nenhum efeito inibitório depois da exposição à luz. Os efeitos a longo prazo da irradiação foram examinados pela contagem do número de células durante uma semana. As células expostas às três fontes de luz apresentaram uma inibição na proliferação celular quando comparadas ao controle. Esse resultado não foi atribuído à quebra da dupla fita de DNA e não foi anulado pela presença

da N-acetil-cisteína, um inibidor de radicais livres. Os autores concluíram que houve uma inibição moderada na proliferação dos fibroblastos gengivais quando expostos à luz azul e que mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo exato desse efeito inibitório.



# ***PROPOSIÇÃO***



### ***3 Proposição***

O presente estudo teve por objetivo avaliar o possível efeito tóxico da PDT em mucosa palatina de ratos, utilizando o Photogem<sup>®</sup> associado à irradiação com LED azul, por meio da análise macroscópica e da microscópica, após diferentes períodos de avaliação. Além disso, a biodistribuição do Photogem<sup>®</sup> no interior do tecido foi determinada por microscopia de fluorescência.



# ***MATERIAL E MÉTODO***



## ***4 Material e método***

O protocolo de pesquisa apresentado a seguir foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Apêndice 1).

### *4.1 Animais*

Foram utilizados 101 ratos (*Rattus Norvegicus Albinus Holtzman*), com peso variando entre 350 e 400 gramas, provenientes do Biotério UNESP - Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais devidamente identificadas no biotério do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP e tiveram acesso livre a comida e água.

### *4.2 Aplicação da Terapia Fotodinâmica*

#### *4.2.1 Preparo do agente fotossensibilizador e da fonte de luz*

A fotossensibilização da mucosa palatina dos animais foi realizada com o agente fotossensibilizador Photogem<sup>®</sup> (Limited Liability Company) (Figura 1). Esse FS é produzido a partir da hematoporfirina, uma substância presente no sangue de animais e de humanos, sendo fabricado na Rússia – Moscou e aprovado pelo *Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation* sob autorização 42-3199-98. A utilização desse agente é aprovada para uso em humanos pelo Comitê Estatal de Farmacologia da Federação Russa e também pela ANVISA (data 8/4/2003; processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4). Apresenta-se na forma de um pó violeta escuro, comercializado em frascos esterilizados contendo 200 mg do pó. Em solução, o Photogem<sup>®</sup> apresenta uma banda característica de absorção com um pico máximo em 369 nm, e outras quatro bandas menores (Figura 2).



FIGURA 1 – Embalagem comercial do fotossensibilizador Photogem<sup>®</sup>.

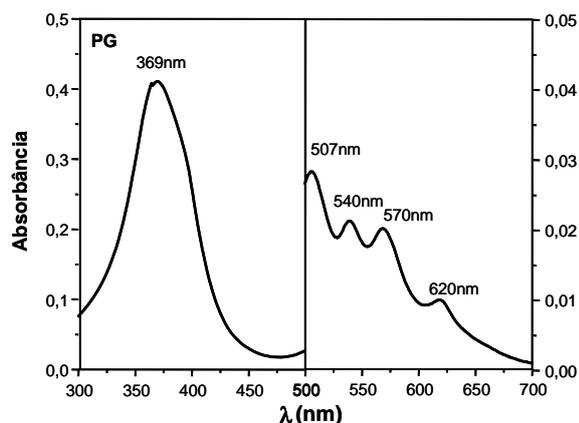


FIGURA 2 – Espectro de absorção óptica do Photogem<sup>®</sup>.

Para a realização deste experimento, alíquotas de 5 mg do FS foram fornecidas pelo Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos – USP (IFSC), e armazenadas em microtubos de plástico envolvidos em papel alumínio para proteção da luz à temperatura de 4°C. Previamente a sua utilização, foi realizado o preparo da solução desse medicamento pela dissolução do pó em solução salina estéril.

Inicialmente, uma alíquota de 1 mL de solução salina estéril foi pipetada no interior de um microtubo contendo 5 mg de pó de Photogem<sup>®</sup>. O microtubo foi colocado em agitador de tubos e agitado vigorosamente por 1 minuto para a completa dissolução do pó. Em seguida, a solução resultante foi removida do microtubo e transferida para um tubo de ensaio contendo 4 mL de solução salina estéril, e o tubo foi agitado por um minuto para homogeneizar a solução fotossensibilizadora. Dessa forma, cada alíquota de 5 mg de pó foi dissolvida em 5 mL de solução salina estéril, obtendo-se uma solução estoque de

fotossensibilizador na concentração de 1.000 mg/L. Essa solução foi armazenada em tubos de ensaio envolvidos em papel alumínio, identificados e datados, à temperatura de 4°C (Figura 3). É importante ressaltar que o Photogem<sup>®</sup> é uma substância fotossensível, isto é, seus componentes podem sofrer degradação quando exposto à luz. Assim, a manipulação desse medicamento durante o preparo da solução estoque e posteriormente, na fotossensibilização da mucosa dos animais, foi realizada em ambiente escuro.

A toxicidade da Terapia Fotodinâmica com Photogem<sup>®</sup> foi avaliada utilizando-se duas concentrações desse agente: 500 mg/L e 1.000 mg/L. Para isso, alíquotas da solução estoque de Photogem<sup>®</sup> (1000 mg/L) foram diluídas em solução salina estéril, até a obtenção da concentração de 500 mg/L. O preparo dessa concentração a partir da solução estoque de Photogem<sup>®</sup> foi sempre realizado instantes antes do seu uso, seguindo uma proporção fixa de solução salina/solução estoque. As soluções foram preparadas em microtubos envolvidos em papel alumínio e agitadas vigorosamente por 1 minuto para sua completa homogeneização.



FIGURA 3 – Tubo de ensaio contendo a solução estoque de Photogem<sup>®</sup> (1.000 mg/L).

A fonte de luz empregada na iluminação das amostras deste estudo foi um aparelho constituído de lâmpadas do tipo LED azul (LED, LXHL-PR09, Luxeon<sup>®</sup> III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California, USA) distribuídas no interior do sistema óptico, sendo ele idealizado e desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) (Figura 4). Este aparelho constituía-se de uma ponta cuja extremidade (diâmetro de 5 mm) apresentava duas fontes de luz LED ao longo de sua extensão e possuía intensidade (potência de saída) constante de 120 mW/cm<sup>2</sup> e potência de 200 mW. A luz emitida se encontrava numa estreita faixa do espectro fotomagnético, predominantemente em 455 nm, na qual o FS empregado apresenta alta capacidade de absorção de luz. Um dosímetro (Figura 5) foi utilizado para que se pudesse verificar se a intensidade (potência de saída) do protótipo de LED permaneceu constante ao longo de todo o experimento. O conhecimento da potência de saída do aparelho utilizado é um fator importante a ser considerado, pois esse valor, juntamente com o tempo de iluminação, determina a quantidade de energia aplicada na amostra irradiada. Essa quantidade de energia é denominada fluência ou dose de luz, e é expressa pela energia por área (J/cm<sup>2</sup>). A fórmula empregada para o cálculo da dose é a seguinte:

$$\text{Dose(J/cm}^2\text{)} = \text{Potência(W/cm}^2\text{)} \times \text{Tempo(s)}.$$



FIGURA 4 – *PROTÓTIPO DE LED* - Aparelho constituído de LEDs utilizado para iluminação das amostras.



FIGURA 5 – Verificação da intensidade de luz emitida pelo protótipo de LED com o auxílio de um dosímetro.

Dessa forma, para a avaliação da toxicidade da PDT uma dose de luz de 144 J/cm<sup>2</sup> foi utilizada.

#### 4.2.2 Fotossensibilização

Para a realização da Terapia Fotodinâmica, os animais foram aleatoriamente divididos em 24 grupos e distribuídos como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição dos grupos experimentais e controle

TRATAMENTOS	PERÍODOS DE AVALIAÇÃO PÓS-TRATAMENTO			
	Imediatamente (n = 25)	Após 1 dia (n = 25)	Após 3 dias (n = 25)	Após 7 dias (n = 25)
<b>Grupo 1 (P-L-)</b> (controle)	2	2	2	2
<b>Grupo 2 (P+L-, 500)</b> (Photogem 500 mg/L)	5	5	5	5
<b>Grupo 3 (P+L+, 500)</b> (Photogem 500 mg/L + Luz)	5	5	5	5
<b>Grupo 4 (P+L-,1000)</b> (Photogem 1000mg/L)	5	5	5	5
<b>Grupo 5 (P+L+,1000)</b> (Photogem 1000 mg/L + Luz)	5	5	5	5
<b>Grupo 6 (P-L+)</b> (Luz)	3	3	3	3

Previamente à realização dos tratamentos preestabelecidos, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal do anestésico geral Quetamina\* na dosagem de 0,16 mL/100g de peso corpóreo associado ao

\* Ketamina<sup>®</sup> - 10 mL – uso veterinário. Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.

relaxante muscular e analgésico Cloridrato de Xylazina<sup>1</sup> na dosagem de 0,04 mL/100g de peso corpóreo (Figura 6). Para a administração da anestesia foi utilizada seringa de insulina (1 mL). Os animais foram colocados em uma mesa cirúrgica na qual havia um dispositivo que permitia a abertura bucal dos animais de maneira que o LED pudesse ser posicionado em contato com a mucosa do palato (Figura 7). Os ratos tiveram a mucosa palatina tratada com fotossensibilizador, sendo este aplicado topicamente com o auxílio de uma micropipeta\*\*, em uma das duas concentrações (Figura 8). Para os Grupos 3 e 5, após os 30 minutos de aplicação tópica do Photogem e com a ponta do aparelho protegida com filme de PVC transparente\*\*\*, a mucosa foi irradiada pelo protótipo de LED durante 20 minutos, correspondendo à dose de 144 J/cm<sup>2</sup> (Figura 9). Como o aparelho utilizado neste trabalho constituía-se de uma ponta cuja extremidade apresentava duas fontes de luz LED ao longo de sua extensão, toda a superfície da mucosa palatina dos animais foi exposta à luz. O efeito isolado da luz e do fotossensibilizador também foi avaliado. Para isso, animais adicionais foram submetidos somente à irradiação com LED (144 J/cm<sup>2</sup>) ou apenas à aplicação das diferentes concentrações do fotossensibilizador. No Grupo 1 (controle), solução salina estéril foi aplicada sobre a mucosa palatina. Então, a ponta ativa do LED azul foi posicionada, porém o aparelho não foi ativado. Assim, este grupo experimental foi considerado como “sem tratamento”.

Um animal adicional foi utilizado para medição da variação de temperatura na mucosa (mapeamento térmico) durante a irradiação com LED. Uma incisão foi realizada na região mediana da mucosa do palato e um termistor de alta precisão\*\*\*\* (Figura 10) foi inserido entre a mucosa e o osso subjacente e, posteriormente, a mucosa foi irradiada pelo LED (Figura 11). O termistor estava conectado a um multímetro digital\* que registrava os valores de resistência elétrica ao longo do tempo. Valores consecutivos de temperatura foram

---

\*Dopaser<sup>®</sup> - 10 mL – uso veterinário. Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.

\*\* Boeco, Hamburg, Germany.

\*\*\* Magipack<sup>®</sup>.

\*\*\*\* Modelo 120-202 EAJ, FenWal Eletronic, Milford, MA.

\*Digitest DT 105, Alfatronic S/A.

registrados durante os 20 minutos de irradiação, seguindo o mesmo protocolo utilizado durante a PDT, sendo os dados obtidos representados em gráfico.



FIGURA 6 – Injeção intraperitoneal do agente quimioterápico.



FIGURA 7 – Animal posicionado na mesa cirúrgica previamente à terapia.

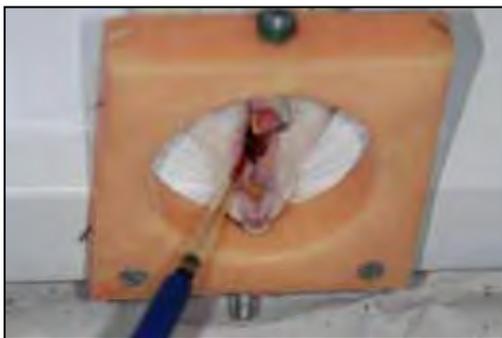


FIGURA 8 – Aplicação do Photogem na mucosa palatina.



FIGURA 9 – Aplicação do LED na mucosa palatina.



FIGURA 10 – Termístor digital de alta precisão.

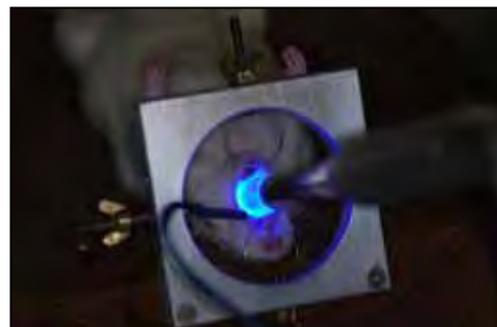


FIGURA 11 – LED e termístor em posição na região central da mucosa.

Todos os procedimentos foram realizados adotando-se as medidas de proteção necessárias, tais como utilização de jaleco, gorro, máscara, luva e óculos de proteção.

Após os tratamentos, realizou-se análise macroscópica e microscópica, por microscopia de luz e de fluorescência, segundo quatro períodos de avaliação, como pode ser observado na Tabela 1. A avaliação da mucosa dos ratos após tais períodos teve por objetivo determinar os efeitos da PDT em curto prazo e a biodistribuição do FS na mucosa do animal ao longo desse período<sup>41</sup>.

#### *4.3 Avaliação macroscópica da mucosa*

Após anestesia e previamente ao sacrifício, a mucosa foi fotografada com máquina digital\*, utilizando-se parâmetros padronizados, para que se realizasse uma descrição macroscópica das possíveis anormalidades ocorridas no tecido após a PDT.

A avaliação macroscópica foi realizada a partir da observação das fotografias obtidas, que foram previamente embaralhadas, codificadas e analisadas de maneira cega por um único examinador. Essa análise foi realizada duas vezes pelo mesmo examinador, com intervalo de um mês, para que houvesse uma correta calibração. Cada fotografia foi classificada por meio de uma escala de 6 pontos (Sonis et al., 2000)<sup>67</sup>, mostrada na Tabela 2.

---

\* Nikon SLR camera D40 X, 10.2 mega pixel, Tokyo, Japan.

Tabela 2 - Classificação clínica

Classificação da inflamação	Características Clínicas da mucosa
Grau 0	Mucosa saudável
Grau 1	Presença de eritema leve, sem sinais de erosão
Grau 2	Eritema severo, vasodilatação e erosão superficial
Grau 3	Formação de úlceras em um ou mais locais, restritas a 25% da superfície total
Grau 4	Formação de úlceras abrangendo 50% da região
Grau 5	Completa ulceração da mucosa e perda de elasticidade

#### 4.4 Avaliação histológica da mucosa

Após a realização das fotografias, os animais foram sacrificados por meio de uma sobredose do anestésico quetamina associado ao cloridrato de xilazina, administrado intraperitonealmente. Em seguida, o palato foi removido (Figura 12) e dividido em duas metades (Figura 13 e 14), sendo uma destinada à microscopia de luz e a outra à microscopia de fluorescência.



FIGURA 12 – Palato do rato após sua remoção.



FIGURA 13 – Palato do rato sendo dividido com o auxílio de um bisturi.



FIGURA 14 – Palato do rato após ser dividido em duas metades.

As amostras destinadas à microscopia óptica foram imediatamente fixadas em formol tamponado a 10% (pH 7,4) por 72 horas e preparadas para exame histológico. Para tal, as peças histológicas obtidas da mucosa palatina dos animais foram armazenadas em compartimentos identificados, e posteriormente, submetidas ao seguinte processamento laboratorial de rotina:

- 1) Fase de desidratação por trocas consecutivas de álcoois em concentrações crescentes:

- álcool 70% por 1 hora;
  - álcool 90% por 1 hora;
  - álcool absoluto, 6 trocas de 1 em 1 hora.
- 2) Fase de diafanização:
- álcool-xilol por 30 minutos;
  - xilol puro por 30 minutos;
  - novo xilol puro por mais 30 minutos.
- 3) Fase de embebição em parafina histológica a 58°C:
- parafina líquida por 3 horas;
  - nova parafina líquida por mais 3 horas.

Após o processamento laboratorial, as amostras foram incluídas em fôrmas de papel contendo parafina líquida. Após seu endurecimento, as fôrmas foram removidas e, com o auxílio de navalhas descartáveis\* foram obtidos blocos de parafina que continham as peças incluídas centralmente. Esses blocos foram fixados em suportes de madeira para serem posicionados em um micrótomo rotatório\*\*. Oito cortes histológicos seriados de cada bloco, com 6 µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro e corados alternadamente pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômico de Masson para posterior avaliação dos eventos histológicos ocorridos em cada um dos grupos através de microscopia de luz \*\*\*.

---

\* Disposable Microtome Blades – LEICA, model 818, Germany.

\*\*820 Spencer Microtome, Spencer Products Co., Carson, CA, USA.

\*\*\*Microscópio Olympus BX51, Olympus Optical do Brasil, Ltda.

A reação do tecido foi analisada de acordo com a intensidade da inflamação, determinada pela presença de células inflamatórias, alteração da população das células residentes do tecido conjuntivo, características da substância intercelular amorfa e da substância intercelular fibrosa. O material foi classificado em escores (Tabela 3) por um único examinador e os eventos histológicos observados na região da mucosa para cada grupo experimental foram descritos nos diversos períodos de avaliação.

Tabela 3 – Classificação dos eventos histopatológicos (ISO 7405: 1997)

Escore	Eventos histopatológicos
Grau 0	Inflamação ausente
Grau 1	Inflamação discreta
Grau 2	Inflamação moderada
Grau 3	Inflamação severa
Grau 4	Formação de abscesso

#### 4.5 Análise por Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada com base no estudo de Komerik et al.<sup>41</sup>. As amostras do palato removidas foram armazenadas em um recipiente de papel alumínio (Figura 15a) e submersas em um meio para congelamento\* (Figura 15b). Para esse procedimento, o recipiente contendo a amostra foi mergulhado em isopentano, estando este em contato com nitrogênio líquido (Figura 15c). Posteriormente, as amostras congeladas (Figura 15d) foram armazenadas em um freezer a -80°. Cortes com 10µm foram realizados com um criostato\*\*, sendo as secções posicionadas em lâminas de vidro tratadas com gelatina. Em seguida, os cortes foram visualizados em um microscópio de fluorescência\* acoplado a uma câmera fotográfica\*\*, que captou as imagens do

\* Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Instruments, Germany

\*\* Microm HE 505, Jena, Germany

\* Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany

tecido emitindo a fluorescência do fotossensibilizador e demonstrando a sua distribuição na mucosa. Algumas lâminas foram subseqüentemente coradas com H&E para visualização em microscópio de luz\* das regiões correspondentes àquelas onde foram observadas em microscópio de fluorescência. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Plasticidade Muscular do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

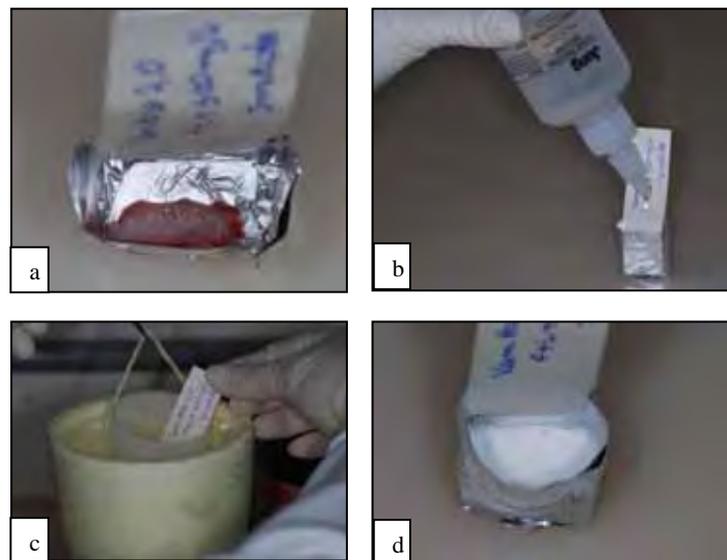


FIGURA 15: a – amostra do palato sendo armazenada em um recipiente de papel alumínio. b – meio para congelamento sendo inserido no recipiente contendo a amostra. c - recipiente contendo a amostra sendo mergulhado em isopentano em contato com nitrogênio líquido. d – amostra congelada.

---

\*\* DSC S75, Sony, Tokyo, Japan



# ***RESULTADO***



## ***5 Resultado***

### *5.1 Avaliação macroscópica da mucosa*

Não foram observadas alterações na mucosa palatina dos animais do grupo controle e dos grupos experimentais em todos os períodos de avaliação.

A mucosa palatina dos animais que não foram submetidos a tratamento apresentava as rugosidades palatinas lisas na região antemolar, três rugosidades em forma de M e duas em forma de V na região intermolar. Na região posterior aos molares, observa-se uma linha esbranquiçada denominada ponte transversa (PT), a qual separa o palato duro do palato mole (Figura 16a, 16b).

Já nos palatos submetidos a algum tratamento (Grupos 2, 3, 4, 5 e 6) observou-se que a mucosa apresentava-se intacta, com aspecto de normalidade semelhante ao do grupo controle (Figura 16c, 16d, 16e, 16f, 16h). Cabe ressaltar que em apenas um único animal (Grupo 5) ocorreu presença de discreto eritema na mucosa, com leve descamação do epitélio, caracterizando uma lesão de grau 1 de acordo com a classificação de Sonis et al.<sup>67</sup> (Figura 16g).



FIGURA 16 - a – animal sendo preparado para a realização das fotografias. b - Aspecto macroscópico do palato de rato que não recebeu nenhum dos tratamentos, mostrando rugosidades palatinas lisas na região antemolar e três rugosidades em forma de M e duas em forma de V na região intermolar. Na região posterior aos molares, observa-se uma linha esbranquiçada denominada de ponte transversa (PT) a qual separa o palato duro do palato mole. c, d, e, f, h – aspecto macroscópico representativo dos grupos experimentais, apresentando-se intacto, com aspecto de normalidade semelhante ao do grupo controle. g - Aspecto macroscópico do palato de rato apresentando-se com discreto eritema na mucosa (seta), com leve descamação do epitélio (seta).

### 5.2 Mapeamento térmico

O Gráfico 1 demonstra a variação de temperatura da mucosa dos animais durante 20 minutos de aplicação do LED, sendo a medida realizada a cada 1 minuto. A temperatura variou de 35°C a 41°C, estabilizando-se aos 657 segundos.

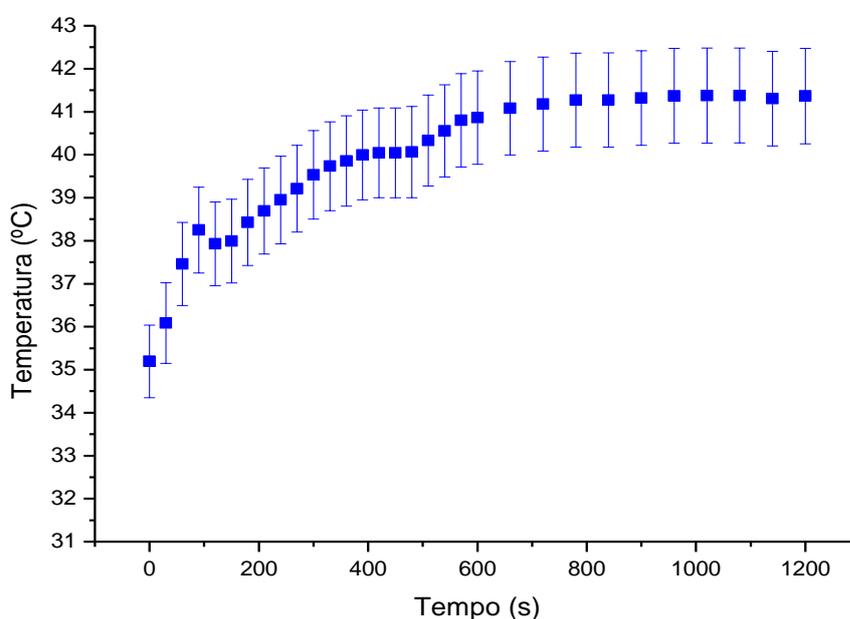


GRÁFICO 1 - Variação da temperatura na mucosa durante aplicação do LED.

### 5.3 Avaliação Histológica

No Grupo 1 (Controle, P-L-), os cortes histológicos avaliados para todos os períodos propostos revelaram presença de epitélio pavimentoso estratificado, que era revestido por espessa camada contínua de ceratina (Figura 17a). Esse tecido de revestimento apresentava poucas papilas epiteliais rasas, e a camada basal estava íntegra. Imediatamente abaixo, foi possível observar uma delgada camada de tecido conjuntivo rica em fibras de colágeno, onde estavam presentes numerosos fibroblastos e pequenos capilares. Essa organização

equilibrada entre células, vasos e componentes da matriz extracelular caracterizou a normalidade desse tecido conjuntivo (Figura 17b). Cabe ressaltar que em apenas um animal, ocorreu discreta presença de células inflamatórias mononucleares em algumas áreas do tecido conjuntivo onde vasos sanguíneos estavam evidentes. Nesse animal, em especial, células inflamatórias também estavam presentes no interior dos vasos sanguíneos dilatados e congestos (Figura 17c). Para todos os animais pertencentes ao grupo controle, foi observado, abaixo desse tecido conjuntivo normal, tecido ósseo íntegro, o qual caracterizou a estrutura óssea do palato (Figura 17b).

No Grupo 2 (P+L-, 500 mg/L), assim como relatado para o Grupo Controle (P-L-), foi observado que o epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado estava intacto. O tecido conjuntivo subjacente, bem como a crista óssea palatina apresentava características histológicas de normalidade (Figura 18a e 18b). Dos 20 animais tratados e que foram sacrificados dentro dos períodos estabelecidos, apenas 2 (1 no período de 24h e outro no de 7 dias) exibiam discreta reação inflamatória com predomínio de células mononucleares associadas à presença de alguns vasos sanguíneos dilatados e congestos (Figura 18c).

No Grupo 3 (P+L+, 500 mg/L), observou-se que a mucosa de revestimento do palato dos animais apresentava características histológicas de normalidade. Essas características teciduais, já descritas para o Grupo 1 (controle), foram presenciadas em todos os períodos de avaliação propostos. Apenas um animal do período de 7 dias apresentou discreta reação inflamatória, limitada ao tecido conjuntivo subjacente ao epitélio. Para este espécime, a inflamação foi caracterizada pelo predomínio de células inflamatórias mononucleares associadas a áreas com vasos sanguíneos dilatados e congestos; porém, o tecido ósseo subjacente estava normal (Figura 19).

No Grupo 4 (P+L-, 1.000 mg/L), os cortes histológicos revelaram que o tecido epitelial estava íntegro, tal como observado para o Grupo 1 (controle). Além disso, o delgado tecido conjuntivo subjacente, bem como o tecido ósseo do palato apresentava características histológicas de normalidade (Figura 20).

No Grupo 5 (P+L+, 1.000 mg/L), observou-se que a mucosa de revestimento do palato dos animais apresentava características histológicas de normalidade. Essas características dos tecidos epitelial e conjuntivo, anteriormente descritas para o Grupo 1 (controle), ocorreram em todos os períodos de avaliação propostos (Figura 21). Porém, apenas um animal do período de 7 dias apresentou discreta reação inflamatória, limitada ao tecido conjuntivo subjacente ao epitélio, o qual se manteve íntegro em toda a sua extensão. Para este espécime, a inflamação foi caracterizada pela presença de células inflamatórias mononucleares associadas a vasos sanguíneos dilatados e congestionados, os quais também continham células inflamatórias no seu interior. Apesar da ocorrência de inflamação imediatamente abaixo do epitélio, o tecido ósseo subjacente estava normal.

No Grupo 6 (P-L+), observou-se que o epitélio pavimentoso estratificado íntegro se manteve recoberto por espessa camada de ceratina, tal como descrito para o Grupo 1 (controle), em todos os espécimes avaliados nesse grupo experimental. Para todos os períodos de avaliação propostos, os cortes histológicos revelaram que o delgado tecido conjuntivo localizado imediatamente abaixo do epitélio de revestimento, bem como o tecido ósseo subjacente, apresentava características histológicas de normalidade (Figura 22).

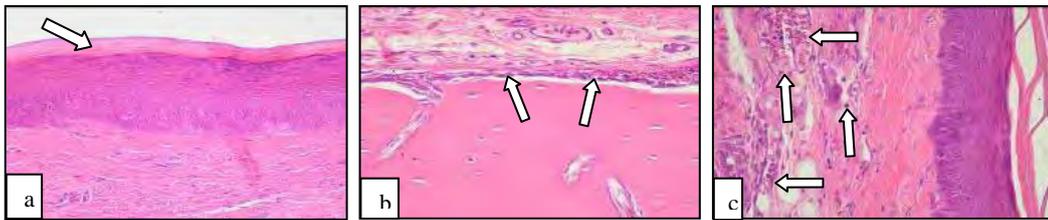


FIGURA 17 (Grupo 1- controle): a – O epitélio pavimentoso extratificado está recoberto por uma espessa e contínua camada de ceratina (seta). Observe que o tecido conjuntivo subjacente apresenta equilíbrio entre fibras colágenas, células e outros componentes da matriz extracelular. H/E, 64x. b - O tecido ósseo do palato, o qual se apresenta normal, está revestido por uma monocamada de osteoblastos (setas) H/E, 125x. c - Note que abaixo do epitélio íntegro, há presença de células inflamatórias mononucleares (setas verticais) no tecido conjuntivo e no interior de vasos sanguíneos, os quais estão dilatados e congestionados (setas horizontais). H/E, 250x.

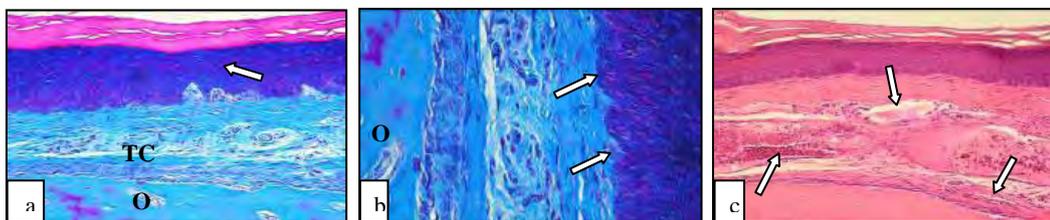


FIGURA 18 (Grupo 2): a – Epitélio pavimentoso extratificado ceratinizado intacto (seta). Observe que o tecido conjuntivo subjacente (TC) e a crista óssea (O) palatina apresentam características histológicas de normalidade. Tricrômico de Masson, 64x. b – Detalhe da figura anterior, onde podemos observar a integridade da camada basal do epitélio, a organização das fibras de colágeno, pequenos vasos sanguíneos e fibroblastos. Note a presença dos osteoblastos revestindo o osso palatino normal (O). Tricrômico de Masson, 250x. c – O tecido conjuntivo abaixo do epitélio exibe discreta reação inflamatória com predomínio de células mononucleares associadas a presença de alguns vasos sanguíneos dilatados e congestionados (setas) H/E, 64x.



FIGURA 19 (Grupo 3): a - Discreta reação inflamatória limitada ao tecido conjuntivo subjacente ao epitélio (E). Observe o predomínio de células inflamatórias mononucleares associadas a áreas com vasos sanguíneos dilatados e congestionados (setas). O tecido ósseo subjacente (O) apresenta-se normal. H/E, 125x. b – Detalhe da figura anterior onde se pode observar tecido ósseo intacto (O) com osteócitos (seta) e estrutura medular em seu interior. Note que o tecido ósseo (O) está completamente revestido por osteoblastos (setas), sendo que o tecido conjuntivo (TC) exibe numerosos vasos sanguíneos com hemácias e células inflamatórias (setas) H/E 250x.

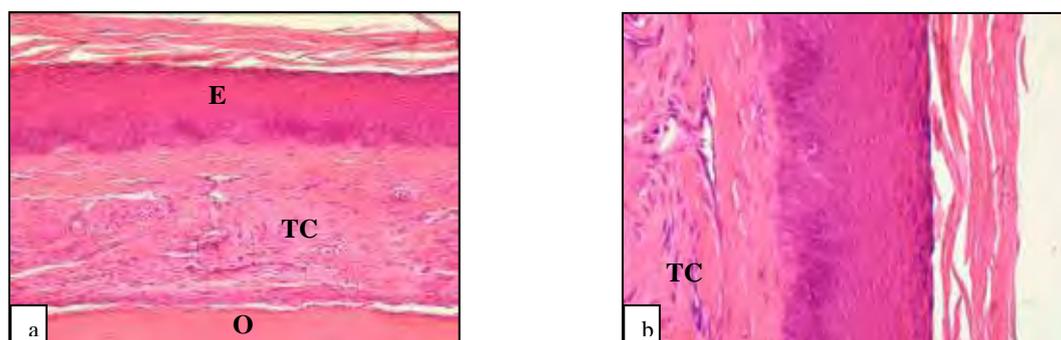


FIGURA 20 (Grupo 4): a - Observe que abaixo do epitélio ceratinizado íntegro (E) está um delgado tecido conjuntivo (TC) e ósseo (O) com características histológicas de normalidade. H/E, 125x. b - Detalhe da figura anterior, onde se pode observar o equilíbrio entre fibras de colágeno, células e pequenos vasos sanguíneos, o que caracteriza um tecido conjuntivo (TC) normal. H/E, 250x.

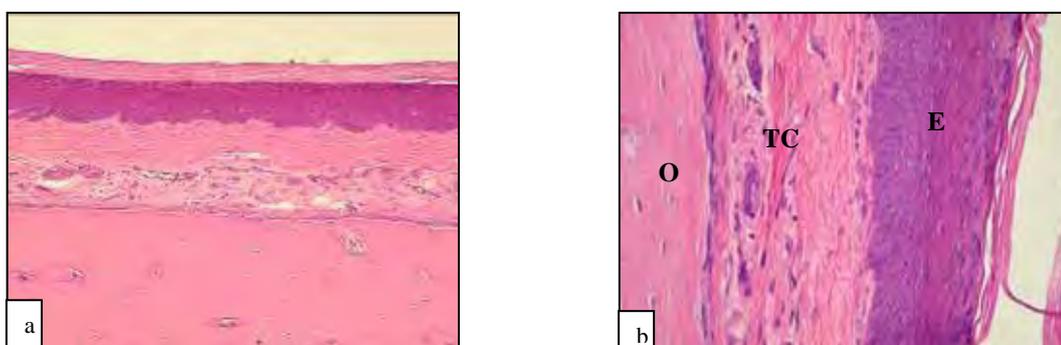


FIGURA 21 (Grupo 5): a - Observe que a mucosa de revestimento apresenta característica histológica de normalidade, semelhante ao do grupo controle. H/E, 64x. b - Detalhe da figura anterior onde se pode observar epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado (E) revestindo um tecido conjuntivo (TC) e ósseo normais (O). H/E 250x.

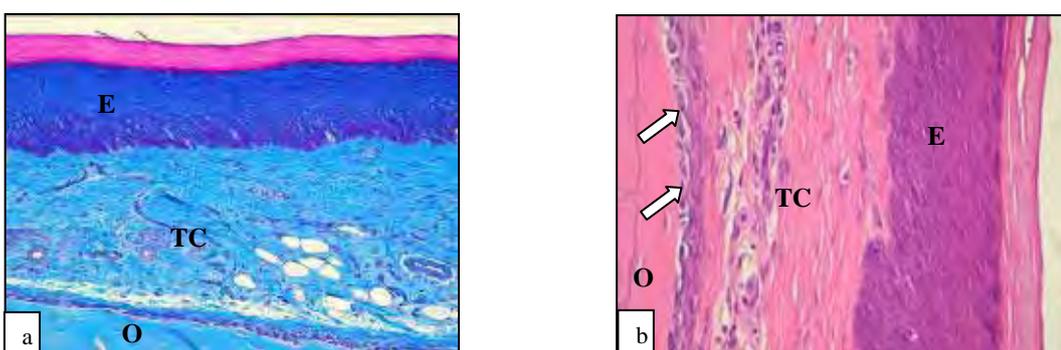


FIGURA 22 (Grupo 6) - Note a presença de delgado tecido conjuntivo (TC) localizado imediatamente abaixo do epitélio (E) de revestimento ceratinizado íntegro. O tecido ósseo subjacente (O) apresenta características histológicas de normalidade. Tricrômico de Masson, 64x. b - Detalhe do epitélio de revestimento (E) íntegro. Observe o tecido conjuntivo subjacente (TC) com equilíbrio entre células e componentes da matriz extracelular, sendo que o tecido ósseo adjacente (O) está revestido por camada contínua de osteoblastos (setas), apresentando características de normalidade. H/E 250x.

#### 5.4 Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência revelou a presença de uma faixa avermelhada uniformemente localizada na camada ceratinizada do epitélio, sendo observada apenas nos grupos em que houve aplicação do Photogem® (Grupos 2, 3, 4, 5) (Figura 23 e 26). A região avermelhada presente no tecido representava a fluorescência emitida pelo Photogem®, enquanto a região mais escura representava a autofluorescência do tecido. No tecido conjuntivo e ósseo, os sinais de fluorescência foram comparáveis aos do grupo controle, em que não havia presença de fotossensibilizador (Figura 24). A localização do Photogem® na camada de ceratina pôde ser confirmada observando-se os cortes submetidos à coloração com H&E.

Após a realização dos tratamentos, a fluorescência emitida pelo fotossensibilizador somente pôde ser observada quando o período de avaliação foi o imediato (0 dias). Nos períodos seguintes (1 dia, 3 dias e 7 dias), não se observou fluorescência no tecido, demonstrando a ausência do fotossensibilizador (Figura 25). Nos grupos em que a mucosa foi irradiada após a aplicação de Photogem® (Grupos 3 e 5), discreta fluorescência, caracterizada por um vermelho-alaranjado, pôde ser observada na camada ceratinizada do epitélio em consequência de a uma possível degradação do fotossensibilizador pela luz (Figura 26).

Não foi observada diferença quanto à localização do agente fotossensibilizador e à intensidade da fluorescência emitida quando houve aumento na concentração de Photogem® de 500 mg/L para 1.000 mg/L (Figura 27).

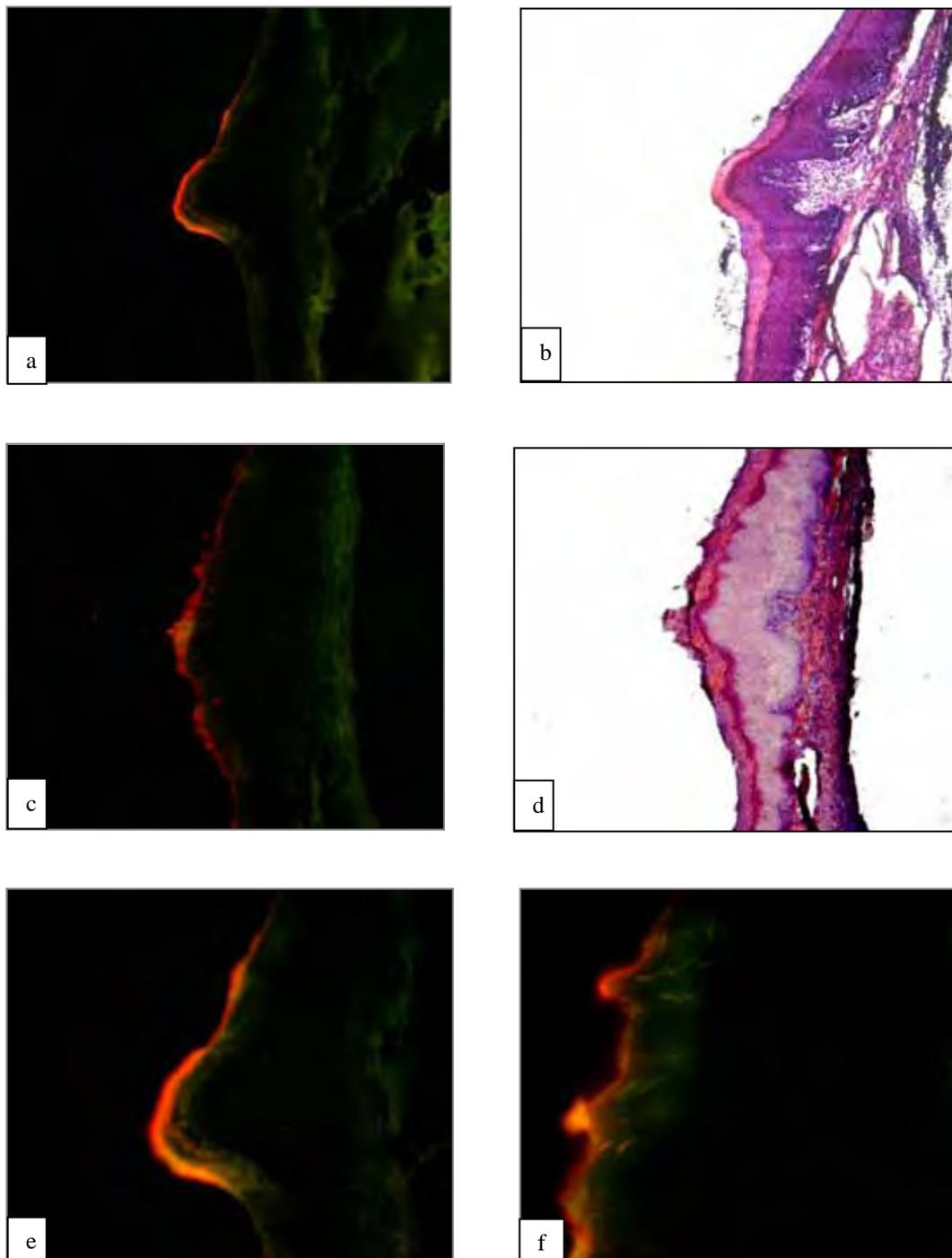


FIGURA 23 - Micrografia de fluorescência de palato de rato representativa do grupo 2 (a,e) e do grupo 4 (c,f) referente ao período de 0 dia. a,c - Uma nítida fluorescência avermelhada pode ser observada imediatamente após a aplicação do Photogem® (FS). Observe que tal fluorescência encontra-se apenas na porção mais externa do epitélio, correspondente a camada de ceratina. b,d - Cortes histológicos correspondente às micrografias anteriores, nos quais a distribuição do FS na camada de ceratina pôde ser confirmada.H/E 64x. e,f - Detalhe das micrografias anteriores (a,c). Note a distribuição do FS no tecido.

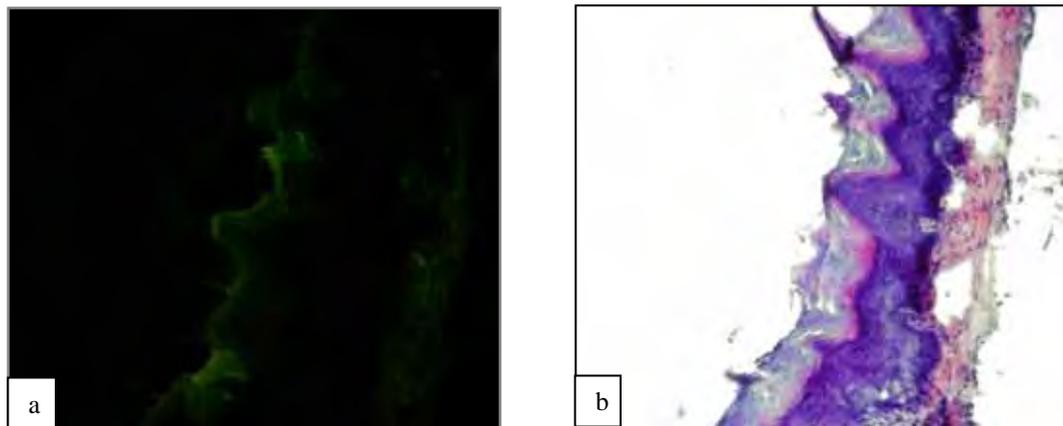


FIGURA 24 - a- Micrografia de fluorescência de palato de rato representativa dos grupos 1 e 6, não submetidos a tratamento com Photogem<sup>®</sup>. Note que somente a autofluorescência do tecido pode ser observada. b – Corte histológico correspondente à micrografia anterior (a). H/E 64x.

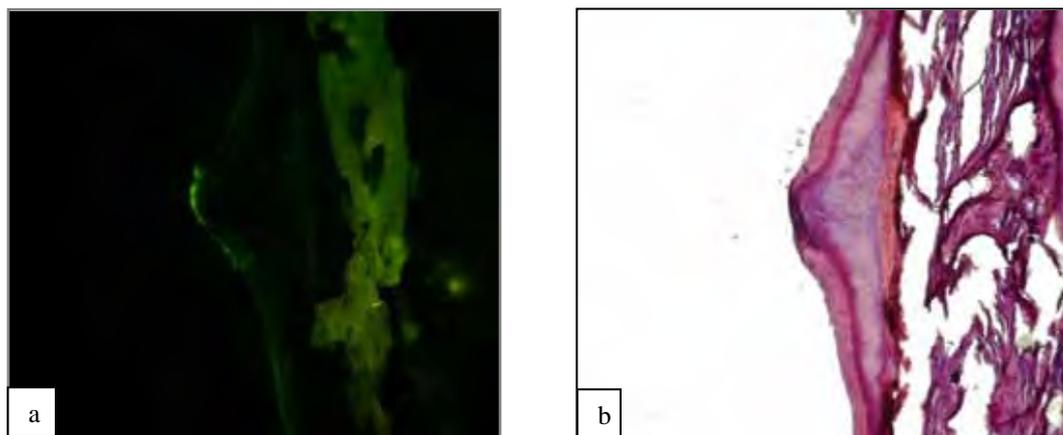


FIGURA 25 - a- Micrografia de fluorescência de palato de rato representativa dos grupos 2, 3, 4 e 5 referente aos períodos 1 dia, 3 dias e 7 dias após a realização dos tratamentos. Observe que os sinais de fluorescência são comparáveis aos do grupo controle, no qual somente a autofluorescência do tecido pode ser observada. b – Corte histológico correspondente à micrografia anterior (a). H/E 64x.

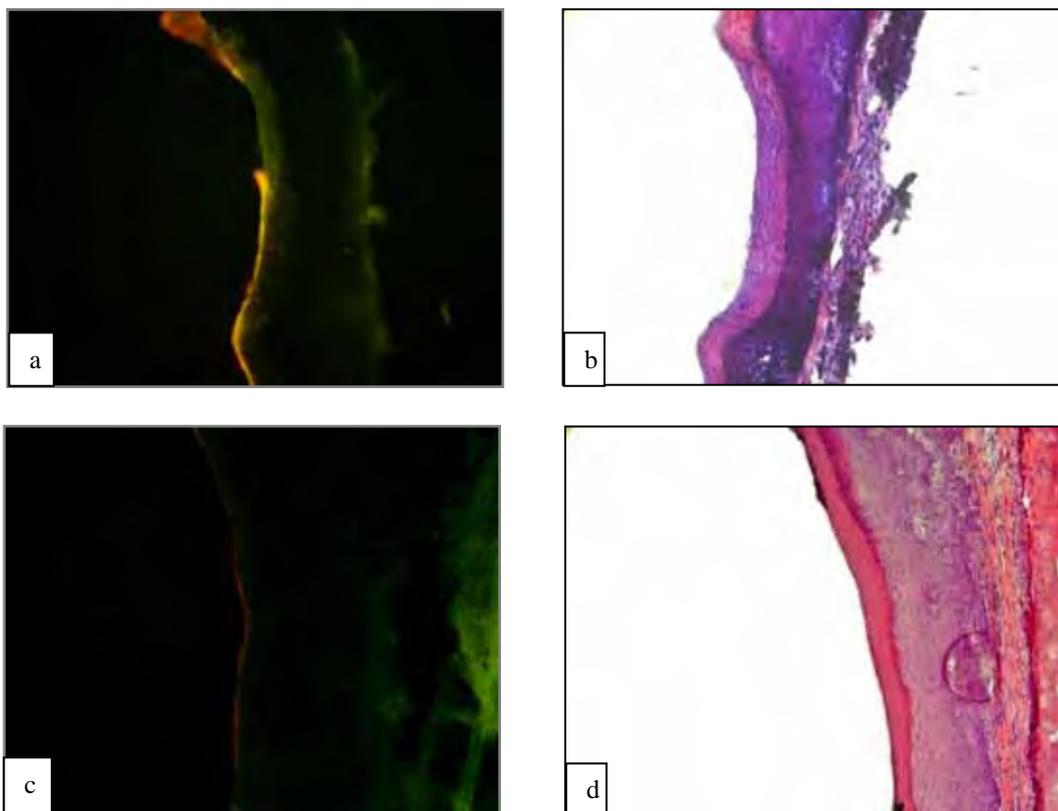


FIGURA 26 - a,c - Micrografia de fluorescência de palato de rato representativa do grupo 3(a) e 5 (c) referente ao período de 0 dia após a PDT. Discreta fluorescência, caracterizada por um vermelho-alaranjado, pode ser observada na camada ceratinizada do epitélio b,d – Cortes histológicos correspondentes às micrografias anteriores.

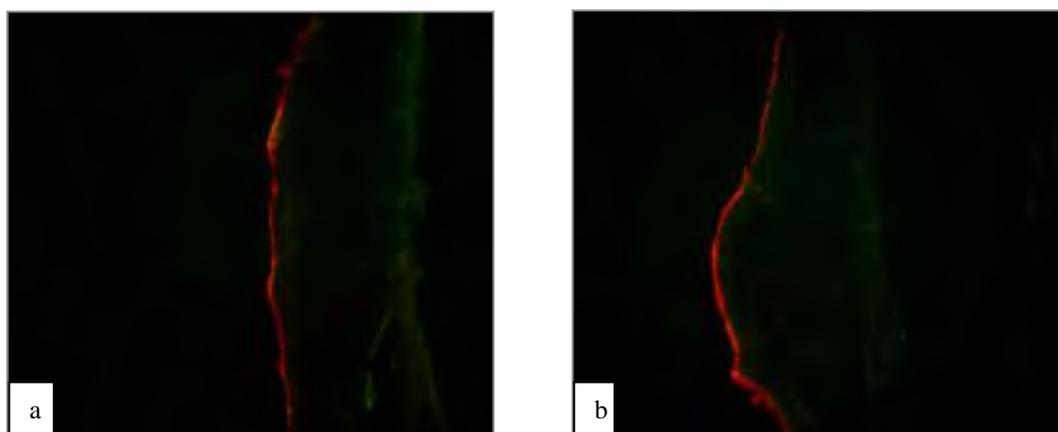


FIGURA 27 - a,b - Micrografia de fluorescência de palato de rato representativa do grupo 2(a) e 4 (b) referente ao período de 0 dia. Note a semelhança entre esses grupos, quanto à localização do Photogem® no tecido e à intensidade da fluorescência emitida.



# ***DISCUSSÃO***



## 6 *Discussão*

A utilização da PDT para o tratamento de infecções apresenta importantes vantagens em relação aos tratamentos convencionais, tendo em vista a possibilidade de obtenção de efeito antimicrobiano, sem o desenvolvimento de resistência por parte do microrganismo. Embora estudos tenham demonstrado que a PDT representa uma alternativa promissora para o tratamento da candidose, alguns aspectos dessa modalidade terapêutica ainda precisam ser esclarecidos, tais como a possibilidade de sua aplicação sem a ocorrência de efeitos colaterais aos tecidos subjacentes. Os estudos que comprovam a eficácia da PDT antimicrobiana se restringem a analisar apenas a capacidade dessa terapia de eliminar os microrganismos envolvidos nas infecções bucais, não avaliando os possíveis efeitos adversos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da PDT na mucosa palatina íntegra de ratos, utilizando parâmetros, como o tipo de fotossensibilizador, sua concentração, o tempo de pré-incubação, a fonte de luz e o tempo de irradiação, previamente estabelecidos com base em dados científicos obtidos em nossos laboratórios para inativação de *C. albicans*<sup>54</sup>.

Nos estudos *in vivo*, é bem estabelecida a utilização de animais experimentais para o estudo da PDT, tendo várias pesquisas baseadas nesse modelo<sup>30,33,35,37,41,57,58,74</sup>. Dentre esses animais, os mais utilizados são os ratos, sendo eles de raças variadas. Dessa forma, neste estudo, foram utilizados ratos da raça *Rattus Novergicus Albinus Holtzman*. Foram selecionados animais com peso que variava de 350-400 g e não foram observados perda de peso ou sinais de debilidade física após a realização dos tratamentos propostos. O protocolo para a realização da anestesia seguiu as recomendações do Guia de Experimentação Animal do Conselho Canadense de Proteção ao Animal (CCAC)<sup>59</sup> que preconiza a associação do anestésico geral ketamina, para produzir rigidez muscular e tornar o animal alheio ao ambiente externo, ao relaxante muscular xilazina, para melhorar a analgesia e reduzir o tônus muscular. Já a dosagem desses medicamentos foi baseada nas normas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de

2005<sup>14</sup>. A via de administração escolhida para este estudo foi a intraperitoneal, devido a maior facilidade de aplicação por um único operador.

A utilização do Photogem® como agente fotossensibilizador, na presente pesquisa, foi estabelecida com base em estudos *in vitro* que comprovam a efetividade dos compostos derivados da hematoporfirina (Photofrin®, o Photogem® e o Photosan®) na fotoinativação de bactérias e fungo<sup>10,11,16,17,31,46</sup>. Além disso, para o tratamento de infecções bucais como a candidose, seria apropriada a utilização de substâncias que não ocasionassem manchamento às superfícies dentais e protéticas. Dessa forma, o Photogem®, que não possui propriedades corantes, poderia ser utilizado com maior segurança em pacientes portadores de restaurações estéticas e em usuários de próteses dentárias.

Particularmente para a *C. albicans*, os processos fotoquímicos mediados por derivados da hematoporfirina parecem promover, inicialmente, uma alteração na membrana citoplasmática do microrganismo. O FS pode penetrar para o interior da célula, e ocasionar danos irreversíveis a organelas intracelulares, o que leva à inativação celular<sup>10</sup>. Segundo Jori et al.<sup>39</sup> (2006), o aumento da permeabilidade da membrana durante os processos fotoquímicos iniciais é fundamental para acentuar o efeito fotodinâmico em células fúngicas, pois a inativação ocorre efetivamente após a captação do FS para o interior da célula. Tal fato pode ser comprovado pelos resultados de Lambrechts et al.<sup>46</sup>. Segundo esses autores, como a permeabilidade da membrana citoplasmática é maior para moléculas com carga positiva, a utilização de FSs catiônicos promove a fotoinativação de *C. albicans* sob uma baixa dose de luz.

A aplicação sistêmica dos fotossensibilizadores é amplamente empregada nos estudos de PDT antitumoral<sup>57,58</sup>. Além disso, a administração tópica de FS para avaliação da PDT também tem sido utilizada<sup>21,41,42,69,73</sup>. Chang et al.<sup>21</sup> comprovaram por meio de microscopia de fluorescência em um estudo *in vivo* que o FS (Photofrin) mesmo aplicado topicamente foi capaz de penetrar nos tecidos, e a PDT foi efetiva em 90% dos carcinomas tratados. Segundo Komerik et al.<sup>41</sup> e Wong et al.<sup>73</sup>, a fluorescência emitida pelo FS revelou que a sua penetração nos tecidos se restringiu ao epitélio, não atingindo os tecidos

subjacentes, tais como o conjuntivo e o ósseo. Com base nesses resultados, a aplicação tópica do Photogem® foi empregada no presente estudo. A fluorescência emitida pelo Photogem® pode ser observada nos grupos que receberam a aplicação do fotossensibilizador, sendo a sua distribuição na mucosa limitada aos tecidos epiteliais, independente da concentração avaliada. Segundo Komerik<sup>41</sup> (2002) a absorção do fotossensibilizador poderia depender da sua capacidade de difusão ou estar relacionada à característica do tecido, sendo a penetração menor em regiões com maior queratinização. Além disso, a absorção da droga pelo epitélio intacto seria menor do que por uma mucosa acometida por lesão, onde a integridade epitelial está comprometida. Como a invasão tecidual da *Candida albicans* é limitada à camada queratinizada do epitélio da mucosa oral<sup>69</sup>, sugere-se que para tratamento da candidose bucal, a PDT com a aplicação tópica do fotossensibilizador poderia ser eficaz, visto que este é capaz de penetrar na região acometida pela infecção.

Outro aspecto que devemos comentar refere-se à capacidade de degradação do FS quanto submetido à irradiação. Tanto na forma de solução quanto no interior dos tecidos biológicos, os FS quando irradiados por uma fonte de luz sofrem transformações químicas em suas moléculas, o que altera as suas propriedades espectrais (espectro de absorção e de fluorescência). Esse processo é denominado fotodegradação ou fotocclareamento<sup>29</sup>. Em nosso estudo, a biodistribuição do FS foi investigada tanto nos grupos que receberam apenas a aplicação do FS quanto nos grupos em que a mucosa foi irradiada após a aplicação do FS. A fluorescência avermelhada emitida pelo Photogem® estava presente apenas nos grupos que receberam a aplicação isolada do FS, enquanto nos grupos submetidos à PDT, essa fluorescência apresentou-se reduzida, com cor alaranjada. Tal fato pode ser explicado pela fotodegradação do FS. Além disso, é importante ressaltarmos que a fluorescência somente pôde ser observada no período de avaliação imediato, após a terapia, tanto nos grupos submetidos apenas ao FS quanto naqueles em que os animais foram submetidos à PDT. Essa observação permite-nos sugerir que após a administração tópica de Photogem® nos tecidos, esse composto é eliminado pelo organismo durante as primeiras 24

horas, já que a fluorescência do Photogem® não foi observada nesse período de avaliação.

A Terapia Fotodinâmica não deve causar efeitos adversos aos tecidos normais. No entanto, alguns estudos demonstraram que a retenção do fotossensibilizador não é limitada aos tecidos tumorais<sup>58,65</sup>, acumulando-se em tecidos alterados e normais, o qual poderá promover efeitos adversos em tecidos epiteliais saudáveis<sup>65</sup>. O mecanismo de retenção depende principalmente da capacidade de o FS penetrar ou ser retido nas células em proliferação ou inflamadas, o que é propriedade característica do FS utilizado<sup>64</sup>. Dessa forma, os tecidos normais também poderão ser susceptíveis aos danos induzidos pela PDT. A eficácia da PDT e os seus efeitos adversos foram investigados por Nauta et al.<sup>57</sup>, em um estudo em mucosa palatina de rato com displasia epitelial induzida utilizando o Photofrin (2,5 mg/Kg) associado a uma luz vermelha (625 nm) com dose de 100 J/cm<sup>2</sup> e uma irradiância de 60 mW/cm<sup>2</sup>. Após a PDT, os autores observaram regiões de osso exposto na área acometida pelo tumor, bem como na mucosa sadia adjacente. Entretanto, no presente estudo foi observado macroscopicamente que a mucosa se manteve íntegra com aspecto de normalidade semelhante ao do grupo controle em todos os grupos experimentais e períodos de avaliação propostos. Em um animal submetido à PDT utilizando Photogem® na concentração de 1.000 mg/L foi observado discreto eritema na mucosa. Essa alteração provavelmente não está relacionada ao tratamento realizado uma vez que foi observada somente em um animal dos 20 avaliados. Tais resultados também foram observados no estudo de Komerik et al.<sup>41</sup>, em que nenhuma alteração visível na mucosa bucal dos animais após a PDT com azul de toluidina (TBO) e laser de 633 nm foi observada.

Microscopicamente, no grupo controle observou-se um tecido epitelial intacto e uma organização equilibrada entre células, vasos e componentes da matriz extracelular caracterizando a normalidade desse tecido conjuntivo. Além disso, abaixo deste tecido conjuntivo normal, o tecido ósseo apresentava-se íntegro. Essas características descritas também ocorreram em todos os grupos experimentais e em todos os períodos de avaliação propostos. Porém, no período

de avaliação de um dia após o tratamento, um animal do Grupo 2 apresentou discreta reação inflamatória limitada ao tecido conjuntivo subjacente ao epitélio, o qual se manteve íntegro em toda sua extensão. Essa alteração microscópica também foi observada, após 7 dias, em um animal em cada um dos Grupos 2, 3 e 5. Em função do reduzido número de animais apresentando discreta alteração microscópica, e sua presença inclusive no grupo controle, não é possível relacionar essa observação com os fatores envolvidos na PDT, como o fotossensibilizador e a fonte de luz. Tal resultado corrobora os obtidos por de Komerik et al.<sup>41</sup>, em um estudo no qual utilizou azul de toluidina (TBO) e laser de 633 nm para a realização da PDT. Os autores concluíram que, apesar de a penetração do fotossensibilizador na mucosa ter sido constatada por meio da microscopia de fluorescência, não foram observadas alterações microscópicas na mucosa bucal dos animais. Por outro lado, Teichert et al.<sup>69</sup> verificaram a presença de infiltrado inflamatório subepitelial na cavidade bucal de animais imunossuprimidos após a aplicação da PDT para inativação de *Candida albicans*, utilizando o azul de metileno como fotossensibilizador (450 µg/mL a 500 µg/mL) associado ao laser de diodo.

Segundo Rousset<sup>64</sup> (2000), a alteração que a PDT pode promover nos tecidos depende da concentração do fotossensibilizador. Entretanto, no presente estudo, o aspecto do tecido de todos os grupos experimentais foi semelhante ao do grupo controle, e em todos os períodos de avaliação, tanto na análise macroscópica quanto na microscópica. Assim, como no estudo de Komerik et al.<sup>41</sup>, neste estudo, o aumento da concentração de fotossensibilizador não resultou na ocorrência de possíveis efeitos adversos, sugerindo que a promoção de efeitos tóxicos pela PDT não foram concentração-dependente, não sendo tóxicas aos tecidos bucais.

Embora a maioria dos estudos de PDT utilize o laser como fonte de luz, no presente estudo foi utilizado o LED azul. Um estudo recente<sup>75</sup> observou que a luz LED vermelha apresentava efeito antimicrobiano semelhante ao obtido pelo laser de He-Ne. Esses resultados corroboram os achados do estudo de Giusti et al.<sup>31</sup>, que concluíram que o LED em associação tanto com o Photogem® quanto

com o TBO foi efetivo na redução bacteriana de *S. mutans* e *L. acidophilus*, presentes na dentina cariada. Sendo assim, o LED é uma alternativa eficaz no tratamento com PDT, já que a taxa de remissão de microorganismos não foi inferior às das demais fontes de luz, atualmente empregadas. Com relação aos efeitos adversos, o LED possui maior espalhamento da luz no tecido biológico, atingindo efeitos mais superficiais em relação aos lasers. Além disso, a luz azul (460 nm), por apresentar um comprimento de onda inferior ao da luz vermelha (630 nm) possui menor penetração nos tecidos<sup>4</sup>, reduzindo as chances de ocorrência de possíveis efeitos adversos. Em nosso estudo, o efeito isolado da aplicação do LED azul também foi avaliado e não se observou alterações teciduais na mucosa palatina dos animais, o que corrobora as afirmações anteriores.

A aplicação do LED foi feita em contato com a mucosa palatina para minimizar possível reflexão da luz e aumentar a quantidade de energia absorvida pelo tecido. Segundo Danhof<sup>25</sup> (2000) apud Gutknecht, Eduardo (2004) após a absorção da energia da luz laser pelo tecido, ocorre um processo de transformação que gera duas formas de reação: calórica e acalórica. A reação acalórica é responsável por transformações bioquímicas relacionadas aos efeitos analgésicos, antiinflamatórios e proliferativos, ou seja, aos efeitos de biomodulação do laser. Já a reação calórica pode provocar efeitos diretos sobre os tecidos adjacentes. Como o LED é uma fonte de luz com características semelhantes às do laser (porém não totalmente colimada e coerente), esse mecanismo de interação luz-tecido também pode ser aplicado. Tendo em vista essas considerações, pode-se especular que houve um aumento de temperatura no tecido durante a aplicação do LED, gerando calor que poderia provocar uma agressão à mucosa. Portanto, um mapeamento térmico foi realizado para avaliar se ocorreu variação na temperatura do tecido causada pela irradiação LED. Foi verificado que houve um contínuo, mas gradual aumento de temperatura após a aplicação do LED, e um aumento máximo de temperatura de 6°C, todavia aumento não suficiente para causar danos aos tecidos.

Os efeitos da PDT in vivo mais rapidamente detectáveis são de natureza vascular<sup>22,34</sup>. Associado ao dano na membrana celular causado pelas

espécies reativas de oxigênio há liberação de mediadores inflamatórios e de imunidade que são vasoativas (constritora ou dilatadora) e agem rapidamente. Tal evidência sugere que essas substâncias estejam envolvidas no desenvolvimento dos danos vasculares causados pela PDT. Já os efeitos tardios da PDT normalmente observados são eritemas e edema agudos, necrose nos casos mais severos, além de fotossensibilidade prolongada da pele<sup>22,34</sup>. Além disso, estudos relataram que outro efeito tardio é a capacidade de cicatrização do tecido após o dano induzido pela PDT. Grönlund-Pakkanen et al.<sup>33</sup> comprovaram essa capacidade de cicatrização dos tecidos quando efeitos adversos são causados pela PDT e que a ocorrência desses efeitos depende da dose de luz utilizada e da concentração do fotossensibilizador. Dessa forma, a presença de danos aos tecidos quando submetidos à PDT e a sua irreversibilidade não constitui em uma regra. No presente estudo, foram estabelecidos quatro diferentes períodos de avaliação: imediatamente, 1 dia, 3 dias e 7 dias após a terapia. O período imediato foi estabelecido para a observação das possíveis alterações causadas pela PDT, previamente a qualquer cicatrização tecidual. Os demais períodos de avaliação foram propostos para o acompanhamento da evolução da reparação tecidual, caso uma possível inflamação tivesse sido provocada pela PDT. Tem sido relatado que os principais eventos de cicatrização ocorrem durante as primeiras 24 horas após o aparecimento da lesão, atingindo uma maior evolução no 3º dia e após o 5º dia. Após esse período, a neovascularização é máxima e o tecido recupera sua arquitetura, apresentando ceratinização da superfície<sup>63</sup>. Portanto, em caso de presença de lesão, poder-se-ia avaliar se tal injúria seria reparada em um curto prazo. Porém, em nosso estudo, nenhuma alteração nos tecidos foi observada, independente do período de avaliação.

De maneira geral, a efetividade antimicrobiana da PDT têm sido amplamente investigada e comprovada, não existindo, entretanto, um consenso na literatura quanto ao tipo de fotossensibilizador e à sua concentração, às fontes de luz e às doses empregadas. Como descrito na literatura, efeitos adversos poderão ocorrer dependendo dos parâmetros utilizados para a realização do tratamento. No presente estudo, a PDT, associando Photogem® ao LED azul, apresentou

resultados promissores quanto à sua utilização no controle de infecções bucais. Além da ausência de toxicidade, a penetração do fotossensibilizador se restringe ao epitélio. Entretanto, estudos clínicos deverão ser realizados para que a PDT possa ser considerada uma alternativa para o tratamento dessas infecções.



# *CONCLUSÃO*



## ***7 Conclusão***

Os resultados deste estudo demonstraram que apesar de fluorescência emitida pelo fotossensibilizador ter sido observada no epitélio da mucosa palatina de rato, constatando a penetração do Photogem® no tecido, nenhum dano significativo foi observado macroscópica e microscopicamente. Esses resultados sugerem que a PDT utilizando Photogem® nas concentrações de 500 mg/L e 1.000 mg/L associado ao LED (dose de 144 J/cm<sup>2</sup>) representa uma alternativa de tratamento em potencial para ser empregada em infecções bucais localizadas.



# ***REFERÊNCIAS***



## **8 Referências\***

1. Aghahosseini F, Arbabi-Kalati F, Fashtami LA, Fateh M, Djavid GE. Treatment of oral lichen planus with photodynamic therapy mediated methylene blue: a case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11: 126-9.
2. Ahn WS, Bae SM, Huh SW, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ, et al. Necrosis-like death with plasma membrane damage against cervical cancer cells by photodynamic therapy. *Int J Gynecol Cancer*. 2004; 14: 475-82.
3. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78: 455-9.
4. Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clin Dermatol*. 2006; 24: 16-25.
5. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol*. 2008; 79: 1081-8.
6. Babilas P, Karrer S, Sidorof A, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology – an update. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005; 21: 142-9.
7. Babilas P, Travnik R, Werner A, Landthaler M, Szeimies RM. Split-face-study using two different light sources for topical PDT of actinic keratoses: non-inferiority of the LED system. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008; 6: 25-32.

---

\* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:  
[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

8. Babilas P, Kohl E, Maisch T, Bäcker H, Gross B, Branzan AL, et al. In vitro and in vivo comparison of two different light sources for topical photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2006; 154: 712-8.
9. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc.* 1995; 61: 199-200, 203-5.
10. Bertoloni G, Reddi E, Gatta M, Burlini C, Jori G. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 1989; 135: 957-66.
11. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-6.
12. Bouillaguet S, Owen B, Wataha JC, Campo MA, Lange N, Schrenzel J. Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. *Dent Mater.* 2008; 24: 1070-6.
13. Brancalion L, Moseley H. Laser e non-laser light sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med Sci.* 2002; 17: 173-86.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Curso de manipulação de animais de laboratório. Brasília; 2005.
15. Budtz-Jorgensen E, Theilade E. Regional variations in viable bacterial and yeast counts of 1-week-old denture plaque in denture-induced stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1983; 91: 288-95.
16. Carré V, Gaud O, Sylvain I, Bourdon O, Spiro M, Blais J, et al. Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents

- on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisie*. J Photochem Photobiol B: Biol. 1999; 48: 57-62.
17. Chabrier-Rosello Y, Foster TH, Perez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 4288-95.
  18. Chan EC, Iugovaz I, Siboo R, Bilyk M, Barolet R, Amsel R, et al. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. J Can Dent Assoc. 1991; 57: 937-9.
  19. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001; 183: 5385-94.
  20. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2001; 80: 903-8.
  21. Chang CJ, Lin MS, Hwang PS, Cheng SMH. Topical application of photofrin for oral neoplasms in animal. Opt Quant Eletron. 2005; 37: 1353-65.
  22. Chin WW, Lau WK, Heng PW, Bhuvanewari R, Olivo M. Fluorescence imaging and phototoxicity effects of new formulation of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone. J Photochem Photobiol B. 2006; 84: 103-10.
  23. Chu ESM, Wu RWK, Yow CMN, Wong TKS, Chen JY. The cytotoxic and genotoxic potential of 5-aminolevulinic acid on lymphocytes: a comet assay study. Cancer Chemother Pharmacology. 2006; 58: 408-14
  24. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. Rev Assoc Med Bras. 1996; 42: 229-36.

25. Danhof G. Biological effects of the laser beam. In: Simuzovic Z. Lasers in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low-energy level laser therapy-LLLT. Rijeka: Vitagraf; 2000. p. 127-52 apud Gutknecht N, Eduardo P. A odontologia e o laser. Atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence; 2004. p. 320.
26. DeSimone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Phys Ther.* 1999; 79: 839-46.
27. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163: 1-12.
28. Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20: 3-7.
29. Ferreira J, Menezes PFC, Kurachi C, Sibata CH, Allison RR, Bagnato VS. Comparative study of photodegradation of three hematoporphyrin derivative: Photofrin, Photogem and Photosan. *Lasers Phys Lett.* 2007; 10: 743-8.
30. Fontana CR, Kurachi C, Mendonça CR, Bagnato VS. Temperature variation at soft periodontal and rat bone tissues during a medium-power diode laser exposure. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22: 519-22.
31. Giusti JS, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26: 281-7.
32. Gritsch K, Ponsonnet L, Schembri C, Farge P, Pourreynon L, Grosgeat B. Biological behaviour of buccal cells exposed to blue light. *Mater Sci Eng C.* 2008; 28: 805-10.

33. Grönlund-Pakkanen S, Pakkanen TM, Talja M, Kosma VM, Ala-Opas M, Alhava E. The morphological changes in rat bladder after photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *BJU Int.* 2000; 86: 126-32.
34. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992; 55: 145-57.
35. Hua Z, Gibson SL, Foster TH, Hilf R. Effectiveness of o-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin as a photosensitizer for photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res.* 1995; 55: 1723-31.
36. Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc.* 1992; 123: 46-51.
37. Jayasree RS, Gupta AK, Rathinam K, Mohanan PV, Mohanty M. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. *J Biomater Appl.* 2001; 15: 176-86.
38. Jiménez-Banzo A, Sagristà ML, Mora M, Nonell S. Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 1926-34.
39. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38: 468-81.
40. Kolarova H, Ditrichova D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Lasers Surg Med.* 1999; 24: 231-5.
41. Komerik N, Curnow A, MacRobert AJ, Hopper C, Speight PM, Wilson M. Fluorescence biodistribucion and photosensitising activity of toluidine blue O on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci.* 2002; 17: 86-92.

42. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 932-40.
43. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86: 694-707.
44. Kongsberg R, Axell T. Treatment of *Candida*-infected denture stomatitis with a miconazole lacquer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78: 306-11.
45. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72: 283-8.
46. Lambrechts SAG, Aalders MCG, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2026-34.
47. Lambrechts SAG, Schwartz KR, Aalders MCG, Dankert JB. Photodynamic inactivation of fibroblasts by a cationic porphyrin. *Lasers Med Sci.* 2005; 20: 62-7.
48. Levy JG, Obochi M. New applications in photodynamic therapy. Introduction. *Photochem Photobiol.* 1996; 64: 737-9.
49. Lipovsky A, Nitzan Y, Lubart R. A possible mechanism for visible light-induced wound healing. *Lasers Surg Med.* 2008; 40: 509 -14.
50. Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 1993; 2: 17-22.
51. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova.* 2000; 32: 237-43.

52. Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. *Med Microbiol.* 1995; 42: 372-9.
53. Melo CA, Lima AL, Brasil IR, Castro e Silva O Jr, Magalhães DV, Marcassa LG, et al. Characterization of light penetration in rat tissues. *J Clin Laser Med Surg.* 2001; 19: 175-9.
54. Mima EGO, Pavarina AC, Dovigo LN, Ribeiro DG, Bagnato VS, Machado AL. Fotoinativação de *Candida albicans* de lesões em língua de camundongos. In: 22º Anais da Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO; 2008 ago. Águas de Lindóia (SP). São Paulo : SBPqO, 2008; p. 216.
55. Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. : *Anticancer Res.* 2003; 23: 3591-600.
56. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol.* 2008; 159: 1245-65
57. Nauta JM, van Leengoed HL, Witjes MJ, Nikkels PG, Star WM, Vermey A, et al. Photofrin-mediated photodynamic therapy of chemically-induced premalignant lesions and squamous cell carcinoma of the palatal mucosa in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 26: 223-231.
58. Nauta JM, Speelman OC, van Leengoed HL, Nikkels PG, Roodenburg JL, Star WM, et al. In vivo photo-detection of chemically induced premalignant lesions squamous cell carcinoma of the rat palatal mucosa. *J Photochem Photobiol B.* 1997; 39: 156-66.
59. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. 1993 [cited 2006 jun. 16]. Disponível em: <http://www.ccac.ca>.

60. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei Jr G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 2005; 50: 353-9.
61. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. J Oral Rehabil. 2003; 30: 532-6.
62. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. J Prosthet Dent. 2005; 93: 288-93.
63. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 91-124.
64. Rousset N, Vonarx V, Eléouet S, Carré J, Bourré L, Lajat Y, et al. Cellular distribution and phototoxicity of Benzoporphyrin derivative and Photofrin. Res Exp Méd. 2000; 199: 341-57.
65. Saczko J, Mazurkiewicz M, Chwiłkowska A, Kulbacka J, Kramer G, Ługowski M, et al. Intracellular distribution of photofrin in malignant and normal endothelial cell lines. Folia Biológica (Praha). 2007; 53: 7-12.
66. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1994; 5: 125-57.
67. Sonis ST. Mucositis as a biological process: A new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. Oral Oncol Eur J Cancer 1998; 34: 39-43.
68. Taoufik K, Mavrogonatou E, Eliades T, Papagiannoulis L, Eliades G, Kletsas D. Effect of blue light on the proliferation of human gingival fibroblasts. Dent Mater. 2008; 24: 895-900

69. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 155-60.
70. Theilade E, Budtz-Jorgensen E. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with denture-induced stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1988; 3: 8-13.
71. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 13-28.
72. Wilson M, Mia N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitization of *Candida albicans* in vitro. *Lasers Med Sci.* 1994; 9: 105-9.
73. Wong TW, Aizawa K, Sheyhedin I, Wushur C, Kato H. Pilot study of topical delivery of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): implication of topical NPe6-photodynamic therapy. *J Pharmacol Sci.* 2003; 93: 136-42.
74. Zacks DN, Ezra E, Terada Y, Michaud N, Connolly E, Gragoudas ES, et al. Verteporfin photodynamic therapy in the rat model of choroidal neovascularization: angiographic and histologic characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 2384-91.
75. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Brugnera Jr A, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 324-30.
76. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2001; 144: 274-8.



# ***APÊNDICE***



## 9 Apêndice 1

O projeto e protocolo de pesquisa referente a este estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Experimentação em animais (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara. O parecer emitido por esse comitê está apresentado abaixo:



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



*Proc. CEEA nº 12/2007*

Araraquara, 29 de agosto de 2007

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em *28/08/2007*, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "*Avaliação dos efeitos citotóxicos da PDT associada ao Led e ao Photogem em mucosa oral de rato*" (Proc. CEEA nº 12/2007) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, com a sugestão de que o número de ratos para cada período e procedimento seja escrito mais claramente, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL em AGOSTO/2009.**

Atenciosamente.



**Prof. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira**  
Coordenadora do CEEA

À  
**Profª Drª ANA CLÁUDIA PAVARINA**  
DD. Pesquisadora Responsável  
Nesta

Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA  
Rua Humildade nº 1.680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP  
2ª andar - fone (16) 3301-6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: [director@faoz.unesp.br](mailto:director@faoz.unesp.br) - home page: <http://www.faoz.unesp.br>

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 16 de março de 2009.

FLÁVIA ZARDO TRINDADE