

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

ANA PAULA DIAS RIBEIRO

**Efeito citotóxico da Terapia Fotodinâmica associando Photogem® e
LED azul e vermelho em cultura de células normais**

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: Profa. Dra. Ana Cláudia
Pavarina

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

Araraquara
2009

Ribeiro, Ana Paula Dias

Efeito citotóxico da terapia fotodinâmica associando PhotogemR e LED azul e vermelho em cultura de células normais / Ana Paula Dias Ribeiro . – Araraquara: [s.n.], 2008.

193 f. ; 30 cm.

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

Orientadora : Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

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

1. Fotoquimioterapia 2. Derivado de hematoporfirina –
Toxicidade 3. Fibroblastos 3. Odontoblastos I. Título

ANA PAULA DIAS RIBEIRO

**EFEITO CITOTÓXICO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIANDO
PHOTOGEN[®] E LED AZUL E VERMELHO EM CULTURA DE
CÉLULAS NORMAIS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Ana Lúcia Machado

3º Examinador: Cristina Kurachi

Araraquara, 20 de março de 2009.

DADOS CURRICULARES
ANA PAULA DIAS RIBEIRO

NASCIMENTO	5.7.1983 – PATOS DE MINAS/MG
FILIAÇÃO	Paulo Cesar Ribeiro Márcia Helena Caixeta Dias Ribeiro
2001/2005	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Brasília-UnB
2006	Estágio de Atualização na disciplina de Prótese Parcial Fixa da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP
2007/2009	Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Prótese), nível de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
2008	Estágio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

Dedico este Trabalho

À Deus,

Por todas as vitórias conquistadas, por todos os sonhos realizados, por todas as provas vencidas, por ser a razão do meu viver e o Deus da minha vida.

Aos meus pais Márcia e Paulo,

Pela oportunidade em realizar esse sonho, por sempre me apoiarem e torcerem por mim, pelo amor incondicional, pelas palavras de carinho na hora certa e pela motivação. Obrigada por todas as renúncias. Vocês são o meu porto seguro. Amo vocês mais que qualquer coisa no mundo.

Às minhas irmãs Ana Cecília e Ana Luísa,

Por todas as alegrias e tristezas compartilhadas, pela amizade e amor. Obrigada por sempre estarem ao meu lado. Amo vocês.

Ao meu amor Domíngos,

Pela paciência, companheirismo, lealdade e incentivo durante todo o curso. Você foi minha motivação e meu presente nessa terra nova. Amo você.

Agradecimentos Especiais

Á Prof. Dra. Ana Cláudia Pavarina, professora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, minha orientadora. Obrigada pelo carinho, pela dedicação, por acreditar no meu potencial, por me incentivar a buscar novos caminhos e me proporcionar todo suporte para avançar como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, meu co-orientador. Obrigada por me receber com tanto carinho em seu laboratório, por me permitir crescer, por seu incentivo e sua dedicação. Obrigada por ser um exemplo de professor e pesquisador. Minha admiração e eterna gratidão.

Aos Professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, **Profa. Dra. Ana Lúcia Machado, Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, Profa. Dra. Eunice Terezinha Giampolo**. Obrigada por me incentivarem a buscar sempre mais e pelo apoio durante todo o mestrado

Á Flávia Zardo Trindade, minha amiga e companheira de todos os momentos felizes e tristes. Você foi essencial para o desenvolvimento dessa dissertação. Realmente formamos uma dupla imbatível. Obrigada por dividir comigo todas as lutas e vitórias, por estar ao meu lado quando eu mais precisei, por me ensinar a ser diferente e por me incentivar

sempre! Ainda que a distância nos separe, você estará sempre no meu coração. Muito obrigada!

*À **Fernanda Campos Rosetti Lessa**, minha amiga-orientadora de laboratório. Fer, nem tenho palavras para agradecer o que você fez por mim. Hoje tudo o que sei de cultura de células e muitas outras coisas se deve a você. Muito obrigada pelos dias inteiros de experimentos e pelas inúmeras repetições. Obrigada de coração!*

*À **Prof. Dr. Regina Helena Barbosa Tavares da Silva**. Obrigada por sempre ter acreditado em mim e no meu potencial. Você é uma amiga maravilhosa que me ajudou em todos os momentos em Araraquara. Com você por perto, tudo ficou mais fácil. Obrigada de coração!*

*À **Natália M. Inada**, pela ajuda nas metodologias novas, pelas horas de conversa a caminho da UNICAMP, pelos momentos de reflexão e discussão dos resultados. Obrigada!*

*Mais uma vez **a minha querida família e ao meu amor**. Com a ajuda de vocês e o suporte emocional tudo ficou bem mais fácil. Amo vocês mais que tudo!*

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. Andréia Affonso Barreto Montandon.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos 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 do Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pelo coordenador Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani e pelo Vice-coordenador Prof. Dr. Francisco de Assis Molloy Junior.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos de mestrado e pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela contribuição na minha formação profissional.

Aos colegas da minha turma de Mestrado em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Ana Lúcia, André, Antônio, Cadu, Camilinha, Carol, Cris, Fabi, Flávia Zardo, Flávia Medeiros, Fe, Lali, Paty, Rodrigo e Tati, por

todos os momentos divididos durante esses dois anos, pelo companheirismo, pela amizade e pelo carinho.

***À Dani, Livia e Ewerton,** pela ajuda nesse mundo novo e vasto da Terapia Fotodinâmica. Sem a ajuda de vocês seria praticamente impossível a realização desse trabalho. Muito obrigada de coração!*

*Aos meus companheiros do laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais **Adriano Mendonça, Adriano Lima, Camila, Cármem, Dê, Fê Lessa, Fê Vargas, Flavinha, Gabi, Joyce, Kina, Indri, Ju, Marcela, Marina, Nancita, Rafa, Regina, Tia Elisa** pelos experimentos que deram certo, por aqueles que deram errado, pelas divertidas ou não muito reuniões de terça-feira, pelos lanchinhos, enfim por momentos de alegria que vivemos no laboratório.*

*Ao Instituto de Física de São Carlos-USP, representados pelo **Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato**, pelo apoio tanto na metodologia quanto na discussão dos resultados desse estudo. Gostaria de agradecer a todos do grupo de Biofotônica, **Didi, Mere, Naty, Ruy, Clovis, Carla, Cristina, Juliana**, e a todos os funcionários do Instituto de Física que auxiliaram no desenvolvimento desse estudo, em especial o Prof. Galo e Orlando.*

*Ao Laboratório de Bioenergética do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, representado pelo **Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi**.*

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, da Biblioteca, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, do Departamento de Fisiologia e Patologia e da Portaria.

Obrigada pelo apoio, carinho e dedicação. Com certeza a execução desse estudo se tornou mais agradável com vocês por perto!

*Aos colegas do Doutorado, **Lívia, Julie, Isa, Paula, Laiza, Dani, Ewerton, Zé, Zeca, Mari, Andréia, Roberta, Michael, Ana Paula.** Obrigada pela atenção e apoio.*

*Aos queridos amigos de Araraquara, **Regina, Lu, Déia, Ana, Celsão, Flavinha, Lorena, Nancita, Dê, Fer Lessa, Camilinha, Carol, Flávia, Diana, Cibeles.** Com a presença de vocês na minha vida, tudo se tornou muito mais agradável. Obrigada por me ajudarem a suportar a saudade da minha casa.*

*Às amigas **Flávia Zardo Trindade, Natália Inada, Fernanda Lessa, Nancy Sacono, Juliana Pirola,** pela ajuda essencial na realização desse projeto.*

*Aos amigos e amigas de Brasília, **Cássia, Fe Sesc, Fe Gomide, Jack, Renats, Kelly, Jana, Ma, Quel, Pipi, Tiago, Tie, Tuca, Danilo, Regino,** e todos os outros. Muito obrigada pela torcida, pelas risadas, companheirismo, apoio, dedicação e incentivo. A amizade de vocês significa muito pra mim!*

***À toda minha família** que acompanhou de pertinho todos esses anos.*

***À minha nova família de Taquaritinga.** Obrigada por me fazerem me sentir em casa e cuidarem tanto de mim.*

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho, e que não estão citadas nominalmente, meu sincero agradecimento.

“Não basta ter belos sonhos para realizá-los. Mas ninguém realiza grandes obras se não for capaz de sonhar grande. Podemos mudar o nosso destino, se nos dedicarmos à luta pela realização de nossos ideais.

É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho; de examinar com atenção a vida real; de confrontar nossa observação com nosso sonho; de realizar escrupulosamente nossa fantasia.

Sonhos, acredite neles.”

Vladimir Ulianov Lênin

Sumário

Resumo.....	12
Abstract.....	15
INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO DE LITERATURA.....	24
PROPOSIÇÃO.....	88
MATERIAL E MÉTODO.....	90
RESULTADO.....	105
DISCUSSÃO.....	153
CONCLUSÃO.....	165
REFERÊNCIAS	167
APÊNDICES.....	179

A microscopic image of neurons, showing cell bodies and branching processes. A red overlay highlights specific areas, possibly indicating areas of interest or damage. The word "Resumo" is written in a stylized font at the bottom right, underlined.

Resumo

Ribeiro APD. Efeito citotóxico da terapia fotodinâmica associando Photogem[®] e LED azul e vermelho em cultura de células normais [dissertação de mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP, 2009.

Resumo:

Para considerar a Terapia Fotodinâmica (PDT) como tratamento clínico da estomatite protética, é necessário conhecer tanto o potencial antifúngico, como efeito citotóxico desta terapia sobre células normais do indivíduo. Assim, o objetivo desse estudo in vitro foi avaliar a citotoxicidade da PDT antifúngica com o fotossensibilizador Photogem[®] associado ao LED azul e ao LED vermelho em cultura de fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23. As células foram cultivadas (30.000 células/cm²) em placas de 24 compartimentos por 48 horas e ambos os tipos celulares foram incubados com Photogem[®] (0, 10, 25, 50, 100 ou 150 mg/L) e irradiados ou não pelo LED azul (460 ± 3 nm; 25,5 ou 37,5 J/cm²; 22 mW/cm²) ou LED vermelho (630 ± 3 nm; 70 ou 100 J/cm²; 25 mW/cm²). O metabolismo celular foi determinado 0, 12 e 24 horas após a PDT utilizando o teste do metiltetrazolium (MTT), e a morfologia celular avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para avaliar o tipo de morte celular (necrose ou apoptose) assim como estimar os níveis intracelulares das espécies reativas de oxigênio (EROs). Observou-se redução do metabolismo celular estatisticamente significativa para todas as concentrações do Photogem[®] quando irradiadas em qualquer dose de luz, sendo essa redução de 90 a 97% tanto para as células L929 quanto MDPC-23 (ANOVA and Dunnet's *post hoc* tests; $p < 0.05$). Essa redução da atividade mitocondrial não foi dependente da concentração do fotossensibilizador e nem da dose de luz empregada. Também, foi

demonstrado que a atividade mitocondrial das células submetidas a PDT não foi recuperada após 12 ou 24 horas, caracterizando um dano irreversível. A presença do Photogem[®] e da luz isoladamente não alterou estatisticamente a atividade mitocondrial de ambas as linhagens. As células submetidas à PDT tiveram sua morfologia alterada, não sendo possível observação dos limites celulares. Em ambas as linhagens, foi observado predomínio de morte celular por necrose quando em contato com o fotossensibilizador. A presença do Photogem[®] e a exposição à luz aumentaram os níveis de EROs intracelulares de uma forma dose-dependente para L929 e MDPC-23. A associação do Photogem[®] com LED azul ou vermelho causou intensos efeitos tóxicos sobre cultura de células normais, caracterizados pela redução da atividade mitocondrial, alterações morfológicas e indução de morte celular por necrose.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, derivado da hematoporfirina toxicidade, fibroblastos, odontoblastos.



Abstract

Ribeiro APD. Cytotoxic effect of the photodynamic therapy associating Photogem[®] and blue or red LED on normal cell culture [dissertação de mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP, 2009.

Abstract

In order to consider the photodynamic therapy (PDT) as a clinical treatment for candidosis, it is necessary to know its antifungal potential and its cytotoxicity effect on normal cells. Therefore, the purpose of this in vitro study was to evaluate the cytotoxicity of PDT with Photogem[®] associated to blue and red LED on L929 and MDPC-23 cell cultures. The cells (30.000 cells/cm²) were seeded in 24-well plates for 48 hours, incubated with Photogem[®] (10, 25, 50, 100 or 150 mg/L) and were irradiated or not with a blue LED source (460 ± 3 nm; 25.5 or 37.5 J/cm²; 22 mW/cm²) or with a red LED source (630 ± 3 nm; 75 or 100 J/cm²; 22 mW/cm²). Cell metabolism was evaluated by the MTT assay (ANOVA and Dunnet's *post hoc* tests; p<0.05) and cell morphology was examined by scanning electron microscopy. Flow cytometry was employed to analyze the type of PDT-induced cell death (necrosis or apoptosis) as well as to estimate intracellular production of reactive oxygen species (ROS). There was a statistically significant decrease of mitochondrial activity for all Photogem[®] concentrations associated to blue or red LED regardless irradiation time; this reduction ranged from 90 to 97% for both cell lines. This reduction, however, was not dependent on the photosensitizer concentration. It was also demonstrated that the mitochondrial activity of the cells submitted to PDT was not recovered after 12 or 24 hours, characterizing irreversible cell damage. PDT-treated cells presented an altered morphology with ill-defined limits. In both cell lines, there was a

predominance of necrotic cell death when in contact with the photosensitizer. The presence of Photogem[®] and exposure to blue and red LED increased the intracellular levels of ROS in both L929 and MDPC-23 cells in a dose-dependent manner. The association of Photogem[®] and blue LED caused severe toxic effects on normal cell culture, characterized by the reduction of the mitochondrial activity, morphological alterations and induction of necrotic cell death.

Key Words: Photochemotherapy, hematoporphyrin derivative, toxicity, fibroblasts, odontoblasts,

A microscopic image of neurons, showing their cell bodies and branching processes. A red overlay highlights specific areas, possibly indicating areas of interest or damage. The text 'Introdução' is overlaid on the bottom right of the image.

Introdução

1 Introdução

A candidose bucal é considerada a infecção fúngica mais comum entre humanos². As espécies de *Candida* spp. são freqüentemente isoladas da cavidade bucal, chegando a estar presente em 40% numa população de indivíduos saudáveis⁷³. No entanto, diante da alteração de alguns fatores como redução do fluxo salivar, trauma local, alterações de pH e uso contínuo de próteses removíveis, esses microrganismos podem atuar como patógenos oportunistas, invadindo tecidos e desencadeando processos infecciosos¹⁸. É também considerada uma doença oportunista de alta incidência em pacientes que utilizam de medicamentos imunossupressores após transplante de órgãos, antibióticos de amplo espectro, terapias antineoplásicas e nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)⁶⁰.

A candidose bucal associada à utilização de próteses removíveis afeta normalmente o palato e ocorre em aproximadamente 65% dos pacientes²³, sendo conhecida como estomatite protética. Clinicamente, essa infecção caracteriza-se pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos na região palatina sob as próteses removíveis dos pacientes, e, em casos mais avançados, também podem ser observadas áreas eritematosas difusas, ou ainda, hiperplasia papilar do palato. Os sintomas da estomatite causada por prótese podem incluir ardência, prurido, dor, desconforto generalizado na cavidade bucal, alteração no paladar e lesões associadas, como a queilite angular¹¹.

O tratamento para a candidose bucal tem como objetivo aliviar o desconforto causado pela inflamação e também evitar a disseminação da infecção. Para isso, podem ser utilizadas medicação antifúngica tópica¹¹ e sistêmica¹⁶, além de procedimentos de higienização

e desinfecção das próteses^{10,22,62}. A terapia antifúngica tópica é realizada com nistatina e miconazol durante os primeiros episódios de candidose e tem se mostrado efetiva no alívio dos sinais e sintomas clínicos da infecção associada à *Candida* spp.¹⁰. No entanto, esses medicamentos possuem ação reduzida devido à diminuição da concentração do agente tópico nos tecidos infectados associada aos efeitos diluentes da saliva e aos movimentos da língua, o que gera uma freqüente recolonização do microrganismo e a conseqüente recidiva da infecção¹⁰. A terapia antifúngica sistêmica é usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecções recorrentes⁶³. Nesses casos, medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B podem ser utilizados. Esses agentes vêm sendo amplamente utilizados para o tratamento da candidose bucal, especialmente em pacientes imunodeprimidos. Entretanto, tem sido relatado que a utilização de antifúngicos sistêmicos, particularmente a anfotericina B, pode promover efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos⁵⁴.

Devido ao aumento da resistência dos microorganismos aos tratamentos disponíveis resultante do uso indiscriminado dos antifúngicos tópicos e sistêmicos, o desenvolvimento de tratamentos antimicrobianos alternativos e coadjuvantes se tornou necessário. A Terapia Fotodinâmica (do inglês, Photodynamic Therapy ou PDT) surgiu como terapia minimamente invasiva utilizada no tratamento de diversos tipos de tumores e em certas doenças benignas⁵⁶. A PDT apresenta vantagens em relação aos tratamentos convencionais (quimioterapia, radioterapia e cirurgia), por ser não-invasiva e apresentar poucos efeitos colaterais⁴⁶. Há aproximadamente cem anos, Raab publicou o primeiro artigo sobre efeitos fotodinâmicos de compostos químicos contra microrganismos. Entretanto, somente na década de 70, com a disseminação da AIDS e aumento das infecções hospitalares devido às bactérias resistentes

surgiram novos estudos que objetivaram aumentar a aplicação clínica dessa terapia.

O interesse na PDT também advém da simplicidade de seu mecanismo de ação resultante da interação entre um agente fotossensibilizante e uma luz visível de comprimento de onda compatível ao espectro de absorção do fotossensibilizador (FS)^{17,46}. A absorção de fótons pelo FS leva o mesmo a um estado triplete excitado que pode interagir com o oxigênio disponível e produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singlete⁷⁵. Na reação tipo 1, a transferência direta de elétrons de um FS excitado para um substrato ocorre pela geração de diferentes tipos de radicais, como hidroxil e peróxido de hidrogênio. Na reação tipo 2, o FS excitado pode reagir com oxigênio molecular e produzir oxigênio singlete, altamente reativo. Todos esses produtos formados geram uma seqüência de eventos oxidativos resultando em morte celular direta, destruição da vascularização do tumor e ativação da resposta imune do hospedeiro¹⁷. Uma vez que os FSs atuam produzindo oxigênio singlete e outros EROs, não existe resistência microbiana a essa terapia, pois os radicais livres são capazes de interagir com diversas estruturas celulares (proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucléicos) por diferentes mecanismos⁴⁶.

A PDT tem sido utilizada nas diversas áreas da Odontologia apresentando excelentes resultados no tratamento de câncer bucal e de lesões pré-malignas^{4,5,79}, bem como no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas^{29,73,77}. Como a cavidade bucal é um sítio de fácil acesso para aplicação das drogas fotossensibilizadoras e para iluminação, o tratamento de candidose bucal e de infecções periodontais assim como a desinfecção de canais radiculares e desorganização do biofilme dentário por meio da PDT têm sido sugeridos por vários autores^{28,46,49}.

A inativação da *Candida* ssp. foi evidenciada em diversos estudos^{29,49,73,78,82}. Foi relatada maior dificuldade em eliminar este tipo de fungo do que bactérias Gram-positivas⁴⁹. Segundo Demidova, Hamblin²⁷ (2005), a presença da membrana nuclear, o maior tamanho da célula fúngica e número reduzido de alvos para o oxigênio singlete por unidade de volume da célula requerem uma maior concentração de fotossensibilizador e maior dose de luz para inativação do fungo. Além disso, a similaridade da célula fúngica com as células de mamíferos dificulta o acúmulo seletivo do agente fotossensibilizante no fungo²⁸.

Um dos objetivos da PDT é eliminar microrganismos sem causar danos aos tecidos saudáveis que cercam a lesão. Estudos demonstram que o FS se acumula em tecidos tumorais e normais, produzindo fotossensibilidade, o qual poderá promover efeitos adversos no caso de tecidos epiteliais normais⁵⁵. Dessa forma, os tecidos normais também poderão ser susceptíveis aos danos induzidos pela PDT. O nível de destruição do tecido após a PDT depende da concentração de FS, sendo que esse nível pode variar de acordo com o tempo de pré-incubação e natureza do transporte da membrana celular e seu metabolismo, além do tempo de irradiação aplicado¹⁷.

Assim, para considerar a PDT como um tratamento clínico da estomatite protética, é necessário conhecer além de seu potencial antifúngico, seu efeito citotóxico sobre células normais do indivíduo. Na literatura, o efeito da PDT com alguns fotossensibilizadores sobre queratinócitos e fibroblastos em cultura já foi demonstrado^{24,48,80,81} através da aplicação de diversos métodos laboratoriais. Em trabalhos anteriores desenvolvidos em nossos laboratórios foram determinados parâmetros específicos de PDT utilizando o Photogem[®], um fotossensibilizador da primeira geração derivado da hematoporfirina, associado ao LED (light emitting diode) para inativação de *C. albicans* e *C. glabrata* (padrão e resistente ao fluconazol)^{30,31}. Entretanto, a toxicidade do Photogem[®]

associado ao LED azul e vermelho em células normais ainda não foi descrito. O LED, ainda pouco utilizado na PDT, tem sido sugerido como um substituto para o laser e para fibras ópticas, por ser uma fonte de luz com custo mais acessível, além de possuir uma versatilidade de formas e tamanhos⁴⁶. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito citotóxico da PDT em células normais associando Photogem[®] e LED azul ou vermelho.

A microscopic image of neurons, showing cell bodies and branching processes. A red overlay is applied to the image, highlighting specific areas. The text 'Revisão de Literatura' is centered at the bottom, underlined.

Revisão de Literatura

2 Revisão da Literatura

Com objetivos didáticos, a revisão da literatura aborda quatro aspectos separadamente: o primeiro fez referência a trabalhos relacionados à terapia fotodinâmica antimicrobiana e citotoxicidade da mesma em células normais; o segundo enfocou estudos relacionados à PDT antitumoral e aqueles que avaliaram o efeito da mesma em cultura de células normais; o terceiro enfocou os efeitos da luz sobre os mecanismos celulares e os agentes fotossensibilizadores disponíveis atualmente, e o quarto fez referência a estudos que utilizaram metodologias com cultura de células.

2.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e citotoxicidade em células normais

Bertoloni et al.¹³, 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/cm², 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.

Wilson, Mia⁷⁸, em 1993, avaliaram a inativação de *Candida* spp. após aplicação da PDT. Foram utilizados os FSs ftalocianina dissulfonato de alumínio (FDA) e azul de metileno (MB) associados ao laser de arseneto de gálio e alumínio (Ga-As, 660 nm), cuja potência é de 11 mW. Também, foram testados os FSs violeta cristal, azul de toluidina (TB), dihematoporfirina-ester (HpDE) e tionina em associação ao laser de hélio e neônio (He-Ne, 632,8 nm), de potência de 7,3 mW. Inicialmente o microrganismo avaliado foi uma cepa padrão de *C. albicans*. Alíquotas de 50 µL da suspensão diluída 1:100 foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos. Uma alíquota de mesmo volume de um dos FSs foi então adicionada a cada orifício, obtendo-se concentrações finais de 100, 500, ou 1000 mg/L. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, as placas foram expostas à luz de laser durante 120 segundos. Amostras adicionais somente receberam o FS ou foram expostas à luz. Para todas as amostras, 50 µL das diluições seriadas foram plaqueadas em duplicatas em Agar Sabouraud Dextrose. Após 3 dias a 37°C, as colônias foram contadas. Após esta etapa inicial, o FS mais efetivo foi então selecionado na concentração de 100 mg/L para avaliar a inativação de suspensões mais densas (1:10) de cepas de *C. albicans*, *C. steallatoidea*, *C. tropicalis* e *C. kefyr*. Os dados foram analisados pelo teste-t de Student. Foi verificada que a exposição ao He-Ne reduziu os valores de ufc/mL das amostras sensibilizadas por TB, tionina e violeta cristal a 100 e 500 mg/L, sendo que a maior redução foi obtida com o TB a 100 mg/L. A irradiação com o laser Ga-As promoveu redução significativa dos valores de ufc/mL das amostras sensibilizadas por MB e FDA a 100 e 1000 mg/L. A PDT não foi efetiva na inativação de *C. albicans* quando o HpDE foi utilizado. Os agentes TB, MB e FDA se mostraram tóxicos às células de *C. albicans*, na ausência de luz. Além disso, o TB a 100 mg/L associado ao laser He-Ne também foi efetivo na inativação das demais espécies de *Candida*, no entanto essas se mostraram menos susceptíveis à terapia em relação a *C. albicans*. Os

autores concluíram que a PDT foi efetiva na inativação de *Candida* spp. quando uma fonte de luz de laser de baixa potência é associada a vários FSs.

O objetivo do estudo de Jackson et al.⁴⁰, em 1999, foi avaliar se suspensões de *C. albicans*, em forma de leveduras e hifas, poderiam ser fotoinativadas. A PDT foi realizada por meio da utilização do azul de toluidina em associação com um laser de hélio-neônio (632,8 nm). Três variáveis foram avaliadas: a concentração do FS (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L), a dose de luz (4,2; 10,5; 21 e 42 J/cm²) e o tempo de pré-irradiação. Além disso, duas cepas de *C. albicans* com resistência a fluconazol foram submetidas à incubação durante 5 minutos com 25 mg/L de azul de toluidina, e em seguida foram iluminadas com 21 J de luz. A sobrevivência do fungo foi determinada pelo método da contagem de ufc/mL. Os resultados demonstraram que as duas formas de *C. albicans* foram efetivamente inativadas, no entanto, as hifas necessitaram de 12,5 mg/L de FS para que a redução da viabilidade ocorresse, enquanto que, para as leveduras, foi necessária a utilização de 25 mg/L. Segundo os autores, a maior susceptibilidade da forma de hifas foi em consequência das alterações celulares ocorridas durante a conversão da forma de leveduras para as hifas. A quantidade de redução obtida, para as duas formas, foi dependente da dose de luz aplicada, sendo que a aplicação de 42 J/cm² promoveu as maiores taxas de inativação. A aplicação de diferentes tempos de pré-irradiação não afetou a efetividade da PDT para a forma de hifa, mas para a forma de levedura, o período ideal de incubação foi de 5 minutos. Como a conversão da forma de levedura para a forma de hifa é responsável pelo desenvolvimento de infecções por *C. albicans*, os autores sugeriram que a eliminação das hifas por meio da PDT pode ser uma possível modalidade de tratamento para a candidose. Além disso, as duas cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol

avaliadas foram inativadas pela PDT, no entanto, a redução obtida foi menor em relação aos resultados dos experimentos anteriores.

Machado⁵⁵, 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. Uma outra classe de FSs são os endógenos, baseados na administração por via oral ou mesmo uso tópico do ácido δ -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.

A fotoinativação de microrganismos cutâneos foi objeto de estudo de Zeina et al.⁸², 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/cm², 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 foram distintos, sendo 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.

Para que a PDT antimicrobiana possa ser utilizada clinicamente, a mesma não deve causar danos aos tecidos adjacentes. Assim, Zeina et al.⁸⁰ (2002) investigaram o efeito da PDT antimicrobiana em queratinócitos de linhagem H103. Suspensões celulares foram semeadas em placas Petri, incubadas com 100 µg/mL de azul de metileno e irradiadas com luz de projetor por 90 e 180 minutos. Foram utilizados dois métodos de avaliação de viabilidade celular: o método de exclusão

do azul de trypan com contagem microscópica e o método vermelho-neutro espectrofotometria. O índice de morte para os queratinócitos foi de 18 a 200 vezes menor que aquele previamente determinado para as espécies microbianas. Além disso, os valores obtidos pelo azul de trypan realizado 6 horas após PDT revelaram que as células foram capazes de recuperar 85 e 48% de seu metabolismo depois de irradiadas por 60 e 90 minutos, respectivamente. Esse dado sugere que os danos celulares observados após períodos longos de PDT são mais irreversíveis e que essa terapia não induz danos posteriores, como morte celular por apoptose. A alta susceptibilidade das espécies microbianas cutâneas a PDT e a baixa toxicidade dessa terapia aos queratinócitos indicam que essa técnica pode ser aplicada in vivo para reduzir consideravelmente os microorganismos na derme.

Após avaliar o efeito na viabilidade celular, Zeina et al.⁸¹ (2003) avaliaram o possível efeito genotóxico da PDT em queratinócitos humanos. Para isso, suspensões celulares de queratinócitos da linhagem H103 foram preparadas em placas petri. As células foram pré-incubadas com 100 µg/mL de azul de metileno e expostas a luz visível (potência de 42 mW/cm²) por um total de 180 minutos. Um grupo de suspensões celulares foi avaliado imediatamente após a PDT, enquanto o outro foi avaliado 4 horas depois para investigar o efeito a longo prazo dessa terapia. O método utilizado para avaliar o efeito genotóxico foi o cometa. Após a preparação das células, quantificou-se o número de células intactas e das que sofreram lise. Além disso, a extensão da migração do DNA das células lisadas foi observada por meio da microscopia confocal. O dano ao DNA foi classificado por um sistema de escores, sendo que o valor 0 representava nenhum dano e o valor 3 o maior dano. Para demonstrar a capacidade desse método em detectar danos ao DNA, um controle positivo (queratinócitos incubados com peróxido de hidrogênio) foi incluído. Os resultados obtidos para os queratinócitos tratados com

peróxido de hidrogênio apresentaram alterações genotóxicas. Das células lisadas pela presença do H_2O_2 (total de 87%), 95% obtiveram escore 3 e as demais escore 2. Para as células tratadas com PDT, cerca de 80 a 90% sofreram lise, sendo que para todas foi dado escore 0, sejam para as que foram avaliadas imediatamente ou 4 horas após a PDT. Os autores concluíram que a PDT antimicrobiana capaz de reduzir microorganismos não apresentou efeitos genotóxicos para os queratinócitos.

A inativação de *C. albicans* in vivo foi avaliada no estudo conduzido por Teichert et al.⁷³, em 2002. Os autores verificaram a susceptibilidade de *C. albicans* presente em línguas de camundongos, por meio da 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* azol-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^2 . 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 a 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.

Bliss et al.¹⁴, em 2004, avaliaram a susceptibilidade de cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* a PDT mediada pelo Photofrin[®]. Neste estudo, suspensões celulares das três espécies avaliadas foram transferidas para cavidades de uma placa de 96 compartimentos, incubadas por 30 minutos com o FS, em concentrações variando de 0,01 a 10 mg/L, e iluminadas com uma lâmpada de arco (mercúrio) durante 10 minutos a 15 mW/cm² (9 J/cm²). A sobrevivência dos microrganismos foi verificada por meio do teste de viabilidade celular (XTT). Adicionalmente, foram realizadas análises em microscopia de fluorescência e confocal, para a verificação da captação do FS pelas células fúngicas. O controle foi constituído de suspensões de *Candida* spp. associadas tanto a solução salina como ao Photofrin[®] (suspensões não iluminadas). Os experimentos foram realizados em triplicatas e as comparações da efetividade da PDT em relação às diferentes espécies avaliadas foram feitas com Análise de Variância. Os autores demonstraram que, a *C. albicans* foi a espécie mais susceptível a PDT, seguida da *C. krusei* e *C. glabrata*. Após a irradiação, foram obtidas altas porcentagens de redução da viabilidade celular, mais de 50%, com a utilização de apenas 1 mg/L do Photofrin[®] para a *C. albicans* e *C. krusei*, sendo que o FS a 10 mg/L reduziu em cerca de 80 % a viabilidade dessas duas espécies. Para a *C. glabrata*, no entanto, a utilização de 10 mg/L do Photofrin[®] promoveu baixas porcentagens de redução, cerca de 30%. As imagens obtidas nas análises microscópicas demonstraram fluorescência quando o FS foi efetivamente captado para o interior da célula fúngica. A fluorescência foi detectada na presença de 10 mg/L de Photofrin[®] em todas as espécies, porém, para a *C. glabrata*, a quantidade de fluorescência foi mínima. Os autores concluíram que a captação do FS para o interior da célula está diretamente relacionada com a efetividade

da PDT, e que a *C. glabrata* apresenta uma menor susceptibilidade à inativação fotodinâmica, em comparação com as outras espécies avaliadas.

Monfrecola et al.⁵⁸, em 2004, avaliaram o efeito in vitro da PDT com ácido aminolevulínico-5 associado a luz visível na *C. albicans*. Suspensões do fungo foram preparadas contendo 10 unidades formadoras de colônia/ μ L. Para o experimento, 30 μ L da suspensão foram pré-incubadas com a droga em diferentes concentrações (125, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 750, 1000 mg/mL) por três horas no escuro. Após esse período, o microrganismo foi irradiado com uma dose de luz fixa (40 J/cm²) por uma fonte de luz visível com pico de emissão no comprimento de onda de 630 nm. As soluções contidas em cada tubo teste foram plaqueadas em Agar Sabouraud Dextrose e incubadas por 48 horas, quando então as colônias foram contadas. Algumas espécies obtidas a partir de colônias tratadas com PDT foram fixadas em glutaraldeído e examinadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Observou-se que o ALA associado à luz inibiu o crescimento da *C. albicans* sendo dose dependente. As concentrações de até 250 mg/mL não afetaram o crescimento; a de 300 mg/mL reduziu em 50% o número de colônias e a completa inibição só ocorreu com concentrações acima de 600 mg/mL. Na MEV foram observadas alterações na membrana celular do fungo. A partir desses resultados, os autores concluíram que o ALA associado à luz visível foi capaz de inibir o crescimento da *Candida* in vitro. Segundo os autores, estudos futuros podem comprovar que a PDT é uma terapia com potencial para tratar candidose.

Chabrier-Roselló et al.²¹, em 2005, avaliaram parâmetros da ação fotodinâmica mediada pelo Photofrin[®] 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[®] 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^2 ($0,9 \text{ J/cm}^2$ 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[®] pela célula. Para avaliar a resposta adaptativa do microrganismo a injúria oxidativa, tubos germinativos foram submetidos repetidamente a tratamentos com H_2O_2 (primeiramente numa concentração subletal de 1 mM e posteriormente em concentrações tóxicas variadas entre 50 e 100 mM), PDT (Photofrin numa concentração subtóxica de 0,5 mg/L associada à irradiação de 9 J/cm^2 , 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, seguida por 30 minutos de incubação e irradiação de 18 J/cm^2) 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 de 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[®] pelos organismos após 5 minutos. Foi verificada resistência na resposta adaptativa do microrganismo tratado repetidamente com H_2O_2 . No entanto, não houve resistência quando amostras foram submetidas repetidamente à PDT ou quando essa foi associada ao tratamento com H_2O_2 . Com relação às amostras em biofilme, a irradiação das amostras sensibilizadas pelo Photofrin[®] 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 é aos efeitos fotodinâmicos é improvável.

Deminova, Hamblin²⁷, em 2005, compararam a efetividade da PDT na inativação de suspensões das bactérias *Escherichia coli* (gram-negativo) e *S. aureus* (gram-positivo), e do fungo *C. albicans*, em concentrações celulares de 10^9 - 10^7 , 10^9 - 10^7 e 10^8 - 10^6 respectivamente. A foto-inativação foi testada com a utilização dos FSs rose bengal, azul de toluidina e conjugado de poli-lisina, em várias concentrações, associados a uma fonte de luz não coerente, composta de pacotes de fibras intercambiáveis. Inicialmente, as suspensões celulares dos três microrganismos foram obtidas por meio do crescimento *overnight* a 37 °C, em meios de cultura específicos, seguido da centrifugação e ressuspensão das células em solução tamponada. As suspensões celulares foram incubadas em ambiente escuro com os FSs em diferentes concentrações durante 20 minutos, e em seguida, alíquotas de 200µL foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos, e a iluminação realizada com doses de luz que variaram de 0 a 200 J/cm². As amostras foram iluminadas com e sem a remoção do excesso do agente. Foram obtidas diluições seriadas de cada amostra, seguidas do plaqueamento, incubação *overnight* a 37°C, e obtenção do número de ufc/mL. Além disso, após a incubação, alíquotas adicionais foram utilizadas com o objetivo de verificar se os FSs testados permanecem somente ligados a membrana celular dos microrganismos ou se a captação para o interior da célula ocorreu. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste t Student. Os resultados demonstraram que a concentração celular das suspensões de microrganismos afetou a efetividade de todos os FSs testados, ou seja, quanto maior a concentração celular presente na suspensão, uma maior concentração de FS foi requerida. O Conjugado de poli-lisina foi o FS mais efetivo para promover a fotossensibilização das

bactérias e do fungo. A susceptibilidade dos três microrganismos variou em decorrência do microrganismo avaliado, sendo que a *C. albicans* mostrou-se mais resistente a PDT em comparação com as bactérias. Os autores concluíram que, por possuir um tamanho 10 a 50 vezes maior que a célula bacteriana, a célula fúngica necessita de uma maior quantidade de oxigênio singlete para que sua inativação ocorra. Além disso, a *C. albicans* é um ser eucarionte e a presença da membrana nuclear poderia atuar como uma barreira adicional para a penetração do FS.

Lambrechts et al.⁴⁹, 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 μ M, durante 1, 15 ou 30 minutos. Alíquotas de 1 mL das suspensões foram transferidas para um placa de 96 compartimentos e iluminadas com uma lâmpada halógena de intensidade de 30 mW/cm². 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, do 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/cm² 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, nem tão pouco 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.

No mesmo ano, Lambrechts et al.⁵⁰ (2005) avaliaram o efeito do plasma sanguíneo humano e do soro humano contendo albumina na inativação do *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* pela PDT. Sabe-se que os líquidos corporais contêm certa quantidade de proteínas e que nas feridas infectadas existe a presença de plasma sanguíneo. Os microrganismos foram incubados por 18 horas, e em seguida, foram centrifugados e resuspendidos em PBS, plasma sanguíneo humano ou suspensão de soro humano contendo albumina (HSA). Foram obtidas suspensões celulares de 10^8 - 10^9 células/mL de *S.aureus* e *P. aeruginosa*, e 10^6 - 10^7 células/mL de *C. albicans*. Quando em PBS, os microrganismos foram incubados com 3,1; 6,3; 12,5; 25 e 50 μ M da porfirina catiônica TriP[4] e iluminados por 15 minutos (27 J/cm²). Já em plasma sanguíneo humano, utilizou-se somente a maior concentração de porfirina (50 μ M) com diferentes tempos de irradiação, 15, 30, 45 e 60 minutos, o que correspondia a uma dose de luz de 27, 54, 81 e 108 J/cm², respectivamente. Os microrganismos resuspendidos em HSA receberam uma concentração de TriP[4] de 25 μ M e foram irradiados por 15 minutos. Os resultados demonstraram uma relação dose-dependente da droga quando diluída em PBS, sendo que quanto maior a concentração, maior a inativação dos três microrganismos. A resuspensão em plasma sanguíneo alterou a

efetividade da PDT de forma que mesmo na maior concentração da droga associada a uma dose de luz de 27 a 108 J/cm², não foi observada redução na viabilidade da *C. albicans*. Em relação à albumina, observou-se que quanto maior a concentração dessa proteína, menor a redução observada para os três microrganismos avaliados após a PDT. Esse efeito foi maior para a *C. albicans*, uma vez que na concentração de 4,5% de albumina não foi observada redução significativa em sua viabilidade. Os autores concluíram que os três microrganismos podem ser inativados pela PDT, entretanto, a concentração de albumina presente no meio é extremamente importante, pois é capaz de reduzir o efeito dessa terapia.

Lambrechts et al.⁴⁸, em 2005, avaliaram a citotoxicidade da PDT em fibroblastos de derme nas mesmas condições experimentais em que a mesma havia sido efetiva contra microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*). Além disso, estudaram o efeito de diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo dos fibroblastos, e avaliaram a influência do tempo entre a PDT e a mensuração da viabilidade celular (0, 6 e 12 horas). Na etapa inicial do estudo foi utilizado o fotossensibilizador TriP[4] porfirina clorina nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,39; 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25,0 e 50,0 µM. Os fibroblastos foram previamente incubados com as diferentes doses TriP[4] e imediatamente irradiados por 15 minutos com luz halógena de 500 W, em uma fluência de 30 mW cm⁻². Depois da lavagem com solução buffer fosfatada (PBS), o meio de cultura foi recolocado e as células foram incubadas num período de overnight. O teste utilizado para avaliação do metabolismo celular foi o metil-tetrazolium (MTT). Numa segunda etapa, os autores utilizaram 5 concentrações de TriP[4] (3,13; 6,25; 12,5; 25,0 e 50,0 µM) diluídas em soluções de PBS/SFB (6,25%; 12,5; 25,0% e 50,0%), no intuito de observar o efeito do soro na PDT. Essas células foram submetidas ao mesmo tratamento do grupo anterior. Para avaliar o efeito do intervalo

entre a PDT e a mensuração da viabilidade, o teste de MTT foi realizado 0, 6 e 18 horas após a PDT. Foi observado que a partir da concentração de 0,78 μM , houve uma redução significativa no metabolismo celular, e a partir da concentração de 12,5 μM houve redução total. A adição de soro fetal em 50% aumentou significativamente a sobrevivência dos fibroblastos em aproximadamente 63% na concentração de 3,1 μM de TriP[4]. A leitura da atividade metabólica em T0 apresentou valores maiores quando comparadas ao T6 e T18, e entre esses dois últimos não houve diferença estatisticamente significativa. Os autores concluíram que os fibroblastos são mais resistentes a PDT em comparação com os microrganismos avaliados (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) em estudo anterior.

Maisch et al.⁵⁶ (2005) avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica com três derivados da porfirina XF (CTP1, XF70 e XF73) em células procarióticas (uma cepa *S. aureus* sensível a meticilina, duas cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina e uma cepa de *S. epidermis* e *E.coli*) e em células eucarióticas (fibroblastos NHDFs e queratinócitos NHDKs humanos). As células foram cultivadas em placas de 96 compartimentos e incubadas com diferentes concentrações das porfirinas (0 a 100 μM) e diferentes tempos de incubação (5 minutos, 1 ou 4 horas). O metabolismo celular foi avaliado 24 horas após irradiação pelo teste MTT. Os FSs XF70 e XF73 na concentração de 0,005 μM seguidos de 15 min (13,7 J/cm^2) de iluminação com fonte de luz incoerente (UV236) causaram uma redução maior que 99,9% no número de células viáveis de todas as cepas de *Staphylococcus*. Esses resultados indicaram que os derivados da porfirina XF são eficientes contra bactérias gran-positivas e que sua atividade independe da resistência aos antibióticos. Nessas mesmas condições, esses dois FSs (XF70 e XF73) não foram tóxicos para os fibroblastos e queratinócitos. Entretanto para inativação da *E. coli* uma concentração 20 vezes maior de FS foi necessária (0.1 μM), e nessa

condição houve redução do metabolismo celular, ainda que não significativa. Os períodos de pré-incubação mais longos (1 e 4 hrs) não aumentaram a fototoxicidade dos derivados da XP para as cepas de *Staphylococcus* ou *E. coli*. Em contraste com o que fora observado com as bactérias, as células eucarióticas apresentaram um comportamento tempo-dependente, de forma que um tempo de pré-incubação mais longo gerou maior redução da viabilidade celular. Após 5 minutos de incubação com XF73, observou-se por fluorescência a presença do FS apenas na membrana citoplasmática dos fibroblastos. Um maior período de incubação demonstrou um maior acúmulo intracelular do FS. Após 4 horas de incubação, o CTP1 se acumulou preferencialmente nos lisossomos dos fibroblastos, enquanto o XF73 se acumulou nas mitocôndrias. Essa diferença se deve as características lipo ou hidrofílicas de cada FS. Os autores concluíram que os existem diferenças entre os derivados da porfirina XF na inativação de microrganismos resistentes via espécies reativas de oxigênio sem causar danos às células eucarióticas nas mesmas concentrações.

O objetivo do estudo de Paulino et al.⁶¹, em 2005, foi avaliar o efeito da PDT sobre cepas de *S. mutans* e fibroblastos, utilizando diferentes concentrações do FS rose bengal (0-50 μM), associando um fotopolimerizador (HHP) com diferentes tempos de exposição de luz (0-40 s). Segundo os autores, o HHP apresentava as seguintes características: 350-500 mJ/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 estas células na presença e 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 azul de trypan. 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 μM . Sob a exposição de luz e concentrações do fotossensibilizante acima de 0,5 μM 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 foto-ativação do FS Rose bengal pelo uso de HHP inativou a bactéria selecionada para este estudo sem afetar a viabilidade de fibroblastos.

O objetivo do estudo de Souza et al.⁶⁸, em 2006, foi avaliar a viabilidade de diferentes espécies de *Candida* após a fotossensibilização com azul de metileno (100mg/L), e iluminação com um laser diodo (685 nm; 28 J/cm²). Suspensões celulares de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, contendo 10⁶ células por mL, foram submetidas às seguintes condições experimentais: aplicação de FS seguida de iluminação com laser, somente aplicação de FS, somente iluminação com laser, e aplicação de nenhum tratamento (controle). Para avaliação da viabilidade celular após a PDT, os autores utilizaram o método da contagem das ufc/mL. Para isso, após a execução dos experimentos, diluições seriadas de cada amostra (10⁻² e 10⁻³), foram plaqueadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, e as placas foram incubadas por 48 horas. Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e teste de Tukey. Foi demonstrado que a iluminação com laser, na presença de Azul de metileno, reduziu o número de ufc/mL em 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dubliniensis*, 91,6% para a *C. krusei* e 82,3% para a *C. tropicalis*. Também foi observado que a utilização do FS ou da luz, isoladamente, não causaram reduções significativas no número de ufc/mL das amostras, exceto para a *C. tropicalis*. Os autores concluíram que a fotoativação do azul de metileno pela luz vermelha do laser promoveu um efeito fungicida sobre as células de todas as espécies avaliadas.

Jori et al.⁴³ 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.

Konopka, Golinski⁴⁶ (2007), em uma revisão de literatura, abordaram as diversas aplicações da PDT na Odontologia nas 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 acreditam que a PDT possa se tornar o tratamento de escolha para o câncer de cabeça e pescoço, incluindo tanto lesões pré-malignas quanto lesões primárias, recorrentes e metástases. A PDT como terapia antimicrobiana foi iniciada 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. Devido à facilidade de iluminação da cavidade oral, a PDT se tornou uma terapia com potencial para ser aplicada 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.

Grinholc et al.³⁶, em 2008, avaliaram o efeito da PDT com a protoporfirina diarginina (PPArg₂) na inativação de uma espécie de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e em fibroblastos de derme humana. O microrganismo foi cultivado em trypticase soy broth (TSB) a 37 °C e depois diluído para uma densidade de 10⁷ células/mL. *S. aureus* foi incubado com diferentes concentrações do fotossensibilizador (0 a 25 µM) por 30 minutos no escuro, e depois foi submetido à irradiação de 30 minutos, correspondendo a uma dose de luz de 6 J/cm². Após a PDT, a viabilidade bacteriana foi determinada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (CFUs) em um período de 18 a 24 horas. Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 compartimentos e submetidos às mesmas condições descritas previamente para o microrganismo. Em um período de 24 horas pós-PDT, a viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT. Os resultados obtidos na concentração de 10 µM da PPArg₂ mostram uma redução de 3,6 log₁₀ ufc/mL do microrganismo, enquanto observou-se uma redução metabólica de apenas 22,5% para os fibroblastos. Para uma concentração maior de PPArg₂ (20 µM), observou-se uma maior citotoxicidade para os fibroblastos, reduzindo mais de 66% da atividade mitocondrial. Os autores concluíram que a protoporfirina PPArg₂ apresentou efeito bactericida contra a espécie de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina sem causar danos às células eucarióticas.

O objetivo do estudo de Giusti et al.³⁵, 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, 2 e 3 mg/mL) ou em azul de toluidina (0,025 e 0,1

mg/mL) e, posteriormente, irradiados por um LED de luz vermelha (630 nm, irradiância de 400 mW/cm² e potência de 200 mW), durante 60 segundos (dose = 24 J/cm²) ou 120 segundos (dose = 48 J/cm²). 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 submeteu-se os espécimes a irradiação, nas duas diferentes doses e grupos em 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/cm², a taxa de sobrevivência desses microorganismos foi menor do que quando a dose de 48 J/cm² 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/cm². 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 microrganismos.

Donnelly et al.²⁸, 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 devido à facilidade de seu mecanismo de ação (droga, luz e oxigênio) e à impossibilidade do fungo em 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 gran-positivas. Essa dificuldade resultou na utilização de uma maior concentração de fotossensibilizador e um aumento da dose e luz. Os autores justificaram que isso ocorreu pela presença da membrana nuclear, maior tamanho da célula e redução do número de alvos para o oxigênio singlete 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, dentre eles: fenotiazínicos, porfirinas, ácido aminolevulínico-5 e ftalocianinas. Todos eles apresentaram sucesso na inativação de fungos, com mecanismos de ação específicos de cada família. Os autores sugerem que a seletividade desses fotossensibilizadores pelas células fúngicas e a ausência de relatos científicos de resistência fúngica à PDT e assim como de efeito genotóxicos ou mutagênicos sugerem o sucesso dessa terapia contra fungos. Segundo os autores é necessário com 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 a permite atuar unicamente em seu sítio de ação.

2.2 Terapia Fotodinâmica em células tumorais e citotoxicidade em células normais

Bäumler et al.¹² (1999) objetivaram estudar in vitro a eficiência clínica e o mecanismo de ação do corante indocianina verde (ICG) e da irradiação por laser. Para investigar os efeitos citotóxicos, as células HT-29 (linhagem imortalizada humana de câncer de cólon) foram semeadas em placas de 96 compartimentos e incubadas com a ICG em diferentes concentrações (10–500 μM) 24 horas antes da irradiação. Após esse período, o meio de cultura com ICG foi removido e as células foram irradiadas por um comprimento de onda contínuo de 805 nm, em uma fluência de 40 mW/cm^2 e uma dose de luz de 30 J/cm^2 . Depois da iluminação, as células foram mantidas na incubadora por mais 24 horas quando foi realizada a análise da viabilidade celular pelo método metil-tetrazolium (MTT). Além da viabilidade celular, foram avaliados os efeitos do azida de sódio, histadina, manitol e D_2O na morte celular e também realizado o teste de peroxidação lipídica (teste fluorimétrico do ácido thiobarbitúrico-TBA). Após a irradiação pelo laser, a viabilidade celular do controle no escuro e das células incubadas com a maior concentração de ICG foi de $1,27 \pm 0,11$ e $0,28 \pm 0,05$, respectivamente. Utilizando D_2O e 100 mM de ICG, a concentração de malondialdeído (marcador de peroxidação lipídica) aumentou de $0,89 \pm 0,10$ nmol para $11,14 \pm 0,11$ nmol. A presença do azida de sódio e histadina (inibidores do oxigênio singlete) reduziram significativamente a morte celular. Em contraste, a presença do manitol, inibidor das demais espécies reativas de oxigênio (EROs), não reduziu a morte celular. Todos esses resultados sugerem que a fotoativação da ICG leva a morte celular da linhagem HT-29 devido à produção de oxigênio singlete e a subsequente formação de peróxidos lipídicos.

Distintos tipos de morte celular podem ocorrer sob diferentes protocolos de PDT. Nesse estudo in vitro, Hsieh et al.³⁹ (2003)

caracterizaram os diferentes mecanismos de morte pós-PDT da linhagem celular A431 obtida a partir de um carcinoma epidermóide humano. As células foram cultivadas em placas Petri de 35 mm de diâmetro, e incubadas com diferentes concentrações de Photofrin (0 a 63 µg/mL) por 3 horas. Em seguida, foram irradiadas com laser de He-Ne (632,8 nm) com uma dose de luz de 10 J/cm². A viabilidade celular foi avaliada pelo teste MTT e confirmada pelo teste do azul de trypan. Para detecção do tipo de morte celular, as células foram incubadas com iodeto de propídeo (marcador de necrose) ou anexina-V (marcador de apoptose) e observadas em microscópio de fluorescência. A formação de espécies reativas de oxigênio foi detectada pelo marcador DCFDA por meio da citometria de fluxo. Observou-se que, após 3 horas de incubação Photofrin (28 µg /mL), a morfologia das células A431 não foi significativamente alterada. Além disso, a fluorescência vermelha emitida pelo fotossensibilizador se restringiu a periferia das células indicando ser a membrana plasmática o alvo do Photofrin. Durante um período de incubação mais longo (24 horas), a morfologia celular foi intensamente alterada e foi possível observar a presença do Photofrin no citoplasma. Quando o fotossensibilizador estava localizado preferencialmente na membrana plasmática, a irradiação com laser causava intensa alteração morfológica, sugerindo um dano irreversível dessa membrana celular. Por outro lado, quando o FS estava localizado internamente na célula, observou-se a formação de vacúolos na região perinuclear. Nas duas situações, a irradiação com laser levou a uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular, sendo que o efeito da PDT nas células onde o Photofrin se localizou na membrana foi mais intenso. A porcentagem de morte celular foi diretamente proporcional a dose de luz aplicada e a concentração do fotossensibilizador. Com relação às espécies reativas de oxigênio, observou-se um aumento significativo da fluorescência para EROs imediatamente após a PDT, permanecendo constante por 10, 30, 60 e 120 minutos. Características típicas de

apoptose como a externalização de fosfatidilserina e fragmentação do DNA não foram identificadas no processo de morte celular causada pela PDT. Os autores concluíram que quando a membrana plasmática foi o principal alvo da PDT com Photofrin ocorreu um aumento instantâneo dos níveis de EROs e alteração causada à membrana levou ao fenótipo de morte por necrose.

Ahn et al.¹ (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). 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/cm²). Após um período de 1, 3, 6, 12, 24, e 48 horas, as células foram observadas em microscópio óptico para determinar as 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 realização da citometria de fluxo, as células foram incubadas com Anexina-V e Iodeto de Propídeo com 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 dose utilizada. 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. Os resultados desse estudo indicaram que o Photogem[®] possui afinidade tumoral e causou morte celular por necrose devido ao

dano na membrana plasmática, sendo esse o principal mecanismo do efeito antitumoral da PDT associada ao Photogem®.

Diversas organelas têm sido postuladas como alvo da PDT, entre elas membrana plasmática, núcleo, mitocôndria, complexo de Golgi, lisossomos e citoesqueleto. Ferreira et al.³⁴, em 2004, avaliaram o efeito fotodinâmico da ftalocianina AIPcS(4), baseando-se em técnicas de fluorescência para detecção de danos nas mitocôndrias, retículo endoplasmático e componentes do citoesqueleto da linhagem celular HeLa. As células foram cultivadas em placas de 24 compartimentos e incubados por 1 hora com o AIPcS(4) na concentração de 10 μM . Após esse período, o meio de cultura contendo o fotossensibilizador foi removido e substituído por meio de cultivo sem fenol vermelho. As células foram irradiadas por um laser de diodo Thera Laser-DMC (670 nm) por 103 segundos (dose de luz de 4,5 J/cm^2 e fluência de 45 mW/cm^2). Ao final da PDT, as células foram incubadas por 24 e 48 horas, e depois expostas a corantes fluorescentes e analisadas por microscopia de fluorescência. Os corantes Rhodamine 123, DioC6(3) e Rhodamine phalloidin foram utilizados na avaliação de alterações no potencial elétrico da membrana mitocondrial, no retículo endoplasmático e nos filamentos actínicos do citoesqueleto, respectivamente. Os resultados demonstraram que as mitocôndrias das células irradiadas apresentavam-se hiperpolarizadas na região perinuclear após 24 horas. No período de 48 horas, essas mitocôndrias possuíam pequena despolarização e presença de fragmentação do citoplasma. A análise das células irradiadas também demonstrou alterações de elementos tubulares formados ao longo do retículo endoplasmático e induziu o rompimento de estruturas filamentosas do citoesqueleto. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica causou alterações mitocondriais, no retículo endoplasmático e no citoesqueleto, demonstrando um efeito celular não seletivo. Dessa forma, estudos mais conclusivos são necessários para melhor

compreensão dessa técnica e para o desenvolvimento de fotossensibilizadores mais seletivos.

Triesscheijn et al.⁷⁴, em 2004, avaliaram o efeito fototóxico da terapia fotodinâmica mediada pela clorina mTHPC em células endoteliais microvasculares humanas (hMVEC), em fibroblastos humanos (BCT-27) e em duas linhagens tumorais humanas (HMESO-1 e HNXOE). As células foram semeadas em placas de 96 compartimentos e incubadas com 0,06 µg/mL de mTHPC por 3, 6, 12 e 24 horas. Após a remoção do meio de cultura com a clorina, as células foram irradiadas por um laser de diodo vermelho (652 nm), sendo que a dose de luz variou de 0 a 10 J/cm². A viabilidade celular foi mensurada por dois métodos: sulforodamina B (SRB) e formação de colônias (CFA). Para avaliar a absorção relativa de mTHPC pelos diferentes tipos celulares, a fluorescência das células tratadas com a clorina foi mensurada pela citometria de fluxo. Além disso, a localização do fotossensibilizador no interior das células foi averiguada por meio da microscopia confocal utilizando o kit MitoTracker[®] Green FM. Os autores expressaram a viabilidade celular em função da fluorescência relacionando a fototoxicidade com conteúdo intracelular da clorina mTHPC. Baseando-se na fluorescência total das células, a linhagem tumoral HNXOE foi a mais sensibilizada pela clorina e os fibroblastos BCT-27 os mais resistentes. As células endoteliais foram tão sensíveis a PDT quanto as células tumorais ou fibroblastos. No entanto, elas apresentaram um aumento linear na absorção da clorina nas primeiras 48 horas, ao contrário das demais linhagens que atingiram um platô nas primeiras 24 horas. Observou-se uma rápida resposta apoptótica após a PDT para as células endoteliais, enquanto na linhagem tumoral HNXOE houve uma tendência para morte celular do tipo necrose ou apoptose tardia. Os autores concluíram que as células endoteliais não são intrinsecamente mais sensíveis a PDT, porém atingem um nível intracelular de clorina mais alto comparada as demais linhagens.

A avaliação da citotoxicidade e dos efeitos mutagênicos da PDT em células tumorais RPMI-2650 e fibroblastos normais WS-1 foi objeto de estudo de Zenzen, Zankl⁸³, em 2004. As células foram pré-incubadas com ALA-H (0,25 mg/mL) por 5 horas e irradiadas com diferentes doses de luz halógena vermelha (633 ± 20 nm; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 J/cm²). Os efeitos citotóxicos foram determinados por meio da mensuração do índice mitótico (MI) e do índice de divisão nuclear (NDI). Para avaliar a genotoxicidade da PDT, foram identificadas aberrações cromossômicas (CA) e presença de micronúcleos (MN). Os resultados mostraram que após a PDT com uma dose de luz de 2,0 J/cm², o MI da linhagem RPMI-2650 reduziu significativamente para 16,9% quando comparado ao grupo tratado apenas com o ALA-H. Entretanto, nenhuma redução significativa foi observada para os fibroblastos quando incubados com ALA-H associado às doses de até 2,0 J/cm². O NDI das células tumorais submetidas à PDT foi significativamente reduzido quando irradiadas por uma dose de luz entre 1 e 2 J/cm², enquanto nenhum efeito negativo foi observado para os fibroblastos. Com relação aos testes de mutagenicidade, tanto as linhagens tumorais quanto as normais não apresentaram aumento significativo das aberrações cromossômicas ou do número dos micronúcleos após a PDT. Para as culturas de RPMI-2650, durante as metáfases, encontrou-se 7 a 7,5% de CA, o que não foi estatisticamente diferente do controle ALA-H (5,5%). Nas culturas de WS-1, as metáfases contendo alguma aberração cromossômica variaram entre 5 a 7,5%, o que também não representou uma diferença estatisticamente significativa. Os índices de MN foram praticamente iguais quando se comparou células submetidas à irradiação com as que não foram irradiadas para os dois tipos celulares. Segundo os autores, a PDT com o ALA-H induziu efeitos tóxicos desejáveis para as células tumorais, e nenhum efeito tóxico para os fibroblastos normais. Além disso, essa terapia não apresentou nenhum potencial mutagênico para os dois tipos celulares.

O sistema de co-cultura *Raft* reproduz in vitro as camadas de epiderme humana ao semear fibroblastos em uma matriz colágena e sobre esses queratinócitos. Chiu et al.²⁴ (2005) avaliaram os efeitos da PDT nesse tipo de cultura tridimensional. Fibroblastos e queratinócitos foram isolados de pacientes para a construção das co-culturas *Rafts* e, após 4 dias de maturação, foram incubadas com ALA-5 (1000 µg/mL) por 3 horas e irradiadas com laser (635 nm) com uma dose total de 5, 10 e 20 J/cm². As *Rafts* foram examinadas 24 horas e 14 dias após a PDT. A viabilidade celular foi determinada utilizando microscopia confocal combinada com corantes fluorescentes capazes de marcar células vivas ou mortas. Além disso, como as *Rafts* contraem ao longo do tempo, a área superficial era medida diariamente com o auxílio de microscopia óptica. Nas doses de luz 10 e 20 J/cm², observou-se praticamente 100% de morte celular em todas as co-culturas, enquanto na dose de 5 J/cm² a viabilidade celular se mostrou semelhante ao controle. As *Rafts* sem o ALA e sem irradiação contraíram de forma distinta dependendo da origem constitutiva dos fibroblastos, de forma que as constituídas por fibroblastos adultos tiveram uma menor contração com o tempo. As *Rafts* submetidas a PDT contraíram menos quando comparadas ao controle. Dessa forma, os autores concluíram que a PDT pode ser utilizada para reduzir a contração tecidual preservando a viabilidade celular, sugerindo sua utilização da PDT para tratamento de cicatrizes com quelóides.

Kirszberg et al.⁴⁵ (2005) compararam a citotoxicidade do azul de metileno (AM) em duas linhagens tumorais de células eritroleucocitária (K 562 e Lucena) e células normais (linfócitos e melanócitos) ativadas ou não por uma fitohemaglutinina. As células foram cultivadas em placas de 96 compartimentos e incubadas com diferentes concentrações de AM (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 µg/mL) por diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 horas). Foram realizadas avaliações da proliferação celular com o método H³-timidina, da viabilidade celular com teste de MTT,

concentração do FS pela citometria de fluxo e níveis de espécies reativas de oxigênio com o corante dihidrorrodamina. Para verificar as diferenças na sensibilidade das linhagens normal e tumoral ao AM, as células foram avaliadas pelo MTT após 48 horas de contato com a droga. Observou-se que as células K 562 e Lucena foram mais sensíveis aos efeitos do AM quando comparadas às células normais, e que as células Lucena, derivadas de uma linhagem celular resistente à drogas da terapia anti-câncer, apresentou uma menor sensibilidade do que as células K 562. Além disso, a produção de EROs estava diretamente relacionada tanto a citotoxicidade do AM verificada pelo MTT quanto a fluorescência obtida pela citometria de fluxo ao avaliar a absorção da droga pelas células. Assim, os maiores níveis de EROs foram encontrados nas linhagens tumorais. Sabe-se que células com alta atividade de proliferação são mais susceptíveis aos agentes químicos, e por isso as linhagens tumorais se apresentaram mais sensíveis que as células normais. Não foram observadas diferenças na toxicidade da droga, mesmo com a ativação das células normais por uma fitohemaglutinina. Entretanto, a indução da proliferação celular nas linhagens normais foi completamente inibida quando essas células foram tratadas com AM, o qual foi capaz de bloquear a síntese de DNA. Os autores concluíram que o AM pode ser utilizado como agente quimioterápico, devido a sua preferência por células tumorais. No entanto, alguns cuidados devem ser tomados durante o tratamento devido aos possíveis danos causados ao sistema imune do hospedeiro.

Babilas et al.⁹ (2006) compararam a eficácia da Terapia Fotodinâmica com ALA in vitro e in vivo no tratamento de queratose actínica utilizando dois tipos de fontes de luz. Para isso, queratinócitos de epiderme humana foram incubados com ALA por 24 horas nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{mol/L}$. Após esse período, as células foram irradiadas ou por luz halógena (580–750 nm) com uma

fluência de 40 mW/cm² na dose de 24 J/ cm² ou por LED (633 ± 3 nm) de mesma fluência nas doses de 3, 6, 12 e 24 J/ cm². A viabilidade celular dos queratinócitos foi significativamente reduzida pelo ALA associado as duas fontes de luz, de forma que não houve diferença entre elas. A irradiação sozinha não afetou o metabolismo celular. Entretanto, os controles apenas com a utilização do ALA apresentaram uma redução progressiva na viabilidade celular após a incubação que variou entre 20 a 1% nas concentrações de 300-500 µmol/L. No estudo in vivo, também não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas fontes de luz no tratamento da queratose actínica. Ambos os tratamento, após 6 semanas, obtiveram índices de remissão completa de 84,3% para o LED e de 82,8% para luz halógena. Observou-se nesse estudo que queratinócitos normais de epiderme humana tiveram seu metabolismo reduzido pela PDT com ALA associado ao LED ou à luz halógena, sugerindo uma alta citotoxicidade desse tratamento. Além disso, ambas as fontes de luz foram eficazes no tratamento da queratose actínica.

Alexiades-Armenakas³, 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 a melhor 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. Devido ao alto poder de penetração tecidual, a utilização de luzes vermelhas provoca o surgimento de efeitos colaterais nos tecidos

próximos a 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 a 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 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.

Os efeitos adversos da PDT com o ácido aminolevulínico (ALA) e o ALA-hexylester (ALA-H) utilizando doses sub-letais ou ausência de luz foram avaliados por Chu et al.²⁵ (2006) em linfócitos normais e em células de carcinoma nasofaríngeo (NPC). Os linfócitos foram obtidos a partir de sangue doado por voluntários e as células tumorais obtidas a partir de um paciente com carcinoma esquamoso nasofaríngeo. As células foram cultivadas em placas de 96 compartimentos e incubadas com as diferentes concentrações das drogas por 4 horas. Após esse período, um grupo de células foi mantido no escuro enquanto outro foi irradiado por luz halógena (600 a 800 nm; 14 mW/cm²) em diferentes doses de luz. Em seguida, as células voltaram para incubadora por um período de 24 horas, quando se realizou a avaliação do metabolismo celular com teste MTT e avaliação de danos ao DNA e o potencial genotóxico da droga com método cometa alcalino. Concentrações de 0,75 mM para o ALA e de 10 µM para o ALA-H foram utilizadas por serem capaz de destruir a maioria das NPCs, e não apresentaram nenhum dano ao DNA. Entretanto, a incubação com ALA (0,75 mM) sem iluminação

apresentou potencial citotóxico e danos ao DNA nos linfócitos. Por outro lado, quando incubados com ALA-H (10 μ M) na ausência de luz não foi detectado dano ao DNA e somente uma baixa citotoxicidade. As imagens de fluorescência demonstraram presença de PpIX difusa na região do núcleo dos linfócitos para o ALA, o que justificaria o fato do ALA induzir danos ao DNA. Os resultados sugeriram um potencial genotóxico para os linfócitos do ALA na concentração de 0,75 mM, sendo esse potencial excluído para o ALA-H na concentração de 10 μ M. Os autores ressaltaram a eficácia do ALA-H em inativar células tumorais sem causar danos genotóxicos em linfócitos normais, o que sugeriu seu ótimo potencial para utilização na PDT.

Postigo et al.⁶⁴, em 2006, avaliaram o efeito de três clorinas (CHL-1, CHL-2, CHL-3) com diferentes veículos de distribuição da droga em dois tipos celulares (fibroblastos e células tumorais HeLa). Os FSs foram dissolvidos em DMSO ou encapsulados nos lipossomos e adicionadas às células na concentração de 1 a 10 μ M por 1 ou 24 horas. Após esse período, as células foram irradiadas por 36 minutos por um sistema de LED (7,2 J/cm²). Depois da irradiação, o metabolismo celular foi avaliado pelo teste MTT em diferentes períodos pós-PDT (0, 1, 2 e 24 horas). Os resultados demonstraram que as clorinas dissolvidas em DMSO apresentaram maior absorção pelas células. Também foi observado aumento da toxicidade das clorinas quando irradiadas, provavelmente devido a formação de oxigênio singlete evidenciado por sua fluorescência infra-vermelha. A clorina CHL-1 apresentou maior toxicidade quando incubada por apenas 1 hora, sendo que essa diferença desapareceu quando se compararam as clorinas após 24 horas de incubação. O maior tempo de pré-incubação aumentou a quantidade intracelular do FS. Os diferentes períodos de avaliação do MTT mostraram que a CHL-1 apresentou dano citotóxico imediatamente após a PDT, enquanto as demais (CHL-2 e CHL-3) causaram uma redução

metabólica mais lenta. Com relação aos diferentes tipos celulares, os fibroblastos foram dez vezes mais sensíveis a PDT com as clorinas que as células tumorais HeLa. Os autores concluíram que a natureza da clorina, o veículo utilizado para sua distribuição, o período de pré-incubação, e o período de avaliação pós-PDT afetaram a fotoinativação celular.

Buytaert et al.¹⁷, em 2007, publicaram uma revisão de literatura baseada nos efeitos moleculares iniciados pela terapia fotodinâmica nas diferentes vias de morte celular. Segundo os autores, múltiplas cascatas sinalizadoras são ativadas concomitantemente nas células expostas ao estresse fotodinâmico e dependendo da localização subcelular do fotossensibilizador e conseqüentemente das espécies reativas de oxigênio, esses sinais são traduzidos em respostas adaptativas ou de morte celular. Estudos recentes indicaram que a PDT pode causar morte das células induzindo a apoptose ou outros tipos de morte celular (necrose ou morte celular por autofagia). A extensão do dano e a citotoxicidade após a PDT é multifatorial e depende da molécula do fotossensibilizador, sua localização no momento da irradiação, o total da dose administrada ou da concentração do agente fotossensibilizante, a dose de luz, o intervalo entre a administração da droga e a irradiação, o nível de oxigenização do tecido, dentre outros. A nível molecular, a destruição celular pela PDT é causada por danos irreversíveis aos alvos vitais, como membrana plasmática, membrana intracelular mitocondrial, lisossomos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Como em geral os FSs não se acumulam no núcleo, a PDT tem potencial mutagênico e genotóxico muito baixo por não causar dano ao DNA. Os fotossensibilizadores que se acumulam nas mitocôndrias ou retículo endoplasmático causam apoptose; enquanto, os que se acumulam na membrana plasmática ou lisossomos predispõem as células para necrose. A morte celular por apoptose é caracterizada por alterações no

fenótipo envolvendo condensação nuclear e contração (encolhimento) celular generalizada. A necrose é caracterizada por intumescência celular e uma rápida perda da integridade da membrana plasmática, o que gera reação inflamatória devido à liberação de componentes celulares e moléculas pró-inflamatórias. A morte por autofagia celular se caracteriza pela presença de vacúolos autofágicos e ocorre uma digestão celular via lisossomo. Os autores concluíram que a compreensão das diferenças moleculares e a identificação desses tipos de morte é importante para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para a PDT no intuito de aumentar a eficiência dos tratamentos anti-tumorais.

O estudo realizado por Egli et al.³³ (2007) objetivou determinar os efeitos da PDT com ALA em cultura de células presentes no tecido ósseo. Todos os tipos celulares (osteoblastos de linhagem primária, fibroblastos L929, células da medula óssea e células dendríticas) foram incubados com 0,5 mM de ALA em meio de cultura sem soro fetal bovino por 4 horas. O acúmulo de PpIX foi determinado por fluorescência e por citometria de fluxo. Após a remoção do fotossensibilizador, as células foram expostas a doses crescentes de irradiação até 20 J/cm² a uma potência de 100 mW/cm², abrangendo um comprimento de onda de 580 a 740 nm. Os efeitos da PDT tanto na viabilidade celular quanto na função celular foram avaliados durante 6 dias. O acúmulo de PpIX atingiu um platô na concentração de 0,05 mM para os osteoblastos, fibroblastos e células dendríticas; entretanto, para as células de medula óssea, esse platô ocorreu somente na concentração de 2,0 mM. Todos os tipos celulares avaliados apresentaram uma porcentagem de viabilidade celular inferior a 12% quando se utilizou ALA-5 na concentração de 0,5 mM associado a uma dose de luz de 20 J/cm². A função dos osteoblastos (proliferação, níveis de RNAm codificando o colágeno tipo I, e atividade da fosfatase alcalina) e a função dos fibroblastos (proliferação, níveis de RNAm codificando o colágeno tipo I e

III) não foram afetadas quando as células foram irradiadas com uma dose de luz de 10 J/cm². Entretanto, a dose de 20 J/cm² foi suficiente para alterar todas as funções celulares. A capacidade das células dendríticas em estimular os linfócitos do tipo T para uma reação leucocitária reduziu para 4 ± 2% a 20 J/cm². Todas as células investigadas foram sensíveis à PDT mediada pelo ALA, o que viabiliza a utilização da PDT para eliminar esses tipos celulares de enxertos osteocondrais.

A localização dos fotossensibilizadores nas organelas citoplasmáticas durante a PDT representa um papel importante na destruição celular. Dessa forma, Saczko et al.⁶⁷, 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.

Como a luz vermelha pode causar danos térmicos aos tecidos subjacentes e circundantes, Bouillaguet et al.¹⁵ (2008) testaram a hipótese de que a luz azul (380-500 nm) poderia também induzir a formação de espécies reativas de oxigênio sem no entanto causar danos às células dos mamíferos. Para isso, monócitos THP1 foram expostos a

concentração de 10 μM 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 J/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 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 μM , e todos exceto a pheophorbide-a-PLL foram mais tóxicos após a exposição à luz azul. Esse estudo demonstrou a possibilidade de uso da luz azul com fotossensibilizadores para produzir espécies reativas de oxigênio e dessa forma ser usada na desinfecção endodôntica.

A terapia fotodinâmica com ALA-5 tem se revelado com um tratamento viável para doenças articulares devido à sensibilidade das células inflamatórias do tecido sinovial. No entanto, para que a PDT com ALA-5 possa ser considerada segura e benéfica para aplicações intra-articulares é necessário que a mesma não cause danos aos condrócitos, prevenindo qualquer tipo de dano a cartilagem articular. Egli et al.³², em 2008 avaliaram a resposta in vitro dos condrócitos à PDT com ALA-5 e compararam essa resposta à dos osteoblastos e das demais células derivadas do tecido sinovial. As células foram obtidas a partir da cultura primária de bovinos após 24 horas da morte dos animais. Após o cultivo, elas foram incubadas por 4 horas com ALA-5 (0,0–2,0 mM) em meio de cultura sem soro e o acúmulo da PpIX foi averiguado por meio da fluorescência no citômetro de fluxo. Em seguida, o meio foi substituído por meio de cultivo completo sem a presença do ALA-5 e as células foram

irradiadas por 100-500 segundos para atingir uma dose de luz de 10 a 50 J/cm². A seguir, o efeito da PDT na viabilidade e função celular foi avaliado após 12 dias. Os condrócitos apresentaram uma menor fluorescência após a incubação com o ALA-5 quando comparados os demais tipos celulares, o que sugere um menor acúmulo de PpIX. Após incubação com 0,5 mM de ALA-5 e irradiação com uma dose de 20 J/cm², os condrócitos não foram funcionalmente afetados, pois continuaram a expressar colágeno tipo II e síntese de glicosaminoglicanas. Entretanto, houve uma redução na proporção de células viáveis para os osteoblastos e demais células sinoviais para 2 e 14 %, respectivamente. Os autores concluíram que a PDT com ALA-5 representa uma possível estratégia de tratamento para doenças inflamatórias articulares sem danificar a cartilagem. No entanto, mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para comprovação desses dados.

O papel desenvolvido pelo oxigênio singlete (¹O₂) na terapia fotodinâmica não está totalmente elucidado. No estudo de Jiménez-Banzo et al.⁴¹ (2008) foram relatadas a cinética da formação, difusão e decomposição do ¹O₂ 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 a 100 µM) 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 µM dos FSs com um período de incubação de 16 horas foi o melhor parâmetro entre a viabilidade celular e concentração do fotossensibilizante no meio de cultivo. A localização intracelular de cada FS dependeu do tipo celular, sendo que o TMPyP localizou-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 triplete, 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, devido a 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 seu curto tempo de vida foi suficiente para que se difundisse por longas distâncias entre as células.

Tapajós et al.⁷², em 2008, avaliaram o efeito da PDT em queratinócitos orais humanos utilizando uma ftalocianina cloro-alumínio (AICIPc) encapsulada em lipossomos. Os queratinócitos foram semeados em garrafas de 25 cm², e divididos em quatro grupos: grupo 1 (AICIPc + luz); grupo 2 (AICIPc); grupo 3 (luz) e grupo 4 (controle negativo). Os grupos 1 e 2 foram pré-incubados com 5 µM de AICIPc por 30 minutos. Em seguida, os grupos 1 e 3 foram irradiados com laser de diodo (670 nm) por 5 minutos com uma fluência de 40 mW/cm² e uma dose de luz de 25 J/cm². Após a PDT, as células foram incubadas por mais 24 horas quando se realizou os testes de citotoxicidade e genotoxicidade. Para avaliação da viabilidade celular, utilizou-se o teste com azul de trypan para identificação das células mortas e os testes com o corante alaranjado de acridina e brometo de etídio para identificação das células vivas e o tipo de morte (necrose ou apoptose). As alterações genotóxicas foram quantificadas pela frequência de formação de micronúcleos e pela fragmentação do DNA identificados pelo método cometa. A fim de complementar os dados, a morfologia celular foi observada pela microscopia óptica e de varredura. Os resultados do estudo demonstraram uma redução na viabilidade celular de 95% associada a

alterações morfológicas após a PDT. A destruição celular foi predominantemente iniciada por um processo de necrose, como observado nos testes com alaranjado de acridina e brometo de etídio sendo confirmado pela microscopia eletrônica de varredura. Os grupos submetidos apenas ao fotossensibilizador ou apenas a irradiação não apresentaram alterações citotóxicas, genotóxicas ou morfológicas. O método cometa mostrou 70% de fragmentação do DNA dos queratinócitos submetidos à PDT; entretanto, não houve aumento das aberrações cromossômicas. Os autores concluíram que a PDT com AICIPc apresentou uma alta toxicidade em cultura de células de câncer bucal, reduzindo a proliferação celular e causando morte via necrose.

Saczko et al.⁶⁶, em 2008, avaliaram o efeito da PDT mediada pelo Photofrin[®] em duas linhagens tumorais (A549 e MCF-7) e uma linhagem celular normal (HUV-EC-C). Além disso, investigaram a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), uma das enzimas antioxidantes mais importantes na resposta ao estresse oxidativo gerado por radicais livres. As células foram incubadas com 15 e 30 µg/mL de Photofrin[®] e irradiadas por uma lâmpada com luz polarizada a uma dose de 6 J/cm² em uma fluência de 10 mW/cm². Após a iluminação, as células foram incubadas por 5 minutos, 3 ou 6 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de MTT. Para detecção de fragmentação do DNA associado a apoptose, foi utilizado o método cometa neutro. Adicionalmente, a atividade intracelular da superóxido dismutase foi avaliada por um kit Ransod. Tanto as células de linhagem tumoral (A549 e MCF-7) quanto às de linhagem normal (HUV-EC-C) apresentaram uma significativa desordem mitocondrial após 5 minutos da PDT quando se utilizou uma dose de 30 µg/mL de FS. A viabilidade celular foi reduzida para 64% após 5 minutos da PDT na dose de 15 µg/mL e somente 3% das células sobreviveram depois de 6 horas. Observou-se uma diferença na detecção de células apoptóticas para linhagem tumoral e normal. A

identificação de apoptose para as células tumorais ocorreu 3 horas após a PDT, e para linhagem normal somente depois de 6 horas. A atividade da SOD aumentou significativamente após 5 minutos de irradiação, permanecendo elevada durante o período de 3 horas após PDT e reduzindo depois de 6 horas. Para a linhagem normal HUV-EC-C, a elevação da atividade foi de 170% quando comparada ao controle, e após 6 horas da PDT foi reduzida para 80%. Os dados obtidos nesse estudo contribuíram para a caracterização do tipo de morte celular que ocorreu via apoptose. Além disso, os autores sugeriram que a SOD está envolvida no processo de morte celular por danos causados às mitocôndrias. Existem poucos dados sobre a resposta anti-oxidante das células em relação a PDT, sendo de extrema importância a determinação do papel dos sistemas de defesa anti-oxidante durante a PDT a fim de aprimorar a eficácia dessa terapia.

2.3 Fotossensibilizadores e efeitos da luz

A ação da luz visível em cultura celular foi objeto de estudo na revisão de literatura realizada por Karu⁴⁴, em 1990. Na maioria dos estudos citados pela autora, a irradiação com luz visível estimulou a proliferação e/ou o metabolismo celular. Entretanto, outros estudos verificaram a inibição da proliferação celular e até mesmo o efeito letal da irradiação. O comprimento de onda, a fluência e a intensidade foram os pontos mais importantes tanto na estimulação quanto na inibição do metabolismo celular. A autora relatou que para os efeitos estimulantes, os parâmetros da luz são mais estreitos e bem definidos. Em relação à fluência e intensidade capazes de gerar efeitos inibitórios, os parâmetros não são bem determinados e além de serem de maior amplitude. A autora acredita que componentes da cadeia respiratória são os fotoreceptores primários tanto para os efeitos estimuladores quanto para os efeitos

inibidores. O efeito positivo ou negativo da luz pode ser explicado pelas diferentes reações que ocorrem em caso de fluências baixas ou altas levando a diferentes campos energéticos após a excitação eletrônica das moléculas fotoreceptoras. Essa excitação eletrônica pode ocorrer de duas formas: pela aceleração da transferência de elétrons nas reações do tipo redox em algumas partes da cadeia respiratória; e pela transferência de energia para o oxigênio, formando o oxigênio reativo e subsequentemente EROs. Em baixas fluências e baixa intensidade, as reações do tipo redox predominam, resultando no controle do metabolismo celular. Em alta fluência e intensidade, os produtos formados pelas reações com oxigênio reativo causam dano e até morte celular por reagirem com as flavinas e com o citocromo-c presentes nas mitocôndrias e considerados como fotossensibilizadores endógenos. A autora concluiu que cada tipo celular reage diferentemente à irradiação, sendo importante considerar as características de cada célula como também o estado fisiológico celular previamente a irradiação.

Com base em dados científicos publicados na literatura, Wainwright⁷⁵, 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 mostradas 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.

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.⁵⁷, 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 feito 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. Neste 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 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 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. Observou-se que a intensidade da luz irradiada se distribui 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), o que demonstra que a aplicação do laser pode realizada externamente, principalmente se o laser estiver próximo ao abdômen. Estes resultados são úteis para muitas aplicações do laser desde a bioestimulação a fototerapia.

Alisson et al.⁶ (2004) revisaram na literatura as três famílias de fotossensibilizadores (FSs), porfirinas, clorofilas e corantes, atualmente disponíveis no mercado. Os FSs são os veículos da PDT que permitem a transferência de energia luminosa para gerar produtos reativos que causam cito e vasculotoxicidade, e, conseqüentemente, a destruição do alvo. Todos os FSs têm a habilidade de se acumular nos tecidos alvos, de uma forma mais ou menos específica, e produzir uma ablação da vascularização. Para serem considerados como fotossensibilizadores ideais são necessárias algumas características, tais como, não ser tóxico, não causar nenhum tipo de mutagenicidade, ser de fácil eliminação do organismo, ter seletividade, possuir uma versatilidade de administração, não causar dor durante a PDT, ser de custo acessível, entre outras. A habilidade de alguns FSs em emitir fluorescência permite maior efetividade da terapia, já que é possível identificar as regiões que devem ser irradiadas. A primeira família a ser discutida foi a hematoporfirina e seus derivados. Após a purificação e manipulação, esses derivados são

transformados em produtos comerciais com diversos nomes Photofrin[®], Photosan, Photocan, entre outros. Dependendo dos passos seguidos durante a purificação, esses produtos comerciais podem ser diferentes bem como as reações aos tecidos. A partir do processo natural de fotossíntese, surge a segunda família com componentes da clorofila, que possuem excelentes características fotossensíveis. Nesse grupo estão presentes as clorinas, purinas e bacterioclorinas. A última família é dos fenotiazínicos, utilizados desde o início da PDT. Segundo os autores, existem diversas opções de fotossensibilizadores, e existe a necessidade uma equipe multidisciplinar para expandir o conhecimento dos os mecanismos fundamentais da PDT e melhorar a aplicabilidade dessa terapia.

Wataha et al.⁷⁶ (2004) investigaram a hipótese de que as células com alto consumo energético são mais susceptíveis a inibição mitocondrial causada pela irradiação com luz azul. Eles estimaram o consumo de energia pelo “population doubling time”, e a viabilidade e crescimento celular pela atividade da desidrogenase succínica (SDH). Seis tipos celulares foram utilizados nesse estudo, dentre eles células normais da cavidade bucal (queratinócitos NHEK e fibroblastos HGF) e células de origem tumoral (WI-38, OSC-2, MCF-7 e Balb/c). As células foram semeadas em placas de 96 compartimentos e após 24 horas foram irradiadas por três tipos de fonte de luz (luz halógena, arco de plasma e laser de argônio) em duas doses 5 ou 60 J/cm². Após a PDT, a atividade mitocondrial foi avaliada pelo teste de MTT nos períodos de 2, 24, 48 e 72 horas. Os fibroblastos da linhagem Balb/c foram analisados em microscopia eletrônica de transmissão para avaliação da estrutura mitocondrial. A luz halógena e o arco de plasma alteraram a atividade de SDH de forma distinta e de acordo com o tipo celular, sendo que a primeira fonte causou maior efeito supressor que a segunda. Essas duas fontes de luz suprimiram a atividade de SDH nas linhagens Balb/c, MCF-

7, e OSC-2 nas primeiras 24 horas e esse efeito persistiu até 72 horas pós-irradiação. Comparativamente aos tipos celulares citados acima, as linhagens de crescimento mais lento (HGF, WI-38, e NHEK) reagiram diferentemente. A exposição da HGF à irradiação por arco de plasma resultou em uma supressão transitória de 30% nas primeiras 24 horas; entretanto, esse efeito foi reduzido para 20% após 72 horas. A exposição ao laser aumentou a atividade de SDH para NHEK, WI-38, e HGF em 30%, 42%, e 53%, respectivamente, quando comparadas aos controles não-irradiados. Todas as fontes de luz causaram uma redução significativa na atividade mitocondrial dos fibroblastos da linhagem Balb/c. As micrografias obtidas pela microscopia eletrônica de transmissão mostraram mudanças estruturais na mitocôndria pós-irradiação, incluindo a perda da estrutura da membrana mitocondrial interna. Dessa forma, a exposição à luz afetou diferentemente a atividade de SDH, viabilidade e crescimento celular, dependendo do consumo energético da célula, podendo ser utilizada como modulador terapêutico do crescimento celular.

Como os efeitos biológicos causados pela exposição à luz azul (380-500 nm) são pouco explorados pela literatura, Lockwood et al.⁵³, em 2005, avaliaram a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) liberadas por células de linhagem normal (NHEK) e células de linhagem tumoral (OSC2) após irradiação com luz halógena azul. As células foram cultivadas em placas de 96 compartimentos por 72 horas, e em seguida irradiadas por diferentes doses de luz (3, 15 e 30 J/cm²), durante 6, 30 e 60 segundos, respectivamente. Após a aplicação da luz, os níveis de EROs foram quantificados pelas duas horas seguintes. O método utilizado para mensuração foi o corante fluorescente HFLUOR-DA que quando em presença de células vivas é absorvido e transformado em HFLUOR. Esse produto, na presença de EROs, é convertido em fluorescência que pode ser mensurada para quantificar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio. Um grupo de células, 24

horas antes da irradiação, foram pré-incubadas com dois antioxidantes (N-acetilcisteína e vitamina E), a fim de reduzir a quantidade de EROs formadas após a iluminação das células. Os níveis intracelulares de EROs formados durante 2 horas após irradiação com luz azul dependeram tanto do tempo de irradiação quanto do tipo celular. A dose de 30 J/cm² aumentou significativamente os níveis de ROS quando comparada as demais doses, e na linhagem OSC2 esse aumento foi maior que na linhagem NHEK. Os níveis altos de EROs gerados pela maior dose de luz persistiram por mais tempo (2 horas) na linhagem tumoral, o que não foi observado para linhagem normal. A presença dos antioxidantes reduziu significativamente os níveis de ROS para as células OSC2, enquanto o pré-tratamento com N-acetilcisteína e vitamina E não causaram efeitos significativos para os queratinócitos normais NHEK. Os autores concluíram que a utilização de antioxidantes atenuou os efeitos gerados pela exposição à luz azul de aparelhos odontológicos e que as diferenças entre os tipos celulares devem ser consideradas no tratamento de câncer epitelial a partir dos efeitos redox causados pela irradiação.

Lewis et al.⁵¹ (2005) identificaram processos celulares que poderiam ser afetados pela irradiação com luz azul e os mecanismos dessa resposta celular. Além disso, verificaram os possíveis riscos da exposição à luz azul durante a fotoativação de biomateriais ou possíveis efeitos terapêuticos da modulação da resposta celular. Dois tipos celulares foram utilizados nesse estudo: queratinócitos normais humanos da linhagem NKEH e células provenientes de um carcinoma escamoso bucal (OSC-2). Ambas as linhagens foram cultivadas em placas de 96 compartimentos (1,5 X 10⁴ células/compartimento) e após 24 horas foram irradiadas por 10 segundos ou 2 minutos caracterizando uma dose de luz de 5 ou 60 J/cm², respectivamente. Após a irradiação, as células foram avaliadas quanto ao número de células viáveis (teste de exclusão do azul de trypan), perfil das proteínas celulares expressas (kit MCG Proteomics),

atividade da enzima desidrogenase succínica (teste de MTT), quantidade de espécies reativas de oxigênio (citometria de fluxo com DFDA) e indução de apoptose (Anexina-V e iodeto de propídeo). A atividade mitocondrial foi ligeiramente aumentada nos queratinócitos pela irradiação com luz azul, enquanto o mesmo tratamento suprimiu a SDH nas células tumorais. A exposição à luz aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio nos dois tipos celulares, entretanto para a linhagem OSC2 esses níveis foram sempre mais altos. Finalmente, somente as células tumorais OSC2 apresentaram sinais de apoptose identificados pela Anexina-V. Esses dados corroboraram com a hipótese de que a luz azul induziu a um estresse oxidativo em cultura celular resultando em diferentes respostas dependendo do tipo celular.

Rotenberg et al.⁶⁵, em 2006, avaliaram o efeito do meio extracelular na supressão da atividade mitocondrial de diferentes tipos celulares. Para isso, fibroblastos da linhagem Balb, queratinócitos normais de derme humana (NKEH), e células de carcinoma escamoso bucal (OSC2) foram cultivados em diferentes meios de cultura de acordo com a necessidade de cada linhagem. As células foram semeadas em placas de 96 compartimentos (4×10^4 células/cm²) e após 24 horas foram submetidas a irradiação tanto em seu meio de cultivo nativo quanto em solução tampão-fosfatada (PBS). Elas foram expostas a luz azul de uma fonte de luz halógena em um intervalo de 10 a 120 segundos, que representa uma dose de luz de 5 a 120 J/cm², respectivamente. Após a irradiação, as células foram incubadas por um período de 72 horas, quando se avaliou a atividade mitocondrial pelo teste MTT. O meio de cultivo celular foi substituído ou suplementado após a exposição à luz para avaliar se o tempo de exposição e degradação do próprio meio poderiam ser os mediadores dos efeitos causados pela luz azul. Os resultados mostraram que a atividade mitocondrial dos queratinócitos não foi reduzida pela exposição à luz independente do meio extracelular. No

entanto, a viabilidade celular foi suprimida tanto para células tumorais OSC2 (50% de redução) quanto para os fibroblastos Balb (90 % de redução) quando irradiadas em meio de cultivo celular nativo. A supressão da atividade mitocondrial foi maior quando o meio de cultivo irradiado permaneceu em contato com as células por no mínimo 1 hora, indicando o caráter tempo-dependente dos efeitos do meio de cultura. A substituição do meio de cultivo ou a suplementação desse não aumentaram a atividade mitocondrial. Os autores concluíram que tanto fatores intracelulares quanto extracelulares são importantes na resposta celular a irradiação com luz azul. No presente estudo, os resultados obtidos puderam ser correlacionados com as flavinas, presentes nos meios de cultivo, sendo consideradas como importantes nos efeitos da luz azul em cultura celular. Entretanto, como as flavinas são encontradas em pequena quantidade in vivo, possivelmente outras espécies como as porfirinas endógenas sejam responsáveis pela mediação dos efeitos da luz azul in vivo.

A influência de diferentes intensidades de luz na terapia de laser de baixa intensidade na biomodulação de fibroblastos gengivais foi avaliada por Azevedo et al.⁸ (2006). As células foram semeadas em placas Petri de 35 mm e mantidas em meio de cultivo suplementado com apenas 5% de soro fetal bovino para simular uma situação de estresse celular. Essa deficiência nutricional, mantida por 2 dias, diminuiu o ritmo de crescimento dos fibroblastos, o que permite uma melhor avaliação das diferenças entre o controle e as células submetidas à irradiação. Em seguida, as células foram irradiadas por um laser de diodo GaAlAs (660 nm) com uma dose de luz de 2 J/cm^2 em duas potências do aparelho de 10 mW ($142,85 \text{ mW/cm}^2$) e 29 mW ($428,57 \text{ mW/cm}^2$). A irradiação foi realizada duas vezes, com um intervalo de 12 horas entre as sessões. As curvas de crescimento celular foram determinadas pela contagem do número de células viáveis em um hematocitômetro pelo método de azul

de trypan. Essa contagem foi realizada 2, 6 e 9 dias depois da irradiação. Os resultados mostraram que a curva de crescimento do grupo controle foi estatisticamente menor quando comparada aos grupos submetidos à irradiação. Além disso, o grupo submetido à menor fluência (142,85 mW/cm²) apresentou uma proliferação celular maior que o grupo submetido à maior fluência de energia (428,57 mW/cm²). Os autores concluíram que a densidade de energia influencia o crescimento celular de uma maneira inversamente proporcional, e que a irradiação com laser de baixa intensidade foi capaz de estimular a proliferação celular.

O estudo de Hawkins, Abrahamse³⁸ (2006) avaliou respostas celulares à irradiação com laser de hélio-neônio (632,8 nm) utilizando diferentes doses de luz em fibroblastos de derme humana. As células foram semeadas em placas Petri de 3,3 cm de diâmetro e irradiadas durante 2, 13, 27, 55 e 88 minutos, segundo as diferentes doses de luz estabelecidas de 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 16,0 J/cm², respectivamente. A irradiação ocorreu uma vez ao dia, durante dois dias consecutivos. Alterações na morfologia dos fibroblastos foram avaliadas por microscopia de luz. Além disso, foram realizadas análise da atividade mitocondrial (luminescência do ATP), da proliferação celular (método do vermelho-neutro e da fostase alcalina), da integridade da membrana (enzima lactato-desidrogenase e percentual de citotoxicidade) e danos ao DNA (método cometa). Foi possível observar, pela microscopia, que os fibroblastos submetidos à irradiação com 5 J/cm² migraram rapidamente através das margens da lesão, indicando um efeito positivo da luz. Esse efeito foi confirmado pelos demais testes que demonstraram um aumento na proliferação celular e da viabilidade celular, sem causar danos celulares ou moleculares. Entretanto, altas doses de luz (10 e 16 J/cm²) causaram uma redução na viabilidade e proliferação celular, com um aumento significativo de danos na membrana das células e ao DNA. Os resultados observados sugeriram que uma dose de 5 J/cm² foi capaz de

estimular a atividade mitocondrial (maior aumento na concentração de ATP intracelular) e estimular a proliferação e migração dos fibroblastos a fim de acelerar o processo de cicatrização. Além disso, os autores concluíram que a irradiação pelo laser pode modificar a resposta celular dependendo da dose de luz a que foram expostas as células.

Calvazara-Pinton et al.¹⁹, em 2006, realizaram uma revisão da literatura com o objetivo de apresentar uma visão geral das propriedades químicas dos fotossensibilizadores e dos princípios biológicos e imunológicos das reações fotodinâmicas assim como apresentar as características das fontes de luz disponíveis para a PDT. Esta terapia é uma técnica onde drogas fotossensíveis são aplicadas tópicamente ou sistemicamente e seguida de irradiação com luz visível. Os fotossensibilizadores ativos são capazes de transferir energia ao oxigênio molecular e gerar espécies reativas de oxigênio. A subsequente oxidação dos lipídios, aminoácidos e proteínas induz morte celular por necrose ou apoptose. Além disso, as EROs são capazes de estimular indiretamente a liberação de mediadores inflamatórios. Os fotossensibilizadores são seletivos, pois são capazes de penetrar e se acumular em células tumorais e endotélio recentemente formado e geralmente evitam os tecidos normais. Os mecanismos de penetração pela membrana celular e a localização intracelular influenciam diretamente o tipo de efeito celular a ser gerado. Os derivados da hematoporfirina e sua forma purificada e liofilizada têm sido investigados por 30 anos. Entretanto, o interesse da dermatologia na PDT aumentou somente na década de 90 com o desenvolvimento do ácido aminolevulínico (ALA) seguido de irradiação por um comprimento de onda vermelho. No mesmo período, inúmeros fotossensibilizadores da segunda geração surgiram (derivados da benzoporfirina, ftalocianinas, clorinas). Esses compostos são quimicamente mais puros, apresentam maior eficiência, seletividade e segurança. Além disso, produzem uma menor sensibilidade pós-

tratamento devido a sua rápida metabolização. Entretanto, ainda não foram aprovados para o uso clínico. Os autores acreditam ser a PDT um tratamento promissor no combate de enfermidades dermatológicas.

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.⁵² (2008) avaliaram a fototoxicidade de luz visível de comprimento de onda entre 400-800 nm e uma dose de luz de 120 J/cm² na sobrevivência de diversas bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, e *Serratia marcescens*. Essas bactérias foram escolhidas devido à 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/cm²) durante 5 minutos (120 J/cm²). 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 pelo 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/cm² 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/cm². 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 a iluminação com baixas doses utilizadas para estimular o processo de cicatrização.

Gritsch et al.³⁷, 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 a partir de biopsias de tecidos gengivais saudáveis e cultivadas em placas de 24 compartimentos para 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 a 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^2) 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 ($650 \text{ a } 1100 \text{ mW/cm}^2$) 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 $488 \pm 42 \text{ mW/cm}^2$ para o arco de plasma e de 61 ± 5 to $140 \pm 16 \text{ mW/cm}^2$ 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 as 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 devido ao estresse oxidativo provocado pela exposição à luz azul.

Taoufik et al.⁷¹ (2008) investigaram o efeito da exposição a luz azul provenientes de diferentes fontes de luz (luz halógena, LED e arco de plasma) na proliferação de fibroblastos gengivais. As células obtidas a partir de cultura primária foram semeadas em placas de 48 compartimentos. Após um período de 24 horas, o meio foi aspirado e uma solução tampão fosfatada foi colocada e as células submetidas à irradiação. Os fibroblastos foram expostos a luz halógena (750 mW/cm²) por 240 segundos, ao LED (900 mW/cm²) por 180 segundos e ao arco de plasma (2000 mW/cm²) por 120 segundos. Esses tempos simulavam o tempo clínico necessário para 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 1 semana. As células expostas às três fontes de luz apresentaram uma inibição na proliferação celular quando comparadas ao controle. Esse resultado não foi atribuído a 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 a luz azul, e que mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo exato desse efeito inibitório.

2.4 Cultura de células

Koulaouzidou et al.⁴⁷, em 1998, estudaram *in vitro* a citotoxicidade do agente clareador com peróxido de uréia (Colgate Platinum) e do peróxido de hidrogênio em células L929 e BHK21/C13. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). As células foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. Após período de incubação, as células foram semeadas em discos de Petri na proporção de 200.000 células/disco em 4 mL de DMEM e cultivadas por 24 horas. Após 24 horas, 1 mL de DMEM contendo os agentes clareadores Colgate Platinum e peróxido de hidrogênio em concentrações de 0,01% a 0,00001% foram adicionadas em cada disco de Petri. Os discos foram novamente mantidos em incubadora por períodos de 24 e 72 horas. Para cada linhagem de fibroblastos foram preparadas quatro amostras para cada concentração dos agentes clareadores e também para cada período de incubação (24 ou 72 horas) e seus respectivos controles. Após os períodos de incubação (24 e 72 horas) o meio de cultura foi removido e 0,5 mL de 0,25% de tripsina em PBS foi adicionado aos discos para soltar as células. As células em suspensão foram introduzidas em hematocítômetro e contadas em microscópio de luz. As células viáveis dos grupos experimentais foram comparadas com as células viáveis dos respectivos grupos controles. Um disco de cada grupo foi preparado para análise de morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura. Nas culturas contendo tanto o peróxido de uréia quanto o peróxido de hidrogênio

houve queda na densidade celular, confirmando o efeito citotóxico dos agentes clareadores. Os dois agentes clareadores mostraram efeito dose-dependente e também tempo-dependente na viabilidade celular. Para a linhagem de células L929, a concentração de peróxido de hidrogênio capaz de causar inibição em 50% no número de células (ID50) foi de 0,00034% (0,0997 mmol/L) após 24 horas, e 0,00001% (0,0029 mmol/L) após 72 horas. Para a linhagem BHK21/C13 os valores foram de 0,00016% (0,0469 mmol/L) após 24 horas e 0,00007% (0,0205 mmol/L) após 72 horas de incubação. A dose inibitória (ID50) para o agente Colgate Platinum em células L929 foi de 0,00074% após 24 horas e 0,00045% após 72 horas e para a linhagem BHK21/C13 foi de 0,00055% e 0,00024%, após 24 e 72 horas respectivamente. As duas linhagens de células utilizadas neste estudo apresentaram diferenças em relação à sensibilidade aos agentes testados, sendo que as células BHK21/C13 foram mais sensíveis aos agentes clareadores do que as células L929. Este resultado levou os autores a concluir que linhagens diferentes podem apresentar diferentes sensibilidades ao mesmo material testado.

Costa et al.²⁶, em 2001, avaliaram *in vitro* os efeitos de três soluções usadas para lavagem química em exposições pulpares. Os autores semearam células odontoblastóides (MDPC-23) em uma quantidade de 30.000 células/cm² em placas de 24 compartimentos as quais foram incubadas por 72 horas. Após a contagem das células em microscópio de luz invertida, foram adicionados 20 µL das soluções experimentais e controle em 980 µL de meio de cultura. As soluções experimentais foram: peróxido de hidrogênio 3%, solução salina de hidróxido de cálcio (5 g de Ca(OH)₂ em 10 mL de água destilada estéril) e solução de NaOCl. Os grupos controles positivo e negativo foram solução de agente adesivo Syntac Sprint (SS) e solução salina de tampão fosfato (PBS), respectivamente. Após a incubação por 120 minutos o número de células foi novamente contado e a morfologia celular foi avaliada em microscopia eletrônica de varredura e o metabolismo celular foi

determinado através de teste MTT. Os resultados mostraram que o peróxido de hidrogênio 3%, solução de NaOCl e solução de adesivo (SS) foram mais citotóxicos que a solução de hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 ou PBS. Nos grupos do peróxido de hidrogênio ou SS, poucas células permaneceram aderidas no fundo dos compartimentos. O peróxido de hidrogênio, NaOCl e SS suprimiram a atividade da enzima mitocondrial em 97,7%, 97,3%, e 95,0%, respectivamente. Por outro lado, o Ca(OH)_2 deprimiu o metabolismo celular em apenas 5%. Enquanto o H_2O_2 , NaOCl and SS causaram mudanças extremas na morfologia celular, o Ca(OH)_2 e o PBS não promoveram alterações dramáticas na morfologia celular. Os autores concluíram que a solução de hidróxido de cálcio não foi tóxico para as células MDPC-23 em cultura.

De Souza Costa et al.⁶⁹, em 2003, avaliaram os efeitos citotóxicos de cimentos de ionômero de vidro, convencionais e modificados por resina, em células imortalizadas de linhagem odontoblástica (MDPC-23). Para tal finalidade, confeccionaram 12 corpos de prova com 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, para cada material: Vitrebond, Vitremer, Fuji II LC, Fuji IX GP, Ketac Molar e Z100 (controle positivo). No controle negativo, discos de papel filtro foram embebidos em 5 μL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) esterilizada. Os corpos de prova e os filtros de papel foram colocados no interior de compartimentos de recipientes plásticos. Em seguida, cerca de 30.000 células MDPC-23/ cm^2 foram semeadas sobre os espécimes e incubadas por 72 horas a 37°C com 5% de CO_2 e 95% de ar, utilizando o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e glutamina. O número de células foi contado, a morfologia celular foi avaliada por meio do microscópio eletrônico de varredura e o metabolismo celular foi verificado pela análise colorimétrica do Metiltetrazolium. Observaram uma redução do número de células pelos materiais estudados de 74,5% (Vitrebond), 75,5% (Vitremer), 45,5%

(Fuji II LC), 29,5% (Fuji IX GP), 32,5% (Ketac Molar) e 88,5% (Z100). O metabolismo celular foi reduzido pelos cimentos de ionômero de vidro em 79% (Vitrebond), 84% (Vitremer), 54% (Fuji II LC), 40% (Fuji IX GP) e 42,5% (Ketac Molar). Os resultados sugeriram que embora todos os materiais experimentais tenham apresentado citotoxicidade sobre as células de linhagem odontoblástica - MDPC-23, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina apresentaram maiores efeitos citotóxicos.

Aranha et al.⁷, em 2006, realizaram um estudo in vitro para avaliar a citotoxicidade de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina submetidos a diferentes procedimentos de polimerização e aplicados em cultura de células odontoblastóides imortalizadas (MDPC-23). Os cimentos ionomêricos testados foram Fuji Lining LC e Vitrebond. Quarenta espécimes de cada material foram preparados e fotopolimerizados de acordo os seguintes grupos: (i): as recomendações do fabricante por 30 segundos, (ii): fotopolimerização curta por 15 segundos; (iii): fotopolimerização longa por 45 segundos; (iv): sem nenhum procedimento de fotopolimerização. Discos de papéis-filtro esterilizados contendo PBS ou HEMA foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Após o posicionamento dos espécimes individualmente em um compartimento da placa de 24 orifícios, cerca de 30.000 células MDPC-23/cm² foram semeadas sobre os espécimes e incubadas por 72 horas a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar, utilizando o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e glutamina. A citotoxicidade dos cimentos foi avaliada pelo método metiltetrazolium (MTT) e a morfologia celular avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). O cimento Fuji Lining LC foi menos citotóxico que o Vitrebond em todas as condições experimentais de maneira estatisticamente significativa. Entretanto, a citotoxicidade do Fuji Lining LC foi notavelmente aumentada na ausência de fotopolimerização, o que não fora observado para o

Vitrebond. O tempo de fotopolimerização (15, 30 ou 45 segundos) não influenciou a toxicidade dos dois materiais quando aplicados sobre a linhagem MDPC-23. A morfologia celular das células em contato com o Fuji Lining LC não foi alterada quando o mesmo foi fotopolimerizado. Entretanto, o grupo que não foi fotopolimerizado apresentou um menor número de células aderidas ao substrato de vidro e as que estavam presentes apresentavam-se arredondadas e com tamanho reduzido. Os autores concluíram que a fotoativação apresenta um papel importante na redução da citotoxicidade do cimento Fuji Lining LC, de forma que o cumprimento das recomendações do fabricante prevenirá de possíveis efeitos tóxicos para células da polpa dentária.

Campanha et al.²⁰, em 2006, avaliaram o efeito dos tratamentos pós-polimerização como banho-maria e microondas na citotoxicidade de seis resinas acrílicas para reembasamento de próteses. As resinas testadas foram Tokuso Rebase Fast (TR), Ufi Gel Hard (UGH), Duraliner II (D), Kooliner (K), New Truliner (NT) e Light Liner (LL). Nove discos de cada material foram feitos nas dimensões de 10 x 1 mm e divididos em três grupos, sendo o grupo 1 sem nenhum tratamento pós-polimerização, o grupo 2 com tratamento pós-polimerização em microondas, e grupo 3 com tratamento pós-polimerização em banho-maria a 55° C por 10 minutos. As células L929 foram semeadas em placas de 96 orifícios e incubadas por 24 horas em meio de cultura Eagle. Os extratos preparados a partir de cada grupo experimental ou apenas o meio de cultivo sem contato prévio com nenhum disco (controle negativo) foi adicionado nos compartimentos da placa de 96. A citotoxicidade das resinas acrílicas foi avaliada pela atividade da enzima desidrogenase succínica (teste de MTT) e pela incorporação radioativa da ³H-timidina. Todos os testes foram feitos em quadruplicata e repetidos duas vezes. Para os valores obtidos a partir do teste de MTT, os tratamentos pós-polimerização não tiveram nenhum efeito na citotoxicidade de todos os

materiais testados. Entretanto, para os valores obtidos pelo método da ^3H -timidina, o tratamento pós-polimerização reduziu significativamente a citotoxicidade da resina UGH. A citotoxicidade das resinas K, NT, LL e LLABC aumentaram após a irradiação com microondas de forma estatisticamente significativa. Além disso, as resinas TR, NT e LLABC também aumentaram seu potencial citotóxico após o banho-maria. Os autores concluíram que a partir dos valores obtidos pelo MTT, a citotoxicidade dos materiais avaliados não foi afetada pelos tratamentos pós-polimerização. Entretanto, o método da ^3H -timidina revelou que a citotoxicidade desses materiais não foi melhorada com os tratamentos pós-polimerização, com exceção da resina UGH.

Jorge et al.⁴², em 2007, objetivaram avaliar o efeito de dois tratamentos pós-polimerização e diferentes ciclos de polimerização na citotoxicidade de duas resinas acrílicas para reembasamento de próteses. As resinas testadas foram Lucitone 550 e QC 20. Para isso, discos de resina foram fabricados de acordo com as informações do fabricante. A resina Lucitone 550 foi processada por um ciclo longo ou um ciclo curto, enquanto a resina QC 20 foi processada por um ciclo normal ou reverso. Para avaliar o efeito biológico dos tratamentos pós-polimerização, os espécimes foram divididos em três grupos: (i) o tratamento pós-polimerização foi forno de microondas por 3 minutos na potência 500 W; (ii) o tratamento pós-polimerização foi banho-maria a 55° C por 60 minutos; (iii) nenhum tratamento pós-polimerização foi realizado. Previamente aos testes de citotoxicidade, os discos foram limpos por ultrassom em água destilada por 20 minutos e expostos a luz ultravioleta por mais 20 minutos. Os extratos experimentais foram obtidos pela adição dos discos de resina em tubos estéreis contendo 9 mL de meio Eagle e incubados a 37° C por 24 horas. No controle negativo, nenhum disco foi adicionado ao meio de cultivo celular. As células L929 foram semeadas em placas de 96 orifícios e a síntese de DNA foi avaliada pelo método ^3H -

timidina. Os resultados mostraram que os espécimes da resina QC 20 polimerizados pelo ciclo normal e submetidos ao tratamento pós-polimerização com microondas foram considerados moderadamente citotóxicos. Resultados semelhantes foram observados para os discos de Lucitone 550 processados pelo ciclo longo. Os demais grupos experimentais foram classificados como não citotóxicos. Após o tratamento pós-polimerização em banho-maria, os espécimes de Lucitone 550 processados pelo ciclo longo produziram uma significativa inibição da síntese de DNA quando comparado aos outros grupos. Os autores concluíram que o ciclo longo da resina Lucitone 550 aumentou a toxicidade dessa resina e que o tratamento pós-polimerização com banho-maria reduziu esses efeitos citotóxicos.

Em 2008, de Souza Costa et al.⁷⁰ avaliaram a resposta pulpar in vivo após pulpotomia com diferentes agentes capeadores. Além disso, avaliaram os efeitos citotóxicos de materiais Pro-Root MTA (PRMTA) e hidróxido de cálcio quando aplicados em cultura de células odontoblastóides MDPC-23. Para os testes realizados in vivo, a polpa coronária de vinte oito dentes de cães foi removida mecanicamente e as polpas radiculares foram capeadas da seguinte forma: Grupo 1 PRMTA e Grupo 2 (controle) pasta de hidróxido de cálcio (HC). Após 60 dias, os animais foram sacrificados e os dentes foram processados para avaliação histológica. Na parte experimental in vitro, extratos foram obtidos de ambos agentes capeadores e aplicados sobre cultura de células odontoblastóides MDPC-23. Os resultados mostraram que nas polpas radiculares capeadas tanto com PRMTA quanto com HC, a necrose por coagulação foi substituída por uma calcificação distrófica e uma camada de matriz dentinária tubular. Nenhuma ou leve resposta inflamatória ocorreu diante do material capeador. Em relação a resposta pulpar, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois materiais. Entretanto, os dentes capeados com HC apresentaram características de

uma perda pulpar mais saudável a qual resultou em um formato convexo de barreira de tecido mineralizado quando comparada ao PRMTA. Quando aplicadas em cultura de células, as soluções de PRMTA e HC reduziram a atividade metabólicas em 9,9 e 29,4%, respectivamente. Dessa forma, o HC causou maiores efeitos citotóxicos nas células MDPC-23 quando comparado ao PRMTA. Os autores sugeriram que houve uma seqüência semelhante no processo de cura após a pulpotomia com os dois materiais avaliados.

A microscopic image of neurons, showing their cell bodies and branching processes. A red overlay is applied to the image, highlighting specific areas. The word "Proposição" is written in a black, serif font, underlined, and positioned in the lower right quadrant of the image.

Proposição

3 Proposição

Com base nas informações apresentadas nas sessões anteriores, este estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade da Terapia Fotodinâmica associando o fotossensibilizador Photogem[®] e LED azul e vermelho em cultura de células normais (fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23). A avaliação da citotoxicidade da PDT foi realizada por meio da análise do metabolismo celular, utilizando-se para isto o teste do metiltetrazolium (MTT) em diferentes períodos (0, 12 e 24 horas) e da morfologia celular utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso, foram realizadas análises por citometria de fluxo que avaliaram o tipo morte celular decorrente da PDT pelo método da anexina-V e iodeto de propídeo e a formação de espécies reativas de oxigênio pelo método com H₂-DCFDA.

A microscopic image of neurons, likely from the central nervous system, showing cell bodies (soma) and extensive branching processes (dendrites and axons). The image is overlaid with a semi-transparent red color, giving it a reddish-pink hue. The neurons are distributed across the frame, with some showing more prominent cell bodies and others appearing as more delicate, branching structures.

Material e Método

4 Material e Método

4.1 Cultura e manutenção das células:

Para a avaliação da citotoxicidade da Terapia Fotodinâmica associando Photogem® e LED azul ou vermelho foram utilizados fibroblastos imortalizados da linhagem L929 e células imortalizadas da linhagem odontoblástica MDPC-23. Ambos os tipos celulares foram cultivados em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL e 100 mg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) em uma atmosfera umedecida contendo CO₂ a 5% e a temperatura de 37°C. Para manutenção da cultura, estas células foram subcultivadas a cada três dias na concentração de 30.000 células/cm², até se obter o número de células adequado para a execução do experimento. Para a realização da PDT e do teste de citotoxicidade, 30.000 células/cm² foram semeadas nos compartimentos das placas acrílicas esterilizadas de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA). Em seguida, as placas foram armazenadas em incubadora na temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar. Após um período de 48 horas, a terapia fotodinâmica foi realizada.

4.2 Terapia Fotodinâmica

4.2.1 Preparo do agente fotossensibilizador e da fonte de luz

A fotossensibilização das amostras celulares deste estudo foi realizada com a utilização do agente fotossensibilizador Photogem® (Figura 1). Esse medicamento é produzido a partir da hematoporfirina,

uma substância presente no sangue de animais e de humanos. O Photogem[®] é fabricado na Rússia – Moscou, aprovado pelo “Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation” sob autorização 42-3199-98. Além disso, a utilização desse agente foi aprovada para uso em humanos pelo Comitê Estatal de Farmacologia da Federação Russa e também pela ANVISA (data 08/04/2003; 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, sendo que sua distribuição é realizada somente sob prescrição para instituições especializadas. Pode ser armazenado por até 2 anos em um local protegido da luz e em temperatura inferior a 5 °C. Em solução, o Photogem[®] apresenta uma banda característica de absorção com um pico máximo em 369 nm, e outras quatro bandas menores (Figura 2).



FIGURA 1 – Photogem[®], fotossensibilizador derivado da hematoporfirina, de origem russa.

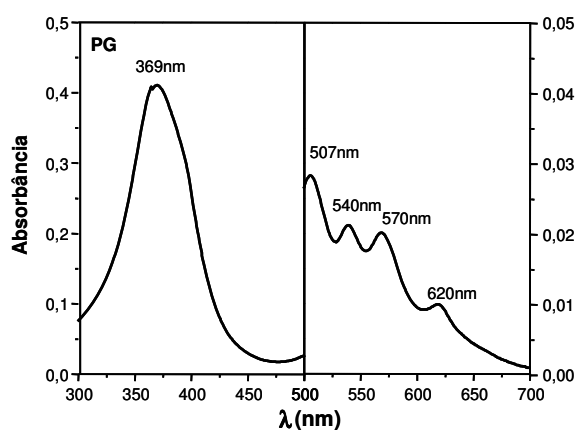


FIGURA 2 – Espectro de absorção óptica do Photogem[®].

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 deste medicamento, por meio da dissolução do pó em DMEM sem fenol vermelho (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Inicialmente, uma alíquota de 1 mL de DMEM sem fenol vermelho foi pipetado no interior de um microtubo contendo 5 mg de pó de Photogem[®]. 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 DMEM sem fenol vermelho, e o tubo foi agitado por 1 minuto para homogeneizar a solução fotossensibilizadora. Dessa forma, cada alíquota de 5 mg de pó foi dissolvida em 5 mL de DMEM sem fenol vermelho, obtendo-se uma solução estoque de fotossensibilizador na concentração de 1000 mg/L. Essa solução foi armazenada em tubos de ensaio envolvidos em papel alumínio, identificados e datados, à temperatura de 4°C. É importante ressaltar que o Photogem[®] é uma substância fotossensível, isto é, pode sofrer degradação de seus componentes quando exposto a luz. Assim, a manipulação deste medicamento durante o preparo da solução estoque e posteriormente na fotossensibilização das células foi realizada com as luzes do ambiente apagadas.

A capacidade fotossensibilizadora do Photogem[®] foi avaliada por meio da utilização das concentrações de 10, 25 e 50 mg/L desse agente quando associado a luz azul. Além disso, foram testadas as concentrações de 50, 100 e 150 mg/L quando associado a luz vermelha. Para isso, alíquotas da solução estoque de Photogem[®] (1000 mg/L) foram diluídas em DMEM sem fenol vermelho, até a obtenção das diluições do FS.

As fontes de luz empregadas na iluminação das amostras deste estudo foram aparelhos constituídos de LEDs azuis e vermelhos,

idealizados e desenvolvidos no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), titulado de “Bio Table” (Figura 3). Foram utilizadas lâmpadas do tipo LED (LXHL-PR09, Luxeon® III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, Califórnia, USA) distribuídas uniformemente no interior do sistema óptico. Sobre as lâmpadas, foi acoplada uma placa de vidro difusora, para permitir a emissão de luz uniforme em toda a superfície de iluminação do aparelho. A “Bio Table” azul possuía potência de saída que varia de 0 a 22 mW/cm², e a luz emitida se encontrava numa estreita faixa do espectro fotomagnético, predominantemente em 455 nm. A “Bio Table” vermelha possuía potência de saída que variava de 0 a 25 mW/cm², e a luz emitida se encontrava numa estreita faixa do espectro fotomagnético, predominantemente em 630 nm. O conhecimento da potência de saída do aparelho utilizado foi um fator importante a ser considerado, pois este valor, juntamente com o tempo de iluminação, determinou 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/cm²). A fórmula empregada para o cálculo da dose foi a seguinte: Dose(J/cm²) = Potência(W/cm²) X Tempo(s).

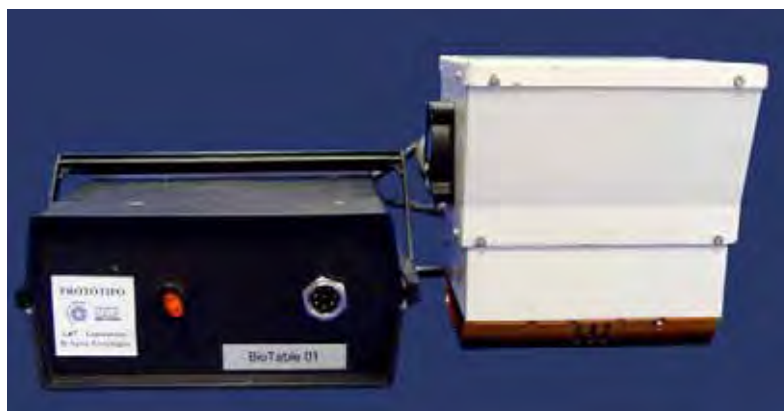


FIGURA 3 – Aparelho de emissão de luz constituído de LEDs de comprimento de onda azul.

Para a avaliação da citotoxicidade da PDT em cultura de células normais foram testadas duas doses de luz azul (25,5 e 37,5 J/cm²) e duas doses de luz vermelha (75,0 e 100,0 J/cm²). Como a potência utilizada foi a máxima de cada aparelho, a variação da dose de luz foi realizada pela variação do tempo de exposição das amostras à luz azul ou vermelha. Assim os tempos de iluminação utilizados foram de 19 e 28 minutos para luz azul e 50 e 66 minutos para luz vermelha.

3.2.2 Realização da Terapia Fotodinâmica

A citotoxicidade da PDT nas duas linhagens celulares (fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23) foi avaliada por meio da exposição das culturas celulares as três concentrações do agente Photogem[®] (10, 25 e 50 mg/L) e duas doses de luz azul (25,5 e 37,5 J/cm²)³⁰. Além disso, ambas linhagens celulares também foram submetidas a PDT utilizando o Photogem[®] nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/L associado a duas doses de luz vermelha (75,0 e 100,0 J/cm²)³¹. Assim, para cada linhagem, foram testadas 12 condições experimentais, obtidas a partir do cruzamento das duas doses de luz com as três concentrações de Photogem[®] avaliadas, denominadas de P+L+. Adicionalmente, o efeito da aplicação isolada de cada concentração do Photogem[®] (P+L-) e de cada dose de luz (P-L+) também foi avaliado, sobre as células, o que totalizou 22 condições experimentais. As amostras referentes ao grupo controle não foram fotossensibilizadas com Photogem[®] e não receberam iluminação com o LED (P-L-). Dessa forma, foram obtidas 24 condições experimentais que avaliaram a citotoxicidade da PDT em cultura de células. Essas condições estão descritas no Apêndice 1 nas Tabelas A1 e A2.

A seguir, estão descritas as etapas realizadas para a avaliação da citotoxicidade da PDT sobre fibroblastos e células

odontoblastóides. As condições experimentais avaliadas estão descritas em forma de tópicos e foram divididas em quatro grupos com a finalidade de simplificar a descrição das etapas.

♦ **P+L+**

As amostras incluídas nesta condição experimental foram fotossensibilizadas com o Photogem[®] em seis concentrações, e, em seguida, foram expostas à iluminação nas quatro doses de luz propostas em um dos comprimentos de luz testados (azul ou vermelho).

Em capela de fluxo laminar (Bio Protector Plus 12, Veco do Brasil – Ind. Com. de Equipamentos Ltda, Campinas, SP, Brasil), após a incubação das células por 48 horas, o meio de cultura foi removido por aspiração com cânulas esterilizadas (Pasteur). Alíquotas de 1 mL de solução fotossensibilizadora em uma das concentrações avaliadas (10, 25 ou 50 mg/L; 50, 100 ou 150 mg/L) foram transferidas individualmente para os compartimentos da placa de 24 compartimentos (Figura 4). Após a adição do FS, a placa permaneceu em repouso no escuro durante 30 minutos no interior da incubadora, para promover a fotossensibilização das amostras (tempo de pré-irradiação). Após esse período, a placa foi posicionada sobre o vidro difusor da “Bio Table”. Cada aparelho então foi acionado e todos os compartimentos da placa foram iluminados uniforme e simultaneamente (Figura 5 e 6). Os tempos de irradiação foram de 19 ou 28 minutos para luz azul, correspondendo à dose de 25,5 e 37,5 J/cm², respectivamente. Já para a luz vermelha, foram utilizados os tempos de 50 ou 66 minutos correspondendo à dose de 75 e 100 J/cm², respectivamente. Para cada concentração de fotossensibilizante e dose de luz avaliada, foram utilizados onze compartimentos das placas de acrílico.

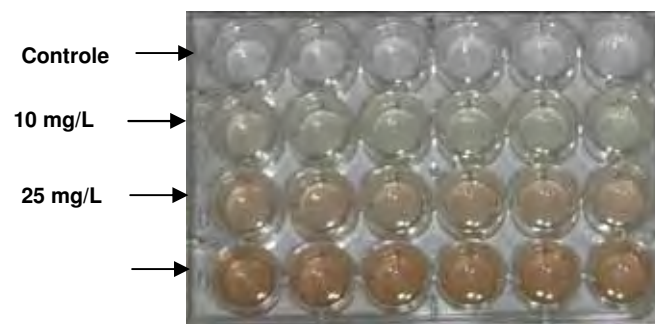


FIGURA 4 – Placa de 24 compartimentos as amostras de cultura celular associadas ao Photogem® em três diferentes concentrações.

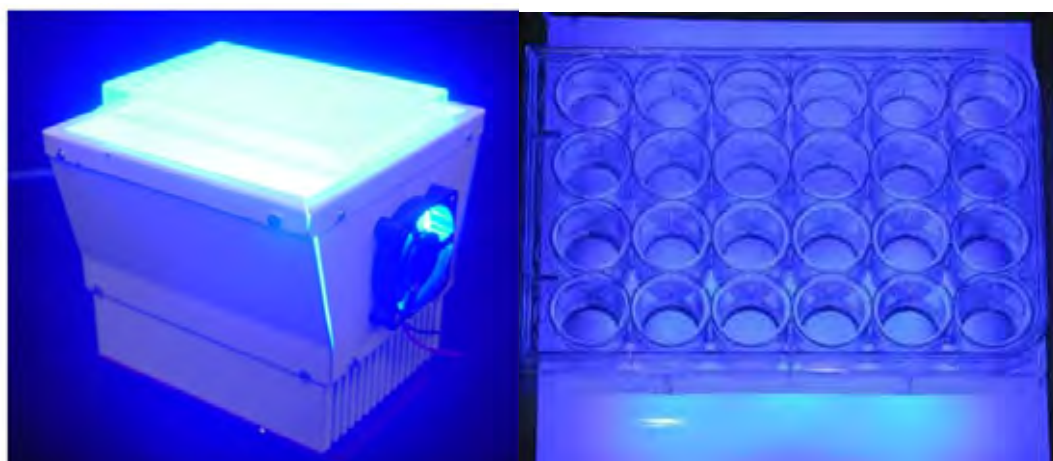


FIGURA 5 – Placa de 24 compartimentos posicionada sobre a superfície de iluminação da “Bio Table” azul acionada.

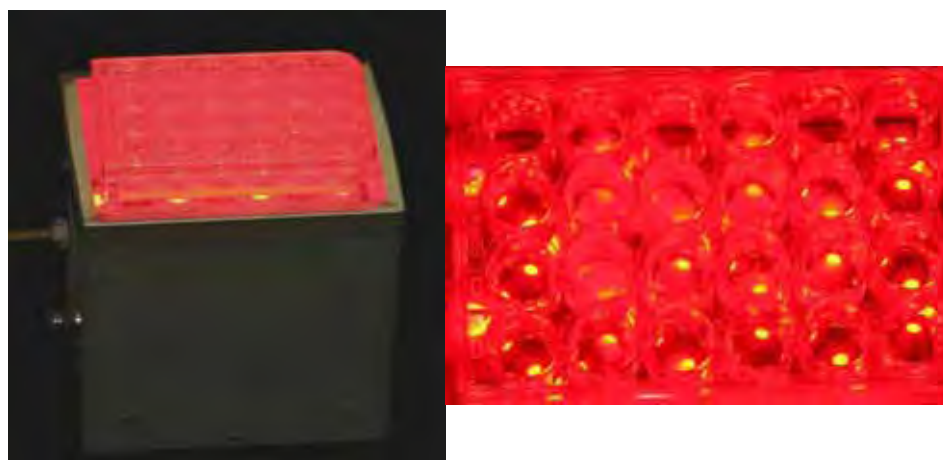


FIGURA 6 – Placa de 24 compartimentos posicionada sobre a superfície de iluminação da “Bio Table” vermelha acionada.

♦ P+L-

Para avaliação dos efeitos tóxicos após a aplicação do Photogem[®] sobre as células, foram incluídas neste estudo amostras sensibilizadas com o medicamento que não foram iluminadas com o LED azul ou vermelho. Alíquotas de 1 mL de solução fotossensibilizadora em uma das concentrações avaliadas (10, 25 ou 50 mg/L; 50, 100 ou 150 mg/L) foram transferidas individualmente para os compartimentos. As placas de 24 compartimentos foram mantidas em repouso no escuro durante 30 minutos, para promover a fotossensibilização das amostras (tempo de pré-irradiação). Em seguida, cada placa foi posicionada sobre uma bancada protegida da luz ambiente durante os períodos de 19 ou 29 minutos (correspondente a irradiação azul) e 50 ou 66 minutos (correspondente a irradiação vermelha).

♦ P-L+

Da mesma forma que na condição anterior, foi avaliado se a aplicação de luz, na ausência do fotossensibilizante, poderia apresentar efeitos tóxicos para as células avaliadas. Assim, alíquotas de 1 mL de DMEM sem fenol vermelho foram transferidas individualmente para os compartimentos. A placa foi deixada em repouso no escuro durante 30 minutos, e em seguida, foi colocada sobre uma das “Bio Tables” para ser iluminada em uma das doses avaliadas. Os tempos de irradiação foram de 19 ou 28 minutos para luz azul, correspondendo à dose de 25,5 e 37,5 J/cm², respectivamente; e de 50 ou 66 minutos para luz vermelha correspondendo à dose de 75 e 100 J/cm², respectivamente.

♦ P-L-

Nesta condição experimental, foram incluídas amostras de células, que não foram submetidas aos procedimentos de PDT. Os resultados obtidos com as culturas dessas amostras foram utilizados

como parâmetro para comparação com aqueles obtidos com as culturas das amostras submetidas à fotossensibilização e iluminação com o LED. A placa com as células semeadas contendo 1 mL de DMEM sem fenol vermelho foi deixada em repouso durante 30 minutos no escuro, e em seguida, foi deixada sobre a bancada por mais 19 ou 29 minutos (correspondente a irradiação azul) e 50 ou 66 minutos (correspondente a irradiação vermelha).

4.3 Análise do metabolismo celular (Teste do MTT)

A análise da atividade metabólica celular foi realizada por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Esse método é baseado na habilidade das mitocôndrias ativas em células vivas em converter o composto tetrazolium em um produto insolúvel e roxo. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal tetrazolium, produzindo cristais de formazan azul, determinando, dessa forma, valores relativos à intensidade da luz azul em espectrofotômetro específico com comprimento de onda determinado⁵⁹.

Dez amostras de cada grupo experimental e grupo controle foram utilizadas para a avaliação do metabolismo celular. Após o período de iluminação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, recolocadas no meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 37°C. O teste MTT foi realizado imediatamente após a PDT (T=0), após um período de incubação de 12 horas (T=12) e 24 horas (T=24). O meio de cultura de cada compartimento dos recipientes de plástico foi substituído por 900 µL de meio de cultura DMEM, ao qual foi adicionado 100 µL de solução MTT (Sigma Chemical Co., EUA), numa concentração de 5 mg/mL, com a finalidade de identificar as células viáveis pela clivagem dos anéis de tetrazolium. As

células em contato com a solução de MTT foram incubadas em estufa umidificada na temperatura de 37°C pelo tempo de 4 horas. Decorrido este período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e substituída por 600 µL da solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl). Este procedimento teve o objetivo de dissolver os cristais violeta resultante da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das células viáveis. Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Avaliou-se viabilidade celular de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, France).

Para a padronização da leitura, os três primeiros compartimentos da placa foram preenchidos com 100 µL da solução de isopropanol acidificado em HCL a 0,04 N para se determinar o valor correspondente à passagem total da luz, ou seja, ao valor máximo para a redução do metabolismo celular. Os resultados foram calculados por meio da média em valores numéricos das três alíquotas de cada compartimento. Os valores finais obtidos para cada grupo experimental e controle foram submetidos à análise estatística.

4.4 Análise da morfologia celular

Do total de onze compartimentos utilizados para cada um dos grupos experimentais e controle, um foi destinado à avaliação da morfologia das células, utilizando-se, para isto, um microscópio eletrônico de varredura (JMST33A Scanning Microscope, JEOL, EUA).

Especialmente para este compartimento, lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro foram posicionadas na base dos compartimentos

antes do cultivo das células. Para esta etapa do experimento, estas lamínulas foram previamente lavadas em solução salina fosfatada tamponada (PBS) e esterilizadas quimicamente em etanol a 70% por no mínimo 6 horas. Em seguida, em capela de fluxo laminar vertical, foram lavadas em PBS, por três vezes sob agitação constante, durante 15 minutos cada lavagem para remoção de resíduos da solução de etanol. Então, estas lamínulas foram posicionadas no fundo dos compartimentos de recipientes plásticos. Em seguida, todos os compartimentos da placa de cultivo celular foram preenchidas com 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e as células foram semeadas como descrito anteriormente na sessão 4.1.

Após os procedimentos relacionados a Terapia Fotodinâmica, descritos acima para os diferentes grupos experimentais e controle, o meio de cultura foi aspirado. As células aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas por 24 horas em glutaraldeído 2,5%. Posteriormente à fixação inicial das células, estas foram submetidas aos seguintes procedimentos:

- a- Lavadas por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
- b- Pós-fixadas em 200 µL de tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos.
- c- Lavadas por duas vezes em 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
- d- Lavadas por duas vezes em 1 mL de água destilada (15 minutos cada lavagem).
- e- Desidratadas em 1mL de solução de etanol 30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% (30 minutos em cada solução).
- f- Lavadas por três vezes com 200 µL de HMDS (HMDS 1,1,1,3,3,3, Hexamethyldisilazane, 98% - ACROS Organics, NJ, USA), 20

minutos cada lavagem, o qual auxilia na secagem das células por ser um solvente de baixa tensão superficial.

Finalmente, a solução de HMDS foi desprezada e os recipientes foram tampados e mantidos por 12 horas no dessecador. Decorrido o tempo, as lamínulas contendo as amostras foram removidas do fundo dos compartimentos dos recipientes plásticos por meio de pinça cirúrgica, fixadas em stubs, metalizadas e analisadas em microscópio eletrônico de varredura para determinação da morfologia celular.

4.5 Análises por citometria de fluxo

Os experimentos para a análise da morte celular e dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram realizados em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson). Para cada amostra foram coletados 10000 eventos e as populações de células L929 e MDPC-23 foram identificadas por suas características de tamanho e granulosidade e analisadas através da intensidade de fluorescência dos marcadores utilizados para cada tipo de experimento.

4.5.1 Análise da viabilidade celular por anexina-V e iodeto de propídeo

A análise do tipo de morte celular pela Anexina-V se baseia na localização da fosfatidilserina. Em células viáveis, a fosfatidilserina se localiza na superfície interna da membrana citoplasmática. Quando as células entram em processo apoptótico, esse lipídeo é translocado para a superfície externa da membrana celular e dessa forma, se expõe ao meio extracelular. A anexina-V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos e

possuiu alta afinidade pela fosfatilserina. Dessa forma, quando adicionada ao meio extracelular tende a se ligar a esse lipídeo tornando possível a identificação das células em processo de apoptose. Já o iodeto de propídeo, é um marcador fluorescente de morte celular capaz de se ligar ao DNA, intercalando-se de forma não específica entre as bases. O iodeto de propídeo, por ser um composto pouco lipossolúvel, só é capaz de atravessar a membrana citoplasmática quando a mesma se encontra danificada, ou seja, com o processo de morte celular por necrose iniciado.

Dessa forma, para a identificação do tipo de morte celular, ambos os tipos celulares (L929 e MDPC-23) foram cultivados em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) e ao atingir uma confluência de 80%, as células foram tripsinizadas e semeadas em garrafas de 25 cm² (30.000 células/cm²), permanecendo no interior da incubadora por 72 horas. Em seguida, removeu-se o meio de cultivo e as células foram incubadas no escuro com a solução de Photogem[®] (10, 25, 50, 100 e 150 mg/L) ou com DMEM sem fenol vermelho, durante 30 minutos. Então, as garrafas foram irradiadas por uma dose de 37,5 J/cm² na luz azul ou por uma dose de 100 J/cm² na luz vermelha. Os grupos que não foram irradiados permaneceram fora da incubadora e protegidas da luz por 28 ou 66 minutos, respectivamente. Após esses procedimentos, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de tampão de ligação, contendo 10 mM de HEPES cujo pH era de 7,4 e a composição química continha 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂. Para a aquisição das células marcadas positivamente para apoptose, uma alíquota de 250 µL da suspensão celular de cada condição foi tratada com anexina-V (Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 1:500, durante 20 min, no escuro. As amostras foram adquiridas em canal de FL-1 do citômetro de fluxo. A aquisição das células marcadas positivamente para

necrose foi realizada imediatamente após a adição de 0,2 µg/mL de iodeto de propídeo, sendo adquiridas em canal de FL-2 do citômetro de fluxo.

4.5.2 Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio

Nas mesmas condições utilizadas para identificação do tipo de morte celular, a geração de EROs foi monitorada espectrofluorimetricamente, pelo corante permeável à membrana H₂-DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, Invitrogen, San Francisco, CA, USA). O método H₂-DCFDA é utilizado para estimar os níveis intracelulares de EROs. Após a resuspensão celular em tampão de ligação, uma alíquota de 250 µL da suspensão celular de cada condição foi tratada com H₂-DCFDA na concentração de 1 µM, durante 20 minutos, no escuro. Esse corante é oxidado na presença de EROs emitindo uma fluorescência, que foi monitorada em 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com a largura da fenda de 3 nm. Calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), o produto da oxidação do H₂-DCF. Para análises em citometria de fluxo, a fluorescência do DCF foi monitorada através dos canais de FL-1.

A microscopic image of neurons, likely from the central nervous system, showing cell bodies (soma) and extensive branching processes (dendrites and axons). The image is overlaid with a red, semi-transparent, textured pattern that resembles a network or a web, possibly representing a specific type of neural connectivity or a pathological state. The red overlay is more prominent in certain areas, such as the upper left and lower right, while other areas are more transparent, revealing the underlying cellular structure.

Resultado

5 Resultado

5.1 Análise da viabilidade celular:

Os dados originais obtidos pela técnica colorimétrica do Metiltetrazolium (teste do MTT) estão apresentados no Apêndice 2 nas Tabelas A3 a A26.

5.1.1 Avaliação do efeito da PDT utilizando Photogem[®] e LED azul na atividade mitocondrial dos fibroblastos L929

Inicialmente, fez-se necessária a elaboração de uma análise gráfica cujo objetivo foi visualizar e tirar conclusões empíricas sobre o comportamento da variável em estudo (valores do MTT) sob a ação dos diversos tratamentos.

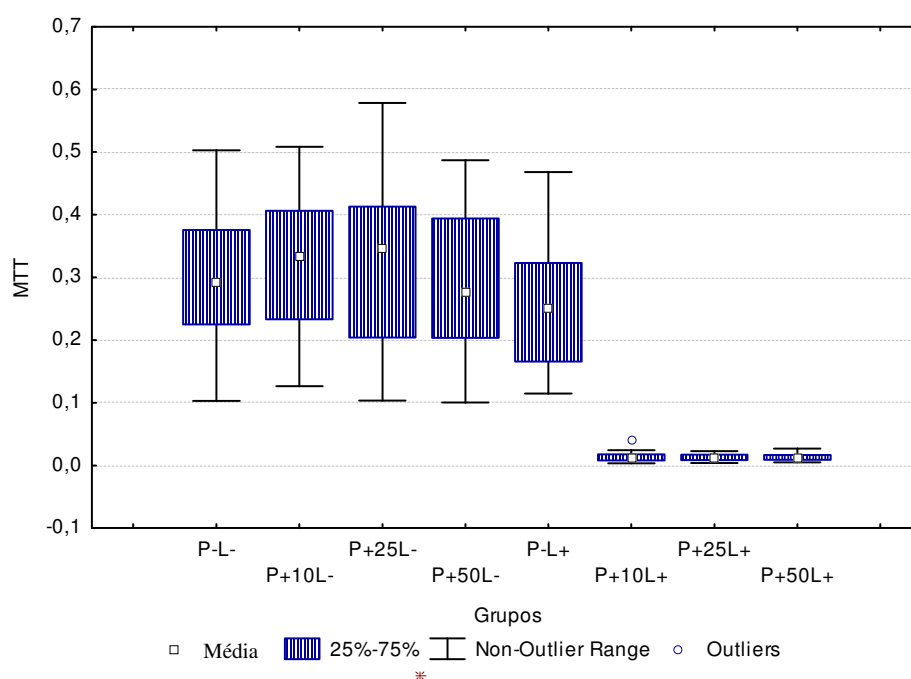


FIGURA 7- Box-plot da variável MTT em função dos tratamentos realizados em fibroblastos L929 submetidos à PDT, ao Photogem[®] nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/L e a irradiação com LED azul.

A Figura 7 representa o gráfico box-plot dos grupos definidos pela presença ou ausência de irradiação com LED azul (L) e fotossensibilizador Photogem[®] (P) em função do metabolismo celular dos fibroblastos L929. Os gráficos do tipo box-plot objetivaram observar a dispersão dos dados em cada um dos grupos apresentados, relacioná-los entre si e verificar possíveis desvios de comportamento. Observa-se que o grupo controle negativo (P-L-) não apresenta diferenças globais em relação aos grupos P+10L-, P+25L-, P+50L- e P-L+. No entanto, há formação de um novo aglomerado que integram P+10L+, P+25L+ e P+50L+ os quais apresentam medidas de metabolismo celular menores que os grupos citados anteriormente, indicando, assim, que os grupos expostos à luz associada ao medicamento têm uma menor taxa de atividade mitocondrial. Além disso, há evidências de que a variabilidade dos grupos seja diferente, principalmente pelo fato de que sob efeito luminoso, os valores são menores e mais homogêneos.

Na avaliação gráfica representada pela Figura 8, cujos componentes são o metabolismo celular dos fibroblastos e o tempo de avaliação em horas (0, 12 e 24 horas), foi observado uma tendência de aumento do metabolismo celular no período de 12 horas. Em seguida, ocorreu um decréscimo voltando, praticamente para o mesmo patamar inicial. No entanto, graficamente não houve evidências de que estas médias sejam significativamente diferentes uma vez que foi observado homogeneidade na variabilidade entre os tempos dos grupos experimentais P+L+.

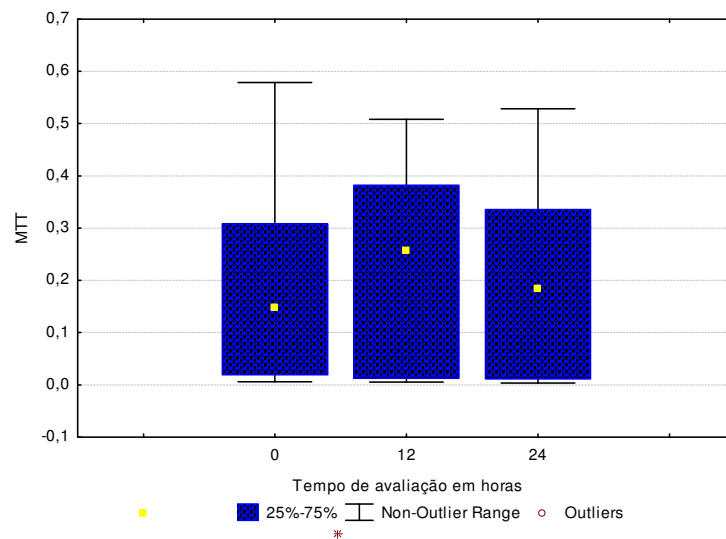


FIGURA 8– Box-plot da variável MTT em função dos tempos de avaliação (0, 12 e 24 horas) para os fibroblastos L929.

Por último, realizou-se a análise gráfica do fator tempo de irradiação de 19 e 28 minutos, os quais correspondem às doses de 25,5 e 37,5 J/cm². Pode ser observado na Figura 9 que não há evidências de diferenças entre os níveis de atividade mitocondrial em função do tempo de exposição à luz, isoladamente.

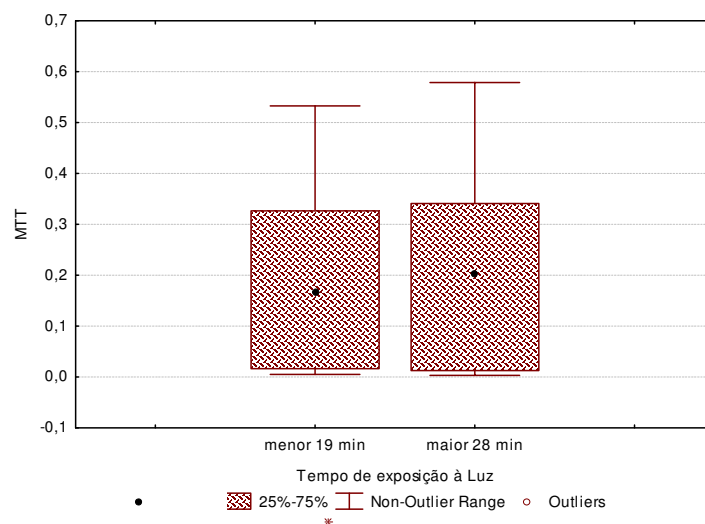


FIGURA 9- Box-plot da variável MTT em função dos tempos de irradiação (19 e 28 minutos) para os fibroblastos L929.

Como o fator denominado GRUPOS é, na verdade, a associação de dois fatores: presença ou não de luz associada à utilização ou não do Photogem[®] (droga), esta variável foi subdividida em duas categorias, definindo, então dois fatores com as seguintes características:

LUZ: *fatores de variação de natureza categórica que apresenta dois níveis: L+: Presença de luz e L-: ausência de luz;*

PHOTOGEN[®]: *fatores de variação de natureza categórica com 4 níveis: P-: ausência do fator droga; P+10: utilização da droga a uma concentração de 10 mg/L; P+25: utilização da droga a uma concentração de 25 mg/L e P+50, droga utilizada a 50 mg/L.*

Essa recodificação do fator GRUPOS foi realizada para evidenciar, de maneira simplificada, a influência destes fatores na atividade mitocondrial e assim, subsidiar de maneira adequada o modelo de análise de variância (ANOVA) a ser utilizado. A principal vantagem desta remodelagem é a possibilidade de avaliar a variabilidade do fator Photogem[®] e Luz, bem como as interações delas recorrentes.

Estatisticamente, situações como a observada na Figura 7 são complicadas para a análise, pois formam distribuições de probabilidade bimodais, o que dificulta muito a técnica, uma vez que os testes pressupõem normalidade que é unimodal. Para exemplificar, apresentamos o histograma dos dados obtidos para a amostra em estudo (Figura 10). É possível observar que há dois pontos de máximo nos dados, indicando a bimodalidade.

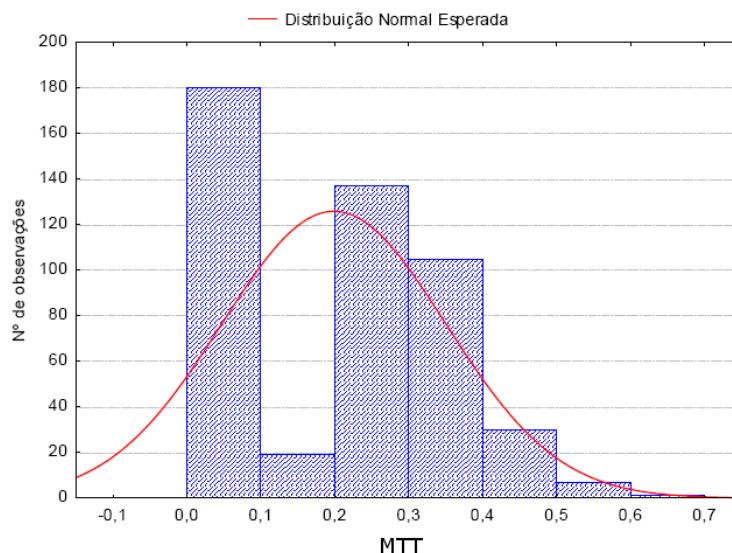


FIGURA 10- Histograma da variável resposta MTT em função dos tratamentos realizados em fibroblastos L929 submetidos à PDT, ao Photogem® nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/L e a irradiação com LED azul.

Uma vez que houve dificuldades em se obter normalidade e homogeneidade de variâncias neste conjunto de dados, fez-se necessária a transformação da variável MTT. Para que o conjunto de dados pudesse ser tratado como um modelo linear para a realização da ANOVA, a seguinte transformação foi utilizada, na qual Y^* é a nova variável resposta que corresponde à aplicação do logaritmo neperiano ($\ln$) aos valores reais de MTT, de modo que os pressupostos de normalidade e, principalmente, homogeneidade de variâncias fosse obtido.

$$Y^* = \ln(MTT)$$

Na Tabela 1 podemos visualizar a ANOVA para a variável transformada Y^* . Os fatores isolados Luz e Photogem® são significativos ao nível de confiança de 95%, como também a interação Luz-Photogem®.

Tabela 1 - Análise da Variância dos dados obtidos pelo teste MTT dos fibroblastos L929 submetido a PDT com Photogem® e LED azul

Fatores	gl	SQ	QM	F	P-Valor
Tempo	2	1,713	0,8567	0,1300	0,878092
Luz	1	724,494	724,4941	109,9668	0,000000
Photogem®	3	200,904	66,9679	10,1647	0,000002
Tempo*Luz	2	9,328	4,6639	0,7079	0,493215
Tempo*Photogem®	6	3,715	0,6192	0,0940	0,996939
Luz*Photogem®	3	200,241	66,7471	10,1312	0,000002
Tempo*Luz*Photogem®	6	1,540	0,2566	0,0389	0,999753
Resíduos	456	3004,263	6,5883		
Total	479	4148,528			

Nas situações, como a descrita acima, somente a análise do fator de interação é necessária para que haja conhecimento completo do comportamento da variável resposta Y^* em função destes fatores. O diagrama abaixo facilita a interpretação (Figura 11).

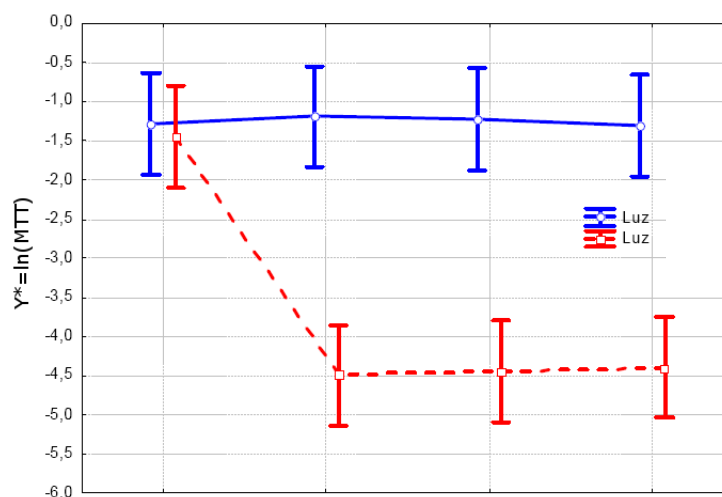


FIGURA 11- Efeito de interação entre o fator Luz azul e Photogem® nas diversas concentrações (10, 25 e 50 mg/L) nos fibroblastos L929.

Observa-se na Figura 11 que o nível de metabolismo celular (Y^*) é muito superior quando não estão presentes os efeitos de Luz e Photogem[®] (linha azul e primeiro ponto da linha tracejada vermelha). Entretanto, sob o efeito do Photogem[®] e Luz, há significativa redução no metabolismo celular. Dessa forma, o Photogem[®] associada à luz azul reduz significativamente a taxa metabólica dos fibroblastos L929 (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias* da variável MTT em função do efeito dos fatores luz azul e droga na atividade mitocondrial dos fibroblastos

Luz	Photogem [®]	Média	Desvio Padrão	LI	LS
L-	P-	0,294626	0,012170	0,270265	0,318987
L-	P+10	0,321843	0,013107	0,295616	0,348070
L-	P+25	0,319894	0,016190	0,287497	0,352291
L-	P+50	0,292540	0,013657	0,265212	0,319868
L+	P-	0,248932	0,011375	0,226171	0,271693
L+	P+10	0,012643	0,000845	0,010953	0,014333
L+	P+25	0,012556	0,000641	0,011272	0,013839
L+	P+50	0,013363	0,000723	0,011916	0,014811

LI: Limite inferior do intervalo de confiança de 95%

LS: Limite superior do intervalo de confiança de 95%

Após a verificação de significância da interação entre os fatores, o teste *post hoc* de Dunnet comparou quais grupos diferiram estatisticamente entre si. Essa análise demonstrou que os grupos P+10L+, P+25L+, P+50L+ apresentaram médias estatisticamente diferentes com relação ao grupo controle negativo (P-L-). Os resultados demonstram que todos os grupos submetidos a PDT (P+L+) apresentaram atividade mitocondrial reduzida de forma estatisticamente significativa, independente da concentração do Photogem[®] (10, 25 ou 50 mg/L) e da dose de luz utilizada (25,5 ou 37,5 J/cm²).

* As estatísticas apresentadas na Tabela 2 referem-se à variável MTT e não a sua transformada Y^* .

5.1.2 Avaliação do efeito da PDT utilizando Photogem® e LED azul na atividade mitocondrial das células odontoblastóides MDPC-23

A Figura 12 representa o gráfico box-plot dos grupos definidos pela presença do fotossensibilizador Photogem® e da irradiação com LED azul em função do metabolismo celular das células odontoblastóides MDPC-23. É possível observar que houve redução no metabolismo na presença dos fatores luz e fotossensibilizador associados. Entretanto, nem a luz nem o Photogem® isoladamente induziram à redução da atividade mitocondrial.

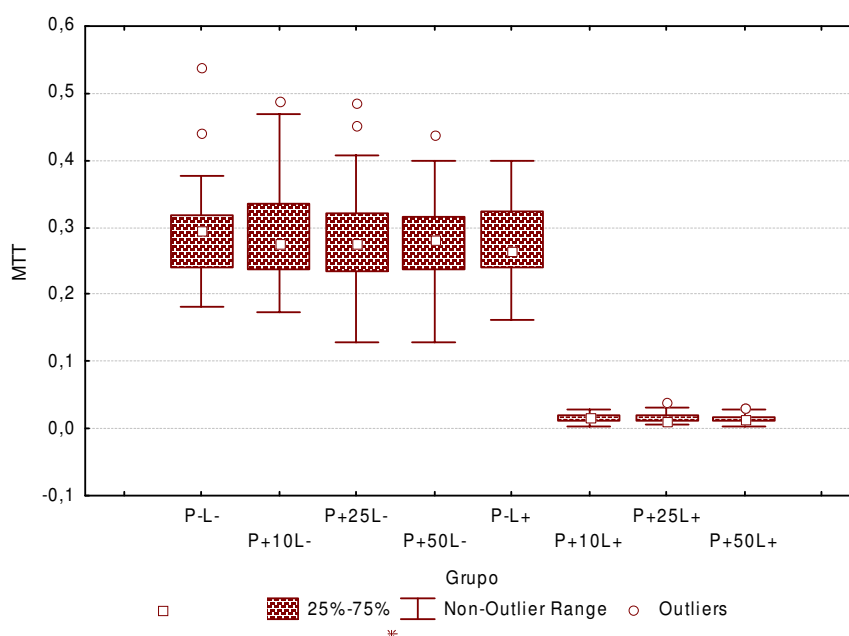


FIGURA 12 - Box-plot da variável MTT em função dos tratamentos realizados em células odontoblastóides MDPC-23 submetidos à PDT, ao Photogem® nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/L e à irradiação com LED azul.

Os componentes da Figura 13 são a atividade mitocondrial das células odontoblastóides MDPC-23 e o tempo de avaliação em horas (0, 12 e 24 horas). Observa-se que não há evidências de diferenças entre médias nos tempos de avaliação.

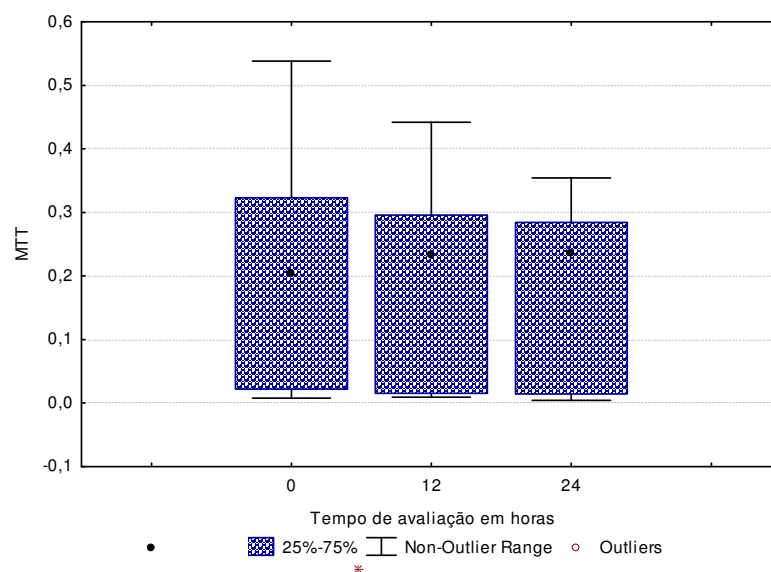


FIGURA 13– Box-plot da variável MTT em função dos tempos de avaliação (0, 12 e 24 horas) para as células odontoblastóides MDPC-23.

Conforme verificado para a linhagem L929, não houve diferenças entre os níveis de metabolismo celular em função do tempo de exposição à luz azul (19 ou 28 minutos) para as células MDPC 23 (Figura 14).

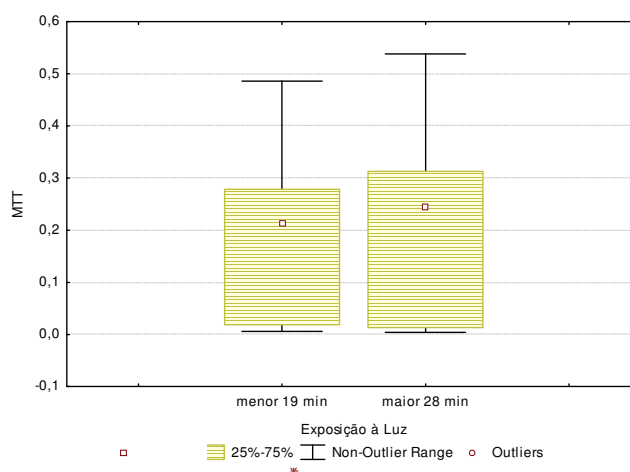


FIGURA 14- Box-plot da variável MTT em função dos tempos de irradiação (19 e 28 minutos) para as células odontoblastóides MDPC-23.

Após sucessivas análises em busca de uma transformação de variáveis aleatórias que minimizassem os problemas relativos à homogeneidade, a seguinte transformação foi proposta:

$$Y^* = MTT^{0,2}$$

Y^* é a nova variável resposta para obtenção dos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias.

A Tabela 3 indica o ANOVA para a variável transformada Y^* . Nesta tabela observa-se que os fatores isolados Luz e Photogem[®] foram significativos ao nível de confiança de 95%, assim como a interação Luz-Photogem[®].

Tabela 3- Análise da Variância dos dados obtidos pelo teste MTT das células MDPC-23 submetido a PDT com Photogem[®] e LED azul

	g.l.	SQ	QM	F	P-valor
Intercepto	1	196,5344	196,5344	150229,3	0,00
Photogem[®]	3	2,6210	0,8737	667,8	0,00
Luz	1	8,1811	8,1811	6253,5	0,00
Photogem[®]*Luz	3	2,5061	0,8354	638,5	0,00
Erro	467	0,6109	0,0013		
Total	474	14,1064			

De acordo com a Figura 15 o nível de metabolismo (Y^*) é muito superior quando não estão presentes os efeitos da luz e Photogem[®] associados (linha azul). Entretanto, na presença do fotossensibilizador e luz, foi verificada redução significativa na taxa do metabolismo celular (linha tracejada vermelha). Além disso, podemos observar que a aplicação da luz (P-L+) não foi significativamente diferente do controle negativo (P-L-), sendo representado pelo primeiro ponto da linha tracejada vermelha.

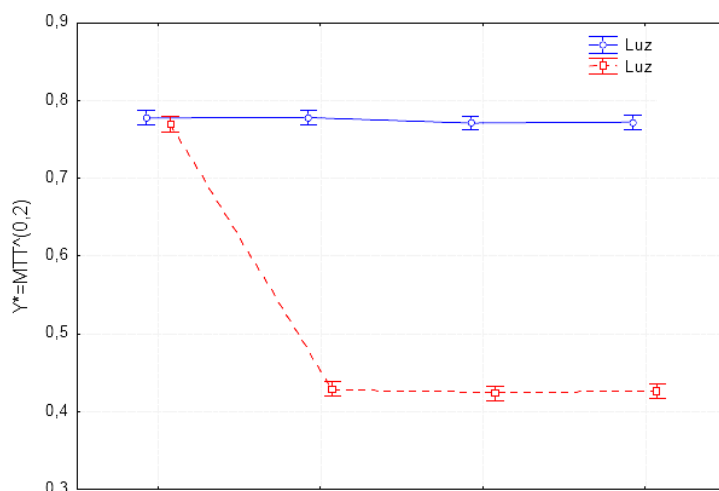


FIGURA 15- Efeito de interação entre o fator Luz Azul e Photogem® nas diversas concentrações (10, 25 e 50 mg/L) nas células MDPC-23.

O teste de Dunnett identificou diferenças significativas entre o controle negativo (P-L-) em relação aos grupos submetidos à PDT (P+10L+, P+25L+, P+50L+). Entretanto, o grupo controle não foi diferente dos demais grupos.

Tabela 4 – Médias* da variável MTT em função do efeito dos fatores luz azul e droga na atividade mitocondrial das células MDPC-23

Photogem®	Luz	Média	Desvio Padrão	LI	LS
P-	L-	0,289066	0,006462	0,276367	0,301764
P+10	L-	0,290882	0,006462	0,278184	0,303580
P+25	L-	0,279878	0,006462	0,267179	0,292576
P+50	L-	0,279863	0,006462	0,267164	0,292561
P-	L+	0,274777	0,006749	0,261514	0,288040
P+10	L+	0,015559	0,006462	0,002860	0,028257
P+25	L+	0,014927	0,006462	0,002229	0,027626
P+50	L+	0,015170	0,006462	0,002471	0,027868

LI: Limite inferior do intervalo de confiança de 95%

LS: Limite superior do intervalo de confiança de 95%

* As estatísticas apresentadas na Tabela 4 referem-se à variável MTT e não a sua transformada Y*.

Na Tabela 4, os resultados demonstraram que todos os grupos submetidos a PDT (P+L+) apresentaram atividade mitocondrial reduzida de forma estatisticamente significativa, independente da concentração do Photogem® (10, 25 ou 50 mg/L) e da dose de luz azul utilizada (25,5 ou 37,5 J/cm²) para as células odontoblastóides MDPC-23.

5.1.3 Avaliação do efeito da PDT utilizando Photogem® e LED vermelho na atividade mitocondrial dos fibroblastos L929

Da mesma forma como nas análises anteriores, inicialmente os dados foram submetidos a análise gráfica para visualização do comportamento da variável MTT sob a ação dos diversos tratamentos. Na Figura 16, foi possível observar que o grupo controle (P-L-) também não apresentou diferenças em relação aos grupos P+50L-, P+100L-, P+150L- e P-L+. No entanto, os grupos P+50L+, P+100L+ e P+150L+ apresentam medidas de metabolismo celular menores que os grupos citados anteriormente, indicando que os grupos expostos à luz associada ao fotossensibilizador apresentam uma menor atividade mitocondrial.

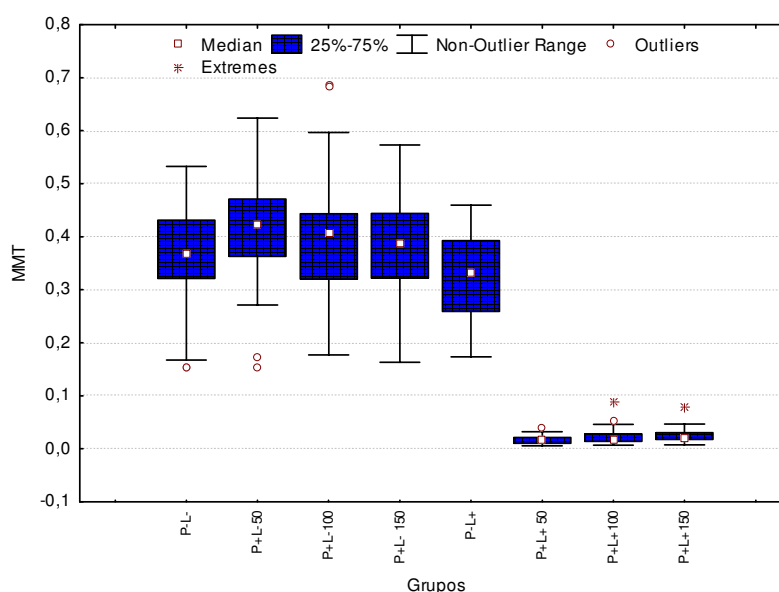


FIGURA 16 - Box-plot da variável MTT em função dos tratamentos realizados em fibroblastos L929 submetidos à PDT, ao Photogem® nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/L e a irradiação com LED vermelho.

Além disso, não houve diferença entre os valores medianos nos diversos tempos de avaliação do teste MTT (0, 12 e 24 horas). Como observado nas análises anteriores, a Figura 17 demonstra a manutenção dos valores obtidos pelo teste MTT imediatamente após a PDT ao longo de 12 e 24 horas.

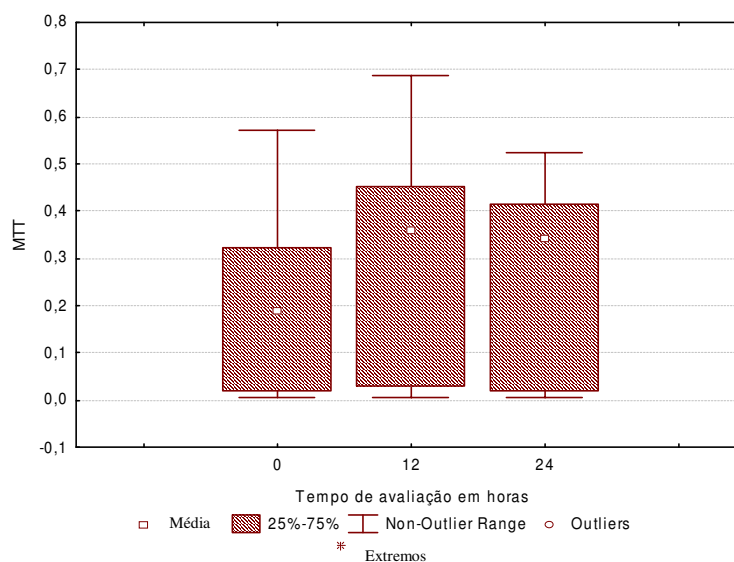


FIGURA 17- Box-plot da variável MTT em função dos tempos de avaliação (0, 12 e 24 horas) para os fibroblastos L929.

Ao analisarmos os valores medianos dos tempos de irradiação (50 e 66 minutos) não foram observadas diferenças significativas (Figura 18).

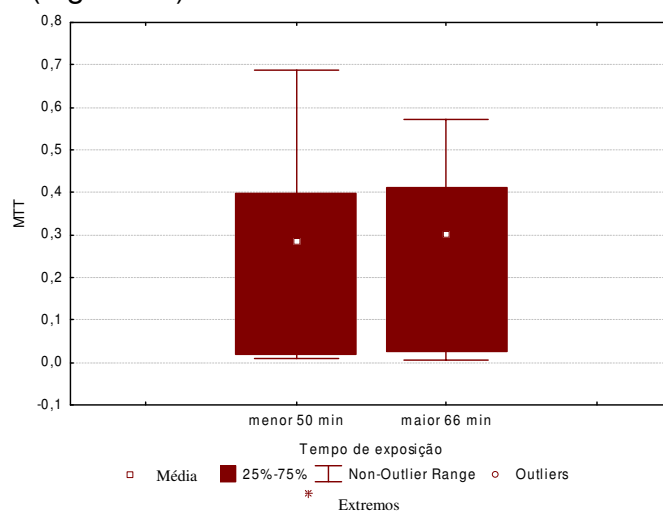


FIGURA 18- Box-plot da variável MTT em função dos tempos de irradiação (50 e 66 minutos) para os fibroblastos L929.

Da mesma forma que as análises anteriores, fez-se necessária a transformação da variável resposta MTT, que segue abaixo.

$$Y^* = MTT^{0,2}$$

O resultado da ANOVA é apresentado a seguir na Tabela 31.

Tabela 5 - Análise da Variância dos dados obtidos pelo teste MTT dos fibroblastos L929 submetido a PDT com Photogem® e LED vermelho

	g.l.	SQ	QM	F	P-valor
Tempo	2	0,3603	0,18016	0,51552	0,597538
Luz	1	13,7985	13,79846	39,48391	0,000000
Photogem®	3	3,3496	1,11655	3,19497	0,023373
Tempo *Luz	2	0,0898	0,04488	0,12843	0,879509
Tempo *Photogem®	6	0,0542	0,00904	0,02586	0,999926
Luz*Photogem®	3	4,1438	1,38127	3,95246	0,008411
Tempo *Luz*Photogem®	6	0,0152	0,00254	0,00726	0,999998
Error	457	159,7080	0,34947		
Total	480	181,5195			

A ANOVA corrobora com a Figura 19, onde pode ser observada redução significativa da variável MTT na associação do Photogem® e luz, independente da concentração do fotossensibilizador. Entretanto, quando na presença de Photogem® ou luz isoladamente, o metabolismo celular permanece semelhante ao controle negativo.

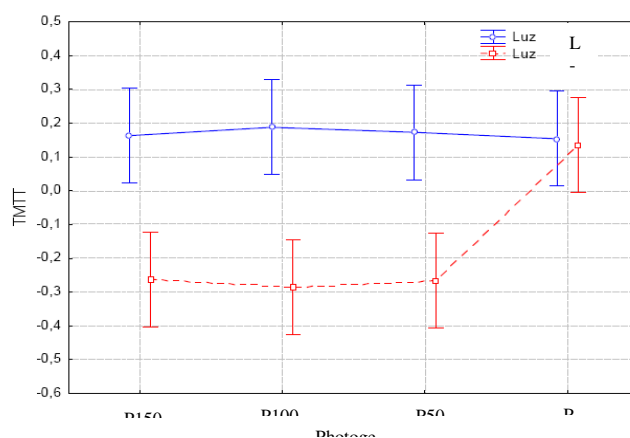


FIGURA 19- Efeito de interação entre Photogem® e Luz vermelha para fibroblastos

O teste de Dunnett comparou o grupo controle negativo (P-L-) com todas as combinações possíveis entre as concentrações de Photogem® e Luz. Houve evidências de que o grupo controle negativo seja estatisticamente diferente dos grupos submetidos a PDT, ou seja, quando na presença de alguma concentração de Photogem® associada ao LED vermelho (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Teste de Comparações múltiplas de Dunnett para o grupo controle

Luz Photogem®		p-valor
L-	P+150	1,000000
L-	P+50	0,999826
L-	P+100	0,999995
L-	P-	
L+	P+150	0,000886
L+	P+50	0,000386
L+	P+100	0,000791
L+	P-	0,999996

Tabela 7 – Médias* da variável MTT em função do efeito dos fatores Luz e Photogem®

Luz Photogem®		Média	Desv. Padrão	LI	LS
L-	P+150	0,373699	0,032700	0,309437	0,437960
L-	P+50	0,412849	0,032700	0,348588	0,477111
L-	P+100	0,390760	0,032700	0,326499	0,455021
L-	P-	0,360657	0,032700	0,296396	0,424918
L+	P+150	0,022928	0,032700	-0,041334	0,087189
L+	P+50	0,017255	0,032700	-0,047006	0,081517
L+	P+100	0,022217	0,032700	-0,042044	0,086478
L+	P-	0,326558	0,032700	0,262297	0,390819

LI: Limite inferior do intervalo de confiança de 95%

LS: Limite superior do intervalo de confiança de 95%

Na Tabela 7 podemos observar as diferenças estatisticamente significantes entre as médias do metabolismo celular com a associação de qualquer concentração do fotossensibilizador e luz em relação aos outros grupos. Novamente, observa-se que para todos os

* As estatísticas apresentadas na tabela 33 referem-se à variável MTT e não a sua transformada Y*.

grupos em que se realizou a PDT, houve redução significativa da atividade mitocondrial independente da concentração do agente fotossensibilizador (50, 100 ou 150 mg/L) e dose de luz empregada (75 ou 100 J/cm²).

1.4 Avaliação do efeito da PDT utilizando Photogem® e LED vermelho na atividade mitocondrial das células odontoblastóides MDPC-23

A amostra em estudo é formada por células odontoblastóides MDPC-23 que foram expostas à fonte de luz vermelha em duas doses (75,0 ou 100,0 J/cm²) e a diferentes concentrações do Photogem® (50, 100 e 150 mg/L). Observa-se novamente na Figura 20 a formação de dois aglomerados, um formado por aquelas amostras que não foram submetidas à associação da luz com o fotossensibilizador, e outro contendo aquelas submetidas aos dois tratamentos simultaneamente, ou seja, submetidas a PDT. Novamente, as células submetidas a associação dos dois fatores (luz e Photogem®) apresentaram o metabolismo celular reduzido.

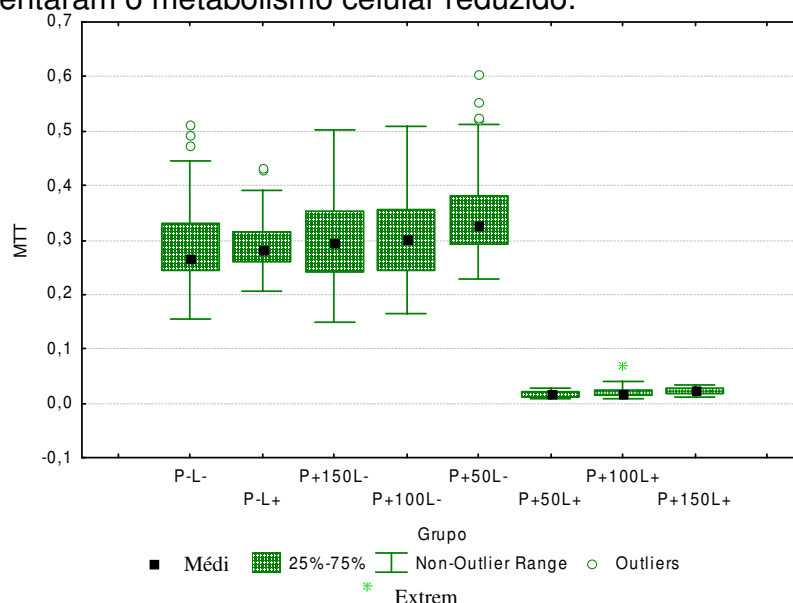


FIGURA 20 – Box-plot da variável MTT em função dos tratamentos realizados em células odontoblastóides MDPC-23 submetidos à PDT, ao Photogem® nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/L e à irradiação com LED vermelho.

A avaliação gráfica dos valores de metabolismo celular (MTT) em função dos tempos de avaliação em 0, 12 e 24 horas indicou uma tendência à redução dos processos mitocondriais no tempo 12 horas. Entretanto, empiricamente, observa-se que não há um comportamento muito discrepante entre os três tempos analisados (Figura 21).

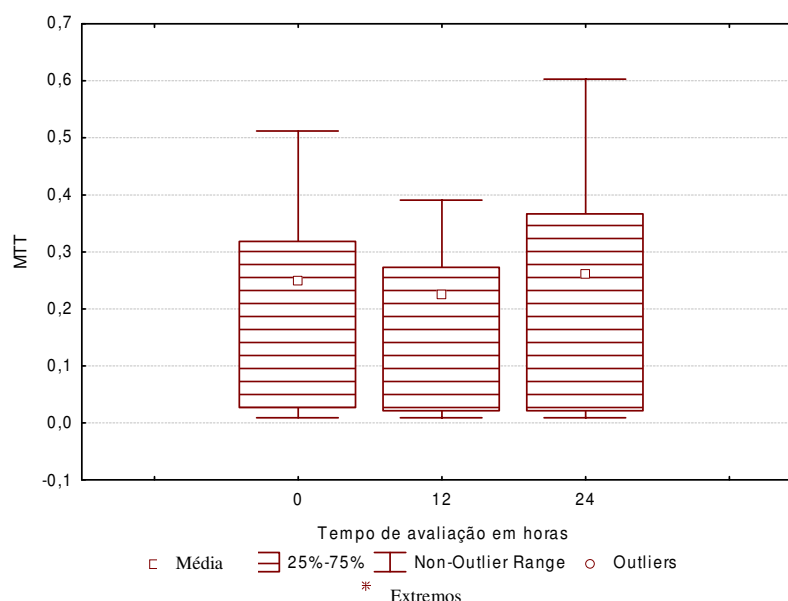


FIGURA 21- Box-plot da variável MTT em função dos tempos de avaliação (0, 12 e 24 horas) para as células odontoblastóides MDPC-23.

A Figura 22 indica que não há, graficamente, diferença entre os valores medianos do nível de metabolismo celular em função do tempo de irradiação com o LED vermelho (50 ou 66 minutos).

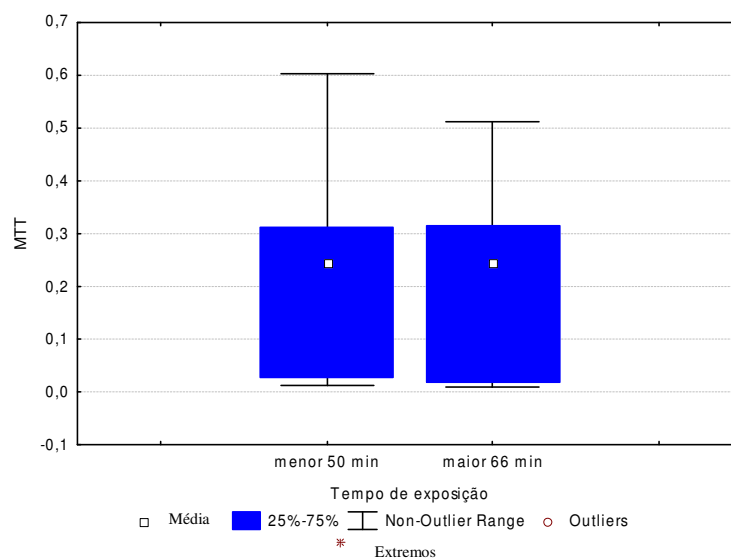


FIGURA 22 - Box-plot da variável MTT em função dos tempos de irradiação (50 e 66 minutos) para as células odontoblastóides MDPC-23.

Para a análise estatística dos dados foi realizada a transformação da variável resposta MTT a fim de se obter normalidade e homogeneidade de variâncias. A transformação sugerida foi:

$$Y^* = MTT^{\frac{1}{4}}$$

A Tabela 8 apresenta os valores da análise de variância obtidos após a transformação dos dados originais do MTT.

Tabela 8 - Análise da Variância dos dados obtidos pelo teste MTT das células odontoblastóides MDPC-23 submetidas à PDT com Photogem® e LED vermelho

Fonte de Variação	g.l.	SQ	QM	F	P-Valor
Intercepto	1	105,0293	105,0293	149463,1	0,00
Luz	1	3,6739	3,6739	5228,2	0,00
Photogem®	3	0,8081	0,2694	383,3	0,00
Luz*Photogem®	3	1,4698	0,4899	697,2	0,00
Erro	232	0,1630	0,0007		
Total	239	6,1149			

A ANOVA identificou que a interação entre os fatores Luz e Photogem® reduziu significativamente a atividade mitocondrial, independente da concentração do fotossensibilizador. Entretanto, quando na presença de Photogem® ou luz isoladamente, o metabolismo celular permanece ligeiramente superior ao controle negativo (Figura 23).

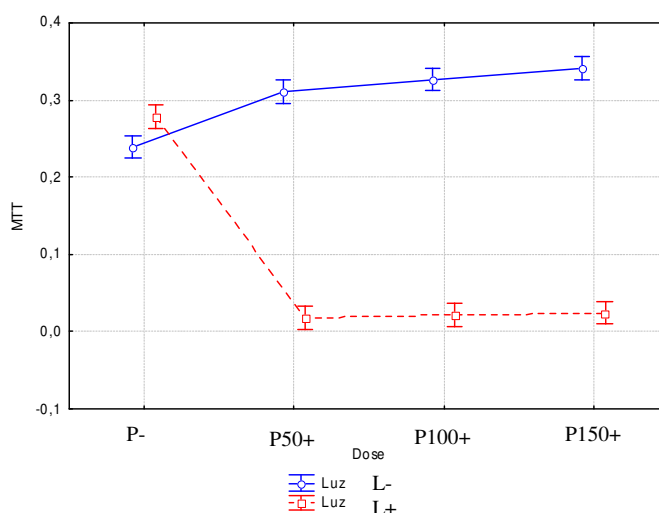


FIGURA 23- Efeito de interação entre Photogem® e Luz para células odontoblastóides MDPC-23 sob a luz vermelha.

Com o propósito de complementar os dados obtidos até o momento, realizou-se o teste de Dunnett que comparou o grupo controle negativo em função dos demais grupos. Observa-se, na Tabela 9, que o grupo controle negativo foi estatisticamente diferente dos grupos submetidos a PDT.

Tabela 9 - Análise da Variância dos dados obtidos pelo teste MTT das células odontoblastóides MDPC-23 submetidas à PDT com Photogem® e LED vermelho

Luz Photogem®		Média	Desvio Padrão	LI	LS
L-	P-	0,239429	0,007452	0,224746	0,254112
L-	P+50	0,310941	0,007452	0,296258	0,325624
L-	P+100	0,326699	0,007452	0,312016	0,341382
L-	P+150	0,341176	0,007452	0,326493	0,355858
L+	P-	0,277943	0,007452	0,263260	0,292626
L+	P+50	0,018087	0,007452	0,003404	0,032769
L+	P+100	0,021442	0,007452	0,006759	0,036125
L+	P+150	0,024119	0,007452	0,009436	0,038802

Dessa forma, para esse conjunto de dados, somente os grupos submetidos a PDT utilizada foram estatisticamente diferentes do controle negativo (P-L-).

5. 2 *Análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV):*

5.2.1 *Avaliação do efeito da PDT utilizando Photogem® e LED azul na morfologia dos fibroblastos L929*

A- Grupo controle negativo (P-L-): Um grande número de células L929 pode ser observado, e numerosas mitoses estão presentes (setas) (Figura 24a). Observa-se em maior aumento, a morfologia celular característica dos fibroblastos com formato alongado com delgados filamentos citoplasmáticos recobrindo o substrato de vidro (Figura 24b).

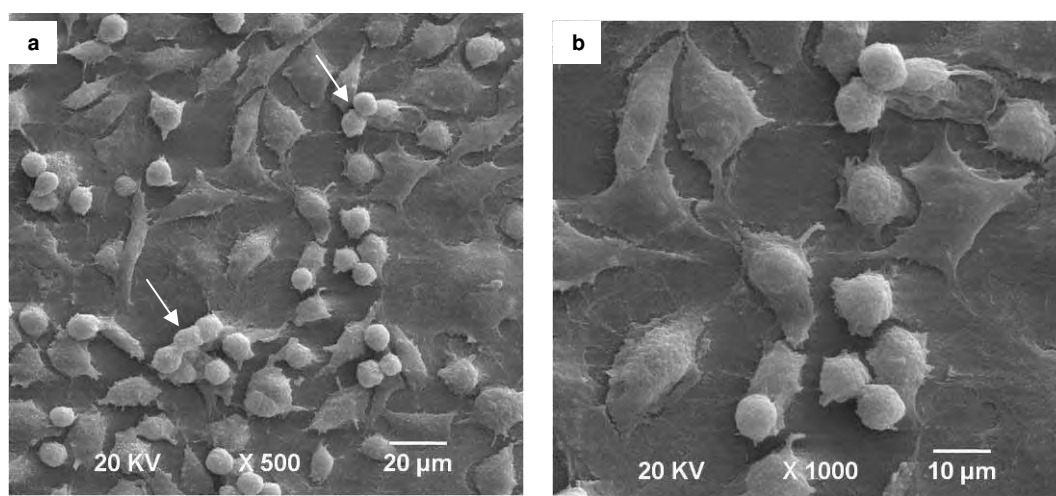


FIGURA 24 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo controle negativo (P-L-).

B- Grupo PDT com Photogem® na concentração de 10 mg/L irradiado por 28 minutos imediatamente após a terapia: Fibroblastos exibem morfologia alterada e tamanho celular reduzido. Não é possível a delimitação dos limites celulares, o que sugere que as células estejam em processo de morte com rompimento da membrana citoplasmática (Figuras 25a e b). Pequenas estruturas (seta) sugestivas de restos de

componentes celulares degradados permaneceram aderidas ao substrato de vidro, em local próximo às células de morfologia alterada (Figura 25b).

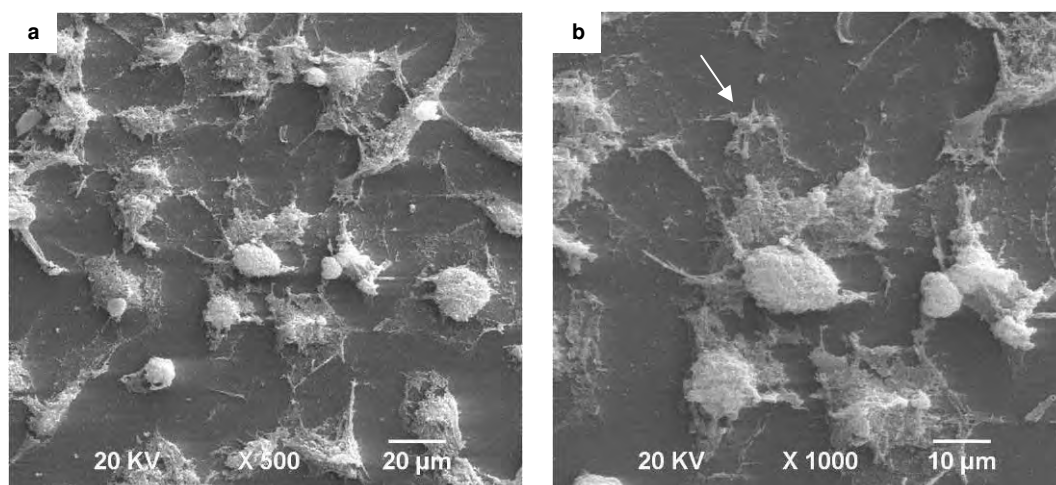


FIGURA 25 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo PDT (P+10L+) imediatamente após a terapia (0 horas).

C- Grupo PDT com Photogem[®] na concentração de 50 mg/L irradiado por 28 minutos imediatamente após a terapia: As células apresentam características semelhantes ao grupo submetido a PDT na concentração de 10 mg/L (Figura 25a). Novamente, sugere-se que houve rompimento da membrana citoplasmática devido à ausência dos limites celulares. Além disso, observam-se áreas livres de células (setas). As Figuras 26a e b evidenciam que não houve diferenças entre as concentrações de Photogem[®] nos danos causados a essa linhagem celular.

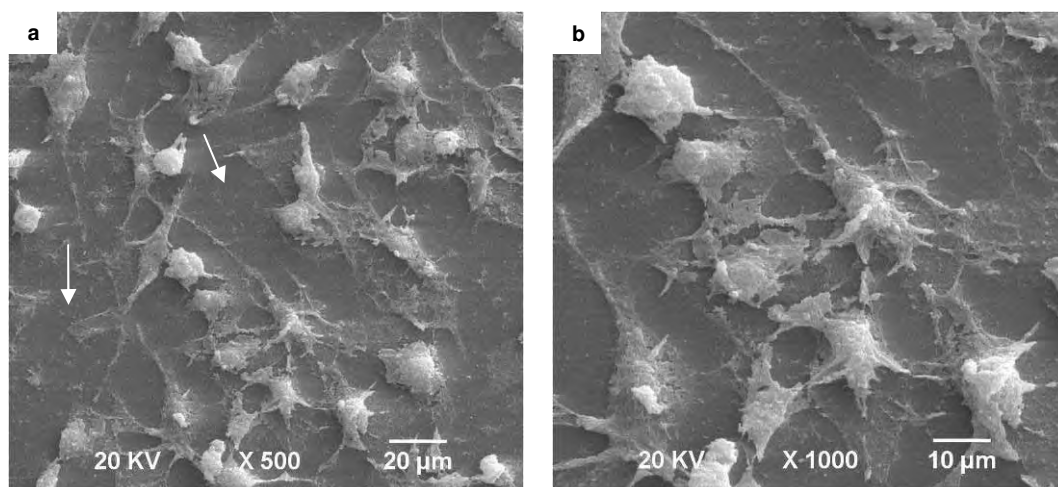


FIGURA 26(a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo PDT (P+50L+) imediatamente após a terapia (0 horas).

D- Grupo PDT com Photogem[®] na concentração de 50 mg/L irradiado por 28 minutos avaliado 24 horas após a terapia: Observa-se a manutenção das alterações morfológicas, que incluem tanto tamanho reduzido das células quanto a ausência dos limites celulares, sugerindo danos a membrana citoplasmática. A Figura 27 (a e b) evidencia o dano irreversível causado pela PDT, de forma que mesmo após 24 horas, não foi possível reverter às alterações sofridas pelas células L929.

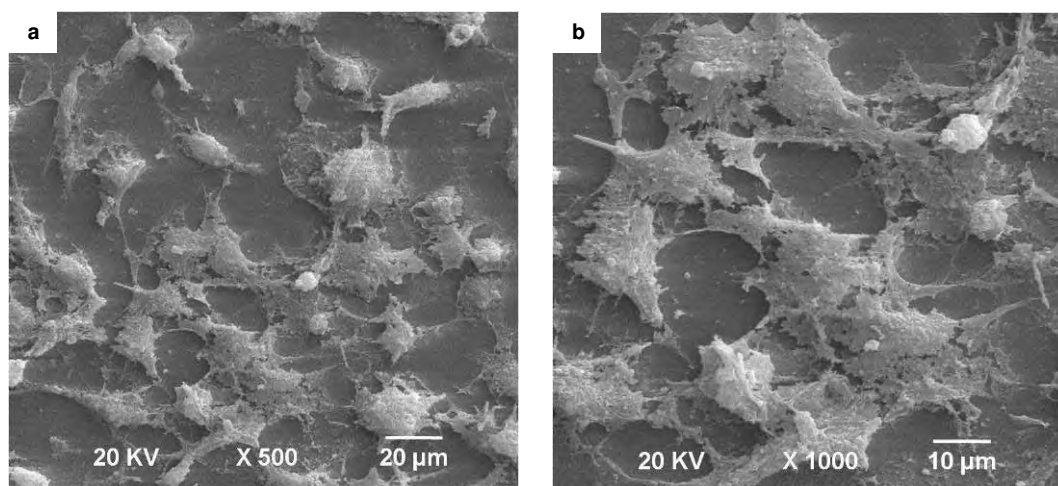


FIGURA 27 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo PDT (P+50L+) 24 horas após a terapia.

E- Grupo Photogem® na concentração de 50 mg/L: As células L929 não apresentaram alteração morfológica após o contato com o Photogem® mesmo na maior concentração avaliada. Os fibroblastos continuam apresentando formato alongado com delgados filamentos citoplasmáticos recobrimdo o substrato de vidro (Figura 28b). Entretanto, observa-se uma menor quantidade de células aderidas ao substrato e um menor número de mitoses (Figura 28a).

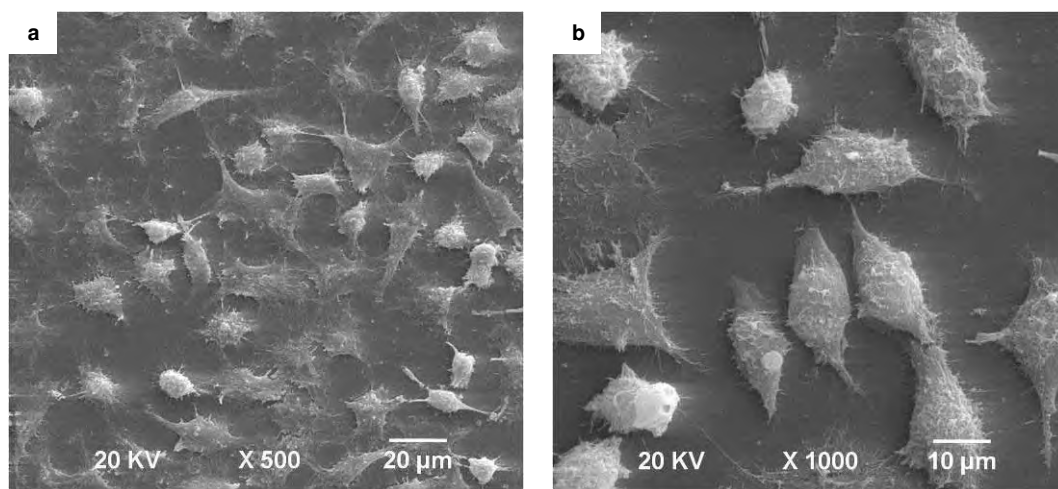


FIGURA 28 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo Photogem® (P+50L-).

F- Grupo Luz (28 minutos): Nesse grupo, as células foram irradiadas na maior dose de luz azul ($37,5 \text{ J/cm}^2$). Não se observa alterações morfológicas consideráveis, ainda que um menor número de células esteja aderido ao substrato de vidro quando comparadas ao controle (Figuras 29a e b).

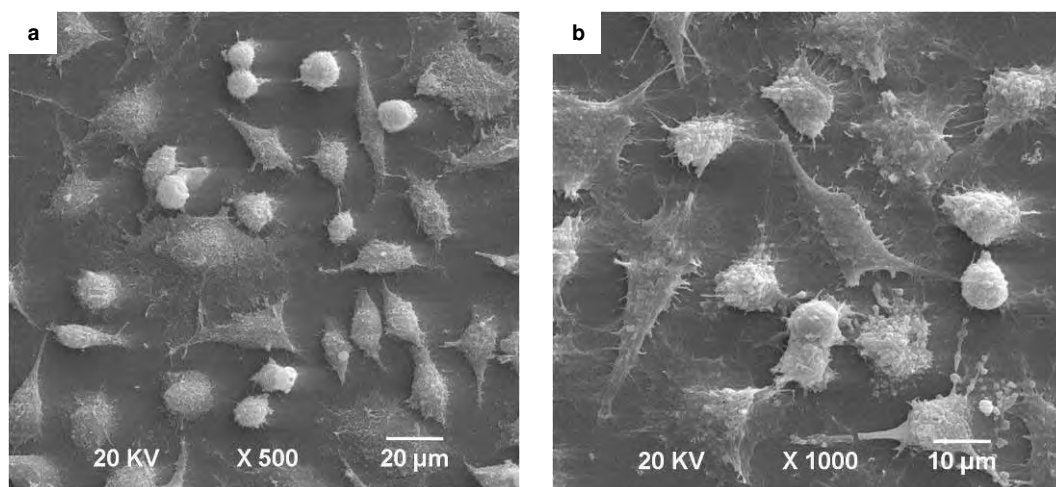


FIGURA 29 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo Luz (P-L+) após 28 minutos de irradiação com LED azul.

5.2.2 Avaliação do efeito da PDT utilizando Photogem® e LED azul na morfologia das células odontoblastóides MDPC-23:

A- Grupo controle negativo (P-L-): Um grande número de células MDPC-23 pode ser observado sobre o substrato de vidro (Figura 30a). Estas células odontoblastóides apresentam citoplasma amplo e múltiplos prolongamentos citoplasmáticos que parecem aderir-las à lamínula de vidro (Figura 30b).

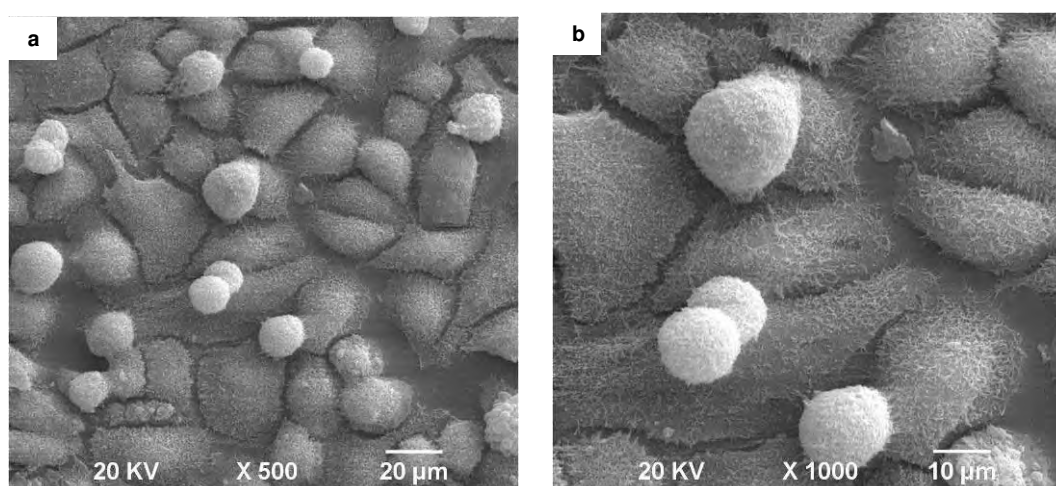


FIGURA 30 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo controle negativo (P-L-).

B- Grupo PDT com Photogem® na concentração de 10 mg/L irradiado por 28 minutos imediatamente após a terapia: As células MDPC-23 exibem uma morfologia arredondada e tamanho reduzido, não sendo possível a delimitação dos limites celulares. Sugere-se que essa linhagem celular também esteja em processo de morte devido ao rompimento da membrana citoplasmática (Figuras 31a, b).

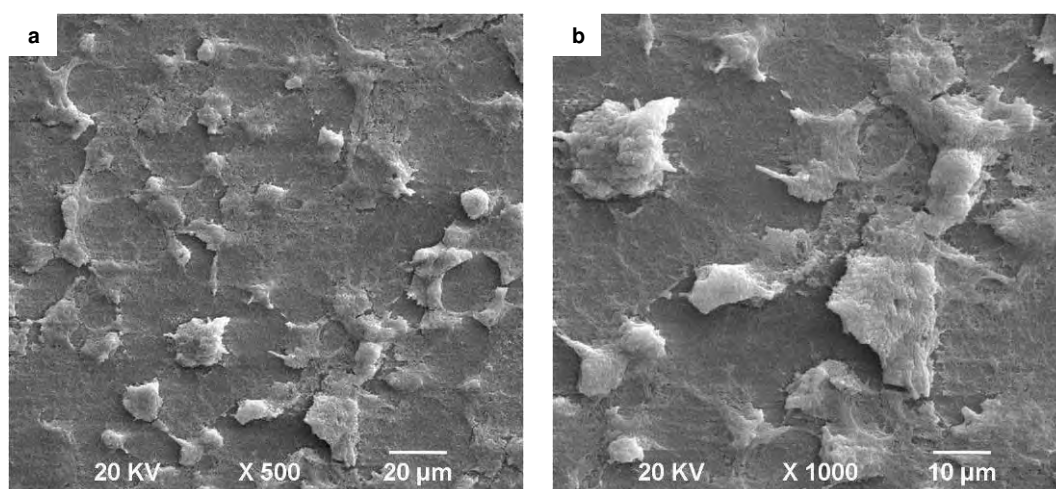


FIGURA 31 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo PDT (P+10L+) imediatamente após a terapia (0 horas).

C- Grupo PDT com Photogem® na concentração de 50 mg/L irradiado por 28 minutos imediatamente após a terapia: As células apresentam as mesmas características daquelas submetidas a PDT na concentração de 10 mg/L (Figura 31a,b), evidenciando que também não houve diferenças entre as concentrações de Photogem® nessa linhagem celular (Figuras 32a, b).

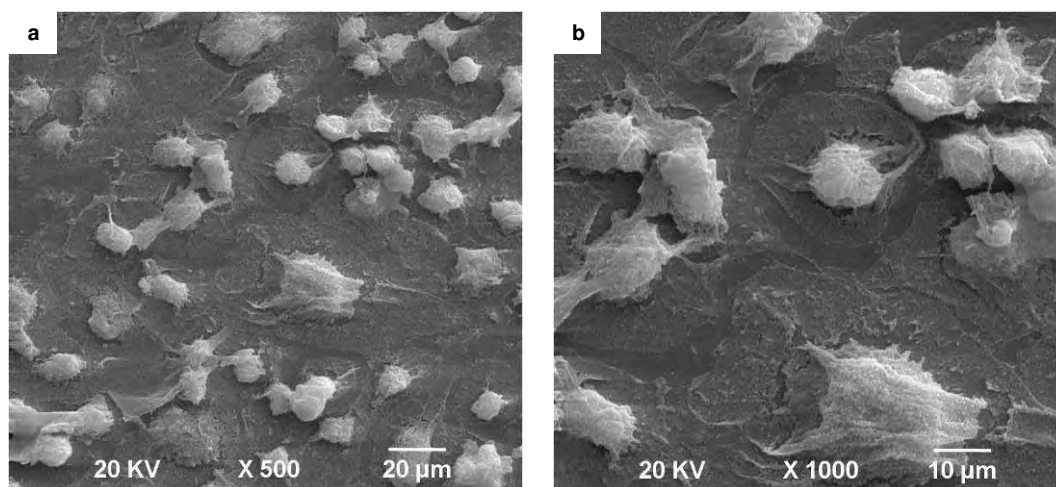


FIGURA 32 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo PDT (P+50L+) imediatamente após a terapia (0 horas).

D- Grupo PDT com Photogem[®] na concentração de 50 mg/L irradiado por 28 minutos avaliado 24 horas após a terapia: Observa-se a manutenção das alterações morfológicas, evidenciando o dano irreversível causado pela PDT. As células odontoblastóides MDPC-23 permaneceram com tamanho reduzido e sem limites celulares definidos (Figuras 33a, b).

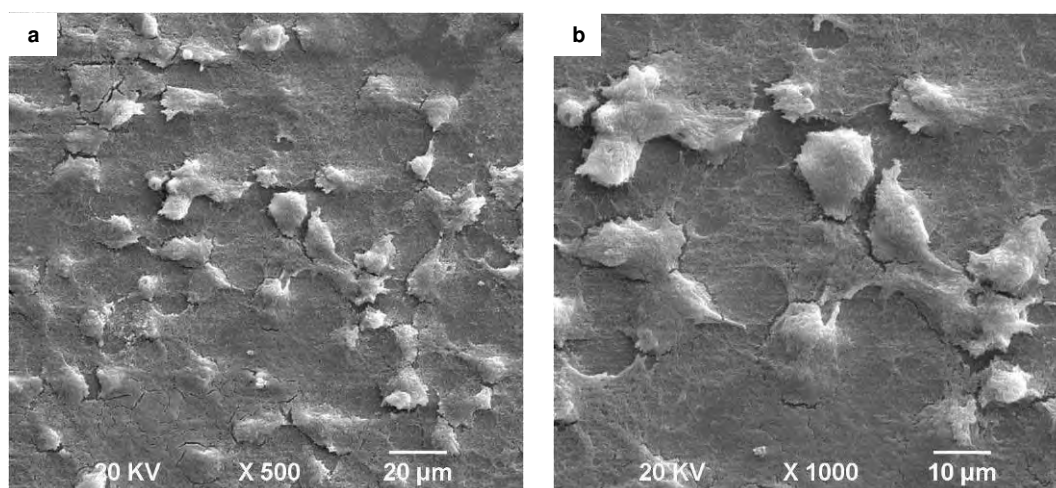


FIGURA 33 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo PDT (P+50L+) 24 horas após a terapia.

E- Grupo Photogem[®] na concentração de 50 mg/L: As células MDPC-23 não apresentaram alteração morfológica após o contato com o Photogem[®] mesmo na maior concentração avaliada. Observa-se morfologia semelhante ao controle negativo, com citoplasma amplo e múltiplos prolongamentos citoplasmáticos que parecem aderir às células a lamínula de vidro (Figura 34b). Entretanto, observam-se áreas livres de células aderidas ao substrato de vidro (setas) e ausência de mitoses (Figura 34a).

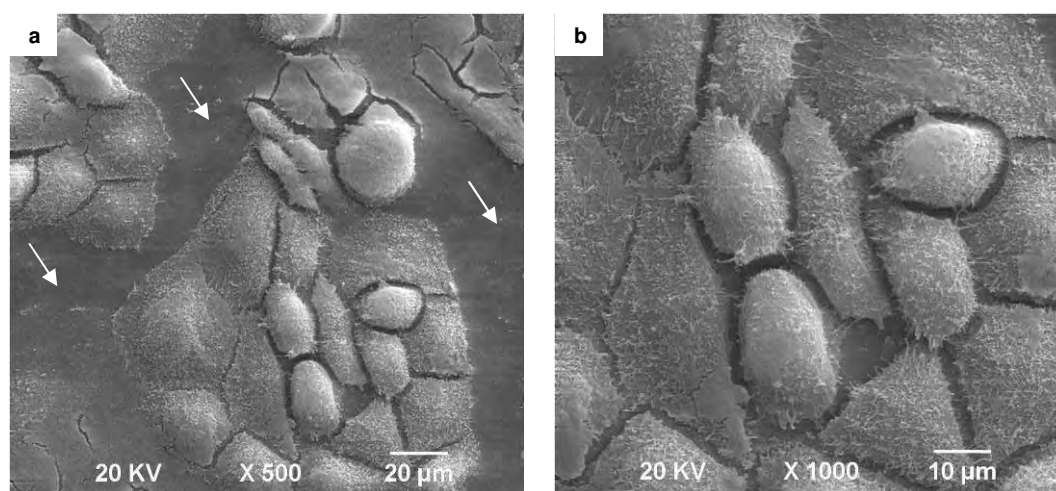


FIGURA 34 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo Photogem[®] (P+50L-).

F- Grupo Luz (28 minutos): Nesse grupo, as células foram irradiadas na maior dose de luz (37,5 J/cm²). Não foram observadas alterações morfológicas quando comparado ao controle negativo (Figuras 35a, b).

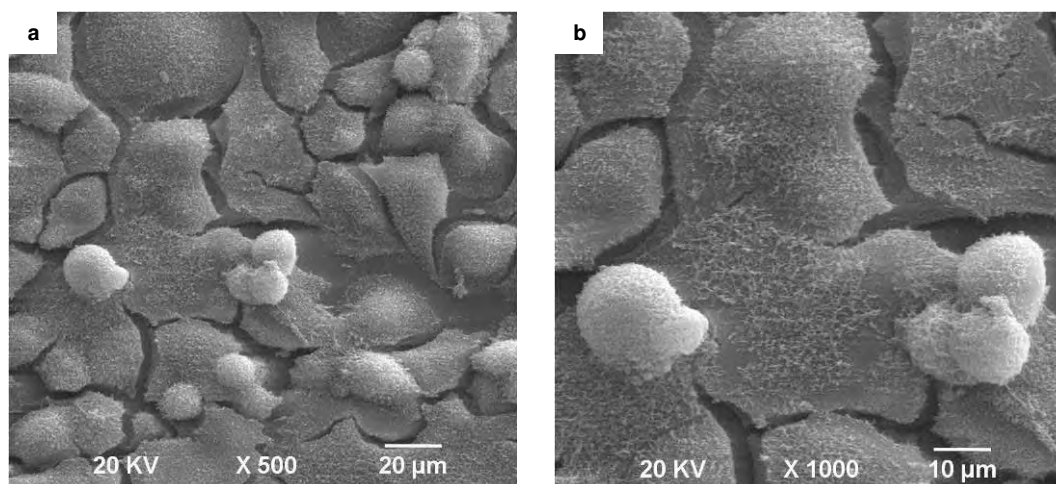


FIGURA 35 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo Luz (P-L+) após 28 minutos de irradiação com LED azul.

5.2.3 Avaliação do efeito da PDT utilizando Photogem® e LED vermelho na morfologia dos fibroblastos L929.

A- Grupo controle negativo (P-L-): Os fibroblastos L929 estão praticamente com 100% de confluência, sendo que um grande número de células pode ser observado e numerosas mitoses estão presentes (Figura 36a). Observa-se, no aumento de 1000X, a morfologia celular característica dos fibroblastos com formato alongado com delgados filamentos citoplasmáticos recobrindo o substrato de vidro (Figura 36b). Além disso, é possível observar células terminando o processo de mitose e apresentam formato arredondado (seta).

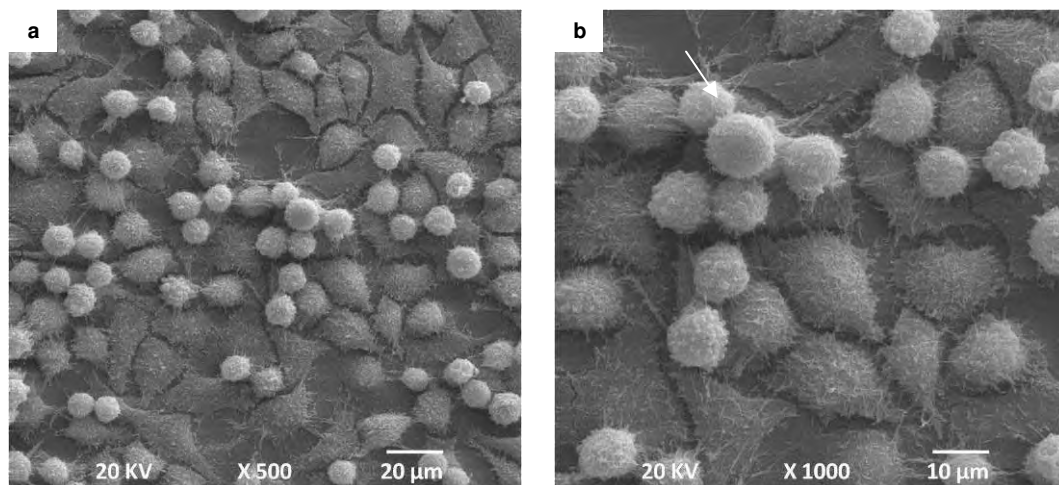


FIGURA 36 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo controle negativo (P-L-).

B- Grupo PDT com Photogem[®] na concentração de 100 mg/L irradiado por 66 minutos imediatamente após a terapia: A PDT associando Photogem[®] com LED vermelho também causou severas alterações morfológicas nos fibroblastos. Os fibroblastos L929 exibiram morfologia alterada e tamanho celular reduzido, não sendo possível a delimitação dos limites celulares. Novamente, sugere-se que as células estejam em processo de morte com rompimento da membrana citoplasmática (Figuras 37a e b). Além disso, é possível identificar restos de componentes celulares (seta) degradados que permaneceram aderidas ao substrato de vidro em local próximo às células de morfologia alterada (Figura 37b).

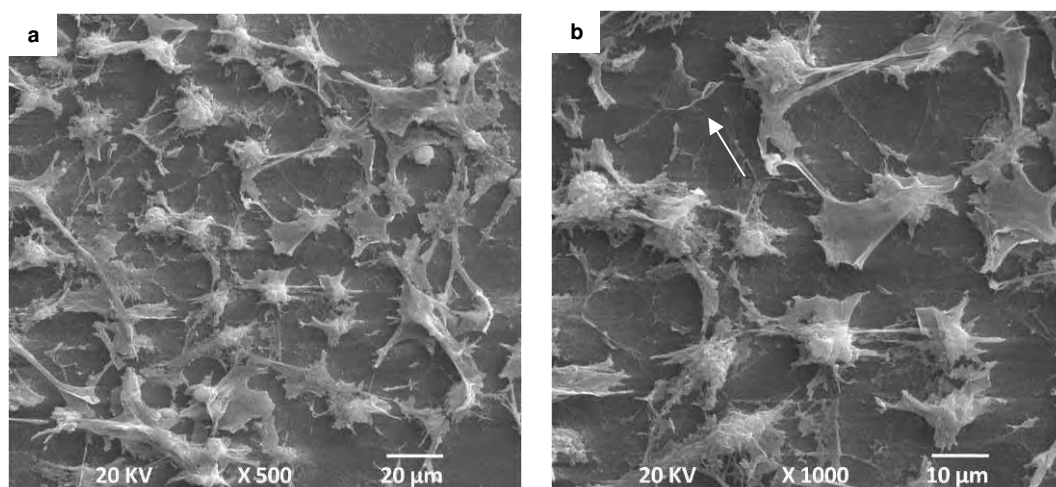


FIGURA 37 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo PDT (P+100L+) imediatamente após a terapia (0 horas).

C- Grupo PDT com Photogem[®] na concentração de 150 mg/L irradiado por 66 minutos imediatamente após a terapia: As células apresentam as características semelhantes àsquelas representadas na Figura 37. Novamente, sugere-se o rompimento da membrana citoplasmática devido à ausência dos limites celulares. Além disso, observam-se áreas livres de células (setas) e presença de restos celulares. As Figuras 38 a e b evidenciam que não houve diferenças entre as concentrações de Photogem[®] nos danos causados a essa linhagem celular.

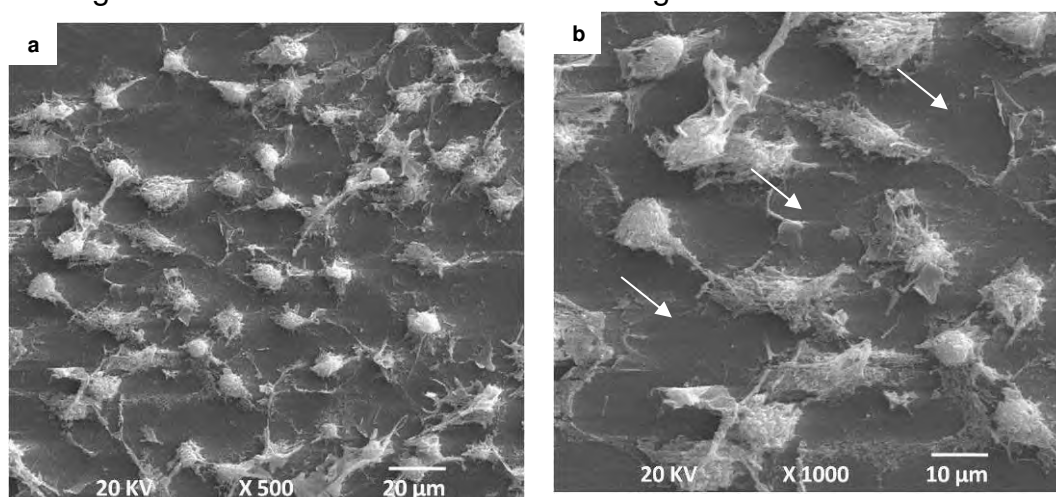


FIGURA 38 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo PDT (P+150L+) imediatamente após a terapia (0 horas).

D- Grupo PDT com Photogem[®] na concentração de 150 mg/L irradiado por 66 minutos avaliado 24 horas após a terapia: Observa-se a manutenção das alterações morfológicas, que incluem tanto tamanho reduzido das células quanto a ausência dos limites celulares. A Figura 39 (a e b) evidencia o dano irreversível causado pela PDT, de forma que mesmo após 24 horas, não foi possível reverter às alterações ocorridas nas células L929.

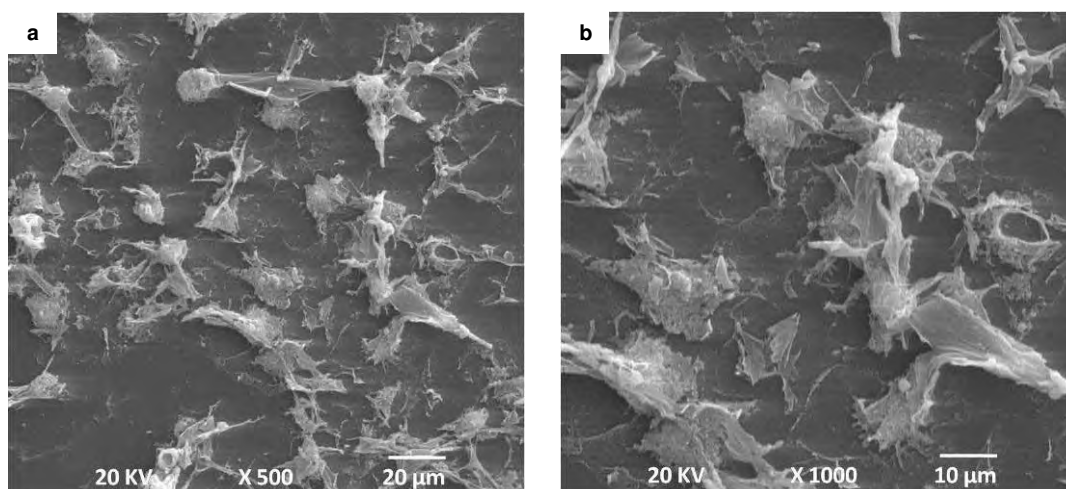


FIGURA 39 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo PDT (P+150L+) 24 horas após a terapia.

E- Grupo Photogem[®] na concentração de 150 mg/L: Nesse grupo, os fibroblastos mantiveram morfologia semelhante ao controle negativo, mesmo após o contato com o Photogem[®] na maior concentração avaliada para luz vermelha. Entretanto, observa-se uma menor quantidade de células aderidas ao substrato e um número reduzido de mitoses (Figuras 40a, b).

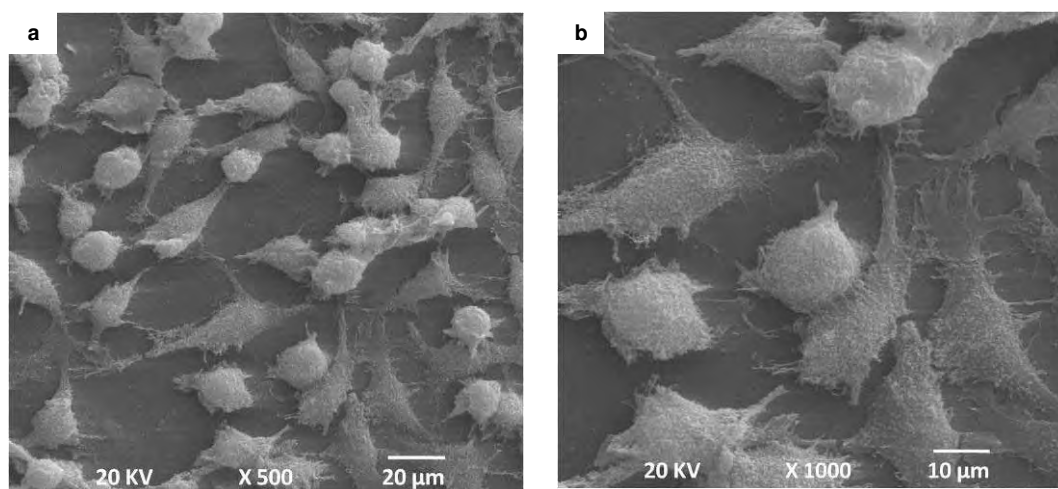


FIGURA 40 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo Photogem® na concentração de 150 mg/L (P+150L-).

F- Grupo Luz (66 minutos): Nesse grupo, as células foram irradiadas na maior dose de luz vermelha (100 J/cm^2). Não foram observadas alterações morfológicas consideráveis, ainda que um menor número de células esteja aderido ao substrato de vidro quando comparadas ao controle negativo, além da ausência de processos mitóticos (Figuras 41a, b).

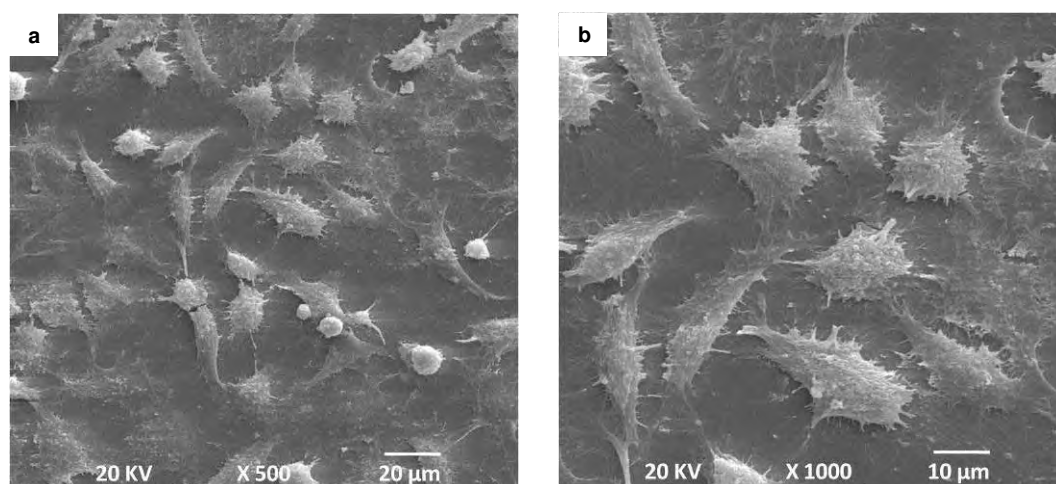


FIGURA 41 (a,b)- Morfologia dos fibroblastos L929 do grupo Luz (P-L+) após 66 minutos de irradiação com LED vermelho.

5.2.4 Avaliação do efeito da PDT utilizando Photogem® e LED vermelho na morfologia das células odontoblastóides MDPC-23:

A- Grupo controle negativo (P-L-): Observa-se um grande número de células odontoblastóides com citoplasma amplo e múltiplos prolongamentos citoplasmáticos que parecem aderi-las à lamínula de vidro (Figuras 42a e b). Além disso, é possível identificar células em mitose (seta).

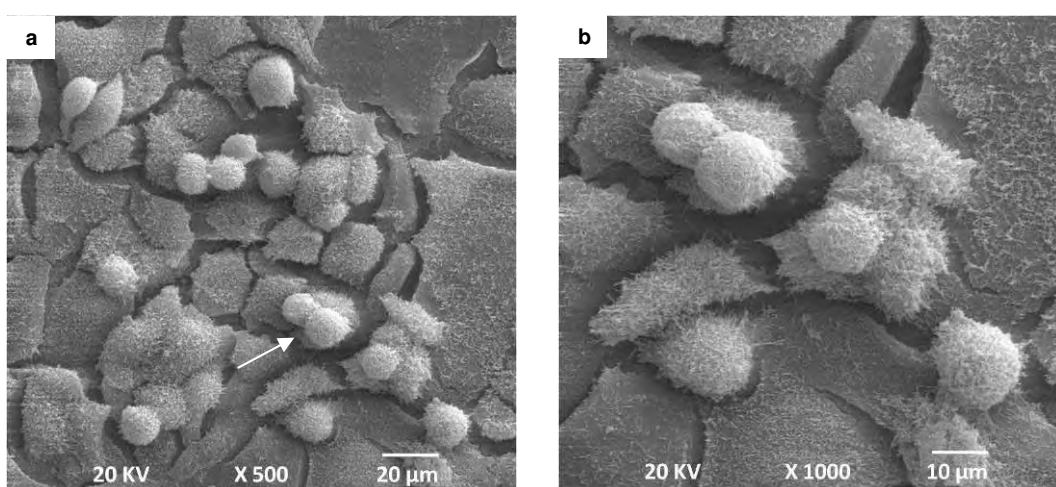


FIGURA 42 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo controle negativo (P-L-).

B- Grupo PDT com Photogem® na concentração de 100 mg/L irradiado por 66 minutos imediatamente após a PDT: Observa-se que a PDT com luz vermelha também causou severas alterações morfológicas as células MDPC-23, as quais exibem uma morfologia arredondada e tamanho reduzido, não sendo possível a delimitação dos limites celulares (Figuras 43a e b)

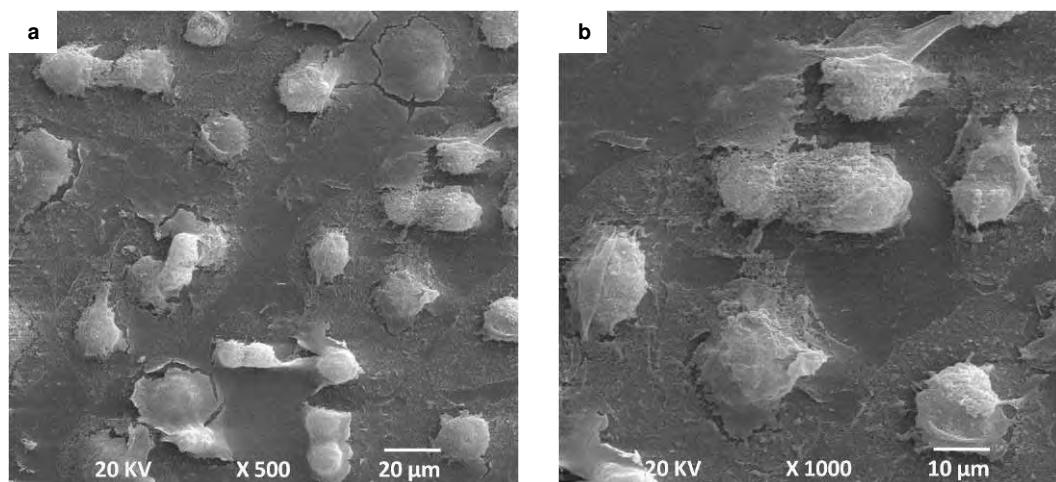


FIGURA 43 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo PDT (P+100L+) imediatamente após a terapia (0 horas).

C- Grupo PDT com Photogem[®] na concentração de 150 mg/L irradiado por 66 minutos imediatamente após a terapia: As alterações morfológicas causadas pela PDT na maior concentração avaliada de Photogem[®] foram semelhantes àsquelas da concentração de 100 mg/L. Entretanto, na Figura 44a e b, observa-se presença de maiores áreas livres de células. Evidencia-se que também não houve diferenças entre as concentrações de Photogem[®] nessa linhagem celular.

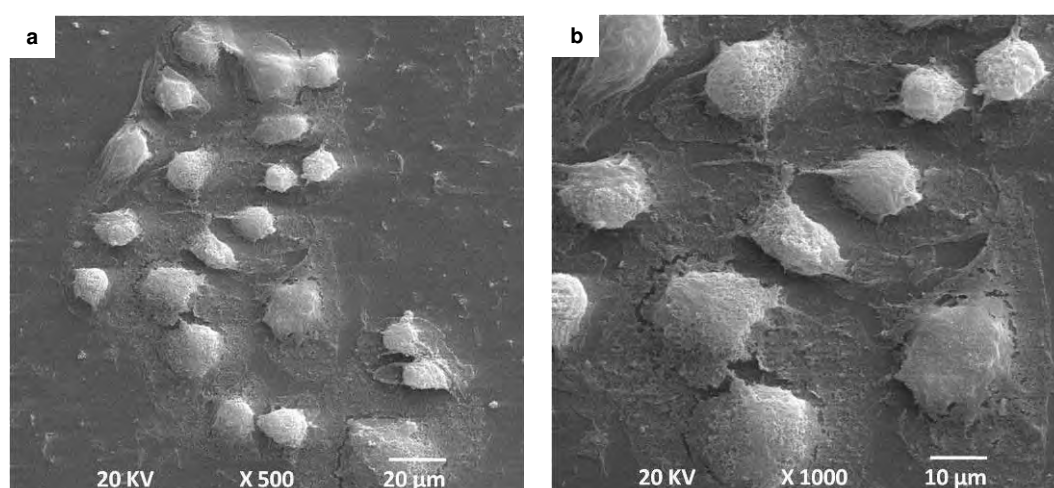


FIGURA 44 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo PDT (P+150L+) imediatamente após a terapia (0 horas).

D- Grupo PDT com Photogem[®] na concentração de 150 mg/L irradiado por 66 minutos avaliado 24 horas após a terapia: É possível observar as mesmas características da Figura 44, o que evidencia a irreversibilidade dos danos causados pela PDT. Estão presentes nas micrografias células com tamanho reduzido, sem limites definidos e extensas áreas vazias (Figuras 45a, b).

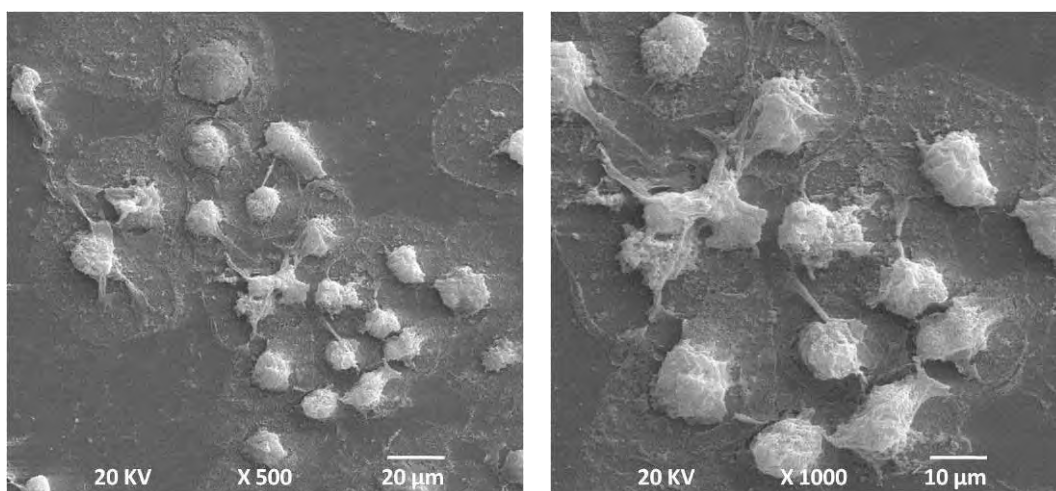


FIGURA 45 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo PDT (P+150L+) 24 horas após a terapia.

E- Grupo Photogem[®] na concentração de 150 mg/L: As células MDPC-23 apresentam morfologia semelhante ao controle negativo mesmo após o contato com o fotossensibilizador na maior concentração avaliada para o LED vermelho. Entretanto, observam-se áreas livres de células aderidas ao substrato de vidro e ausência de mitoses (Figura 46a, b).

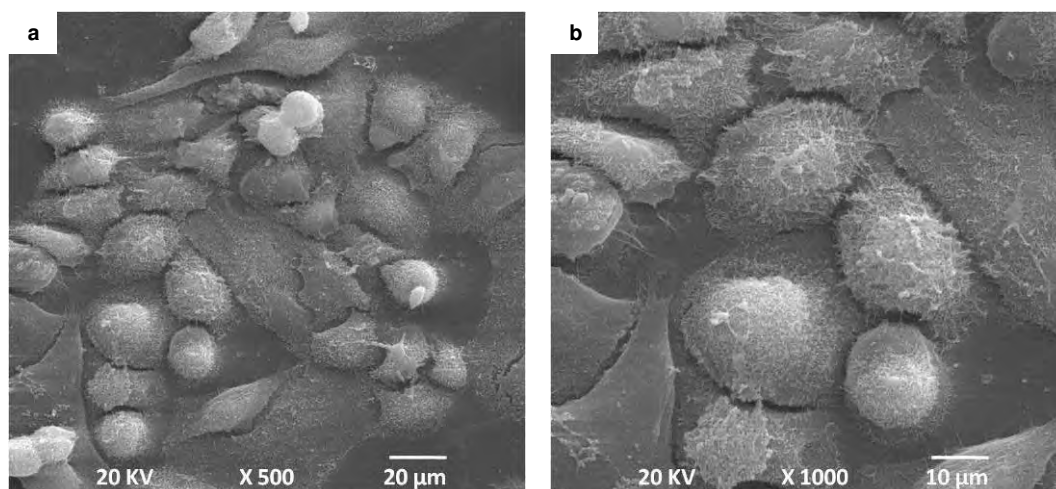


FIGURA 46 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo Photogem® (P+150L-).

F- Grupo Luz (66 minutos): Nesse grupo, as células foram irradiadas na maior dose de luz vermelha (100 J/cm^2). Não se observa alterações morfológicas comparativamente ao controle negativo. No entanto, um menor número de células permaneceu aderido ao substrato de vidro, o que pode ser evidenciado pela presença de áreas livres de células (Figuras 47a, b).

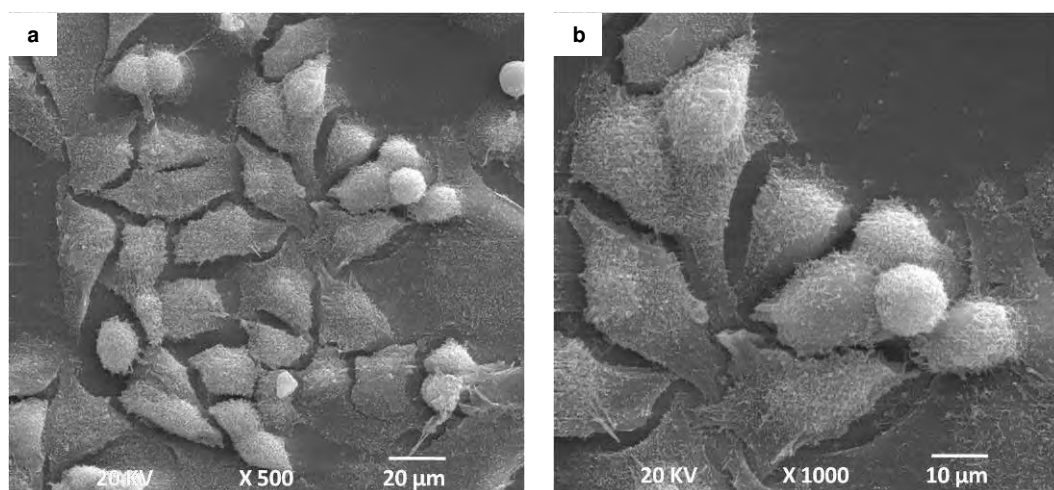


FIGURA 47 (a,b)- Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo Luz (P-L+) após 66 minutos de irradiação com LED vermelho.

5.3 Análise do tipo de morte celular (Anexina-V e Iodeto de propídeo)

5.3.1 Avaliação do tipo de morte celular decorrente da PDT utilizando Photogem[®] e LED azul nos fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23

O tipo de morte celular para ambos os tipos celulares (L929 e MDPC-23) decorrente do contato com o Photogem[®] seguido ou não de irradiação pelo LED azul foi avaliado por meio da citometria de fluxo, utilizando os fluorocromos Anexina-V e Iodeto de Propídeo. As células não tratadas com a droga e nem irradiadas foram caracterizadas como controle negativo (P-L-). Os dados obtidos pela avaliação de morte celular, apresentados nas Figuras 48 a 52 são resultantes de valores da média $\pm$ SEM (desvio do erro da média) de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Na Figura 48, observa-se que as células MDPC-23 quando expostas as três concentrações do Photogem[®] (10, 25 e 50 mg/L) na ausência de luz azul tiveram 0,42; 1,14 e 1,51% de morte por apoptose, respectivamente; e 1,14; 13,85 e 34,69% de morte por necrose, respectivamente. Já os fibroblastos L929 quando expostos às diferentes concentrações do fotossensibilizador (10, 25 e 50 mg/L) sem irradiação tiveram 2,59; 1,33 e 0,79% de morte por apoptose, respectivamente; e 7,85; 6,59 e 9,13 % de morte por necrose, respectivamente (Figura 48). Em ambos os tipos celulares observou-se um predomínio da morte por necrose quando em contato somente com a droga.

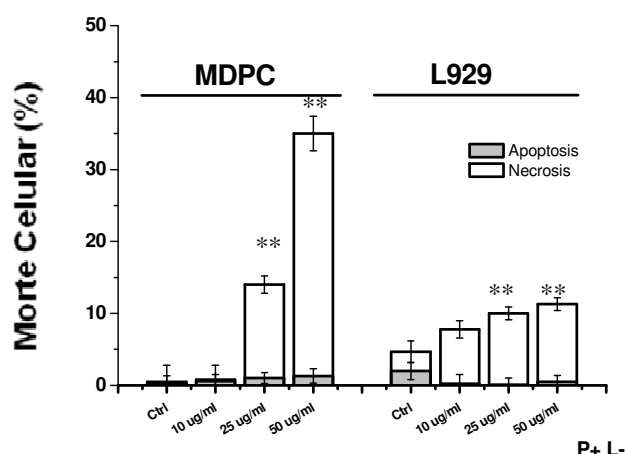


FIGURA 48- Representação gráfica da porcentagem da morte celular induzida pelo Photogem®. As células L929 e MDPC-23 foram incubadas com as diferentes concentrações de Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e o tipo de morte foi avaliado pela citometria de fluxo com Anexina-V e Iodeto de Propídeo. Para comparação (controle vs tratado com Photogem®) foi aplicado o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas (**) para $p < 0,005$ observando apenas os resultados de morte por necrose.

O efeito da luz sozinha também foi avaliado (P-L+). Esses grupos celulares foram irradiados pelo LED azul na máxima dose de luz avaliada ($37,5 \text{ J/cm}^2$), o que correspondeu a um tempo de irradiação de 28 minutos. A Figura 49 é a representação gráfica da irradiação pelo LED azul. Observa-se um predomínio de morte por apoptose, sendo de aproximadamente 3% para as células MDPC-23 e 6% para os fibroblastos L929, enquanto que a morte do tipo necrose foi nas proporções de 3% para as células MDPC-23 e 5% para os fibroblastos L929.

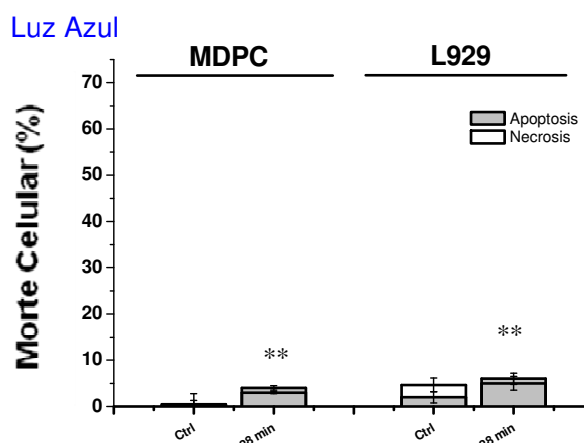


FIGURA 49- Representação gráfica da porcentagem da morte celular induzida pela irradiação com LED azul. As células L929 e MDPC-23 foram irradiadas por 28 minutos e o tipo de morte foi avaliado pela citometria de fluxo com Anexina-V e Iodeto de Propídeo. Para comparação (controle vs irradiação com luz azul) foi aplicado o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas (**) para $p < 0,005$ observando apenas os resultados de morte celular por apoptose.

Para os grupos submetidos à PDT, ou seja, quando aplicou-se o Photogem® e a luz, a destruição celular foi tão intensa não sendo possível a identificação e a aquisição das células pelo citômetro de fluxo, inviabilizando essa técnica para a avaliação do tipo de morte celular nesses grupos.

5.3.2: Avaliação do tipo de morte celular decorrente da PDT utilizando Photogem® e LED vermelho nos fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23

Da mesma forma, o tipo de morte celular para ambos os tipos celulares (L929 e MDPC-23) decorrente do contato com o Photogem® seguido ou não de irradiação pelo LED vermelho foi avaliado por meio da citometria de fluxo, utilizando os fluorocromos Anexina-V e Iodeto de Propídeo. As células não tratadas com a droga e nem irradiadas foram caracterizadas como controle negativo (P-L-). Na Figura 50, observa-se que as células MDPC-23 quando expostas as três

concentrações do Photogem[®] (50, 100 e 150 mg/L) na ausência de luz azul tiveram 1,08; 0,74 e 0,83% de morte por apoptose, respectivamente; e 34,7; 64,3 e 64,7% de morte por necrose, respectivamente. Já os fibroblastos L929 quando expostos às diferentes concentrações do fotossensibilizador (50, 100 e 150 mg/L) sem irradiação tiveram 2,5; 4,0 e 4,23% de morte por apoptose, respectivamente; e 8,9; 31,0 e 33,0% de morte por necrose, respectivamente (Figura 51). Em ambos os tipos celulares observou-se um predomínio da necrose quando em contato somente com a droga.

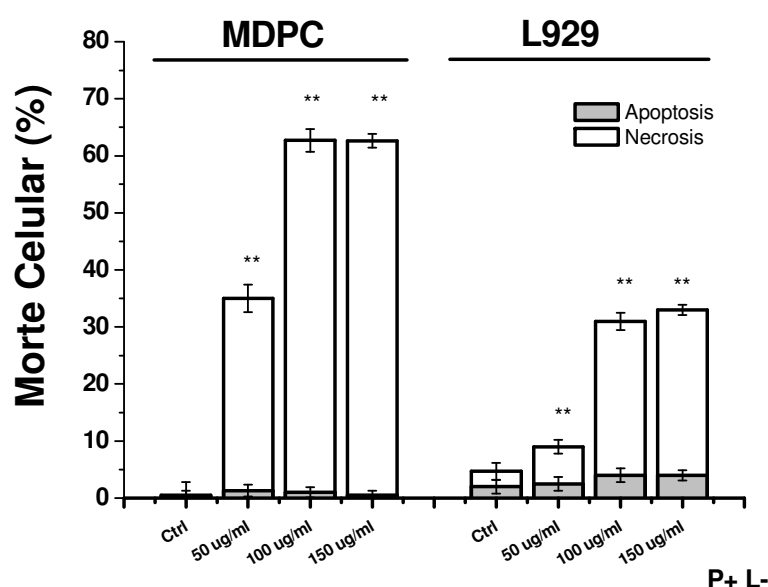


FIGURA 50- Representação gráfica da porcentagem da morte celular induzida pelo Photogem[®]. As células MDPC-23 e L929 foram incubadas com as diferentes concentrações de Photogem[®] (50, 100 e 150 mg/L) e o tipo de morte foi avaliado pela citometria de fluxo com Anexina-V e Iodeto de Propídeo. Para comparação (controle vs tratado com Photogem[®]) foi aplicado o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas (**) para $p < 0,005$ observando apenas os resultados de morte celular por necrose.

O efeito da luz sozinha também foi avaliado (P-L+). Esses grupos celulares foram irradiados pelo LED vermelho na máxima dose de luz avaliada ($100,0 \text{ J/cm}^2$), o que correspondeu a um tempo de irradiação de 66 minutos. A Figura 52 é a representação gráfica da irradiação pelo LED vermelho. Observa-se que houve um predomínio de morte por necrose, sendo de aproximadamente 18% para as células MDPC-23 e 24% para os fibroblastos L929. Entretanto, o nível de apoptose foi maior quando comparado ao efeito da luz azul, sendo de aproximadamente 15% para as células MDPC-23 e 14% para os fibroblastos L929.

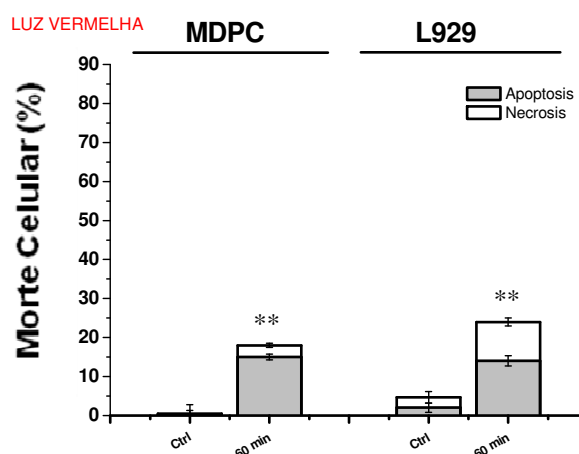


FIGURA 52- Representação gráfica da porcentagem da morte celular induzida pela irradiação com LED vermelho. As células L929 e MDPC-23 foram irradiadas por 66 minutos e o tipo de morte foi avaliado pela citometria de fluxo com Anexina-V e Iodeto de Propídeo. Para comparação (controle vs iluminado com luz vermelha) foi aplicado o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas (**) para $p < 0,005$ e observando tanto os resultados de morte celular por necrose como por apoptose.

Novamente, para os grupos submetidos à PDT, ou seja, quando aplicou-se o Photogem® e a luz vermelha, a destruição celular foi tão intensa que não foi possível fazer a identificação e captura das células pelo citômetro de fluxo, inviabilizando o emprego da técnica para a avaliação do tipo de morte nesses grupos.

5.4 Análise dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs):

5.4.1 Avaliação dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio decorrente da PDT utilizando Photogem® e LED azul nos fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23

Os níveis de EROs tanto para os fibroblastos L929 quanto para as células odontoblastóides MDPC-23 foi investigada pelo monitoramento da produção dessas espécies reativas na presença do corante permeável H₂-DCFDA. . As Figuras 53 a 58 são representativas de pelo menos 3 experimentos realizados em duplicata.

No controle negativo, a produção intracelular de EROs para ambas as linhagens avaliadas (L929 e MDPC-23) foi considerado insignificante, sendo a intensidade de fluorescência entre 3 e 3,44. Entretanto, o contato com o Photogem® na ausência de luz aumentou os níveis intracelulares de EROs de uma forma dose-dependente, ainda que não tenha sido observada uma diferença significativa entre as concentrações do Photogem® (10, 25 e 50 mg/L). As intensidades de fluorescência observadas para células L929 quando em contato com essas concentrações do FS foram de 75, 87 e 92, respectivamente. Já para células MDPC-23, as intensidades de fluorescência observadas foram de 225, 296 e 308 (Figura 53). Essa diferença entre os tipos celulares pode ser identificada pelo maior deslocamento observado nas curvas referentes às células MDPC-23. Além disso, a irradiação com LED azul de ambos tipos celulares por 28 minutos (37,5 J/cm²) na ausência do fotossensibilizador também aumentou os níveis de EROS intracelular. Para os fibroblastos L929, a intensidade de fluorescência quando irradiados foi de 40 e para as células odontoblastóides MDPC-23 foi de 45. (Figuras 54 e 55).

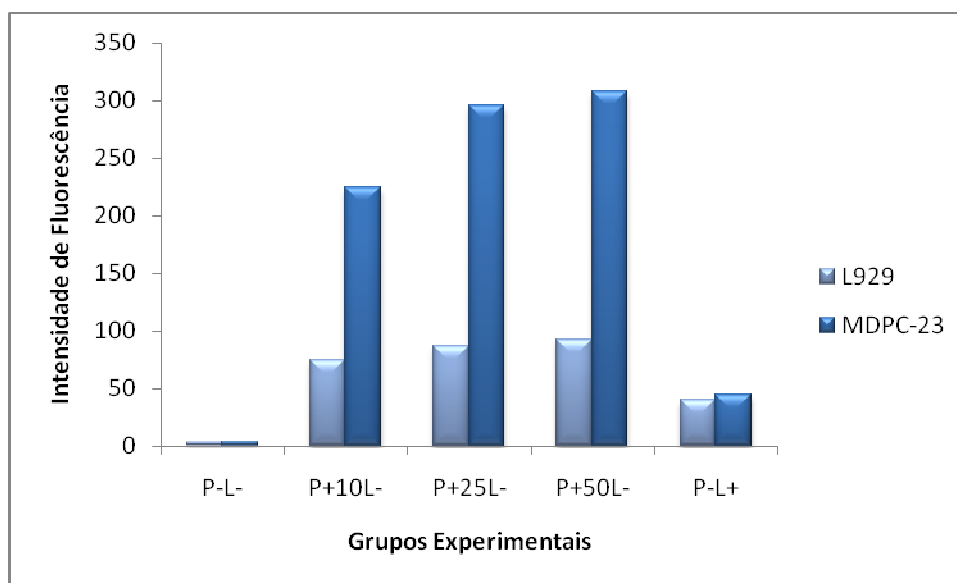


FIGURA 53- Gráfico de barras representativo da intensidade de fluorescência das células L929 e MDPC-23 quando em contato com o Photogem® e quando irradiadas por 28 minutos na luz azul. Os valores representativos são de pelo menos três experimentos em duplicata.

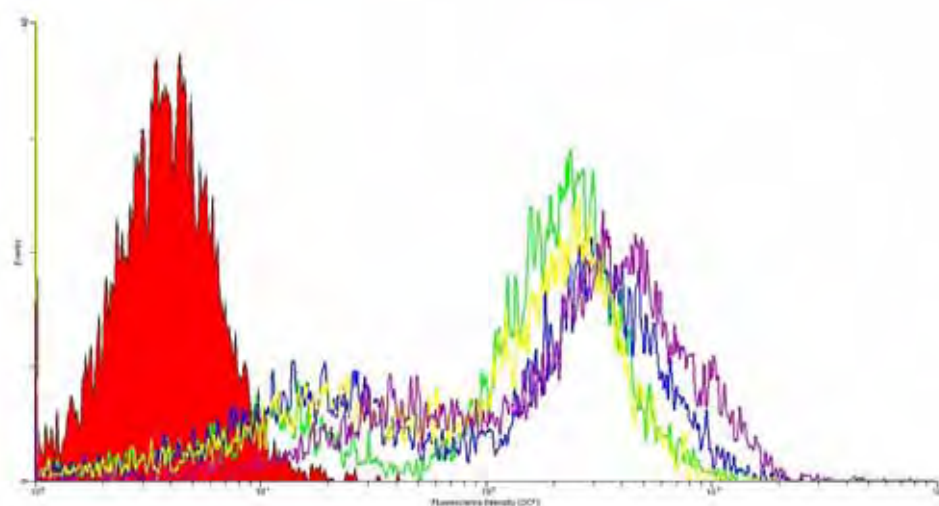


FIGURA 54- Espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo contato com Photogem® com os fibroblastos da linhagem L929. Os histogramas representados se referem a: controle (vermelho), Photogem® a 10 mg/L (verde), Photogem® a 25 mg/L (azul) e Photogem® a 50 mg/L (violeta), Irradiação por 28 minutos (amarelo). Os valores representativos são de pelo menos três experimentos em duplicata.

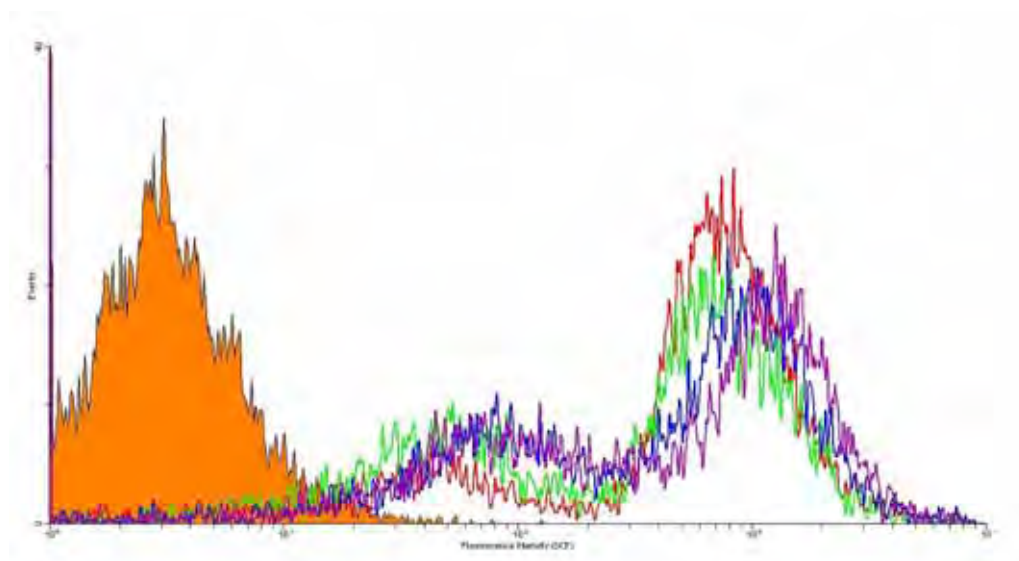


FIGURA 55- Espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo contato com Photogem® com as células odontoblastóides MDP-23. Os histogramas representados se referem a: controle (laranja), Photogem® a 10 mg/L (vermelho), Photogem® a 25 mg/L (verde) e Photogem® a 50 mg/L (azul), Irradiação por 28 minutos (violeta). Os valores representativos são de pelo menos três experimentos em duplicata.

Novamente, para os grupos submetidos a PDT (Photogem® + LED azul), a destruição celular das duas linhagens foi intensa o que impossibilitou a aquisição das células coradas com H₂-DCFDA pelo citometro de fluxo, inviabilizando a utilização dessa técnica para a estimativa dos níveis de EROS intracelular nesses grupos.

5.4.2 Avaliação dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio decorrente da PDT utilizando Photogem® e LED vermelho nos fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDP-23

Para os tratamentos realizados com Photogem e LED vermelho, novamente para os grupos submetidos a PDT não foi possível a utilização dessa técnica na avaliação dos níveis de EROS intracelulares. No controle negativo, a produção intracelular de EROS para ambas as

linhagens avaliadas (L929 e MDPC-23) foi considerado insignificante, sendo a intensidade de fluorescência entre 3 e 3,40. Entretanto, o contato com o Photogem® na ausência de luz aumentou os níveis intracelulares de EROs de uma forma dose-dependente para concentrações do Photogem® (50, 100 e 150 mg/L). As intensidades de fluorescência observadas para células L929 quando em contato com essas concentrações do FS foram de 92, 193 e 198, respectivamente. Já para células MDPC-23, as intensidades de fluorescência observadas foram de 308, 331 e 463 (Figura 56). Essa diferença entre os tipos celulares pode ser identificada pelo maior deslocamento observado nas curvas referentes às células MDPC-23. Além disso, a irradiação com LED vermelho de ambos tipos celulares por 66 minutos (100 J/cm^2) na ausência do fotossensibilizador também aumentou os níveis de EROS intracelular. Para os fibroblastos L929, a intensidade de fluorescência quando irradiados foi de 44 e para as células odontoblastóides MDPC-23 foi de 62. (Figuras 57 e 58).

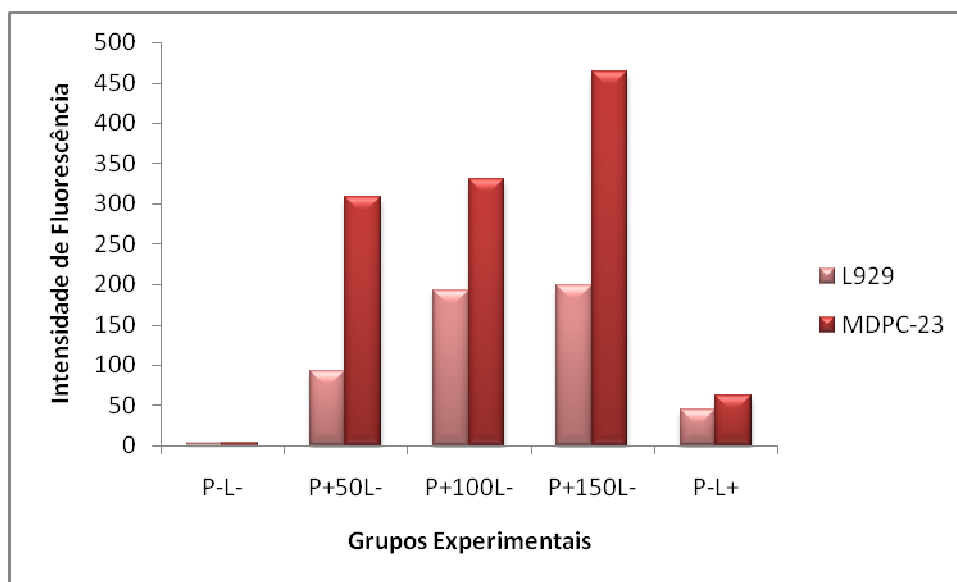


FIGURA 56- Gráfico de barras representativo da intensidade de fluorescência das células L929 e MDPC-23 quando em contato com o Photogem® e quando irradiadas por 66 minutos na luz vermelha. Os valores representativos são de pelo menos três experimentos em duplicata.

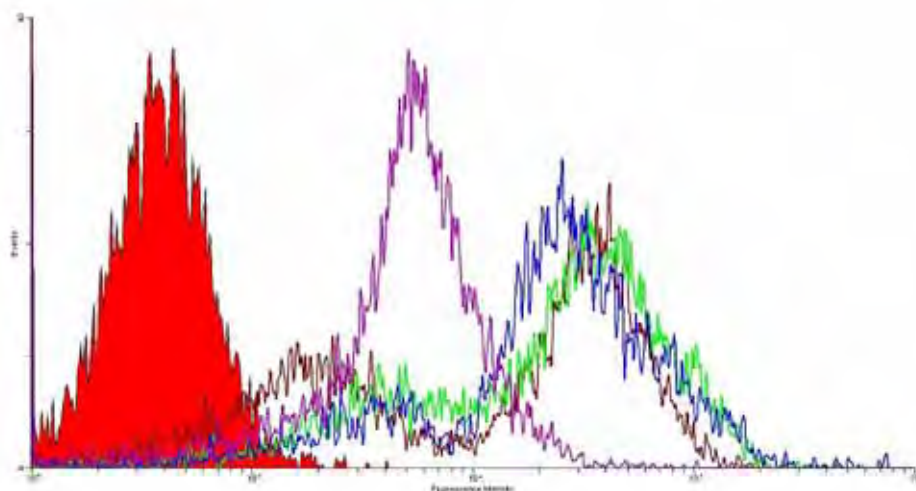


FIGURA 57- Espécies reativas de oxigenio (EROs) produzidas pelo contato com Photogem® com os fibroblastos da linhagem L929. Os histogramas representados se referem a: controle (vermelho), Photogem® a 50 mg/L (vermelho escuro), Photogem® a 100 mg/L (verde) e Photogem® a 150 mg/L (azul), Irradiação por 66 minutos (roxo). Os valores representativos são de pelo menos três experimentos em duplicata.

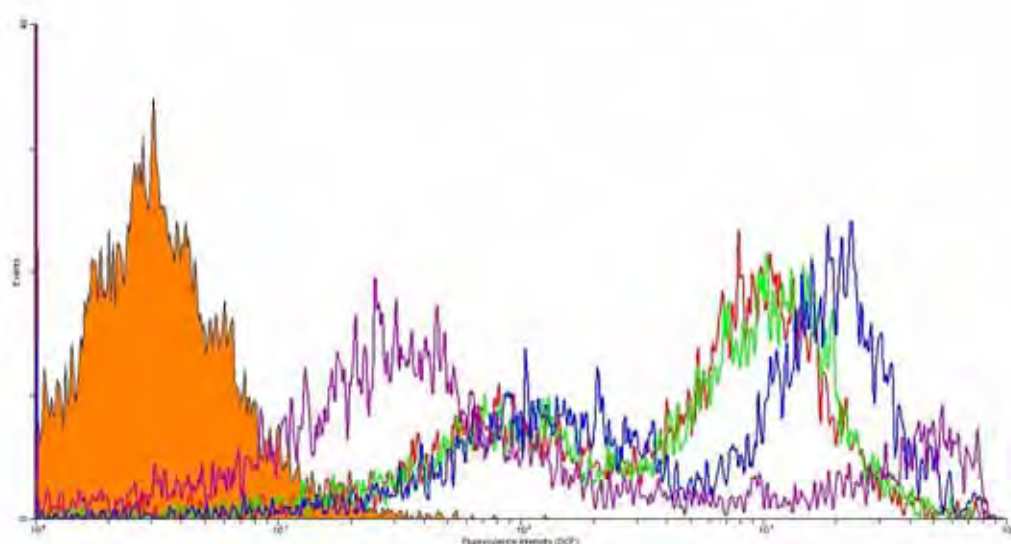


FIGURA 58- Espécies reativas de oxigenio (EROs) produzidas pelo contato com Photogem® com as células odontoblastóides MDPC-23. Os histogramas representados se referem a: controle (laranja), Photogem® a 50 mg/L (vermelho), Photogem® a 100 mg/L (verde) e Photogem® a 150 mg/L (azul), Irradiação por 66 minutos (roxo). Os valores representativos são de pelo menos três experimentos em duplicata.

A microscopic image of neurons, showing cell bodies and branching processes. A red overlay highlights specific areas, possibly indicating areas of interest or damage. The text 'Discussão' is overlaid on the bottom right.

Discussão

6 *Discussão*

A Terapia Fotodinâmica tem sido empregada para inativação de espécies microbianas, desde bactérias até fungos, e para eliminação de células de origem tumoral^{1,25,49,82}. A associação da energia luminosa ao FS gera uma cascata de eventos oxidativos levando a formação tanto de radicais livres (reação do tipo I) como de oxigênio singlete (reação do tipo II). Todos esses produtos são capazes de promover estresse oxidativo, ocasionando a morte celular pelos danos causados na membrana citoplasmática, nas mitocôndrias e nos lisossomos. Qualquer tipo celular está sujeito a esse estresse por espécies reativas de oxigênio (EROs). Dessa forma, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e os demais radicais livres interagem, através de diferentes mecanismos, com diversas estruturas celulares dos microrganismos (proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucléicos) resultando em morte celular por apoptose ou necrose⁴⁶. Essa variedade de mecanismos de ação em diferentes estruturas intracelulares dificulta o desenvolvimento de resistência dos microrganismos a essa terapia²⁸. Considerando esses aspectos seria interessante avaliar não somente os parâmetros necessários para a inativação das células alvo da PDT, mas assegurar que esses parâmetros não causem injúrias aos tecidos e células normais.

O presente estudo avaliou o potencial citotóxico da Terapia Fotodinâmica utilizando o fotossensibilizador Photogem[®] associado a um sistema de LEDs (azuis ou vermelhos) sobre cultura de fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23. Os testes em cultura de células têm sido amplamente utilizados para avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos e biomateriais *in vitro*, sendo essas linhagens celulares amplamente utilizadas para esse fim^{7,20,26,42,47,69,70}. O uso de mais de um tipo de cultura de células tem sido sugerido por alguns autores devido às diferentes respostas observadas após a PDT, sendo os efeitos dessa

terapia considerados célula-dependentes^{1,64}. Entretanto, no presente estudo, tanto os fibroblastos L929 quanto as células odontoblastóides MDPC-23 apresentaram repostas semelhantes quando submetidas aos tratamentos propostos. Ambas as linhagens tiveram seu metabolismo celular reduzido significativamente quando submetidas a PDT.

A avaliação dos efeitos da PDT antimicrobiana em células normais reside na importância de se determinar se os parâmetros necessários para inativação de microrganismos podem causar algum efeito tóxico em células normais. Zeina et al.⁸⁰ verificaram que o tempo mínimo de PDT para causar alterações nos queratinócitos foi 200 vezes maior que o utilizado para inativação das bactérias. Entretanto, este tempo mínimo de PDT foi somente 18 vezes maior que o tempo necessário para inativar *C. albicans*. Esses resultados sugeriram que a PDT foi capaz de inativar tanto bactérias quanto *C. albicans* sem causar danos às células normais, sendo que a inativação do fungo requereu um tempo de irradiação mais longo. Em pesquisa recente, Lambrechts et al.⁴⁸ avaliaram os efeitos tóxicos da PDT antifúngica em fibroblastos. Os autores observaram redução total na viabilidade celular quando se utilizou doses acima de 12,5 µM da porfirina TriP[4], sendo que a dose utilizada para inativação da *C. albicans* foi de 25 µM.

No presente estudo, foi verificada elevada toxicidade da PDT para as duas linhagens celulares a partir dos valores obtidos pelo teste de MTT. A associação de todas as concentrações do Photogem[®] (10, 25, 50, 100 e 150 mg/L) com as doses de luz testadas (25,5 e 37,5 J/cm² para LED azul e 75,0 e 100,0 J/cm² para LED vermelho) reduziram significativamente o metabolismo celular. Os parâmetros utilizados nesse foram previamente estabelecidos com base em dados científicos obtidos em nossos laboratórios, onde se determinou os parâmetros específicos de PDT para inativação de *C. albicans* e *C. glabrata* (padrão e resistente ao fluconazol)^{30,31}. Esses autores observaram que devido ao espectro de

absorção do Photogem[®], o menor comprimento de onda utilizado (460 nm) necessitou de menores doses de luz (25,5 e 37,5 J/cm²) e menores concentrações do fotossensibilizador (10, 25 e 50 mg/L). Já o comprimento de onda vermelho (630 nm) necessitou de maiores concentrações de FS (50, 100 e 150 mg/L) e maiores tempos de irradiação (50 e 66 minutos). A inativação da *Candida ssp.* com a PDT constitui-se de um processo múltiplo e complexo, ao contrário das bactérias, cujo processo é mais simples. Como a efetividade da PDT é dependente da geração de EROs e oxigênio singlete, uma maior quantidade desses componentes deve ser produzida para atuar em uma célula de maior tamanho e que possui uma variedade de alvos, inclusive uma barreira adicional como a membrana nuclear²⁷. Dessa forma, a inativação das diferentes espécies de *Candida* exige maior concentração de fotossensibilizador (FS) e maior dose de luz, o que gera maior probabilidade de danificar as células normais do hospedeiro⁴⁸.

Existem diversos fatores relacionados à toxicidade da PDT, tais como a natureza do FS, a intensidade da luz, o tipo celular e o tempo de pré-incubação da droga³⁹. Em nosso estudo foi observado que não houve relação direta entre o aumento da concentração do FS e da dose de luz em relação aos danos causados às células L929 e MDPC-23. Nos grupos submetidos a PDT com LED azul, a menor concentração do FS (10 mg/L) utilizada foi tão tóxica quanto a maior (50 mg/L), independente do tempo de irradiação (19 ou 28 minutos). Em relação aos grupos submetidos a PDT com LED vermelho, também não foi observada diferença entre as concentrações do Photogem[®] (50, 100 ou 150 mg/L) independente da dose de luz aplicada (75 ou 100 J/cm²). Esses dados divergem de outros estudos, nos quais foi observado o efeito dose-dependente entre concentração de FS e toxicidade da PDT para microrganismos ou células neoplásicas^{1,14,29}. Além disso, foi observado que a relação de dependência entre a concentração da droga e o dano

celular foi geralmente evidenciada quando se utilizou diluições decimais (10^1 , 10^2 , 10^3) do FS, o que não ocorreu na presente investigação^{15,56}.

Os dados obtidos na presente pesquisa sugerem que o tempo de pré-incubação das células com o Photogem[®] (30 minutos) foi capaz de sensibilizar e saturar os sítios celulares, tanto dos fibroblastos quanto as células odontoblastóides, mesmo quando a menor concentração do FS foi utilizada. Esse período de incubação com a droga é extremamente importante, pois ele determina a toxicidade da terapia e a localização do FS intracelular. Hsieh et al.³⁹ verificaram, por meio da microscopia de fluorescência, que quando o Photofrin permaneceu em contato com as células tumorais por uma hora o FS foi observado na membrana citoplasmática. Entretanto, quando o período de incubação foi aumentado para 24 horas, o FS penetrou no interior das células e promoveu danos celulares mesmo na ausência da luz^{39,56}. Triesscheijn et al.⁷⁴, ao avaliarem o efeito fototóxico da PDT em diversos tipos celulares, observaram que quanto maior o período de incubação menor foi a dose de luz necessária para reduzir a viabilidade celular. Dessa forma, possivelmente, a incubação com o Photogem[®] por 30 minutos possibilitou a saturação dos sítios celulares de modo que a quantidade de espécies reativas de oxigênio produzidas pela presença do Photogem[®] irradiado por um dos comprimentos de onda estudados nas células L929 e MDPC-23 promoveu danos celulares irreversíveis de mesma intensidade independente da concentração de FS utilizada.

A irreversibilidade dos danos causados pela PDT foi verificada pela avaliação do metabolismo celular em diferentes períodos após o tratamento das células (0, 12 e 24 horas). Os resultados mostraram que mesmo 24 horas após a realização da PDT, o metabolismo celular permaneceu entre 3 e 10% em relação ao controle negativo (sem tratamento), o qual foi considerado como 100% de metabolismo para ambas linhagens celulares utilizadas neste estudo. O

acompanhamento da viabilidade celular ao longo do tempo é necessário, pois tem sido descrito na literatura que o teste de MTT realizado imediatamente após a PDT apresenta valores mais altos de viabilidade celular quando comparado aos períodos mais longos^{48,64}. Lambrechts et al.⁴⁸ avaliaram os resultados obtidos no MTT 0, 6 e 18 horas após a PDT. A avaliação realizada imediatamente após a terapia apresentou valores mais altos de viabilidade celular quando comparada aos demais períodos (6 e 18 horas). Postigo et al.⁶⁴ também observaram maior redução no metabolismo celular quando a avaliação foi realizada em períodos mais longos após a PDT (24 horas). Este dado sugere o possível efeito contínuo e acumulativo do FS foto-ativado aplicado sobre células em cultura. No presente estudo, os efeitos citotóxicos da PDT testada se mantiveram com o tempo, o que indica que tanto os fibroblastos L929 quanto para as células MDPC-23 não se recuperaram no período de 24 horas após a aplicação da PDT.

As imagens obtidas pela MEV comprovaram que os danos causados pela PDT foram irreversíveis, uma vez que após 24 horas da PDT as células mantiveram as mesmas alterações morfológicas. No grupo controle negativo dos fibroblastos L929, um grande número de células pode ser observado, com numerosas mitoses presentes. Foi possível observar a morfologia celular característica dos fibroblastos com formato alongado com delgados filamentos citoplasmáticos recobrimo o substrato de vidro. As células MDPC-23, por sua vez, apresentaram citoplasma amplo e múltiplos prolongamentos citoplasmáticos que parecem aderi-las à lamínula de vidro. Entretanto, nos grupos submetidos à PDT, ocorreu intensa destruição celular, com alteração da morfologia, redução no tamanho e no número de células aderidas à lamínula de vidro. Além disso, observou-se presença de restos celulares e a ausência de definição da membrana citoplasmática das células submetidas a PDT, sugerindo ser a membrana citoplasmática o principal alvo.

Ahn et al.¹ avaliaram o efeito antitumoral da PDT, aplicando o fotossensibilizador Photogem[®] sobre quatro linhagens celulares de câncer de útero. Os autores observaram que a irradiação das células 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 da droga. Geralmente, os FS que se acumulam nas mitocôndrias ou retículo endoplasmático causam apoptose; enquanto, àqueles que se acumulam na membrana plasmática ou lisossomos predispõem às células à necrose¹⁷. Com o objetivo de caracterizar o tipo de morte celular resultante da PDT com Photogem[®], foi realizada a marcação com anexina-V e iodeto de propídeo para detecção de apoptose e necrose, respectivamente. Entretanto, após realização da PDT, o dano celular foi de tal magnitude, que a técnica de citometria de fluxo foi incapaz de reconhecer e localizar ambos os tipos celulares (L929 e MDPC-23). A suspensão celular obtida após a PDT apresentava-se altamente viscosa, sugerindo possível rompimento da membrana citoplasmática e liberação do conteúdo nuclear (exposição de DNA). Esse fato pode ser confirmado pela MEV dos grupos submetidos a PDT, onde se observou a falta de limites celulares, sugerindo rompimento da membrana celular.

A análise pela citometria de fluxo foi realizada com sucesso apenas nos grupos que tiveram somente o contato com a droga (P+L-) ou que foram somente irradiados (P-L+). Assim, foi possível observar para as concentrações utilizadas na PDT com luz azul que para as células MDPC-23 quanto mais elevada a concentração do FS, maior o número de células mortas, sendo que a concentração de 50 mg/L causou cerca de 34,69% de morte por necrose. Esse tipo celular se mostrou mais sensível ao contato com o Photogem[®] quando comparado à linhagem L929, cujo maior índice de morte por necrose (9,13%) correu na concentração de 25 mg/L. Para as concentrações utilizadas na PDT com luz vermelha

também se verificou um predomínio de morte por necrose e a maior sensibilidade das células MDPC-23 em relação ao contato com o fotossensibilizador. Para essa linhagem as concentrações de 100 e 150 mg/L causaram cerca de 64,3 e 64,7% de morte por necrose, respectivamente. Já para os fibroblastos L929, o percentual de morte foi de 31,0 e 33,0% para as concentrações de 100 e 150 mg/L, respectivamente. Verificou-se que quanto maior a concentração do FS utilizada, maior foi o percentual de morte celular causada, indicando uma relação diretamente proporcional entre a concentração do Photogem® e a toxicidade do mesmo. Essa toxicidade está possivelmente relacionada a capacidade do Photogem® em aumentar os níveis de EROs intracelulares, como verificado pelo monitoramento da produção dessas espécies reativas na presença do corante permeável H₂-DCFDA por meio da citometria de fluxo. Observou-se que o contato com o Photogem® aumentou os níveis de EROS em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle. Para as concentrações utilizadas em associação com o LED azul, os níveis observados para a concentração de 10 mg/L não foram estatisticamente diferentes dos observados na concentração de 50 mg/L. Entretanto, para as concentrações utilizadas nos parâmetros do LED vermelho, observa-se maiores valores de fluorescência nas concentrações de 100 e 150 mg/L.

Em relação à toxicidade da droga, ainda que os resultados obtidos pela análise em citômetro de fluxo tenham apresentado percentuais de morte celular, os dados obtidos pelo teste de MTT não revelaram diferenças significativas do metabolismo celular dos grupos que tiveram somente o contato com Photogem® (P+L-) em relação ao controle negativo (P-L-). Nas fotomicrografias obtidas pela MEV, observou-se que após o contato com o Photogem® nas maiores concentrações utilizadas para cada comprimento de onda estudado houve a manutenção das características morfológicas celulares semelhantes ao do controle

negativo. Entretanto, foi possível observar menor quantidade de células aderidas ao substrato surgindo algumas áreas livres de células e um menor número de mitoses. Esses dados indicam que ainda que o FS não tenha alterado a atividade mitocondrial, a presença de áreas livres de células sugere que tenha ocorrido morte celular, com desprendimento de células da lamínula de vidro, e assim corroborando com os dados obtidos na identificação do tipo de morte celular pela análise de citometria de fluxo. Essa diferença entre os dados obtidos pelo teste do MTT e pela citometria de fluxo pode ser explicada pelo fato de que mesmo que a célula tenha iniciado o processo de morte celular, pode coexistir alguma atividade mitocondrial, o que é captada pelo MTT.

O efeito da luz isoladamente sobre as células L929 e MDPC-23 em cultura também foi verificado na presente pesquisa, pois sabe-se que a luz pode causar um efeito estimulador ou inibitório do metabolismo celular⁴⁴. Nos resultados obtidos pelo teste MTT, ainda que se tenha observada uma redução no metabolismo celular dos grupos submetidos somente a irradiação (P-L+) em relação ao grupo controle negativo, essa redução em nenhuma das linhagens estudadas foi estatisticamente significativa. A redução da viabilidade celular pela exposição à luz visível também foi observada em outros estudos recentes^{71,76}. Zeina et al.⁸⁰ observaram que quanto maior o tempo de iluminação, maiores foram os danos celulares e menor foi a recuperação das células após a PDT. Tem sido descrito que altas fluências de luz levam a formação de EROs, os quais podem interagir com fotossensibilizadores endógenos, como as flavinas e citocromo-c, para causar danos ou até mesmo morte celular⁴⁴. Alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo causado pela formação de espécies reativas de oxigênio após a irradiação é o principal responsável pelo efeito positivo ou negativo sobre a atividade celular⁵¹⁻⁵³. Em pequenas quantidades, as EROs podem levar a um estímulo das mitocôndrias; entretanto, em quantidade elevada pode danificar

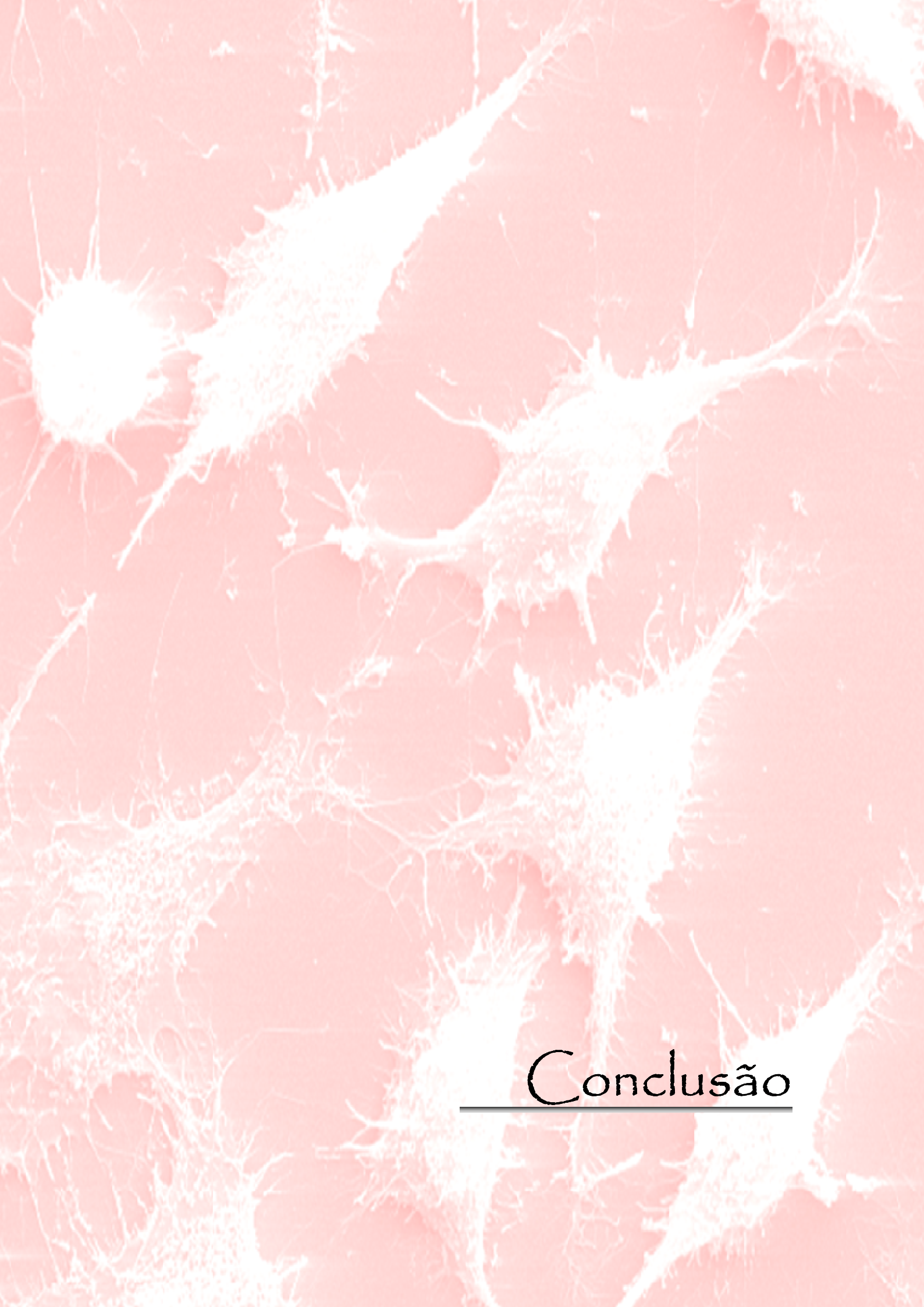
componentes intracelulares³⁸. No presente estudo, a identificação dos níveis de EROs intracelular foi realizada para as células L929 e MDPC-23 expostas somente ao LED azul ou vermelho. Foi possível observar maior produção de EROs para os grupos irradiados quando comparados ao grupo controle negativo. Estes dados científicos sugerem que as espécies reativas produzidas pelas células irradiadas podem ter causado danos celulares e morte celular como identificada na citometria de fluxo. Foi possível observar, após a irradiação pelo LED azul na maior dose estudada ($37,5 \text{ J/cm}^2$), predomínio de morte por apoptose, sendo de aproximadamente 3% para as células MDPC-23 e 6% para os fibroblastos L929; enquanto que a morte do tipo necrose foi nas proporções de 3% para as células MDPC-23 e 5% para os fibroblastos L929. Já para a irradiação com LED vermelho (100 J/cm^2), observou-se um predomínio de morte por necrose, sendo de aproximadamente 18% para as células MDPC-23 e 24% para os fibroblastos L929. Entretanto, o nível de apoptose foi maior quando comparado ao efeito da luz azul, sendo de aproximadamente 15% para as células MDPC-23 e 14% para os fibroblastos L929. Essas diferenças entre os dois LEDs estudados (azul e vermelho) estão relacionadas às diferentes doses de luz testadas para cada aparelho, sendo a dose de luz do LED vermelho maior (maior tempo de irradiação) e conseqüentemente capaz de causar maiores alterações celulares. Além disso, sabe-se que o comprimento de luz vermelho é maior e esta relacionada a um maior aumento na temperatura. Hawkins, Abrahamse³⁸ encontraram que o laser vermelho causou inibição da atividade e proliferação celular, com um aumento significativo de danos na membrana dos fibroblastos e ao DNA celular nas doses de 10 e 16 J/cm^2 . Entretanto, Lockwood et al.⁵³ avaliaram a quantidade de EROs produzida após irradiação com luz halógena azul em diferentes doses de luz (3, 15 e 30 J/cm^2) e observaram que a dose de 30 J/cm^2 apresentou os maiores níveis de EROs. Além disso, observaram que a presença de antioxidantes reduziu os efeitos tóxicos sobre as células, confirmando

serem as espécies reativas de oxigênio as responsáveis pela redução do metabolismo celular. As fotomicrografias da MEV dos grupos submetidos somente a irradiação pelo LED azul ou vermelho identificaram menor número de células aderidas ao substrato de vidro e menor número de mitoses quando comparadas ao controle. Esses dados sugerem que a luz isoladamente foi capaz de causar morte celular, principalmente no comprimento de onda vermelho, no qual se observa um maior percentual de morte e maiores áreas livres de células na MEV.

Não existe consenso sobre qual o melhor tipo de aparelho a ser utilizada na PDT, qual o melhor comprimento de onda e a melhor dose de luz a ser empregada. Todos esses fatores variam de acordo com o tipo de lesão ou infecção a ser tratada e o tipo de fotossensibilizador escolhido. A maioria dos estudos utiliza o comprimento de onda vermelho por ter a característica de maior penetrabilidade no tecido chegando a 17 mm⁵⁷. No entanto, estudos clínicos têm relatado o aparecimento de eritema, sangramento e edema após o tratamento de lesões superficiais, como neoplasmas cutâneos e acne³. Sendo assim, a utilização de laser na PDT esta mais indicada no tratamento de tumores, nos quais se faz necessária maior penetração da luz nos tecidos⁷⁹. Entretanto, para o tratamento de lesões superficiais, como a candidose bucal, pode estar mais bem indicada à luz azul, devido ao menor seu menor comprimento de onda, caracterizando uma menor penetração no tecido. Bouillaquet et al.¹⁵ testaram a hipótese de que a luz azul também seria capaz de induzir a formação de EROs e observaram que todos os fotossensibilizadores testados produziram níveis de EROs dependentes da exposição à luz azul.

Embora os resultados obtidos no presente estudo tenham demonstrado um efeito citotóxico da PDT sobre cultura de células normais, é importante lembrar que este foi um estudo in vitro, no qual não foram simuladas todas as condições encontradas clinicamente.

Entretanto, como são muitos os fatores que influenciam a efetividade da PDT, a obtenção de um protocolo único, capaz de inativar diferentes espécies microbianas e não lesar células normais do hospedeiro torna-se um grande desafio. Assim, são necessários estudos *in vivo* que comprovem tanto a efetividade da PDT no tratamento da candidose bucal quanto seu possível efeito tóxico sobre os tecidos normais do hospedeiro.



Conclusão

7 Conclusão

Com base nas condições experimentais do presente estudo, foi possível concluir que a utilização da PDT com LED azul ou vermelho associado ao Photogem[®] foi citotóxica em cultura de células de fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23. A PDT causou redução da atividade mitocondrial das células e intensas alterações morfológicas caracterizadas pela redução do tamanho celular e ausência de limites celulares indicando que as células estejam em processo de morte com rompimento da membrana citoplasmática. Além disso, a presença do Photogem[®] foi capaz de induzir morte celular predominantemente por necrose e aumentar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio.

A microscopic image of neurons, showing their cell bodies and branching processes. A red overlay is present, highlighting specific areas of the neurons. The word "Referências" is written in a serif font, underlined, and positioned in the lower right quadrant of the image.

Referências

*8 Referências**

1. 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.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78 (922): 455-9.
3. Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clin Dermatol*. 2006;24:16-25.
4. Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH. The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol*. 2006;2:53-71.
5. Allison RR, Cuenca RE, Downie GH, Camnitz P, Brodish B, Sibata CH. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers- a review of applications and outcomes. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2005;2:205-22.
6. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2004;1:27-42.
7. Aranha AMF, Souza PPC, Giro EMA, Hebling J, Costa CAS. Effect of Curing Regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater*. 2006; 22: 864-9.

* 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. Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006;21:86-9.
9. 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.
10. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist.* 2001; 21: 4-8.
11. 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.
12. Bäuml W, Abels C, Karrer S, Weiß T, Messmann H, Landthaler M, et al. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light. *Br J Cancer.* 1999;80:360–3.
13. 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.
14. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-6.
15. 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.

16. Budtz-Jorgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32: 1859-63.
17. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1776:86-107.
18. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 327-35.
19. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; 21:293-302.
20. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of hard chairside relined resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont.* 2006;19:195-201.
21. 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.
22. 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.
23. 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.

-
24. Chiu LL, Sun CH, Yeh AT, Torkian B, Karamzadeh A, Tromberg B, et al. Photodynamic therapy on keloid fibroblasts in tissue-engineered keratinocyte-fibroblast co-culture. *Lasers Surg Med.* 2005;37:231-44.
 25. Chu ES, Wu RW, Yow CM, Wong TK, Chen JY. The cytotoxic and genotoxic potential of 5-aminolevulinic acid on lymphocytes: a comet assay study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;58:408-14.
 26. Costa CAS, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent.* 2001;14:25-30.
 27. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2329-35.
 28. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008;163:1-12.
 29. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B.* 2007;86:59-69.
 30. Dovigo LN. Efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida spp.* [dissertação de mestrado]. Araraquara. Faculdade de Odontologia da UNESP, 2007.

31. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Mima EGDO, Ballan LF, Bagnato VS. Photoinactivation of fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. In: Anais da 16. International Association of Dental Research; 2008 jul. 3-5; (Canadá). Toronto: IADR; 2008. p. 87.
32. Egli RJ, Di Criscio A, Hempfing A, Schoeniger R, Ganz R, Hofstetter W, et al. In vitro resistance of articular chondrocytes to 5-Aminolevulinic acid based photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2008;40:282-90.
33. Egli RJ, Schober M, Hempfing A, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M. Sensitivity of osteoblasts, fibroblasts, bone marrow cells, and dendritic cells to 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2007;89:70-7.
34. Ferreira SD, Tedesco AC, Sousa G, Zângaro RA, Silva NS, Pacheco MT, et al. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS(4). *Lasers Med Sci.* 2004;18:207-12.
35. Giusti JS, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmerson 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.
36. Grinholc M, Kawiak A, Kurlenda J, Graczyk A, Bielawski KP. Photodynamic effect of protoporphyrin diarginate (PPArg2) on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and human dermal fibroblasts. *Acta Biochim Pol.* 2008;55:85-90.
37. Gritsch K, Ponsonnet L, Schembri C, Farge P, Pourreynon L, Grosogeat B. Biological behaviour of buccal cells exposed to blue light. *Mater Sci Eng C.* 2008;28:805-10.

-
- 38.Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following Helium-Neon laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006;38:74–83.
- 39.Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, Yu JS. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol.* 2003;194:363-75.
- 40.Jackson Z, Meghji S, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med Sci.* 1999; 14: 150-7.
- 41.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.
- 42.Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 fibroblasts. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007;24:52-7.
- 43.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.
- 44.Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochem Photobiol.* 1990;52:1089-98.

- 45.Kirszberg C, Rumjanek VM, Capella MA. Methylene blue is more toxic to erythroleukemic cells than to normal peripheral blood mononuclear cells: a possible use in chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 56:659-65.
- 46.Konopka K, Goslinski T. Photodynamic Therapy in Dentistry. *J Dent Res.* 2007;86:694-707.
- 47.Koulaouzidou E., Lambrianidis T, Konstantinidis A, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of a bleaching agent. *Endod Dent Traumatol.*1998;14:21- 5.
- 48.Lambrechts SA, Schwartz KR, Aalders MC, Dankert JB. Photodynamic inactivation of fibroblasts by a cationic porphyrin. *Lasers Med Sci.* 2005;20:62-7.
- 49.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.
- 50.Lambrechts SAG, Aalders MCG. Verbraak FD, Lagerberg JWM, Dankert JB, Schuitmaker JJ. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J Photobiol Photochem B.* 2005;79:51-7.
- 51.Lewis JB, Wataha JC, Messer RL, Caughman GB, Yamamoto T, Hsu SD. Blue light differentially alters cellular redox properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;72:223-9.
- 52.Lipovsky A, Nitzan Y, Lubart R. A Possible mechanism for visible light-induced wound healing. *Lasers Surg Med.* 2008;40:509–14.

-
- 53.Lockwood DB, Wataha JC, Lewis JB, Tseng WY, Messer RL, Hsu SD. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. Dent Mater. 2005;21:683-8.
- 54.Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. Eur J Prosthodont Restor Dent. 1993; 2: 17-22.
- 55.Machado AEH. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. Quim Nova. 2000;32:237-43.
- 56.Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:1542-52.
- 57.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.
- 58.Monfrecola G, Procaccini EM, Bevilacqua M, Manco A, Calabro G, Santoianni P. In vitro effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*. Photochem Photobiol Sci. 2004;3:419-22.
- 59.Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65: 55-63.
- 60.Nikawa H, Jin C, Makihiro S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. J Oral Rehabil. 2003; 30: 243-50.

-
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Postigo F, Sagristá ML, De Madariaga MA, Nonell S, Mora M. Photosensitization of skin fibroblasts and HeLa cells by three chlorin derivatives: Role of chemical structure and delivery vehicle. Biochim Biophys Acta. 2006;1758:583-96.
65. Rotenberg S, Lewis JB, Lockwood PE, Tseng WY, Messer RL, Hsu SD, et al. Extracellular environment as one mediator of blue light-induced mitochondrial suppression. Dent Mater. 2006;22:759-64.
66. Saczko J, Chwiłkowska A, Kulbacka J, Berdowska I, Zieliński B, Drag-Zalesińska M, et al. Photooxidative action in cancer and normal cells induced by the use of photofrin in photodynamic therapy. Folia Biol. 2008;54:24-9.
67. 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 Biol. 2007;53:7-12.
68. Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. J Photochem Photobiol B. 2006;83:34-8.

-
- 69.de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. *In vitro* cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*.2003; 24:3853-8.
- 70.de Souza Costa CA, Duarte PT, de Souza PP, Giro EM, Hebling J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. *Am J Dent*. 2008; 21:255-61.
- 71.Taoufik K, Mavrogonatou E, Eliades T, Papagiannoulis L, Eliades G, Kletsas D. Effect of blue light on the proliferation of human gingival fibroblasts. *Dental Materials*. 2008;24:895-900.
- 72.Tapajós EC, Longo JP, Simioni AR, Lacava ZG, Santos MF, Morais PC, et al. *In vitro* photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. *Oral Oncol*. 2008.10. [Epub ahead of print]
- 73.Teichert MC, Jones MD, 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.
- 74.Triesscheijn M, Ruevekamp M, Aalders M, Baas P, Stewart FA. Comparative sensitivity of microvascular endothelial cells, fibroblasts and tumor cells after *in vitro* photodynamic therapy with meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin. *Photochem Photobiol*. 2004;80:236-41.
- 75.Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998;42:13-28.
- 76.Wataha JC, Lewis JB, Lockwood PE, Hsu S, Messer RL, Rueggeberg FA, Bouillaguet S. Blue light differentially modulates cell survival and growth. *J Dent Res*. 2004;83:104-8.

-
77. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ. Antibacterial action of photoactivated disinfection (PAD) used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent*. 2006;34:363-71.
78. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med*. 1993;22:354-7.
79. Yu CH, Chen HM, Hung HY, Cheng SJ, Tsai T, Chiang CP. Photodynamic Therapy outcome for oral verrucous hyperplasia depends on the clinical appearance, size, color, epithelial dysplasia, and surface keratin thickness of the lesion. *Oral Oncology*. 2008;44:595-600.
80. Zeina B, Greenman J, Corry D, Purcell WM. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol*. 2002;146:568-73.
81. Zeina B, Greenman J, Corry D, Purcell WM. Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol*. 2003;148:229-32.
82. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 2001;144:274-8.
83. Zenzen V, Zankl H. In vitro evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of the 5-aminolevulinic acid hexylester-mediated photodynamic therapy. *Mutat Res*. 2004;561:91–100.



Apêndices

9.1 Apêndice 1- Condições experimentais

Tabela A1- Condições experimentais avaliadas para cada tipo celular (fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23) exposto a PDT com Photogem[®] e LED azul.

Condições Experimentais	Dose de luz (J/cm ²)	Concentração do Photogem (mg/L)	Período de avaliação (horas)
P-L- (controle negativo)	-----	-----	0
P-L+	25,5	-----	0
P-L+	37,5	-----	0
P+10L-	-----	10	0
P+25L-	-----	25	0
P+50L-	-----	50	0
P+10L+	25,5	10	0
P+25L+	25,5	25	0
P+50L+	25,5	50	0
P+10L+	37,5	10	0
P+25L+	37,5	25	0
P+50L+	37,5	50	0
P-L- (controle negativo)	-----	-----	12
P-L+	25,5	-----	12
P-L+	37,5	-----	12
P+10L-	-----	10	12
P+25L-	-----	25	12
P+50L-	-----	50	12
P+10L+	25,5	10	12
P+25L+	25,5	25	12
P+50L+	25,5	50	12
P+10L+	37,5	10	12
P+25L+	37,5	25	12
P+50L+	37,5	50	12
P-L- (controle negativo)	-----	-----	24
P-L+	25,5	-----	24
P-L+	37,5	-----	24
P+10L-	-----	10	24
P+25L-	-----	25	24

P+50L-	-----	50	24
P+10L+	25,5	10	24
P+25L+	25,5	25	24
P+50L+	25,5	50	24
P+10L+	37,5	10	24
P+25L+	37,5	25	24
P+50L+	37,5	50	24

Tabela A2- Condições experimentais avaliadas para cada tipo celular (fibroblastos L929 e células odontoblastóides MDPC-23) exposto a PDT com Photogem® e LED vermelho.

Condições Experimentais	Dose de luz (J/cm ²)	Concentração do Photogem (mg/L)	Período de avaliação (horas)
P-L- (controle negativo)	-----	-----	0
P-L+	75,0	-----	0
P-L+	100,0	-----	0
P+10L-	-----	50	0
P+25L-	-----	100	0
P+50L-	-----	150	0
P+10L+	75,0	50	0
P+25L+	75,0	100	0
P+50L+	75,0	150	0
P+10L+	100,0	50	0
P+25L+	100,0	100	0
P+50L+	100,0	150	0
P-L- (controle negativo)	-----	-----	12
P-L+	75,0	-----	12
P-L+	100,0	-----	12
P+10L-	-----	50	12
P+25L-	-----	100	12
P+50L-	-----	150	12
P+10L+	75,0	50	12
P+25L+	75,0	100	12
P+50L+	75,0	150	12
P+10L+	100,0	50	12
P+25L+	100,0	100	12
P+50L+	100,0	150	12

P-L- (controle negativo)	-----	-----	24
P-L+	75,0	-----	24
P-L+	100,0	-----	24
P+10L-	-----	50	24
P+25L-	-----	100	24
P+50L-	-----	150	24
P+10L+	75,0	50	24
P+25L+	75,0	100	24
P+50L+	75,0	150	24
P+10L+	100,0	50	24
P+25L+	100,0	100	24
P+50L+	100,0	150	24

9.2 Apêndice 2- Valores originais obtidos pelo teste metiltetrazolium (MTT)

Tabela A3- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada imediatamente após PDT (0 hora) associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 25,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,3843996	0,414466	0,4168	0,3091	0,31023	0,017133	0,022833	0,0191
0,3248663	0,504433	0,4078	0,3093333	0,32243	0,017599	0,018466	0,0189
0,2842996	0,408166	0,5326333	0,2797	0,33	0,021033	0,018399	0,0189
0,277633	0,389233	0,4014333	0,3512333	0,28513	0,0222	0,016733	0,0150
0,282333	0,348633	0,3863333	0,3141666	0,31686	0,018533	0,0195	0,015
0,1541996	0,207799	0,126433	0,1202333	0,15976	0,018466	0,021966	0,0228
0,1334996	0,174433	0,1238663	0,1140333	0,13683	0,019666	0,019233	0,0207
0,136133	0,173066	0,105733	0,1217333	0,12476	0,015333	0,020533	0,0208
0,105533	0,143333	0,1161663	0,1003333	0,1148	0,018133	0,0173	0,0200
0,1028663	0,165133	0,1033663	0,1117333	0,1219	0,015266	0,017966	0,0191

Tabela A4- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada imediatamente após PDT (0 hora) associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 37,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,3777336	0,407133	0,4796337	0,375067	0,2581	0,0059	0,010433	0,007
0,3281003	0,489333	0,472267	0,3712003	0,2598	0,008133	0,009166	0,009
0,3234003	0,331533	0,460967	0,4277336	0,351	0,0073	0,007	0,007
0,2895003	0,404300	0,5784336	0,4442003	0,32483	0,011766	0,008333	0,009
0,350767	0,362933	0,4649336	0,3070003	0,2804	0,0075	0,008533	0,009
0,1705333	0,213266	0,1876	0,1588	0,20263	0,020599	0,021399	0,026
0,16055	0,224033	0,1603333	0,1689	0,16803	0,018466	0,021099	0,026
0,1518333	0,222533	0,1509666	0,1705	0,15303	0,018599	0,018999	0,024
0,1609666	0,205333	0,1467333	0,1851	0,1557	0,018999	0,021799	0,023
0,1558333	0,24226	0,151166	0,1973	0,1534	0,017199	0,021299	0,023

Tabela A5- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada 12 horas após PDT associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 25,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,4012666	0,4106	0,3733333	0,4350666	0,37773	0,005033	0,006	0,007
0,4324	0,4194	0,4068333	0,4061333	0,3281	0,005033	0,006533	0,006
0,3778	0,410433	0,4287	0,4328	0,3234	0,007233	0,0086	0,008
0,3974666	0,367833	0,3937333	0,4871333	0,2895	0,017333	0,019566	0,014
0,4040666	0,3835	0,4091333	0,4145	0,35076	0,012133	0,0129	0,013
0,3321333	0,3528	0,2258333	0,2576003	0,28153	0,014666	0,0149	0,011
0,2863333	0,312066	0,2122666	0,2713003	0,2525	0,0087	0,0113	0,016
0,2923666	0,305133	0,2424	0,2733336	0,25393	0,008666	0,013	0,012
0,26	0,295566	0,2074	0,2580996	0,25173	0,0081	0,0081	0,009
0,2764333	0,288766	0,2144	0,2597996	0,24856	0,008833	0,009233	0,010

Tabela A6- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada 12 horas após PDT associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 37,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,502767	0,451633	0,444900	0,425500	0,3686	0,039633	0,013733	0,012
0,393533	0,508367	0,406300	0,434167	0,46843	0,0079	0,008333	0,009
0,380967	0,414300	0,467300	0,432633	0,39526	0,010733	0,013666	0,009
0,422533	0,390033	0,419117	0,424300	0,38366	0,019422	0,011522	0,013
0,415100	0,423633	0,445300	0,440633	0,38266	0,008311	0,011911	0,010
0,292633	0,2943	0,257333	0,236966	0,20146	0,009266	0,012666	0,012
0,284933	0,322966	0,340433	0,217733	0,20666	0,008066	0,0092	0,013
0,293833	0,209633	0,307133	0,2624	0,1961	0,0076	0,0127	0,013
0,2242	0,319366	0,260333	0,274633	0,17383	0,007966	0,010066	0,014
0,2833	0,299433	0,3068666	0,2507333	0,20656	0,008	0,0137	0,011

Tabela A7- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada 24 horas após PDT associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 25,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,3496	0,4073	0,3654333	0,2834	0,3232	0,015967	0,012	0,012
0,3849666	0,470466	0,3983666	0,3628666	0,3676	0,017767	0,011766	0,008
0,3606666	0,405966	0,4408333	0,3501	0,29983	0,018333	0,0075	0,008
0,3732666	0,337033	0,5282333	0,3935666	0,3495	0,016567	0,007533	0,009
0,4078333	0,372166	0,3865333	0,3352333	0,33523	0,015933	0,0081	0,009
0,2606333	0,153666	0,1863366	0,2100033	0,20766	0,011833	0,009933	0,015
0,226	0,126366	0,17767	0,1833366	0,18503	0,006166	0,012066	0,014
0,2221666	0,154166	0,2010033	0,18367	0,1416	0,0091	0,011266	0,009
0,2017666	0,1504	0,1960033	0,1730033	0,16333	0,011133	0,0111	0,008
0,2172	0,1612	0,1660033	0,16167	0,17643	0,013866	0,008366	0,011

Tabela A8- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada 24 horas após PDT associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 37,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,401933	0,317933	0,3512996	0,3729996	0,232	0,004	0,0112	0,009
0,3231663	0,456533	0,3949663	0,3948663	0,2776	0,0035	0,0117	0,009
0,3567996	0,375499	0,3924663	0,3463663	0,25983	0,0048	0,0098	0,010
0,3243996	0,362799	0,4290996	0,4033663	0,2295	0,0245	0,008	0,022
0,3514996	0,357666	0,359633	0,4215996	0,24523	0,0087	0,0089	0,017
0,2903333	0,256433	0,2741333	0,2486333	0,14706	0,0087	0,0087	0,006
0,2024	0,271166	0,2930333	0,2239666	0,12496	0,006566	0,007933	0,008
0,2555666	0,289566	0,3417666	0,1953666	0,12573	0,0075	0,008333	0,005
0,2637	0,352433	0,2729666	0,2201333	0,12636	0,006833	0,006566	0,005
0,2346666	0,320666	0,2952	0,2553666	0,1475	0,006333	0,003933	0,007

Tabela A9- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada imediatamente após PDT (0 hora) associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 25,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,35996	0,3559663	0,317699	0,3732996	0,321233	0,02456	0,040966	0,0299
0,2915	0,3784996	0,485799	0,366133	0,265033	0,02806	0,026033	0,0318
0,31136	0,4009663	0,402033	0,322833	0,315933	0,02406	0,030666	0,0276
0,3071	0,3394996	0,376666	0,439333		0,01956	0,011533	0,0191
0,30733	0,373633	0,370466	0,376633		0,01766	0,010566	0,0169
0,23433	0,2394336	0,280666	0,2426666	0,193067	0,02133	0,018633	0,0210
0,1954	0,246567	0,1758	0,1975	0,168667	0,01596	0,017767	0,0183
0,19416	0,213667	0,158866	0,2053	0,1609003	0,0174	0,0201	0,0183
0,18183	0,198467	0,1536	0,1647	0,190567	0,01656	0,0196	0,0173
0,20253	0,2220003	0,127466	0,1285666	0,1763003	0,01593	0,0166	0,0161

Tabela A10- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada imediatamente após PDT (0 hora) associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 37,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,5382	0,341533	0,4081	0,29173	0,393699	0,0122	0,0121	0,013
0,3776	0,48776	0,3484	0,28866	0,348233	0,00906	0,0107	0,013
0,3719	0,46943	0,45286	0,3304	0,349466	0,0112	0,0102	0,014
0,3064	0,3945	0,3369	0,38966	0,342299	0,0075	0,0107	0,016
0,3521	0,35863	0,3703	0,29276	0,357566	0,0081	0,012	0,012
0,33333	0,379017	0,323966	0,289733	0,2791336	0,024	0,024367	0,023
0,2741	0,328767	0,301199	0,2798	0,260167	0,02293	0,0218	0,023
0,2294	0,311567	0,263533	0,235033	0,24300	0,0264	0,018733	0,025
0,20733	0,267267	0,201599	0,2814336	0,2472336	0,02183	0,026100	0,021
0,24376	0,288067	0,227133	0,2591336	0,239267	0,022	0,031967	0,023

Tabela A11- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada 12 horas após PDT associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 25,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,27523	0,225733	0,19223	0,2023	0,3197	0,0100	0,01496	0,013
0,23343	0,2444	0,23656	0,17773	0,29266	0,01113	0,01123	0,017
0,2271	0,21373	0,24386	0,23393	0,292033	0,01076	0,009	0,011
0,2375	0,237333	0,20213	0,2492666		0,0221	0,0194	0,019
0,22016	0,228433	0,185766	0,2336		0,0092	0,0127	0,011
0,34236	0,3383666	0,2503	0,2145663	0,323733	0,0199	0,0172	0,018
0,2999	0,2548	0,2378	0,296033	0,353333	0,0153	0,0213	0,015
0,30696	0,28063333	0,20773	0,253166	0,35113	0,0173	0,015366	0,031
0,2729	0,28586667	0,2399	0,2905996		0,01766	0,022266	0,026
0,2959	0,2831	0,25613	0,2731996	0,397883	0,01616	0,02083	0,018

Tabela A12- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada 12 horas após PDT associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 37,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,3047	0,2195666	0,196466	0,2820333	0,3264	0,01163	0,012266	0,012
0,2405	0,2579666	0,216466	0,2384666	0,3024333	0,01256	0,012333	0,012
0,24493	0,2367333	0,289933	0,2609666	0,3137333	0,02976	0,0104	0,011
0,23486	0,2534333	0,2841	0,3022666	0,324833	0,0121	0,014755	0,014
0,21866	0,2555666	0,319033	0,3047	0,3305996	0,01385	0,01305	0,014
0,44196	0,4225	0,3216	0,3254663	0,323	0,0128	0,015466	0,016
0,3254	0,3214666	0,367966	0,3994663	0,2791	0,01186	0,016666	0,013
0,31813	0,3329333	0,336633	0,3179996	0,2584	0,01163	0,012133	0,013
0,2996	0,3385333	0,3215	0,2916663	0,2963666	0,0128	0,0129	0,014
0,3193	0,3356333	0,3429	0,300933	0,2507	0,0149	0,0132	0,013

Tabela A13- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada 24 horas após PDT associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 25,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,3363	0,269067	0,247000	0,279600	0,278366	0,01825	0,008433	0,008
0,293567	0,276333	0,314000	0,255733	0,2855	0,02081	0,0069	0,018
0,2872	0,259300	0,292100	0,331233	0,2526	0,02036	0,006166	0,009
0,3075	0,298933	0,272167	0,354267	0,2374	0,01873	0,006233	0,011
0,247667	0,257300	0,301233	0,323267	0,260933	0,01923	0,0107	0,016
0,2943	0,237	0,273266	0,278366	0,282966	0,01706	0,019166	0,018
0,301667	0,220633	0,234333	0,2855	0,2561	0,01943	0,022966	0,014
0,227367	0,207933	0,2331	0,2526	0,2307	0,0222	0,016733	0,015
0,234267	0,174766	0,220766	0,2374	0,2618	0,01853	0,0195	0,015
0,245333	0,2087	0,241466	0,260933	0,3247	0,01893	0,018533	0,009

Tabela A14- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada 24 horas após PDT associando Photogem® (10, 25 e 50 mg/L) e LED azul na dose de luz de 37,5 J/cm².

P-L-	P+10L-	P+25L-	P+50L-	P-L+	P+10L+	P+25L+	P+50L+
0,3215	0,3301666	0,312733	0,3122996	0,2083666	0,0085	0,0062	0,013
0,29043	0,3104666	0,315233	0,317733	0,2155	0,0106	0,0068	0,006
0,28833	0,326	0,303666	0,310633	0,2526	0,0107	0,0063	0,006
0,28073	0,3131333	0,326333	0,329533	0,2374	0,0091	0,0067	0,004
0,32816	0,3094	0,293833	0,2954996	0,2609333	0,01	0,0105	0,008
0,33213	0,255933	0,26473	0,25863	0,257	0,0091	0,00853	0,008
0,3195	0,2691666	0,256566	0,2239666	0,2439666	0,00746	0,009033	0,007
0,31883	0,2755	0,241466	0,2253666	0,1951666	0,0049	0,006733	0,006
0,29766	0,2590333	0,279	0,2201333	0,1968666	0,00543	0,005166	0,006
0,3122	0,2321666	0,237533	0,2353666	0,1860666	0,0042	0,005733	0,006

Tabela A15- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada imediatamente após PDT (0 hora) associando Photogem® (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelho na dose de luz de 75,0 J/cm².

P-L-	P+50L-	P+100L-	P+150L-	P-L+	P+50L+	P+100L+	P+150L+
0,3936996	0,325466	0,2580996	0,2145663	0,28203	0,017133	0,022833	0,0192
0,348233	0,419466	0,2597996	0,296033	0,23846	0,017599	0,018466	0,0189
0,3494663	0,447999	0,3509996	0,2531663	0,26096	0,021033	0,018399	0,0189
0,3422996	0,401666	0,324833	0,3305996	0,30226	0,0141	0,017055	0,0183
0,3575663	0,300933	0,2803996	0,3231996	0,3047	0,012322	0,018418	0,0191
0,183	0,1729	0,3026666	0,3164333	0,17373	0,016033	0,0233	0,0308
0,1548333	0,152266	0,3594	0,3710333	0,20013	0,012166	0,0154	0,0323
0,1714333	0,286266	0,3101	0,3684	0,18293	0,010566	0,012466	0,0238
0,1729	0,271233	0,3303	0,3571666	0,2411	0,011033	0,0171	0,0176
0,1522666	0,3018	0,3158	0,3416	0,1889	0,015366	0,0211	0,0189

Tabela A16- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada imediatamente após PDT (0 hora) associando Photogem® (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelho na dose de luz de 100,0 J/cm².

P-L-	P+50L-	P+100L-	P+150L-	P-L+	P+50L+	P+100L+	P+150L+
0,4495666	0,3686	0,188233	0,181233	0,3215	0,0059	0,010433	0,0075
0,4089	0,468433	0,207633	0,167133	0,29043	0,008133	0,009166	0,0094
0,3837	0,395266	0,176933	0,162933	0,28833	0,0073	0,007	0,0077
0,3231333	0,383666	0,1926996	0,2271663	0,28073	0,018433	0,023555	0,0243
0,3208666	0,38266	0,188333	0,172933	0,32816	0,007111	0,008866	0,0082
0,184067	0,289067	0,4370336	0,3942336	0,2012	0,019033	0,022667	0,0322
0,187867	0,328700	0,3567336	0,5728336	0,19823	0,019767	0,022600	0,0298
0,167567	0,352933	0,422367	0,3997003	0,25723	0,016500	0,025400	0,0236
0,1944003	0,35850	0,41190	0,230267	0,23886	0,021167	0,021233	0,0277
0,1849336	0,358833	0,406367	0,2153336	0,25146	0,02210	0,016333	0,0209

Tabela A17- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada 12 horas após PDT associando Photogem® (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelho na dose de luz de 75,0 J/cm².

P-L-	P+50L-	P+100L-	P+150L-	P-L+	P+50L+	P+100L+	P+150L+
0,5325003	0,506737	0,4468003	0,3861003	0,3861	0,017133	0,022833	0,0192
0,455467	0,501067	0,5968003	0,3877003	0,3877	0,017597	0,018463	0,0189
0,4709003	0,440003	0,5032337	0,4718003	0,3618	0,021033	0,018397	0,0189
0,417467	0,475767	0,5226003	0,442617	0,44267	0,024133	0,0281	0,0287
0,4593337	0,513203	0,413367	0,4555003	0,3455	0,017363	0,018433	0,0191
0,2924667	0,623567	0,6872333	0,4872667	0,25413	0,029633	0,031533	0,0251
0,4121	0,574567	0,5252333	0,4735667	0,35627	0,02323	0,03173	0,0323
0,4861	0,446433	0,485033	0,445333	0,2693	0,0192	0,035167	0,0322
0,4747667	0,48573	0,5401667	0,4841	0,2493	0,023933	0,0281	0,0346
0,4748	0,49203	0,682633	0,5323667	0,25697	0,022	0,0281	0,0388
0,3724	0,508433	0,445933	0,3848	0,2578	0,026467	0,037667	0,0322

Tabela A18- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada 12 horas após PDT associando Photogem® (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelho na dose de luz de 100,0 J/cm².

P-L-	P+50L-	P+100L-	P+150L-	P-L+	P+50L+	P+100L+	P+150L+
0,4900996	0,454399	0,360467	0,355567	0,37333	0,0059	0,010433	0,0075
0,4871663	0,507166	0,4092003	0,3724336	0,40683	0,008133	0,009166	0,0094
0,412733	0,445899	0,4315003	0,4103003	0,3587	0,0073	0,007	0,0077
0,4370663	0,475666	0,3883336	0,38550	0,3937	0,0071	0,008866	0,0082
0,425533	0,480799	0,4205336	0,4196003	0,32913	0,010967	0,012765	0,0099
0,2989666	0,452766	0,417	0,4179333	0,33783	0,0287	0,037966	0,041
0,3268	0,404166	0,4229666	0,4469666	0,31323	0,032366	0,039866	0,0402
0,3477	0,45333	0,4484	0,5352	0,27803	0,0304	0,0323	0,0404
0,346033	0,503566	0,4709	0,4578333	0,26863	0,0193	0,040733	0,0412
0,3597666	0,40693	0,4059	0,5562333	0,24486	0,027966	0,027533	0,0469

Tabela A19- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada 24 horas após PDT associando Photogem[®] (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelho na dose de luz de 75,0 J/cm².

P-L-	P+50L-	P+100L-	P+150L-	P-L+	P+50L+	P+100L+	P+150L+
0,4801663	0,367199	0,2741333	0,2564333	0,4255	0,017133	0,022833	0,0192
0,3850996	0,344766	0,2930333	0,2711666	0,43416	0,017599	0,018466	0,0189
0,3938996	0,326533	0,3417666	0,2895666	0,35263	0,021033	0,018399	0,0189
0,3957996	0,368899	0,2729666	0,3524333	0,3743	0,015244	0,016455	0,0176
0,4158663	0,321766	0,2952	0,3206666	0,41063	0,018588	0,019899	0,0191
0,2818996	0,404666	0,4541996	0,4200996	0,41906	0,017899	0,017366	0,0180
0,371233	0,440733	0,3698663	0,3519996	0,45966	0,016299	0,016066	0,0178
0,345233	0,409399	0,432833	0,4124996	0,32776	0,011533	0,015933	0,0169
0,3649663	0,371866	0,3927996	0,450833	0,39373	0,009633	0,014633	0,0195
0,423933	0,425533	0,4461996	0,4094996	0,35143	0,016166	0,013399	0,0193

Tabela A20- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular L929 avaliada 24 horas após PDT associando Photogem[®] (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelho na dose de luz de 100,0 J/cm².

P-L-	P+50L-	P+100L-	P+150L-	P-L+	P+50L+	P+100L+	P+150L+
0,5225333	0,4164	0,3562666	0,3585	0,35273	0,0059	0,010433	0,0075
0,4181	0,524233	0,3874	0,3645666	0,4461	0,008133	0,009166	0,0094
0,4547333	0,5242	0,4363666	0,4523	0,43456	0,0073	0,007	0,0077
0,4879	0,396066	0,4177333	0,3986666	0,38456	0,009867	0,089762	0,0798
0,4135	0,46553	0,44033	0,336433	0,41666	0,007111	0,008866	0,0082
0,3025666	0,437666	0,394433	0,430833	0,3405	0,0292	0,0363	0,0362
0,3342	0,4501	0,4457	0,4050666	0,42706	0,038366	0,04593	0,0267
0,329533	0,44003	0,438433	0,415833	0,40886	0,0245	0,0333	0,0324
0,358	0,4509	0,4676	0,4425	0,39203	0,0284	0,05203	0,0249
0,3218	0,474	0,4294	0,462133	0,3965	0,0292	0,027466	0,0274

Tabela A21- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada imediatamente após PDT (0 hora) associando Photogem[®] (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelha na dose de luz de 75,0 J/cm².

P-L-	P+50L-	P+100L-	P+150L-	P-L+	P+50L+	P+100L+	P+150L+
0,39023	0,513267	0,341833	0,378533	0,2578666	0,02456	0,040966	0,0299
0,36243	,488667	0,273033	0,3125663	0,2962666	0,02806	0,026033	0,0318
0,33	0,4630336	0,398066	0,4288663	0,275033	0,02406	0,030666	0,027
0,32513	0,4275003	0,399033	0,3736996	0,291733	0,02531	0,017044	0,0270
0,31686	0,4902336	0,434466	0,3033663	0,2938666	0,01825	0,0408	0,0263
0,15653	0,292700	0,31130	0,315800	0,232500	0,02493	0,01740	0,0269
0,15893	0,300200	0,275033	0,2586336	0,228600	0,0257	0,018067	0,0264
0,29003	0,261667	0,303467	0,3189336	0,2923336	0,0186	0,015667	0,0278
0,16866	0,2821	0,2727	0,3019336	0,2564003	0,01623	0,038567	0,0225
0,1878	0,3349	0,3244	0,2532	0,2074336	0,01993	0,068167	0,0284

Tabela A22- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada imediatamente após PDT (0 hora) associando Photogem[®] (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelha na dose de luz de 100,0 J/cm².

P-L-	P+50L-	P+100L-	P+150L-	P-L+	P+50L+	P+100L+	P+150L+
0,51333	0,2861	0,201533	0,1479333	0,3301666	0,0122	0,012133	0,0139
0,3981	0,3297	0,1942	0,1705333	0,3104666	0,00906	0,0107	0,0133
0,33336	0,3412666	0,233466	0,1728666	0,326	0,0112	0,0102	0,0135
0,31823	0,343	0,249333	0,2457333	0,3131333	0,01671	0,027644	0,0277
0,32216	0,3062	0,33	0,2411666	0,3094	0,01082	0,011011	0,0135
0,2455	0,3217336	0,333067	0,3344336	0,2603003	0,01596	0,028200	0,0263
0,22436	0,3123003	0,382300	0,3462003	0,2808336	0,01983	0,023100	0,0293
0,24216	0,2722003	0,302500	0,318067	0,2648336	0,01433	0,031633	0,0274
0,21766	0,3365336	0,346200	0,3344336	0,2656336	0,01906	0,016900	0,0221
0,2863	0,303767	0,318067	0,3934003	0,285867	0,02753	0,025167	0,0257

Tabela A23- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada 12 horas após PDT associando Photogem® (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelha na dose de luz de 75,0 J/cm².

P-L-	P+50L-	P+100L-	P+150L-	P-L+	P+50L+	P+100L+	P+150L+
0,29953	0,3141003	0,234133	0,1609003	0,2642333	0,02456	0,040966	0,0299
0,26443	0,307467	0,234767	0,1821003	0,2829	0,02806	0,026033	0,0318
0,2683	0,2959336	0,257367	0,2951336	0,2522333	0,02406	0,030666	0,0270
0,23306	0,2859336	0,216633	0,3156003	0,2758333	0,01532	0,017638	0,0186
0,24976	0,2780336	0,199700	0,2922336	0,2669333	0,02556	0,019960	0,0166
0,17528	0,2383163	0,254016	0,3051496	0,3273496	0,01698	0,016383	0,0200
0,20075	0,2276163	0,166016	0,273083	0,2267163	0,01508	0,017316	0,0171
0,18471	0,239883	0,233949	0,251283	0,2696163	0,01798	0,026183	0,0188
0,21811	0,238783	0,213416	0,240683	0,260483	0,01661	0,016716	0,0167
0,31098	0,2469163	0,264383	0,2924496	0,224883	0,01541	0,018416	0,0164
0,2176	0,2807163	0,252749	0,2521163	0,218783	0,01395	0,017783	0,0167

Tabela A24- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada 12 horas após PDT associando Photogem® (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelha na dose de luz de 100,0 J/cm².

P-L-	P+L-50	P+L-100	P+L-150	P-L+	P+L+50	P+L+100	P+L+150
0,2767	0,3034996	0,214266	0,2098996	0,2820333	0,0122	0,012133	0,0139
0,25493	0,292033	0,237499	0,2307996	0,2384666	0,00906	0,0107	0,0133
0,2293	0,288833	0,250599	0,1904996	0,2609666	0,0112	0,0102	0,0135
0,19323	0,3019663	0,269999	0,219133	0,2522666	0,01128	0,013276	0,0117
0,24323	0,253233	0,236199	0,196433	0,2247	0,01082	0,011011	0,0135
0,25763	0,3443333	0,2799	0,3411666	0,3541333	0,02066	0,0168	0,0212
0,25706	0,3002	0,300633	0,3461	0,3218	0,02073	0,019066	0,0182
0,2653	0,3423333	0,280533	0,39	0,3161666	0,0196	0,021033	0,0210
0,24966	0,2881333	0,303633	0,3555	0,2730333	0,0204	0,0223	0,0296
0,26166	0,2917333	0,3134	0,3303666	0,2710333	0,02096	0,021933	0,0303
0,26466	0,3072	0,311833	0,3551	0,3175333	0,01983	0,0213	0,0252

Tabela A25- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada 24 horas após PDT associando Photogem® (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelha na dose de luz de 75,0 J/cm².

P-L-	P+L-50	P+L-100	P+L- 150	P-L+	P+L+ 50	P+L+100	P+150L+
0,357	0,552299	0,406533	0,265166	0,390266	0,02456	0,040966	0,0299
0,412233	0,456733	0,357699	0,257833	0,3457	0,02806	0,026033	0,0318
0,446233	0,520266	0,330066	0,255799	0,372933	0,02406	0,030666	0,0270
0,4203	0,603366	0,349799	0,250799	0,428666	0,01211	0,017260	0,0259
0,472666	0,523333	0,305966	0,260233	0,432266	0,02556	0,032555	0,0296
0,26665	0,361283	0,412749	0,375916	0,273516	0,01321	0,013783	0,0200
0,25165	0,430183	0,362483	0,384149	0,283783	0,01395	0,019083	0,024
0,276216	0,362383	0,407883	0,400549	0,283383	0,01268	0,019383	0,021
0,27475	0,381383	0,393449	0,353349	0,243416	0,01261	0,017549	0,033
0,273983	0,3185163	0,355449		0,2627163	0,01105	0,014849	0,022

Tabela A26- Dados dos valores originais obtidos pela técnica colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) referentes a linhagem celular MDPC-23 avaliada 24 horas após PDT associando Photogem® (50, 100 e 150 mg/L) e LED vermelha na dose de luz de 100,0 J/cm².

P-L-	P+L-50	P+L-100	P+L- 150	P-L+	P+L+ 50	P+L+100	P+150L+
0,4931	0,403266	0,264733	0,1873333	0,3381666	0,0122	0,012133	0,0139
0,3682	0,4338333	0,256566	0,2544333	0,3030666	0,00906	0,0107	0,0133
0,37673	0,3815333	0,241466	0,1958	0,3069333	0,0112	0,0102	0,0135
0,3607	0,4114666	0,279	0,2036	0,2717	0,01831	0,014166	0,0181
0,42133	0,3695	0,237533	0,2076666	0,2884	0,01082	0,011011	0,0135
0,25193	0,335366	0,367299	0,4211996	0,340033	0,01813	0,009099	0,0284
0,26636	0,3068996	0,449333	0,413133	0,3500996	0,0196	0,016099	0,0259
0,2538	0,3583996	0,510066	0,5023663	0,319766	0,0172	0,017299	0,0279
0,2626	0,346166	0,450199	0,432433	0,294666	0,0192	0,018499	0,0276
0,24576	0,3512996	0,453133	0,403833	0,266966	0,0183	0,018599	0,0188

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

Araraquara, 20 de março de 2009.

ANA PAULA DIAS RIBEIRO