



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Uso da Terapia Fotodinâmica para a inativação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em meio planctônico e em biofilme

Rosangela de Carvalho Goulart

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Uso da Terapia Fotodinâmica para a inativação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em meio planctônico e em biofilme

Rosangela de Carvalho Goulart

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Goulart, Rosangela de Carvalho

Uso da Terapia Fotodinâmica para a inativação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em meio planctônico e em biofilme. Ribeirão Preto, 2009.

p. 95

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Ciancaglini, Pietro

1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 2. Terapia Fotodinâmica 3. Fotopolimerizador de Resina odontológica 4. Biofilme

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente não poderia iniciar meus agradecimentos sem agradecer a **DEUS**, que me proporcionou mais essa conquista, que colocou as pessoas certas em meu caminho, me guardou me livrou e renovou a cada manhã as suas misericórdias sobre a minha vida. Obrigada meu DEUS!*

*Obrigada aos meus pais **Luiz** e **Mary**, por se fazerem presentes em todos os momentos de minha vida, que com amor, carinho e dedicação me fizeram ver o mundo como ele é e me incentivaram a procurar nele, o meu lugar.*

*Agradeço a cada uma de minhas irmãs, **Rosemary**, **Rosana**, e **Renata** por fazerem parte da minha vida. Vocês são muito especiais para mim.*

***Gustavo** obrigado pelo incentivo, companheirismo, pelas palavras de animo pelos abraços que nos momentos difíceis, eram meu refugio.*

*Aos companheiros e amigos de laboratório, que sempre ficarão na minha memória e no meu coração, **Ana**, **Andréia**, **Bruno**, **Carol**, **Daniela**, **Fernandinha**, **Imaculada**, **Juliana**, **Thais**, **Luis Eduardo**, **Marcelle**, **Maytê**, **Simone** e **Tony**, obrigada pelo companheirismo, amizade, carinho, cumplicidade, auxílios nas horas de sufoco e alegrias constantes durante todos estes anos.*

Niltinho e Ivana o que seríamos de nós sem vocês!

Aos docentes, técnicos, funcionários e demais pessoas do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Aos amigos e companheiros da UNIFEB.

*À **Priscila Cerviglieri**, pelas correções dos textos em inglês.*

*À **FAPESP**, **CAPES** e **CNPq**, pelos auxílios concedidos ao laboratório. À **CAPES**, pela bolsa de doutorado concedida.*

Enfim, agradeço a todos que torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Pietro, por mais que eu procure não encontrarei palavras suficientes que expressem o meu agradecimento a você.

Para mim foi um privilégio, uma verdadeira benção de Deus, encontrar você em minha jornada acadêmica. A realização desse trabalho não seria possível se meu orientador não fosse você, pois durante essa caminhada encontrei muitas pedras no caminho, e você sempre presente me ajudou a transpor cada uma delas, com carinho, orientação, compreensão, amizade e muita, muita paciência.

Tenho orgulho de ter sido sua aluna e me alegro quando falo de você com os que o conhecem, pois todos compartilham a pessoa maravilhosa que você é. Em você reconheço o verdadeiro significado de ser um educador e amigo. Que sempre otimista acalenta e orienta!

Como agradecimento peço a Deus que inunde toda a sua vida de Graça, Paz, Amor, Alegria e bênçãos sem fim. E que DEUS lhe permita realizar os desejos de seu coração.

Muito obrigada!

*Feliz o que traz sempre no coração:
DEUS, ideal, verdade e bem.
Pasteur*

ÍNDICE

	Pag.
Lista de abreviaturas e siglas.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
1. Introdução.....	1
1.1 A doença periodontal e sua etiologia.....	1
1.2 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5
1.3 Terapia fotodinâmica (TFD).....	8
1.4 Mecanismos fotofísicos e fotoquímicos em TFD.....	14
1.5 Periodontia e Terapia Fotodinâmica.....	18
1.6 Agentes fotossesíveis: Azul de Metileno, Eritrosina e Rose Bengal.....	21
2. Objetivos.....	25
3. Material e Métodos.....	27
3.1 Obtenção, padronização e manutenção do cultivo da linhagem do microrganismo <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	27
3.2 Análises bioquímicas da linhagem bacteriana <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	27
3.2.1 Coloração de Gram.....	27
3.2.2 Provas Bioquímicas.....	28
3.3 Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). ..	29
3.4 Curva de crescimento da <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	29
3.5 Avaliação do pH e densidade óptica do meio de cultivo durante o crescimento da <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	30
3.6 Preparação da solução estoque dos agentes fotossensíveis utilizadosna TFD.....	30
3.7 Determinação da sensibilidade de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	31
3.8 Fonte de luz: Fotopolimerizador de resina odontológica.....	31
3.9 Fibroblastos.....	32
3.9.1 Condições de crescimento dos fibroblastos.....	32
3.9.2 Avaliação dos efeitos citotóxicos da TFD sobre os fibroblastos na presença de Rose Bengal.....	33
3.9.3.Determinação da viabilidade celular.....	33
3.10 Aplicação da Terapia Fotodinâmica: Avaliação dos efeitos citotóxicos da TFD aplicada à cultura planctônica de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	34
3.11 Aplicação da Terapia Fotodinâmica: Avaliação dos efeitos citotóxicos da TFD aplicada ao biofilme de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	35
3.11.1 Formação do biofilme.....	35
3.11.2 Irradiação do biofilme.....	35
3.11.3 Quantificação do biofilme.....	36
3.12 Descarte de células.....	36

3.13 Tratamento estatístico.....	Pag. 37
4. Resultados e Discussão.....	38
4.1 Otimização das condições de crescimento de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	38
4.2 Avaliação da capacidade acidogênica de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> em meio planctônico.....	43
4.3 Caracterização fotoquímica dos agentes fotossensíveis e seu emprego na TFD.....	43
4.3.1 Rose Bengal.....	45
4.3.1.1 Caracterização fotoquímica do Rose bengal.....	45
4.3.1.2 Efeito da toxicidade no escuro e da TFD sobre <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> em meio planctônico e em fibroblastos utilizando-se o Rose Bengal.....	46
4.3.2 Azul de metileno.....	55
4.3.2.1 Caracterização fotoquímica do Azul de metileno.....	55
4.3.2.2 Efeito da toxicidade no escuro e da TFD sobre <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> em meio planctônico utilizando-se o Azul de Metileno.....	57
4.3.3 Eritrosina.....	61
4.3.3.1 Caracterização fotoquímica da Eritrosina.....	61
4.3.3.2 Efeito da toxicidade no escuro e da TFD sobre <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> em meio planctônico utilizando-se a Eritrosina.....	61
4.4 Avaliação dos efeitos citotóxicos da TFD aplicada ao biofilme de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	68
4.4.1 Formação do biofilme.....	68
4.4.2 Efeitos citotóxicos da TFD aplicada ao biofilme de <i>A. actinomycetemcomitans</i> usando Rose Bengal, Azul de Metileno e Eritrosina.....	70
5. Conclusão.....	80
6. Referências Bibliográficas.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$ –	Oxigênio singleto
DMEM-F12 –	Meio Dulbeccos Modified Eagle/ Medium F-12 Nutrient médium
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DO –	Densidade óptica
EROs –	Espécies reativas de oxigênio
FBS –	Soro Bovino Fetal
HBSS –	Hanks Balanced Salt Solution
LAP –	Periodontite agressiva localizada
PBS –	Tampão Fosfato Salino
S_n –	Estado excitado singleto superior
S_0 –	Estado singleto fundamental
T_1 –	Estado excitado tripleto
TFD –	Terapia Fotodinâmica
TSA –	Tryptic Soy Agar
TSB –	Tryptic Soy Broth
UFC –	Unidade Formadora de colônia

RESUMO

A proposta deste trabalho foi de aplicar a Terapia Fotodinâmica (TFD) para avaliar a inativação da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), um patógeno que está associado à endocardite bacteriana, abscessos cerebrais e subcutâneos e principalmente à doença periodontal, que é caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, e consequentemente a perda de dentes.

O surgimento de resistência bacteriana a diversas classes de antibióticos vem sendo um problema sério que surge como efeito do uso indiscriminado destes fármacos e até mesmo por fatores adaptativos dos microrganismos. Devido a este fator, várias investigações vêm surgindo com referências satisfatórias no que diz respeito ao emprego da TFD como medida terapêutica.

O efeito da TFD foi verificado sobre a cultura da bactéria *A. actinomycetemcomitans* em meio planctônico e em biofilme.

Foi utilizado como agentes fotossensibilizadores Rose bengal, Azul de metileno e Eritrosina, que em baixas concentrações não causam toxicidade para células de fibroblastos e células humanas. Como fonte de luz foi utilizado o fotopolimerizador de resina odontológica, que é de fácil acesso, baixo custo e apresenta uma faixa de emissão de luz de 300 a 800 nm.

Rose Bengal até 1 μM não afetou as células de fibroblastos, mas essa mesma concentração sem usar a TFD reduziu a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* em 41,2%, porém as células de *A. actinomycetemcomitans* quando cultivadas em biofilme não foram afetadas quando se usou apenas o corante (0,5 e 1,0 μM) ou apenas a luz. Quando se aplicou a TFD Rose Bengal foi o segundo corante (entre os três estudados), que causou uma maior redução da viabilidade celular de *A. actinomycetemcomitans* cultivadas em meio planctônico 54,4% e o terceiro em reduzir a viabilidade quando cultivadas em biofilme com 45% de redução.

Azul de Metileno nas concentrações de 0,5 e 1,0 μM reduziu a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* em meio planctônico 16 e 24% respectivamente, já sobre o biofilme essa concentração de corante não promoveu redução da viabilidade bacteriana. Com a TFD observou-se uma redução de 50% da viabilidade das células de *A. actinomycetemcomitans* em meio planctônico e 53,3% em biofilme.

Dos três corantes utilizados Eritrosina foi o corante que *per se* apresentou menor redução da viabilidade 5 e 14%, indicando ter baixa toxicidade, no escuro, e não afetou as células do biofilme de *A. actinomycetemcomitan*. Porém com a TFD, esse corante promoveu uma maior redução da viabilidade das células bacterianas de *A. actinomycetemcomitans* cultivadas em meio planctônico e em biofilme 75% e 67,2% respectivamente. Desta forma, a Eritrosina foi o corante

mais eficiente em diminuir a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* nas condições estudadas.

Esses resultados indicam que a TFD reduz as células viáveis de *A. actinomycetemcomitans* cultivadas em meio planctônico e em biofilme, indicando que essa terapia poderá ser uma opção efetiva para o tratamento clínico da doença periodontal, com a vantagem de não apresentar efeitos colaterais como a terapia medicamentosa, nem desenvolver a resistência bacteriana que vem sendo um grande problema do tratamento com antibióticos.

Palavra chave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Terapia Fotodinâmica, Fotopolimerizador de Resina odontológica, Biofilme.

ABSTRACT

The objective of this work was to apply the photodynamic therapy (TFD) to evaluate the inactivation of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) bacteria, a pathogen that is associated to bacterial endocarditis, subcutaneous and cerebral abscesses and mainly to periodontal disease, which is characterized by inflammation of teeth support tissue and as a consequence, teeth loss.

The occurrence of bacterial resistance to many classes of antibiotics has been a serious problem that results from the indiscriminate use of these drugs and also by the adaptation factors of these microorganisms. Due to this, many investigations are being done with satisfactory references regarding the use of TFD as therapeutic step.

The TFD effect on *A. actinomycetemcomitans* bacteria culture in planktonic medium and biofilm was verified.

Rose Bengal, methylene Blue and Erythrosyn were used as photosensitizing agents which, in low concentrations are not toxic to fibroblast cells and human cells.

The odontological resin photopolymerizer was used as a light source since it is easy accessible, low cost and has a light emission range between 300 and 800nm.

Rose Bengal up to 1 μ M did not affect the fibroblast cells, but this same concentration without the use of TFD has reduced viability of *A.*

actinomycescomitans in 41.2%, but the cells when cultivated in biofilm were not affected when only dye (0.5 and 1.0 μ M) or only light were used.

When TFD was applied, Rose Bengal was the second dye (among the three studied) to cause the highest reduction of cell viability of *A. actinomycescomitans* cultivated in 54.4% planktonic medium and the third in reducing the viability when cultivated in biofilm, with 45% reduction.

Methylene Blue in 0.5 and 1.0 μ M concentrations has reduced the viability of *A. actinomycescomitans* in planktonic medium in 16% and 24%, respectively. In biofilm, this dye concentration has not fostered bacterial reduction. With TFD, a 50% reduction of *A. actinomycescomitans* cells in planktonic medium and a 53.3% in biofilm was observed.

Among the three dyes used, Erythrosyn was the one that , per se, has shown the lowest viability reduction of all, 5% and 14%, indicating its low toxicity in the dark, and it did not affect the biofilm cells.

Nevertheless, with TFD, this dye has fostered a higher viability reduction of *A. actinomycescomitans* bacterial cells cultured in planktonic medium and in biofilm of 75% and 67.2%, respectively. Therefore, Erythrosyn was the dye that, per se, has been the most efficient in reducing *A. actinomycescomitans* viability in the conditions studied.

These results indicate that TFD reduces *A. actinomycescomitans* viable cells cultivated in planktonic medium and biofilm, indicating that

this therapy could be an effective option for the treatment of periodontal disease, with the advantage that it does not show collateral effects like the drug therapy and without developing bacterial resistance, as this has been a major issue with antibiotics treatment.

Key words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Photodynamic therapy, Odontological resin photopolymerizer, biofilm.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença periodontal e sua etiologia

A doença periodontal é causada por microrganismos, geralmente bactérias anaeróbias obrigatórias Gram negativa, que colonizam a superfície dental acima ou abaixo da margem gengival (Socransky e Haffajee, 2002). É a maior causa de perda de dentes em adultos, devido o desenvolvimento de inflamação crônica e destruição do tecido pelas enzimas, endotoxinas e outros fatores citotóxicos, liberados por essas bactérias anaeróbias (Azarpazhooh et al., 2009).

Apresenta-se como infecção resultante da formação de biofilme no qual a maioria dos agentes etiológicos são membros da microbiota endógena. Sua evolução depende da interação de fatores microbianos com os fatores de defesa do hospedeiro, onde, existem bactérias mais patogênicas e indivíduos mais susceptíveis, o que vai gerar os diversos quadros de severidade da doença. Sua progressão está relacionada a fatores de risco como diabetes melito e tabagismo (Haake et al., 2004).

A doença periodontal afeta os tecidos de suporte dos dentes levando a perda óssea e do ligamento periodontal, além de colocar em risco a função do elemento dental. Esta infecção representa também forte risco sistêmico, pois a liberação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea pode desencadear uma série de respostas pelo organismo (Grossi e Genco, 1998).

A associação de espécies bacterianas mais específicas com a doença surgiu no início dos anos 1960, quando o exame microscópico da placa

dental revelou que diferentes morfotipos bacterianos eram encontrados na microbiota bucal de pacientes saudáveis e em sítios com a doença periodontal. Então, nas décadas de 1960 e 1970, o aprimoramento técnico dos procedimentos usados para isolar, cultivar e identificar microrganismos periodontais resultou no refinamento da taxionomia bacteriana e no esclarecimento de que grupos específicos de microrganismos estão presentes em doenças do periodonto (Haake et al., 2004).

O diagnóstico microbiológico em Periodontia está baseado na etiologia bacteriana das doenças periodontais as quais são essencialmente doenças infecciosas. A presença de determinadas espécies bacterianas, dentre centenas presentes no ambiente subgengival, parece estar relacionada a condições de doença periodontal destrutiva. Espécies como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacterioides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium sp.*, *Streptococcus intermedius*, e *Treponema sp.* têm sido associadas a doenças periodontais (Galvão et al., 2001). A detecção destas espécies seria de interesse na prevenção e tratamento de alguns tipos de doenças periodontais destrutivas (Lotufo e Pannuti, 2001).

Os microrganismos anaeróbios encontrados com maior frequência em bolsas periodontais são os *Fusobacterium species*, contribuindo no total da contagem cultivável com 5 a 20%. Esses microrganismos

também podem ser detectados na ausência de doença periodontal, mas normalmente em pouca quantidade. *Fusobacterium species* são associadas com peri-implante e com muitas infecções mistas. *Porphyromonas gingivalis* é um anaeróbio de pigmentação negra, produz várias enzimas tóxicas em particular collagenases e proteases, endotoxinas e outros agentes tóxicos. *P. gingivalis* é considerado o mais virulento patógeno entre os anaeróbios pigmentados e encontrado principalmente nas formas destrutivas da doença periodontal (Galvão et al., 2001). *Prevotella intermédia* é outro anaeróbio pigmentado que tem recebido considerável interesse. Amostras positivas para *P. gingivalis* são comumente positivas também para *P. intermédia*. Esse organismo representa um oportunista típico, que pode ser encontrado em baixas quantidades em indivíduos saudáveis.

A. actinomycetemcomitans tem sido encontrada em casos de endocardites bacterianas, mas também em infarto agudo do miocárdio, abscessos cerebrais e subcutâneos e rompimento de trombos vasculares (Beck et al., 1996; Perez et al., 2006).

As propriedades desses microrganismos, que os permitem atuarem como patógenos no meio ambiente periodontal, estão atualmente sob investigação e prometem fornecer muitas informações sobre os mecanismos básicos do processo da doença. Avanços tecnológicos na microbiologia molecular melhoraram a habilidade de detectar bactérias específicas e seus produtos, os quais podem servir de marcadores da doença em atividade ou para previsão de futura doença. Algumas dessas

tecnologias resultaram em produtos comerciais que estão correntemente disponíveis para uso na terapia clínica (Haake et al., 2004).

Além disso, não existe ainda um protocolo plenamente estabelecido de terapia para processos de doença periodontal agressiva, que consiga com boa previsibilidade barrar consistentemente o avanço da doença e manter esses pacientes em uma situação de estabilidade. Os esforços de terapia mecânica em geral são combinados ao uso de antibioticoterapia sistêmica, no sentido de tentar estacionar o curso da doença. Entretanto, a abordagem mais apropriada parece ser o uso de agentes antimicrobianos locais, aplicados no interior da bolsa periodontal, combinados à terapia mecânica de remoção da placa bacteriana e do cálculo ou placa calcificada (Slots e Ting, 2000; Bonito et al., 2005).

Embora a literatura relate uma série de substâncias antimicrobianas para uso local, na forma de géis, pastilhas biodegradáveis, líquidos irrigadores, dentre outros, atualmente, no mercado nacional, não existem produtos que atuem com esta finalidade eficientemente. Desse modo, há uma importante deficiência no arsenal terapêutico à disposição dos periodontistas, e seria interessante a investigação do potencial antimicrobiano de novas substâncias que pudessem ser utilizadas com função coadjuvante à terapia periodontal (Bonito et al., 2005; Oliveira et al., 2007).

1.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) é o novo nome da linhagem bacteriana anteriormente conhecida como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.



Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura da bactéria gram-negativa *A. actinomycetemcomitans* (21.000x) (www.saishika.jp/biofilm/aa.html).

A. actinomycetemcomitans é uma espécie bacteriana encontrada na cavidade oral, apresenta uma morfologia de coco bacilos pequenos e curtos (0.4 a 1.0 μm). São Gram negativo (Figura 2), anaeróbios facultativos sem mobilidade, e não formam esporos.

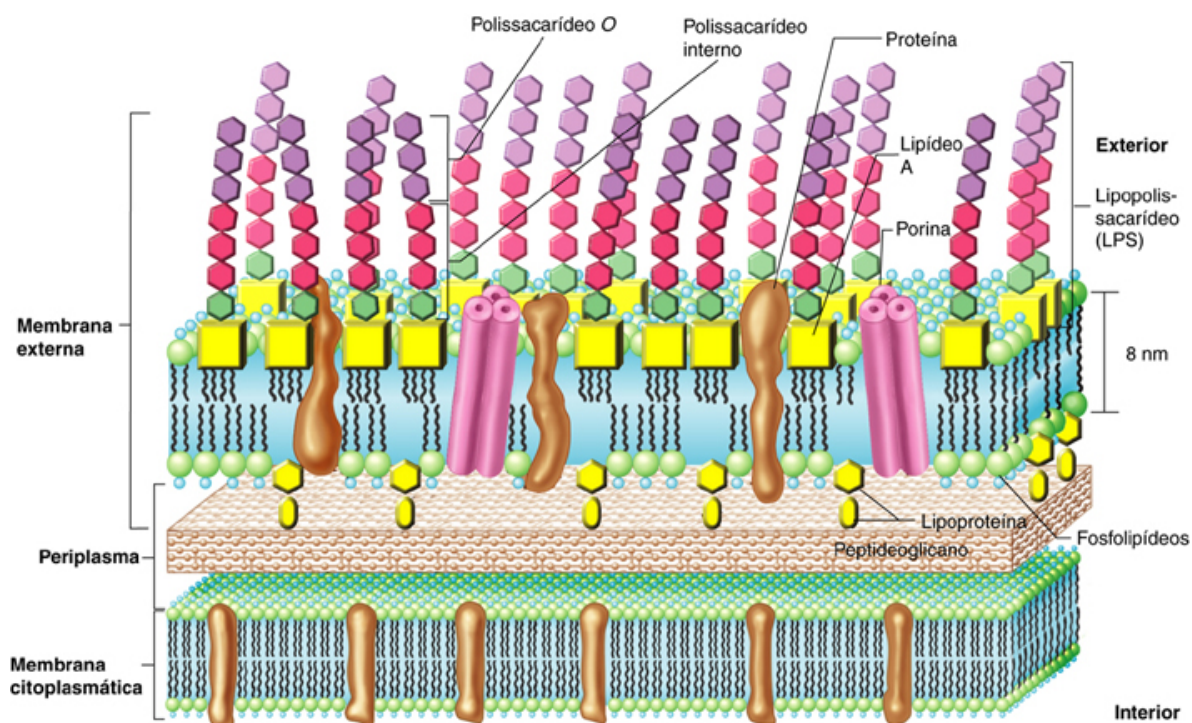


Figura 2. Parede celular gram-negativa (retirado de Madigan et al., 2004).

São sacarolítico e desenvolvem um papel importante nos quadros de periodontites agressiva e crônica, em adolescentes e adultos. Este quadro patológico apresenta grandes dificuldades de resoluções terapêuticas devido à capacidade deste microrganismo de colonizar tanto a parede mole quanto a parede dura da bolsa periodontal, necessitando frequentemente do uso de antibióticos sistêmicos para solução dos casos (Nishihara e Koseki, 2004; Prates et al., 2007; Gallant et al., 2008).

Se *A. actinomycetemcomitans* conseguir transpassar a cavidade oral entrando no sistema circulatório pode causar infecções fora da cavidade oral, como endocardite e abscessos em varias partes do corpo. Portanto, sua presença na cavidade oral também pode indicar um aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardíacas. *A. actinomycetemcomitans* é

membro de um grupo de patógenos clinicamente relevantes que causam infecções endocardiais denominado HACEK que consiste em *Haemophilus species*, *A. actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella species* (Tang et al., 2008; Gallant et al., 2008; Fine et al., 2007).

A. actinomycetemcomitans foi primeiramente identificada como um possível patógeno periodontal em 1975 em um estudo de periodontite juvenil localizada, agora classificada como periodontite agressiva localizada (LAP). Outros estudos mostraram que *A. actinomycetemcomitans* esta associada com a doença periodontal em adolescentes (Fine et al., 2007).

Pacientes com periodontite juvenil localizada apresentam uma quantidade elevada de anticorpos no soro contra essa bactéria. Além disso, esta bactéria possui um grande numero de fatores de virulência, com várias atividades que permitem colonizar a cavidade oral, invadir o tecido periodontal, invadir o mecanismo de defesa do hospedeiro, inibindo e matando os leucócitos polimorfonucleares, matando monócitos, produzindo fatores imunossupressores, secretando proteínas capazes de clivar IgG e produzir proteínas que se ligam com a fração Fc, além de iniciar o processo de destruição do tecido e interferir no reparo do tecido. Possuem proteínas na superfície de sua membrana, microvesículas e fimbrias que lhe permitem aderir no tecido epitelial e na superfície do dente. Os componentes da superfície da membrana desta bactéria são potentes estimuladores da reabsorção óssea e podem induzir a liberação

de citocinas que podem iniciar a destruição do tecido, e ainda produz várias substancias potencialmente tóxicas, incluindo a leucotoxina, que é um potente fator de virulência codificado por quatro genes que causa citotoxicidade em neutrófilos e macrófagos além de poder causar doença em animais e em sítios extra-orais (Cortelli et al., 2009; Wilson e Henderson 1995; Galvão et al., 2001).

1.3 Terapia fotodinâmica (TFD)

A luz tem sido utilizada no tratamento de doenças desde a antiguidade. Muitas civilizações antigas utilizaram a fototerapia, mas apenas neste ultimo século ela foi utilizada como terapia reparadora. Segundo os descobrimentos científicos dos pioneiros Finsen, Raab e Von Tappeiner, a combinação de luz e a administração de uma droga levam a uma fotoquimioterapia agindo como uma ferramenta terapêutica (Ackroyd et al., 2001).

Nos últimos anos tem sido investigada a potencialidade do uso de corantes fotossensibilizáveis como agentes no tratamento fotoquimioterápico de tecidos tumorais, definindo-se uma linha de ação nesta área denominada terapia fotodinâmica. A TFD é uma modalidade terapêutica que emprega a combinação de luz visível, uma droga (chamada de agente fotossensível) e oxigênio. Este agente fotossensível pode ser uma molécula presente normalmente nas células e tecidos, mas no caso específico da TFD ela é administrada, sendo esse o primeiro passo do tratamento. No segundo passo o tecido alvo é exposto a um

comprimento de onda específico para a absorção pelo agente fotossensível. O agente ou a luz sozinhos não apresenta citotoxicidade, pelo menos nas doses de droga fototerapeuticamente ativas. Entretanto, a combinação dos dois agentes em presença de oxigênio leva a morte das células tumorais (Gomer et al., 1989; Henderson e Dougherty, 1992; Meisel e Kocher 2005; Wood et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Plaetzer et al., 2009).

Agentes fotossensíveis são compostos capazes de absorver luz de um comprimento de onda específico e transformá-la em “energia proveitosa”. No caso da TFD, esta energia estará envolvida na produção de agentes citotóxicos. Um fotosensibilizador para TFD deve apresentar algumas características importantes; Ter sua composição química pura e conhecida. Ter uma toxicidade mínima no escuro, e somente ser citotóxico em presença de luz. Ser rapidamente excretado pelo corpo, para não desenvolver toxicidade sistêmica. Ter uma alta reatividade fotoquímica, com altas produções do estado triplete com longo tempo de vida, e ser hábil para produzir oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio. Ser ativado dentro do comprimento de onda 600-850 nm. E uma característica chave de um agente citotóxico é a sua capacidade de se associar preferencialmente em tecidos ou células doentes, e gerar agentes citotóxicos que irão induzir a produção do dano biológico desejado (Sharman et al., 1999; Plaetzer et al., 2009).

Em estudos citológicos com diferentes agentes fotossensíveis, tem sido constantemente notado que, por razões ainda desconhecidas,

diferentes tecidos ou culturas de células (tumoriais ou não) respondem de maneira distinta aos diferentes sensibilizadores (Schick et al., 1995).

A TFD pode também afetar de maneira distinta as diferentes organelas celulares (Sporn e Foster, 1992). Estudos do uso de corantes como agentes fotossensíveis tem demonstrado que dentre os principais centros de ataque, por parte das espécies geradas no processo de TFD, destacam-se a membrana plasmática, membrana de organelas como mitocôndrias, lisossomos, envelope nuclear, ou mesmo DNA e RNA, que são estruturas responsáveis pela transmissão do código genético (Henderson e Dougherty, 1992).

As membranas biológicas, na sua maioria, apresentam uma diferença de potencial elétrico, entre as fases aquosas separadas por fosfolipídios, resultantes de uma distribuição desigual de íons presentes no meio celular. A importância desta atividade elétrica em membranas celulares tem sido reconhecida por fisiologistas há vários anos. Este potencial elétrico existente em membranas celulares está envolvido em várias funções celulares como: transporte de solutos (Wilson et al., 1978); regulação do volume celular (Jakobsson, 1980); transferência de informações em tecidos nervosos (Cohen et al., 1974) bem como inúmeras outras funções. Métodos espectrofotométricos podem ser utilizados para realizar medidas e monitoramento de potenciais elétricos em membranas celulares, organelas celulares ou suspensões de vesículas sintéticas (Cohen et al., 1974; Ross et al., 1977; Waggoner, 1979), bem como para quantificar o agente fotossensível associado a diferentes

compartimentos celulares que durante a TFD, pode vir a produzir algumas espécies reativas que danifiquem estas estruturas e organelas (Merchat et al., 1996).

Foi determinado bioquimicamente que algumas enzimas podem ser inativadas de maneira dose-dependente e luz-dependente de forma temporária ou definitiva pela TFD, utilizando como agente fotossensível o Photofrin, que é um derivado porfirínico de 1ª geração (Murant et al., 1987).

O estudo da inativação de outras enzimas pela TFD, associada a outros métodos terapêuticos como a hipertermia, mostra uma situação bastante curiosa, onde certas enzimas são mais facilmente desnaturadas após TFD (como a gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, uma enzima chave da via glicolítica), outras são insensíveis (como a amilase) e outras ainda são protegidas da desnaturação pela hipertermia pós TFD como a mioglobina (Prinsze et al., 1991).

Embora a principal aplicação da TFD seja o tratamento de tumores, esta modalidade terapêutica tem sido utilizada no tratamento de psoríase, inativação de bactérias, fungos e vírus (incluindo HIV). Porfirinas e derivados de hematoporfirinas foram testados em sua capacidade de fotoinativar uma variedade de microrganismos, tais como bactéria (Venezio et al., 1985), leveduras (Bertoloni et al., 1984) e vírus (Skiles et al., 1985), inclusive o HIV (Matthews et al., 1988).

Num estudo sistemático sobre os efeitos da TFD em microrganismos, Shawar e Cooper (1990) relataram a importância da

concentração da droga, sua absorção e sua relação com a fotossensibilidade de *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecalis*, empregando um derivado de hematoporfirina como agente fotossensível e irradiando as células com luz visível no espectro do vermelho ($\lambda=630$ nm). Os estudos cinéticos conduzidos por esses autores mostram que a quantidade de droga ligada às células é maior com o aumento da concentração da droga na mistura de incubação, até a saturação dos sítios de ligação, os quais, até o momento, não foram identificados.

Estudos específicos indicam que certas bactérias orais incluindo *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, entre outras, podem ser inativadas após TFD com Azul de Toluidina e Azul de Metileno (Wilson et al., 1993) ou Alumínio Ftalocianina dissulfonada (Burns et al., 1995).

Soukos et al. (1996) mostraram que o Azul de Toluidina é citotóxico para *S. sobrinus* em concentrações ao redor de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ após irradiação com luz laser de baixa energia (7,3 mW em laser de Hélio-Neônio), enquanto que o tratamento similar não afetou a viabilidade de queratinócitos orais, sugerindo que o sistema de TFD pode ser empregado eficazmente no combate a bactérias causadoras de doenças periodontais. Nesse sentido, Wood et al. (1999) elaboraram um estudo *in vitro* para testar a TFD não em uma bactéria isolada, mas no ecossistema representado pelo biofilme dental, empregando para isso um sistema removível implantado no dente de voluntários que permita o estabelecimento de um biofilme. Após um tempo determinado, esse sistema era removido e submetido à TFD com ftalocianina. Os resultados

mostrados por esses autores incluem a ocorrência de danos na membrana das bactérias e vacuolação do citoplasma, indicando que a TFD causou sérios danos para a estrutura bacteriana, sendo um potencial agente no combate a esses microrganismos.

Paulino et al. (2005a; 2005b) verificaram o efeito da terapia fotodinâmica em *Streptococcus mutans*, utilizando o fotosensibilizador Rosa Bengal e como fonte de luz um fotopolimerizador de resina odontológica. Uma suspensão bacteriana de *S. mutans* foi tratada com diferentes concentrações de Rosa Bengal (0-10 μM) irradiado com uma luz de 400-600 nm, por vinte segundos. Observaram que a luz por si só não é tóxica e na fase escura Rosa Bengal é tóxico somente quando as células são tratadas com uma concentração acima de 5,0 μM . Sob a exposição da luz, a concentração de Rosa Bengal de 0,5 μM , inativou todas as bactérias.

O uso de corantes derivados de porfirinas (Shawar e Cooper, 1990; Meulen et al., 1997; Rovaldi et al., 2000) e ftalocianinas (Wood et al., 1999) tem sido comprovadamente eficientes no controle de microrganismos Gram positivos, dentre os quais está incluso o *Streptococcus mutans*.

O desenvolvimento da TFD voltado para a inativação de bactérias tem sido motivado pela observação do surgimento, nos últimos anos, de linhagens de bactérias altamente resistentes a antibióticos. Diversas investigações têm estabelecido que bactérias Gram positivas são sensíveis a ação de fotossensibilizante de uma ampla variedade de porfirinas e

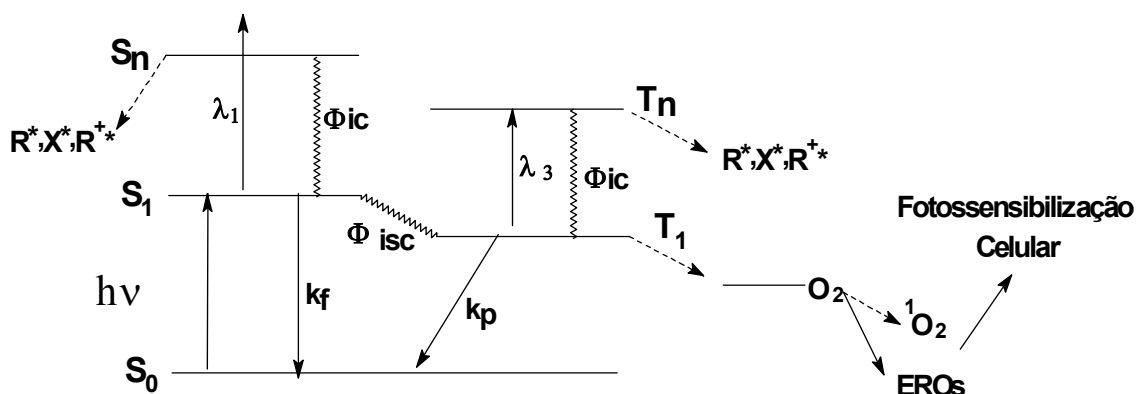
ftalocianinas. Por outro lado, bactérias Gram negativas possuem uma considerável resistência à fotossensibilização, a não ser que seja aumentada a permeabilidade de sua membrana externa pelo tratamento anterior com agentes químicos ou biológicos tais como CaCl_2 ou Tris-EDTA por exemplo. A razão para a resistência de bactérias Gram negativas a fotossensibilização não é clara, mas pode estar relacionada com a carga do agente fotossensível. A maioria das drogas usadas na TFD, que são ineficientes contra estas bactérias, são neutras ou negativamente carregadas. Entretanto, estudos demonstraram que porfirinas e ftalocianinas positivamente carregadas induzem a fotossensitização eficiente tanto de bactérias Gram positivas quanto Gram negativas (Venezio et al., 1985; Shawar e Cooper, 1990).

1.4 Mecanismos fotofísicos e fotoquímicos em TFD

Os efeitos da TFD são conseguidos através de uma série de eventos fotofísicos oriundos da excitação do agente fotossensível pela luz, que levam à produção de espécies reativas de oxigênio (basicamente oxigênio singleto e radicais livres de oxigênio), que iniciam uma série de eventos citotóxicos, os quais induzem danos a todos os componentes celulares com a conseqüente morte da célula (Cohen et al., 1974; Ross et al., 1977; Brasseur et al., 1988; Penning e Dubbelman, 1994; Meisel e Kocher 2005; Wood et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Plaetzer et al., 2009).

No diagrama de Jablonski apresentado no Esquema 1.1, estão

representados os processos fotofísicos e fotoquímicos que um agente fotossensível pode sofrer após a absorção de radiação.



$h\nu$ - absorção de luz

S_0 - estado singleto fundamental

S_n - estado excitado singleto superior

T_n - estado excitado tripleto superior

k_f - fluorescência

k_p - fosforescência

ic - conversão interna

isc - cruzamento intersistema

R - produto de uma reação fotoquímica

Esquema 1.1: Digrama de Jablonski para um sistema fotoluminescente.

Após a absorção de um fóton de luz, o agente fotossensível passa a popular um estado excitado singleto mais energético (S_n), de onde pode retornar para o seu estado fundamental pelo processo de relaxação física conhecido como conversão interna ou através do processo radioativo de emissão de fluorescência. As propriedades fluorescentes dos agentes fotossensíveis têm sido úteis para a visualização, localização e delineação da lesão maligna. Contudo, a ação fotodinâmica é dependente do processo de cruzamento intersistemas, caracterizado pela inversão do

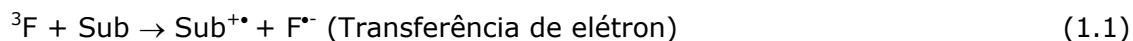
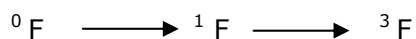
spin eletrônico. Através deste processo a molécula do agente fotossensível passa a popular os estados excitados tripletos (T_1).

A partir do estado tripleto, a droga fotossensibilizadora pode retornar para o estado fundamental pelo processo de conversão interna ou pelo processo de emissão de fosforescência (Lakowicz e Keating, 1984).

De maior importância que os processos fotofísicos, entretanto, são as reações que a droga fotossensibilizadora pode sofrer neste estado excitado. A maioria dos dados disponíveis sobre a TFD sugerem um mecanismo comum de ação, onde o agente fotossensível tripleto na presença do oxigênio molecular presente no meio induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (1O_2 , $\cdot O_2^-$, $\cdot OH$, H_2O_2) que atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares, levando à morte celular (Sharman et al., 1999; Kessel e Luo 1999; Meisel e Kocher 2005; Plaetzer et al., 2009). Os mecanismos de produção destas espécies reativas são descritos a seguir.

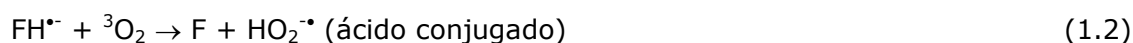
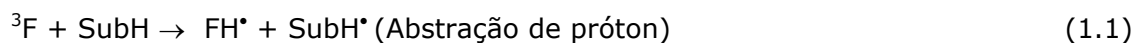
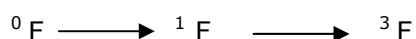
O mecanismo do Tipo I (Foote, 1991; Sharman et al., 1999; Plaetzer et al., 2009) envolve a abstração de um átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre o agente fotossensível no estado excitado tripleto e diferentes macromoléculas biológicas (Sub), levando a produção de radicais livres e íons radicais. A espécie reduzida do agente fotossensível pode transferir um elétron ao oxigênio molecular presente no meio formando espécies reativas de oxigênio

como peróxidos, ânion superóxido, etc. Este tipo de mecanismo de fotossensibilização, esquematizado abaixo:

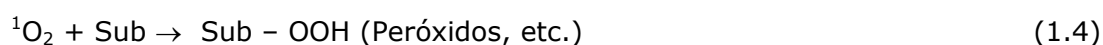
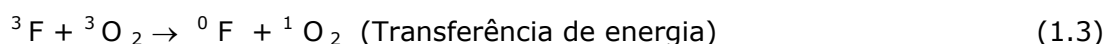


Substrato - semioxidado, Sensibilizador semi-reduzido

Ou



Outro caminho possível para a droga em seu estado excitado tripleto é o de transferência de energia para o oxigênio molecular com formação de oxigênio singleto. (1O_2), generalizando assim a produção dos EROs. Esta espécie ativa de oxigênio reage rápida e indiscriminadamente com os mais variados materiais biológicos como lipídios insaturados, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (Esquema 1.2), sendo apontado como o principal responsável pela inativação da célula tumoral. Este tipo de reação de fotossensibilização é conhecido como do Tipo II (Foote, 1991).



Em solução homogênea, a probabilidade e a eficiência do processo de

fotossensibilização dependem de vários parâmetros fotofísicos, tais como o rendimento quântico de produção do estado excitado tripleto e sua velocidade de decaimento para o estado fundamental. Contudo, em meio micro-heterogêneo tais como células e tecidos, os parâmetros estruturais e funcionais também estão envolvidos na determinação da eficiência do processo de fotossensibilização. Estes parâmetros regulam a incorporação, localização e a ligação/interação das moléculas do agente fotossensível com as moléculas alvo.

O primeiro passo no processo de fotossensibilização de uma célula é a ligação do agente fotossensível às membranas plasmáticas ou sua permeação através das mesmas para o citossol. Em princípio, a permeação pode ocorrer por difusão, por um sistema de transporte ativo ou por endocitose.

1.5 Periodontia e Terapia Fotodinâmica

A proposta terapêutica para o tratamento da doença periodontal consiste em três passos estratégicos: (1) controle da placa subgengival por raspagem e aplainamento radicular (2) administração de antibióticos sistêmicos e (3) procedimento cirúrgico (Cortelli et al., 2009).

A terapia que consiste apenas na descontaminação por meio do uso de antibióticos pode não ser suficiente para tratar a doença periodontal, além de apresentar uma preocupação adicional com os efeitos colaterais como desordens gastrointestinais entre outras e a emergente resistência a antibióticos desenvolvida pela comunidade microbiana. Uma alternativa

é o uso de antibióticos locais que apresentam menores efeitos colaterais, porém eles apresentam a desvantagem de serem removidos a cada higienização oral e além do custo a aplicação que é em pequenas áreas da cavidade oral, o que não é conveniente para o tratamento da doença generalizada (Azarpazhooh et al., 2009; Oliveira et al., 2007).

Outro caminho para a aplicação de agentes antimicrobianos é o emprego da Terapia Fotodinâmica para o tratamento da doença periodontal. A aplicação da luz e corante para destruir espécies bacterianas in vitro é estudada há muitos anos, e fotossensibilizadores como Azul de metileno apresentam tanto a propriedade bactericida como a antiviral e antiprotózoários (Chan e Lai, 2003; Prates et al., 2007; Azarpazhooh et al., 2009; Oliveira et al., 2009; Fontana et al., 2009; Goulart et al., 2009).

O uso da Terapia Fotodinâmica em periodontia está documentado em diversos estudos que mostram sua efetividade contra bactérias periodontopatogênicas com o uso dos corantes azul de toluidina e azul de metileno, associados ao laser de He-Ne, e do corante ftalocianina dissulfonada de alumínio, com o laser de diodo com emissão infravermelha (Yamada et al., 2004).

Segundo König et al. (2000), bactérias como *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces odontolyticus* não necessitam do uso adicional de corantes externos, pois são capazes de sintetizar a protoporfirina IX, um dos corantes mais utilizados em terapia fotodinâmica. Por isso, a simples irradiação com laser de emissão vermelha produz a morte bacteriana

destes microorganismos e melhora a inflamação periodontal.

Garcez et al. (2002), em um relato de caso clínico, mostraram remissão dos sinais da infecção periodontal, como supuração, edema e ulcerações na gengiva, em um período de 48 horas após a remoção do cálculo, aplicação do corante e irradiação laser, sem o uso de medicação local ou sistêmica.

Ovchinnikov e Tuchin (2001) em um estudo clínico em pacientes com bolsa periodontal, compararam a raspagem e aplainamento radicular com o mesmo tratamento associado a TFD. Os autores obtiveram como resultado uma redução microbiana de apenas 85% com a raspagem e aplainamento radicular de 95% com a complementação com TFD, em um tempo de irradiação de 120 segundos.

Soukos et al. (2003), em um ensaios *in vitro* demonstraram que 99% da placa subgengival, foram destruídas por meio da terapia fotodinâmica, quando associou os fotossensibilizadores clorina e poli-lisina com laser "red". Prates et al. (2007), também demonstraram que *A. actinomycetencomitans* pode ser fotoinativada pelo uso da terapia fotodinâmica, usando laser "red" e verde malaquita como fotossensibilizador.

Em um recente estudo Fontana et al. (2009) verificaram que o uso da terapia fotodinâmica sobre bactérias da placa dental humana foi eficiente em matar 63% das bactérias em meio planctônico e 32% das bactérias em biofilme, quando se usou azul de metileno 25 µg/ mL e laser "red" com emissão em 665 nm.

Além do efeito bactericida, podemos observar outras vantagens do uso da TFD no tratamento da doença periodontal. A TFD é uma terapia local não invasiva onde a aplicação do fotossensibilizador e da luz é em uma área determinada, o que não provoca distúrbios na microflora das demais regiões bucais e o dano aos tecidos adjacentes pode ser evitado. TFD favorece a eliminação de patógenos em áreas inacessíveis da bolsa periodontal em um curto espaço de tempo favorecendo tanto o paciente como o operador. O risco de bacteremia depois do debridamento periodontal é minimizado. Não necessita de prescrição de antibióticos. E não requer a aplicação de anestesia no local onde vai ser aplicado a TFD (Takamatsu et al., 1999; Oliveira et al., 2009; Raghavendra et al., 2009).

1.6 Agentes fotossensíveis: Azul de Metileno, Eritrosina e Rose Bengal

Fenotiazínicos são corantes azuis (λ_{max} de absorção = 600-660 nm) como Azul de Metileno e Azul de Toluidina. O Azul de Metileno tem sido muito utilizado em histologia há mais de um século e são empregados em identificações cirúrgicas em concentrações razoavelmente altas, normalmente 1% (v/v), sem causar toxicidade humana (Wainwright, 1998). A primeira informação de sua ação fotodinâmica apareceu por volta de 1930, e desde então vários trabalhos de TFD vêm empregando azul de metileno como agente fotossensibilizador, pois são efetivos contra organismos patogênicos incluindo vírus, bactérias e leveduras (Usacheva et al., 2001).

O azul de metileno é um corante orgânico redox fenotiazínico descoberto por Heinrich Claro em 1876, que inicialmente ganhou prestígio como corante citológico e como indicador de óxido-redução. Devido às suas propriedades fotoquímicas, têm sido desenvolvido estudos visando sua aplicação na inativação de bactérias (Scott et al., 2006).

O tamanho e a forma dos fenotiazínicos, linear com grupos heteroaromáticos tricíclicos linear (Figura 3), fazem deles um composto que intercala com ácidos nucleicos. A ação fotodinâmica de azul de metileno sobre os ácidos nucleicos é seletiva para resíduos de guanosina, preferencialmente para a formação de 8-hidroxiguanosina. A inativação efetiva de HIV foi alcançada usando 1 μM de azul de metileno e 10.5 mw/cm² de luz, e varias linhagens bacterianas tem sido fotoinativadas por essa classe de corantes (Wainwright, 1998).

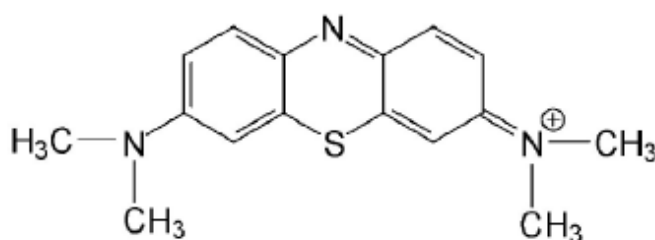


Figura 3. Estrutura química do Azul de Metileno.

Entre as várias classes de agentes fotossensíveis, destacam-se os derivados de xantenos, merocianinas, ftalocianinas e hematoporfirinas (Sharman et al., 1999).

Rose Bengal e Eritrosina pertencem à classe de compostos cíclicos

denominados de xanteno, que apresentam cinco subgrupos: pirólicos, rodamina, fluorano, acridina e fenol e sulfoftaleínas. No grupo dos fluorans são encontrados os corantes Eritrosina, Eosina e Rose Bengal (Begue et al., 1966).

Primeiramente os xantenos foram empregados em meios de cultura seletivos para impedir o crescimento de um grupo de microrganismos (Begue et al., 1966). Eles foram os primeiros fotossensibilizadores a serem empregados no tratamento de doenças como pitíriase versicolor, molusco contagioso, sífilis, lúpus vulgar e câncer de pele (Touma e Szeimies, 2007). Atualmente Eritrosina tem sido empregada para inativar bactérias Gram-positivas e gram-negativas (Wood et al., 2006).

Os derivados de xanteno (Figura 4) são comumente utilizados como marcadores auxiliares de trauma corneano (Bowyer et al., 2001), apesar de que não são utilizadas na TFD clínica sendo utilizados apenas como modelos experimentais comparativos, pois apresentam uma boa produção de oxigênio singleto (Paczkowski et al., 1985).

A possibilidade de diferentes respostas à fotossensibilização dos corantes, variando-se o comprimento de onda de excitação, a intensidade de luz, a presença ou não de oxigênio no meio, alterações estruturais nos compostos químicos utilizados como agentes fotossensíveis certamente ampliaram a versatilidade do uso destes em aplicações biológicas e médicas (Sieber et al., 1984; Gaffney e Sieber, 1990).

Derivados de Xanteno

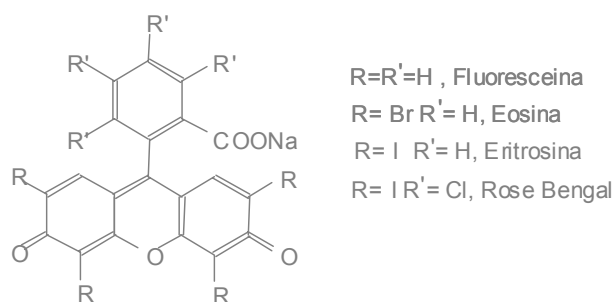


Figura 4. Estrutura química de derivados do xanteno.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste teste foi o de padronizar e adequar um método capaz de inativar a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, utilizada como modelo biológico, através do emprego da terapia fotodinâmica, auxiliada pelo emprego de uma luz não laser do fotopolimerizador de resina odontológica e corantes de baixo custo e fácil acesso.

Os testes realizados englobam estudos bioquímicos visando a utilização de corantes fotossensíveis compreendendo os seguintes objetivos específicos:

- * Padronização de condições ótimas de cultivo do microrganismo selecionado.
- * Análises bioquímica da linhagem bacteriana *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- * Definição da luz fotoativadora e das concentrações ideais dos agentes fotossensibilizadores para o estudo da TFD em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- * Identificação do tempo ideal de incubação dos corantes “*in vitro*”.
- * Avaliação do efeito do corante sobre o crescimento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em meio planctônico com e sem irradiação.
- * Avaliação do efeito do corante sobre o crescimento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em biofilme com e sem irradiação.
- * Otimização das condições de concentração de corante, potência e

tempo de irradiação com luz fotoativadora sobre as células bacterianas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

- * Avaliação da TFD sobre o biofilme formado por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Obtenção, padronização e manutenção do cultivo da linhagem do microrganismo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A linhagem bacteriana de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Francisco Hofling (FOP-UNICAMP). Para utilização freqüente esta linhagem foi mantida em estoques fracionados a -20°C em uma solução 40% (v/v) de glicerol (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Para cultivo em meio líquido, foi usado o meio Tryptic Soy Broth (TSB) (Acumedia, Michigan, USA) preparado de acordo com as instruções do fabricante, autoclavado a 120°C por 20 minutos, e incubados a 37°C, em sistema de microaerofilia pela “técnica da vela” por 48 horas.

Para o crescimento em meio sólido foi empregado o meio Tryptic Soy Agar (TSA-Soybean-casein digest agar) da Difco, (Sparks, MD, USA), o qual também foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e autoclavado a 120°C por 20 minutos.

A temperatura de incubação foi de 37°C, em sistema de microaerofilia pela “técnica da vela” por 72 horas para visualização de colônias, em meio sólido (Paulino et al., 2005a).

3.2 Análises bioquímicas da linhagem bacteriana *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

3.2.1 Coloração de Gram

A partir da linhagem bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* cultivada em meio sólido foi realizado o esfregaço em lamina de vidro, colocando uma pequena gota de soro fisiológico esterilizado no centro da lamina e dissolvido uma alíquota da colônia bacteriana, espalhada sobre a superfície da lamina com movimentos circulares e suaves. O esfregaço foi seco a temperatura ambiente e quando ficou completamente seco, com auxilio de uma pinça de madeira, foi fixado na lamina, passando-o na chama do bico de Bunsen, por 2 a 3 vezes, após o resfriamento da lâmina foi realizado a coloração de Gram, que consiste nos seguintes passos:

- cobrir o esfregaço com solução Violeta Genciana por 1 minuto.
- cobrir o esfregaço com Lugol por 1 minuto.
- lavar rapidamente em água corrente.
- lavar com álcool e água ate retirar todo o excesso do complexo cristal violeta-iodo.
- cobrir o esfregaço com Fucsina por 30 segundos.
- lavar a lâmina com água.

Após a coloração a lamina foi seca a temperatura ambiente e observada ao microscópio óptico Leica DMLB com câmera digital Leica DC 300F acoplada, com objetiva de imersão (100X).

3.2.2 Provas Bioquímicas

Para identificação da linhagem bacteriana *A. actinomycetemcomitans* foram efetuadas as provas bioquímicas de catalase, urease, dextrose, maltose e sucrose que caracterizam essa linhagem (Zambon 1985; Wilson

e Henderson 1995).

3.3 Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Para a determinação do número de UFC da suspensão bacteriana utilizada nos experimentos, foi empregada a técnica de semeadura em placa Spread Plate. Assim após a realização de cada experimento, as células foram plaqueadas (50 μ L) e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski sobre a superfície da placa contendo meio de cultura (TSA). Posteriormente foram incubadas, a 37°C em microaerofilia, durante 72 horas para determinação da contagem de UFC.

3.4 Curva de crescimento da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Para o preparo do inóculo de *A. actinomycetemcomitans*, para a realização da curva de crescimento, a turbidez inicial da bactéria foi avaliada em um espectrofotômetro e a absorbância foi ajustada inicialmente para $A_{600}=0,5$. Quatro mL desta suspensão foram inoculadas em 100 mL de meio de cultura TSB. A cada quatro horas uma alíquota foi coletada e feita a leitura da DO (densidade óptica) em 600 nm e a partir de um mL foi feita a diluição seriada até 10^9 . Uma alíquota de 50 μ L de cada diluição foi inoculada em meio de cultura TSA, empregando-se a técnica de semeadura em placa Spread Plate, onde o inóculo foi espalhado pela superfície do Agar com o auxílio de uma alça de Drigalski.

As placas foram incubadas durante 72 horas a 37°C em microaerofilia, depois do período de incubação foi feita a contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) em um contador de colônias conforme descrito por Paulino e colaboradores (Paulino et. al., 2005a).

3.5 Avaliação do pH e densidade óptica do meio de cultivo durante o crescimento da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Durante o crescimento da bactéria, para a realização da curva de crescimento, a densidade óptica e o pH do meio também foram avaliados a cada quatro horas, coletando-se uma alíquota de 2mL do meio de cultivo previamente homogeneizado. A leitura da densidade óptica (absorbância) foi realizada em espectrofotômetro em 600 nm de comprimento de onda.

3.6 Preparação da solução estoque dos agentes fotossensíveis utilizados na TFD

Para os experimentos realizados foi preparada uma solução estoque de Rose bengal (Sigma – St. Louis, MO, USA) Azul de metileno e de Eritrosina, em tampão fosfato salino (PBS) (NaCl 0,13 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM and KH₂PO₄ 1,47 mM, final pH 7,4) esterilizado em um filtro de 0,22 µm. A concentração final de cada solução de corante foi de 2 mM. Estas soluções foram então armazenadas a uma temperatura de -20°C até seu uso.

3.7 Determinação da sensibilidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Antes da incubação com diferentes concentrações de Rose bengal (0 a 15 μM), Azul de metileno (0 a 15 μM) e Eritrosina (0 a 10 μM), a suspensão bacteriana previamente incubada para atingir o meio da fase exponencial (10^9 UFC/mL), foi serialmente diluída em PBS esterilizado para a obtenção de 10^3 UFC/ mL. Após esse procedimento um mL da suspensão bacteriana foi pré-incubada com as diferentes concentrações dos corantes estudados. Rose Bengal foi pré-incubado com a cultura bacteriana durante 10 minutos, antes de ser plaqueado, Azul de Metileno e Eritrosina foram pré-incubados durante 10 e 30 minutos. Posteriormente a pré-incubação com os corantes, 50 μL da suspensão foi inoculada em meio TSA utilizando a técnica de semeadura Spread Plate. As placas foram colocadas em uma jarra de microaerofilia e incubadas a 37°C por 72 horas. Após o período de incubação foi determinado o número de UFC/mL.

3.8 Fonte de luz: Fotopolimerizador de resina odontológica

Como fonte de luz, foi utilizado um fotopolimerizador de resina odontológico onde o espectro de absorção dos corantes empregados nesse trabalho é coerente com o espectro de emissão da luz irradiada pelo fotopolimerizador, o que permite a fotossensibilização do corante com a luz disponível.

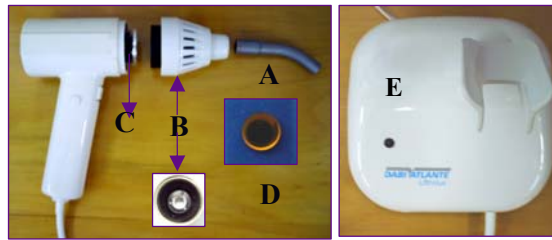


Figura 5: Fotopolimerizador de Resina odontológica: ponteira autoclavável (A), suporte do filtro de luz (B), lâmpada halógena (C), filtro de luz adaptado (D), fonte de alimentação (E).

3.9 Fibroblastos

3.9.1 Condições de crescimento dos fibroblastos

As cepas de fibroblastos foram obtidas a partir de uma linhagem ATCC CCL-110 (Paulino et al., 2005a) e mantidas em solução estoque congeladas em nitrogênio líquido com soro bovino fetal (FBS) e DMSO (9:1 v/v). Após o processo de descongelamento, os fibroblastos foram crescidos em placa de cultivo com meio Dulbeccos Modified Eagle/ Medium F-12 Nutrient médium (DMEM-F12), o qual foi preparado de acordo com as instruções do próprio fabricante, filtrando em uma membrana de 0,22 μm . O meio obtido foi ainda enriquecido com FBS 10% penicilina 100 U/ mL, estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$ e anfotericina 0,2 $\mu\text{g/mL}$.

O meio onde foram crescidas as células foi renovado duas vezes por semana e os fibroblastos foram utilizados quando todas as células estavam completamente confluentes e alcançaram uma contagem aproximada de 1×10^6 células/mL.

3.9.2 Avaliação dos efeitos citotóxicos da TFD sobre os fibroblastos na presença de Rose Bengal

Para a realização deste experimento $1,0 \times 10^6$ células foram crescidas em meio DMEM-F12 como descrito por Paulino e colaboradores (Paulino et al., 2005a). As células foram isoladas por centrifugação e lavadas duas vezes com HBSS. A concentração inicial de células usadas em todos os experimentos foi de $0,7 \times 10^6$ células/mL em HBSS. Um mL dessa suspensão foi distribuída em tubos de ensaio (12 x 120 mm) e uma parte dos tubos foram submetidos ao controle de toxicidade do corante e da luz *per se* e a outra parte foi submetida ao experimento de irradiação com adição de diferentes concentrações de Rose bengal (0 a 50 μ M). Sob suave agitação as células foram incubadas por 10 minutos e posteriormente irradiadas (0.65 J/cm^2) com o fotopolimerizador. Após estes procedimentos, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultivo DMEM/F-12.

Em seguida a cultura foi levada a uma incubadora de CO₂ e a viabilidade de fibroblastos foi calculada usando uma câmara de Neubauer's com Trypan Blue conforme descrito abaixo.

3.9.3 Determinação da viabilidade celular

A solução azul tripan na concentração de 0,1% (p/v) foi preparada e posteriormente filtrada em um filtro 0,22 μ m. A suspensão celular foi diluída na proporção de 1:1 (v/v) com o corante. Após 10 minutos de incubação esta suspensão foi diluída apropriadamente em solução salina

(PBS) para permitir uma fácil contagem de células em cada campo da câmara de Neubauer, possibilitando assim estimar a relação que havia entre as células viáveis e as células lisadas.

3.10 Aplicação da Terapia Fotodinâmica: Avaliação dos efeitos citotóxicos da TFD aplicada à cultura planctônica de *A. actinomycetemcomitans*

A suspensão bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* contendo 10^3 UFC/ mL foi pré- incubada com Rose Bengal nas concentrações de 0,01, 0,1 e 0,5 μM durante 10, 30 e 60 minutos e com Azul de Metileno e Eritrosina nas concentrações de 0,5 e 1,0 μM durante 10 e 30 minutos de pré-incubação. Posteriormente a suspensão bacteriana foi transferida para um tubo de ensaio 12 x 120 mm protegido da luz ambiente, ficando a uma distância de 11 cm do sistema de detecção de luz do fotopolimerizador e em seguida foi submetida a irradiação por 10 ($0,108 \text{ J/cm}^2$), 20 ($0,217 \text{ J/cm}^2$) e 30 ($0,325 \text{ J/cm}^2$) segundos, 1 minuto (0.65 J/cm^2) e 3 minutos ($\sim 2 \text{ J/cm}^2$).

Após o tratamento com a droga e a luz, 50 μL da suspensão bacteriana de cada uma das amostras foram inoculadas em meio TSA utilizando a técnica de semeadura Spread Plate. As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia durante 72 horas para determinar a contagem de UFC.

3.11 Aplicação da Terapia Fotodinâmica: Avaliação dos efeitos citotóxicos da TFD aplicada ao biofilme de *A. actinomycetemcomitans*

3.11.1 Formação do biofilme

Para a formação do biofilme de *A. actinomycetemcomitans*, foi utilizado uma placa de cultura de células contendo 24 poços (Corning Costar 3524, flat bottom; Corning, NY USA) onde foi inoculado 15 µL da cultura de *A. aggregatibacter* previamente inoculada em meio TSB por 48 horas, apresentando uma turbidez de $Abs_{600} = 0,5$ correspondente a 10^9 células por mL, e um mL de meio TSB. As placas inoculadas foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas.

3.11.2 Irradiação do biofilme

Após o período de incubação das placas com o biofilme, o meio de crescimento foi removido e cada poço foi lavado três vezes com tampão PBS. Cada poço contendo o biofilme foi incubado durante 30 minutos com 1 mL de cada agente fotossensível empregado nesse trabalho (Rose bengal, Azul de metileno e Eritrosina) nas concentrações de 0,01, 0,5 e 1,0 µM. Depois desse período cada poço foi irradiado durante 1 e 3 minutos ($0,65$ a ~ 2 J/cm²) com o fotopolimerizador de resina odontológica, posteriormente a solução do fotossensibilizador foi removida e foi colocado 1 mL do meio de cultura TSB. As placas foram incubadas em microaerofilia por 24 horas, depois cada poço foi lavado três vezes com

tampão PBS, seco a temperatura ambiente em capela de fluxo laminar e fotografado com microscópio óptico Leica DC 300 F com câmera digital acoplada (Leica Bensheim, Germany) proporcionando um aumento de 100x da imagem do biofilme.

3.11.3 Quantificação do biofilme

A quantificação das células presente no biofilme depois da TFD (ou sem TFD, na presença de corante como um controle) foi determinado usando o cristal violeta como descrito por Kaplan et al. (2003) onde, cada poço contendo o biofilme foi lavado três vezes com água destilada esterelizada e foi adicionado 600 µL da solução de cristal violeta 1% , e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 60 minutos e posteriormente a solução de cristal violeta foi removida e cada poço foi lavado novamente com água destilada esterilizada três vezes e foi colocado 600 µL de etanol durante 30 minutos para solubilizar o corante. A solução de etanol foi removida, diluída dez vezes e foi determinada a densidade óptica (a 550 nm) da solução etanol cristal violeta de cada poço para quantificar o biofilme de *A. actinomycetemcomitans*.

3.12 Descarte das células

As células bacterianas, meios de cultura e outros materiais contaminados ou não utilizados nos experimentos foram autoclavados a 127 °C durante 20 minutos e posteriormente descartados.

3.13 Tratamento estatístico

Os dados apresentados foram obtidos por experimentos feitos em triplicatas e com três diferentes preparações, sendo considerados estatisticamente significativos com $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições de crescimento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

A linhagem bacteriana *A. actinomycetemcomitans* teve um bom crescimento no meio Tryptic Soy Broth e no meio Tryptic Soy Agar incubada a 37°C em microaerofilia, essa linhagem cultivada nessas condições apresentou desenvolvimento de colônias em 48 horas, ficando mais evidentes com 72 horas. Essas condições de crescimento foram melhores do que a proposta por Slots (1982) que sugeriu o uso do meio de cultura Tryptic Soy-serum Bacitracina Vancomicina, onde só se observava o desenvolvimento de colônias com 72 horas. As colônias apresentaram aspecto mucoide, com colônias translúcidas, com bordas circulares e convexas, conforme pode ser observado na Figura 6, sendo difíceis de serem removidas da superfície do Agar (Zambon, 1985).

Na Figura 7 podemos observar a fotomicrografia da linhagem bacteriana *A. actinomycetemcomitans* crescida em meio sólido e corada pelo método de Gram, apresentando a morfologia de bacilo Gram negativo, que foi observado com o auxílio de um microscópio óptico.

Para identificação e diferenciação de *A. actinomycetemcomitans* foram feitas provas bioquímicas proposta por Zambon (1985) e Wilson e Henderson (1995) considerando que *A. actinomycetemcomitans* é um microrganismo fermentativo, não hemolítico, indol negativo e produtor de catalase. Os testes revelaram que a bactéria apresentou catalase positiva,



Figura 6. Aspecto das colônias bacterianas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Colônias correspondem a massas visíveis de células, originadas de sucessivas divisões de uma ou poucas células. (A) Aspecto de uma placa semeada com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cultivada em meio Tryptic Soy Agar incubada a 37°C em microaerofilia por 72 horas. (B) Ampliação das colônias apresentadas em (A).

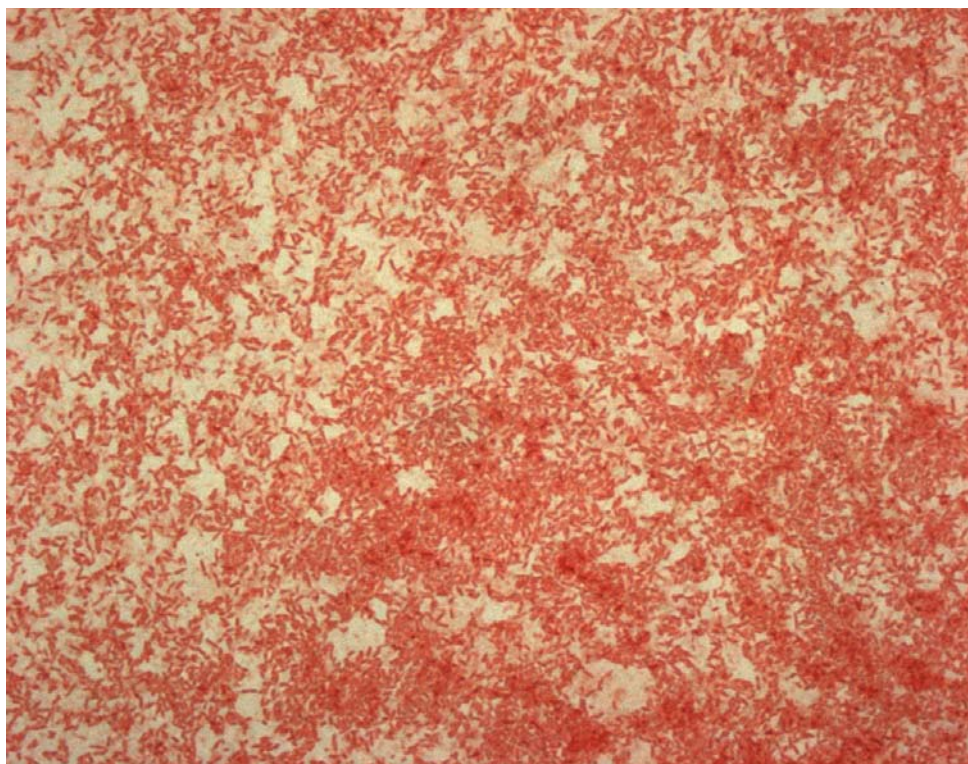


Figura 7. Fotomicrografia das células bacterianas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, cultivada em meio sólido Tryptic Soy Agar, corada pelo método de Gram, observada com objetiva de imersão em microscópio óptico Leica DMLB com câmera digital Leica DC 300 F acoplada, proporcionando um aumento de 1000x.

dextrose positiva com produção de gás, que é característico da *A. actinomycetemcomitans*, maltose positiva, uréia e sacarose negativa, confirmando a pureza da cepa empregada nos experimentos.

A curva de crescimento da *A. actinomycetemcomitans* foi acompanhada durante 72 horas (Figura 8). Foi observado durante as primeiras 14 horas pouco crescimento o que indica a fase Lag desta linhagem. Essa fase é o período de adaptação ao meio de cultura e as condições de cultivo que a linhagem bacteriana esta sendo cultivada. Após essas primeiras horas a linhagem bacteriana iniciou a fase exponencial que se caracteriza por apresentar inicialmente uma taxa lenta de aumento no numero de células que, posteriormente é acelerada. Com isso se observou um aumento “exponencial” dos números de células nos estágios finais (Figura 8). Células em crescimento exponencial geralmente se encontram nas condições mais saudáveis, com todas as suas reações metabólicas ativas (Madigan et al., 2004). A linhagem de *A. actinomycetemcomitans* atingiu a fase estacionária após 50 horas de cultivo (Figura 8), onde não foi observado mais aumento no número de células. Segundo Madigan et al. (2004) normalmente não ocorre crescimento nessa fase, mas muitas funções celulares podem ainda estar ativas, inclusive o metabolismo energético e alguns processos biossintéticos, neste período algumas células se dividem e outras morrem, os dois processos são equilibrados e não promovem alterações do número de células. Após esse período a linhagem entra na fase de morte ou de declínio.

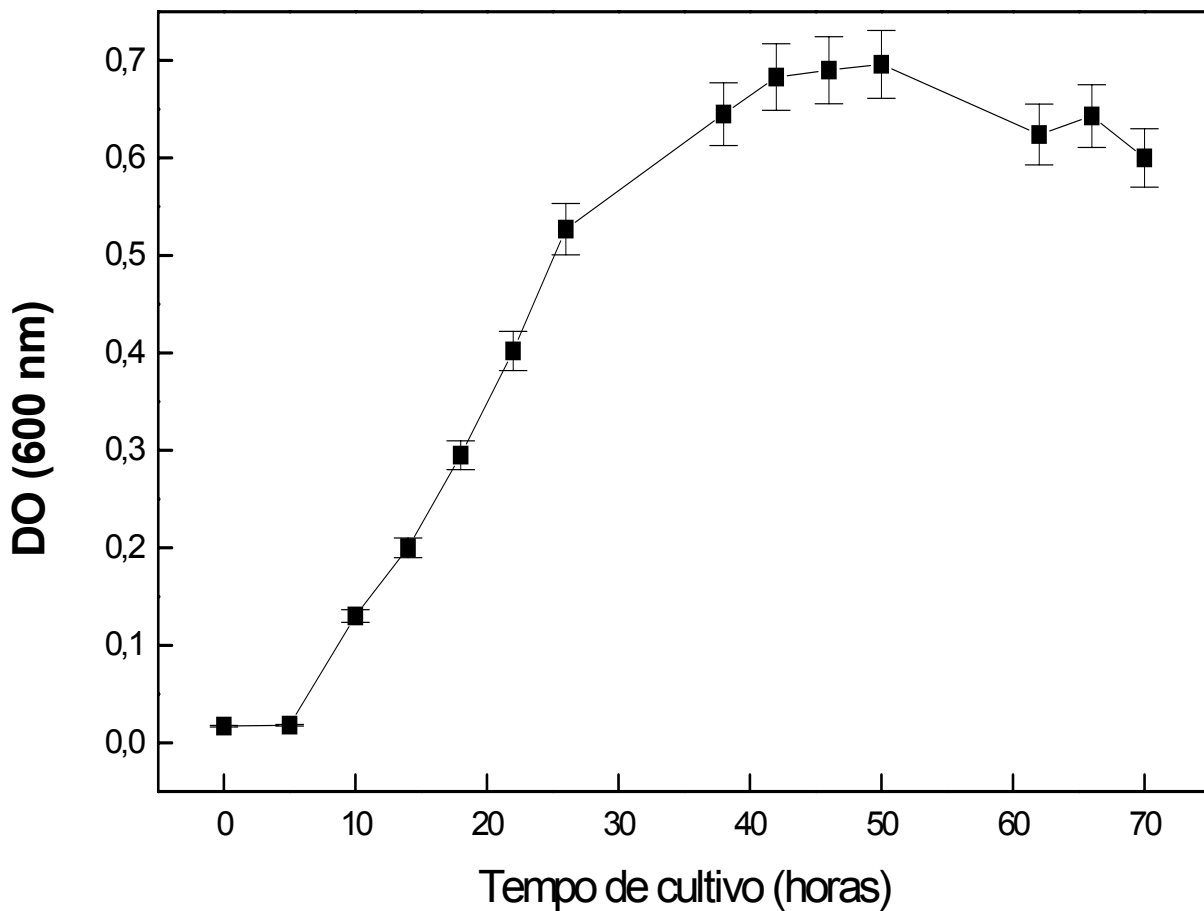


Figura 8. Curva de crescimento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, cultivada em meio líquido Tryptic Soy Broth a 37°C em microaerofilia. Foi feita a leitura da DO em 600 nm a cada quatro horas, durante 72 horas e a partir de uma alíquota de 1 mL foi feita a diluição seriada e plaqueado 50µL de cada diluição para realização da contagem de UFC, conforme descrito em Materiais e Métodos.

4.2 Avaliação da capacidade acidogênica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em meio planctônico.

A. actinomycetemcomitans inicialmente apresentou um discreto aumento do pH, que logo em seguida foi decaindo de acordo com o tempo de cultivo (Figura 9). Após esta etapa inicial, ocorre uma intensa liberação de ácido, e uma fase de decaimento do pH foi observado. Esse decaimento do pH pode ser devido a metabolização do açúcar contido no meio de cultivo (Dextrose 8,5%), com posterior produção de ácidos orgânicos que tornam o ambiente ácido. Essa característica também foi observada por Paulino et al. (2005b), em seu estudo com *Streptococcus mutans* devido ao metabolismo anaeróbico ou fermentativo.

4.3 Caracterização fotoquímica dos agentes fotossensíveis e seu emprego na TFD.

Após a padronização das condições de cultivo, a verificação da pureza da cepa e a análise do comportamento fisiológico de *A. actinomycetemcomitans*, foram iniciados os testes com os corantes usados como agentes fotossensibilizadores, para verificar qual seria a melhor condição para se aplicar a TFD.

Estudos envolvendo a utilização da TFD com fins bactericidas são realizados desde a década de 80 (Venezio et al., 1985). O efeito bactericida, antiviral e contra protozoários proveniente do uso de

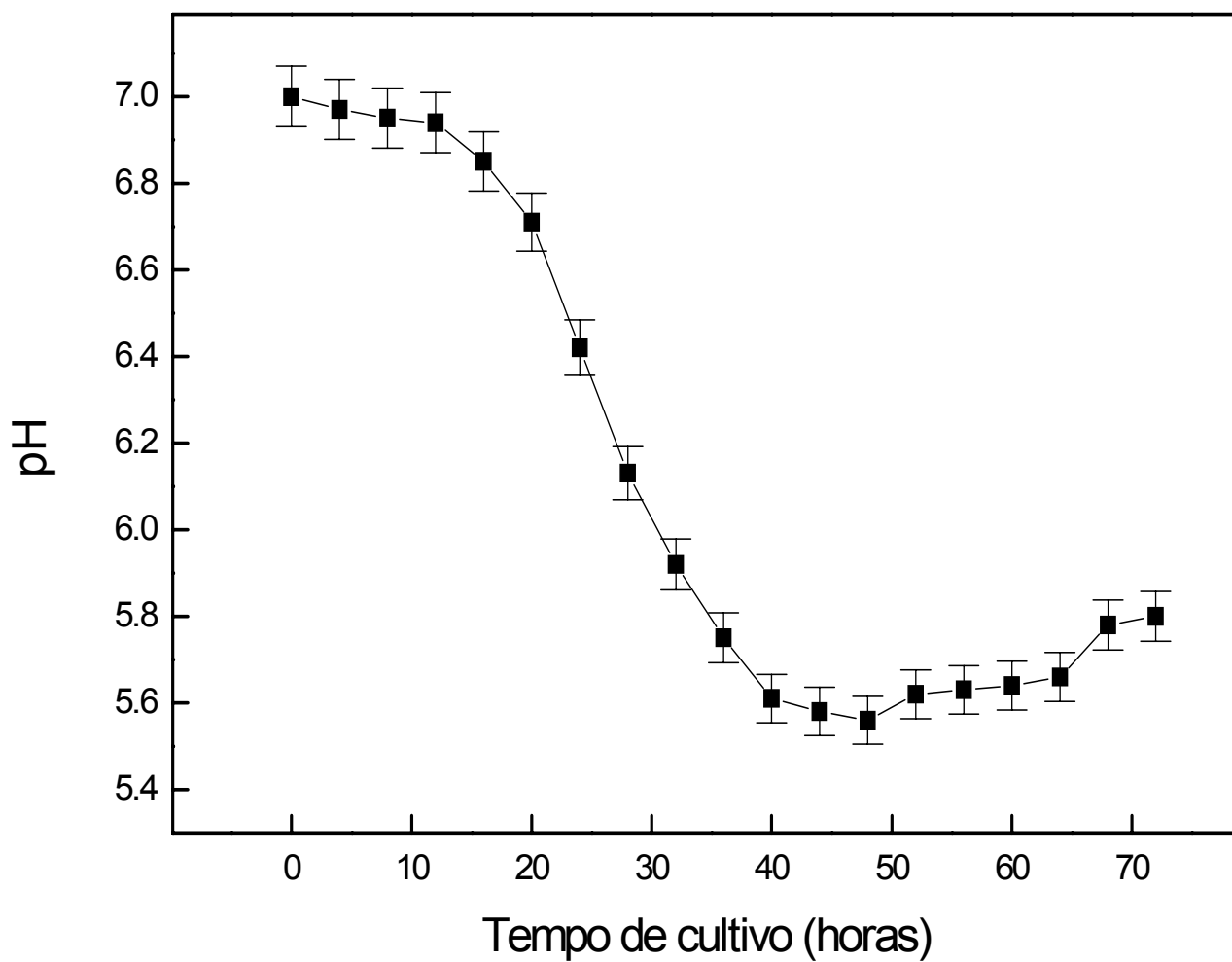


Figura 9. Monitoramento do pH em função do tempo de cultivo, da linhagem bacteriana *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, cultivada em meio Tryptic Soy Broth, conforme descrito em Materiais e Métodos.

fotossensibilizadores como azul de metileno são relatados desde a segunda guerra mundial (Azarpazhooh et al., 2009).

Desta forma, ente os agentes fotossensíveis foram avaliados quanto aos seus aspectos fotoquímicos e fotofísicos para que posteriormente pudessem ser empregados corretamente na inativação de *A. actinomycetemcomitans* em meio plactônico ou em biofilme, aplicando a TFD.

4.3.1 Rose Bengal

4.3.1.1 Caracterização fotoquímica do Rose Bengal

O Rose Bengal, também chamado de Rosa bengala é a 4,5,6,7-tetracloro-2,4,5,7-tetraidrofluoresceína, um corante comumente utilizado como colírio, em consultórios oftalmológicos, para identificação de células da córnea ou células com lesões (Singh, et al., 2004).

O Rose Bengal é um agente fotossensível muito empregado na TFD, este agente fotossensível possui uma grande capacidade de se localizar na membrana plasmática de mamíferos, formando altas quantidades de oxigênio singleto e levando estas células à morte e, por esta razão, seu emprego na clínica com finalidade terapêutica tem sido evitado (Kochevar et al., 1996; Watchter et al., 2003). Entretanto em baixas concentrações pode ser usado no tratamento tópico de doenças odontológicas (Paulino et al., 2005b). Quanto aos seus aspectos fotoquímicos, estudos já realizados demonstram uma banda de absorção de luz na faixa de 500 a

600 nm e, de fato, na Figura 10 está mostrado o espectro de absorção do Rose Bengal (4,0 μM em PBS), cuja banda de absorção no espectro do visível (450-600 nm) é semelhante ao descrito por outros autores (Kochevar et al., 1996; Stiel et al., 1996).

4.3.1.2 Efeito da toxicidade no escuro e da TFD sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em meio planctônico e em fibroblastos utilizando-se o Rose Bengal

Para a aplicação da TFD é muito importante que a concentração do fotossensibilizador seja uma concentração que não apresente toxicidade para células humanas. Podemos observar nos resultados mostrados na Figura 11 que fibroblastos gengivais não são afetados quando se usam concentrações de Rose Bengal até 1 μM . Resultados similares foram obtidos por Mousavi et al. (2006) que verificou que baixas concentrações de Rose Bengal (5-10 μM) *per se* não matam células do tecido epitelial e de fibroblastos. Esta avaliação também foi feita por Paulino et al. (2005a; 2005b) empregando-se fibroblastos.

O Rose Bengal nas concentrações de 0,01 e 0,1 μM não apresentaram toxicidade *per se* às células de *A. actinomycetemcomitans*, pois estas apresentaram 94,1% de viabilidade celular para a concentração de 0,01 μM e 82,4% de viabilidade celular para a concentração de 0,1 μM . Quando a concentração de Rose Bengal passa para 1,0 μM foi observado

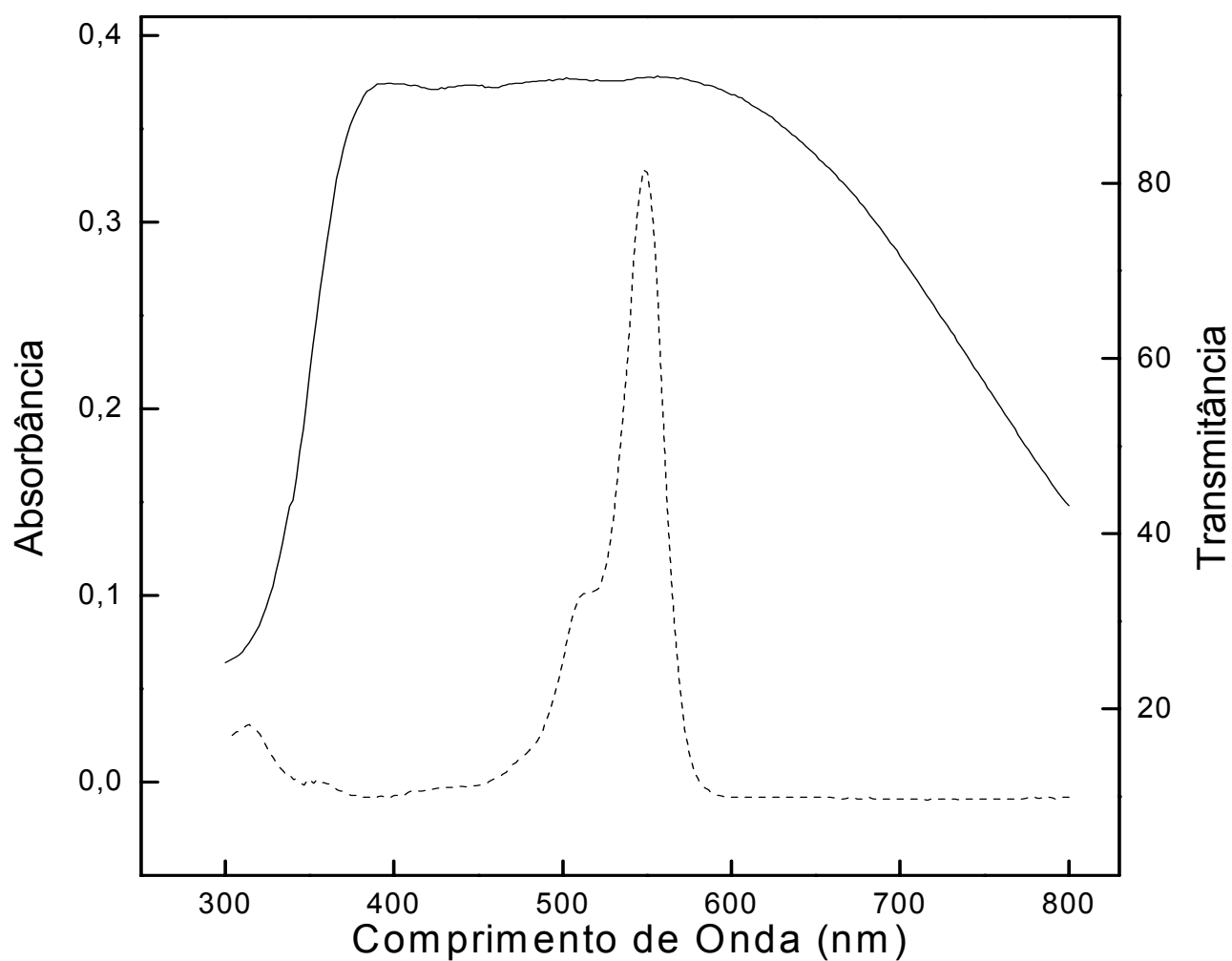


Figura 10. Espectro de absorção do Rose bengal 4.0 $\mu\text{mol/L}$ em tampão PBS pH 7.4 (linha pontilhada) e espectro de transmitância do filtro do fotopolimerizador de resina odontológica (linha sólida).

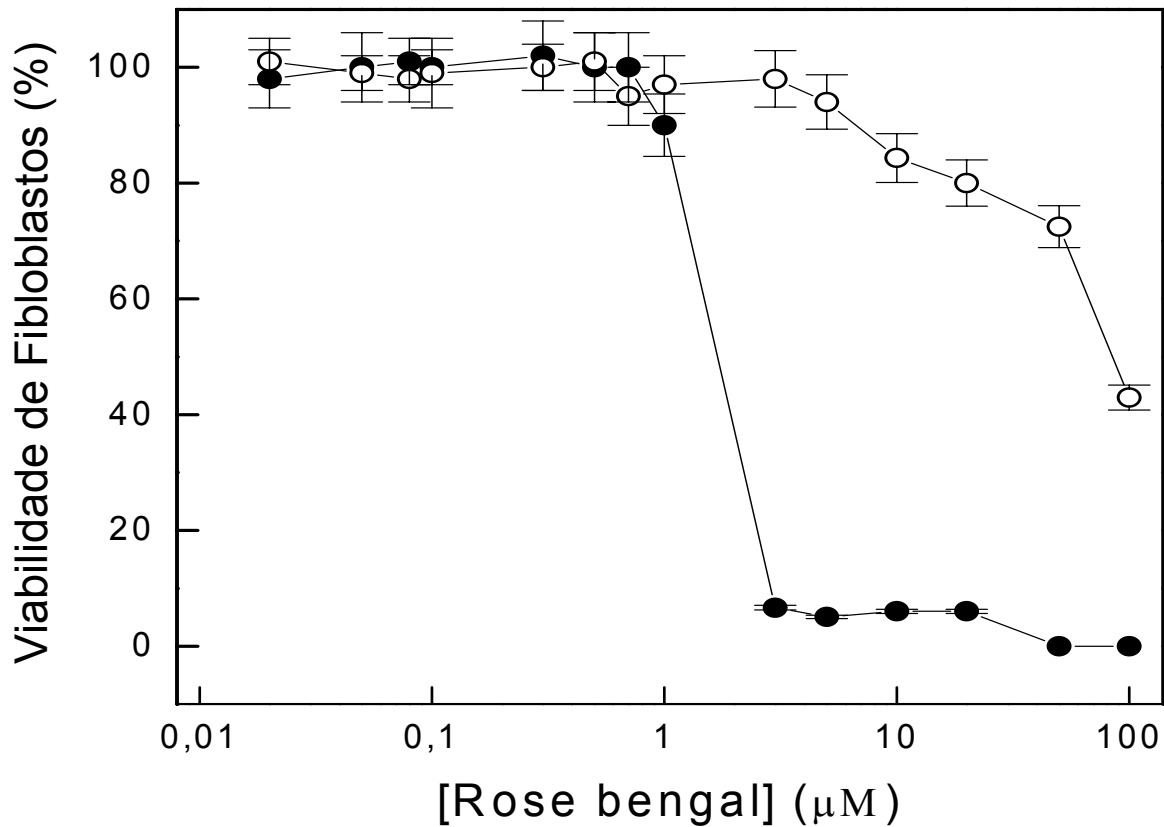


Figure 11. Viabilidade de Fibroblastos em presença de varias concentrações de Rose bengal, com (circulos fechados) ou sem (circulos abertos) irradiação de luz (0.65 J/cm^2). Um mL da suspensão celular (0.7×10^6 células) foi avaliado como indicado e as células foram isoladas por centrifugação, lavadas com HBSS e cultivadas em meio de crescimento DMEM/F-12. Posteriormente, a cultura foi incubada por 24 horas a 37°C em uma estufa de CO_2 . A viabilidade de fibroblastos foi calculada usando uma câmara de Neubauer's com Trypan Blue conforme descrito em Materiais e Métodos.

58,8% de viabilidade celular, aumentando a concentração à sensibilidade da célula bacteriana também foi aumentada, pois nas concentrações de 10 μM , apresentou 17,7% de viabilidade celular e 50 μM é uma concentração que foi capaz de inibir totalmente o desenvolvimento celular de *A. actinomycetemcomitans* (Figura 12).

Quando se aplicou a TFD verificamos que a irradiação durante 1 minuto com o fotopolimerizador (0,65 J/cm²) empregando-se Rose Bengal 0,01 μM inibe 23,3% das células bacteriana, e a concentração de 0,1 μM inibe 34% (Figura 13). Indicando que a fotoirradiação mesmo em baixas concentrações de corante pode levar a uma redução na viabilidade do crescimento de *A. actinomycetemcomitans*. O que também foi observado por vários autores empregando-se outras bactérias (Bhatti, 1998; Paulino et al., 2005a; 2005b).

Diante destas condições decidimos trabalhar dentro de uma faixa de concentração de Rose Bengal, que não promove a morte celular (no escuro), 1,0 μM e 0,5 μM . E para verificar se pode ocorrer um aumento na faixa de mortalidade da linhagem bacteriana foi variado o tempo de contato com o corante antes da irradiação e o tempo de irradiação.

Foi observado que durante dez minutos de contato com o corante Rose Bengal na concentração de 1,0 μM e um minuto de irradiação a viabilidade das células bacterianas é reduzida em 14%, quando o tempo de irradiação passa para três minutos o percentual de redução da viabilidade da linhagem bacteriana em estudo passa para 17,5%. Nesta mesma concentração de Rose Bengal, quando o tempo de contato com a

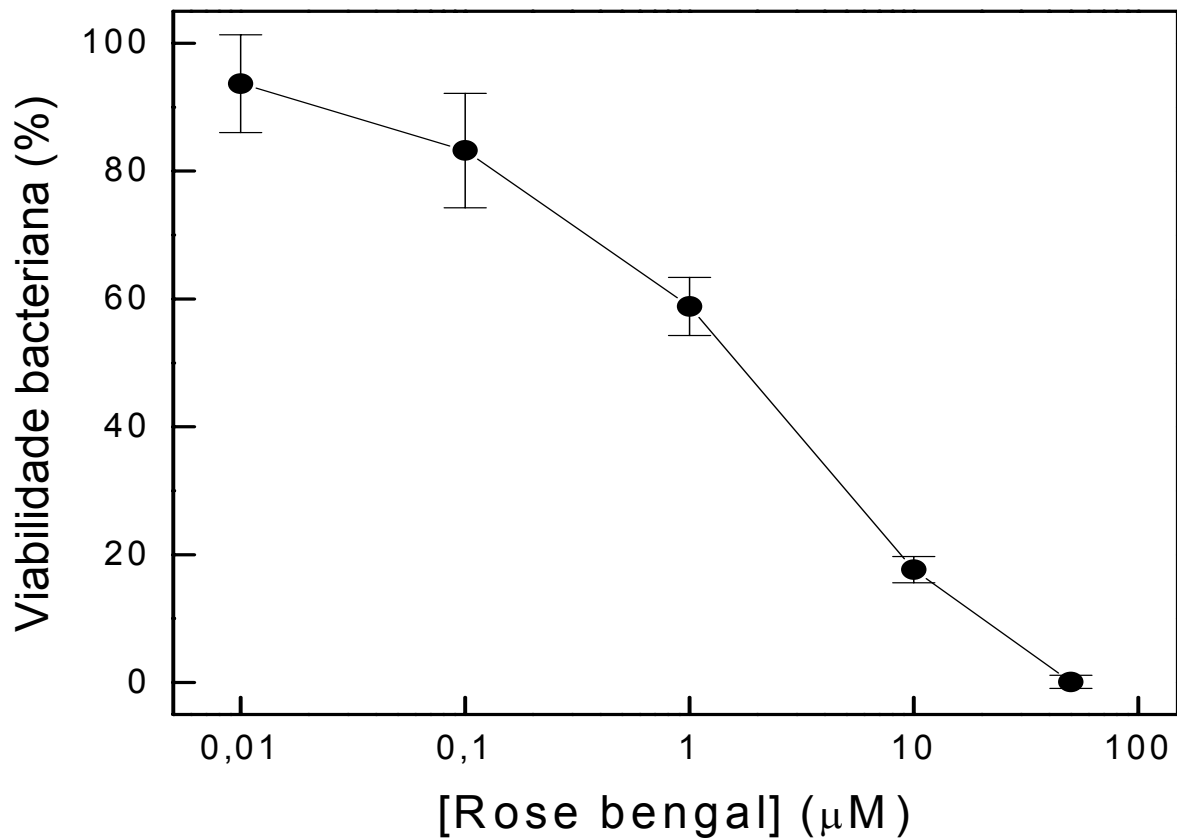


Figura 12. O efeito da concentração de Rose bengal (no escuro) sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Um mL (10^3 UFC) da suspensão bacteriana foi pré-incubado com diferentes concentrações de Rose bengal, por 10 minutos e 50 μL da suspensão foi inoculado em meio TSB. As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia por 72 horas para determinar as células viáveis conforme descrito em Materiais e Métodos.

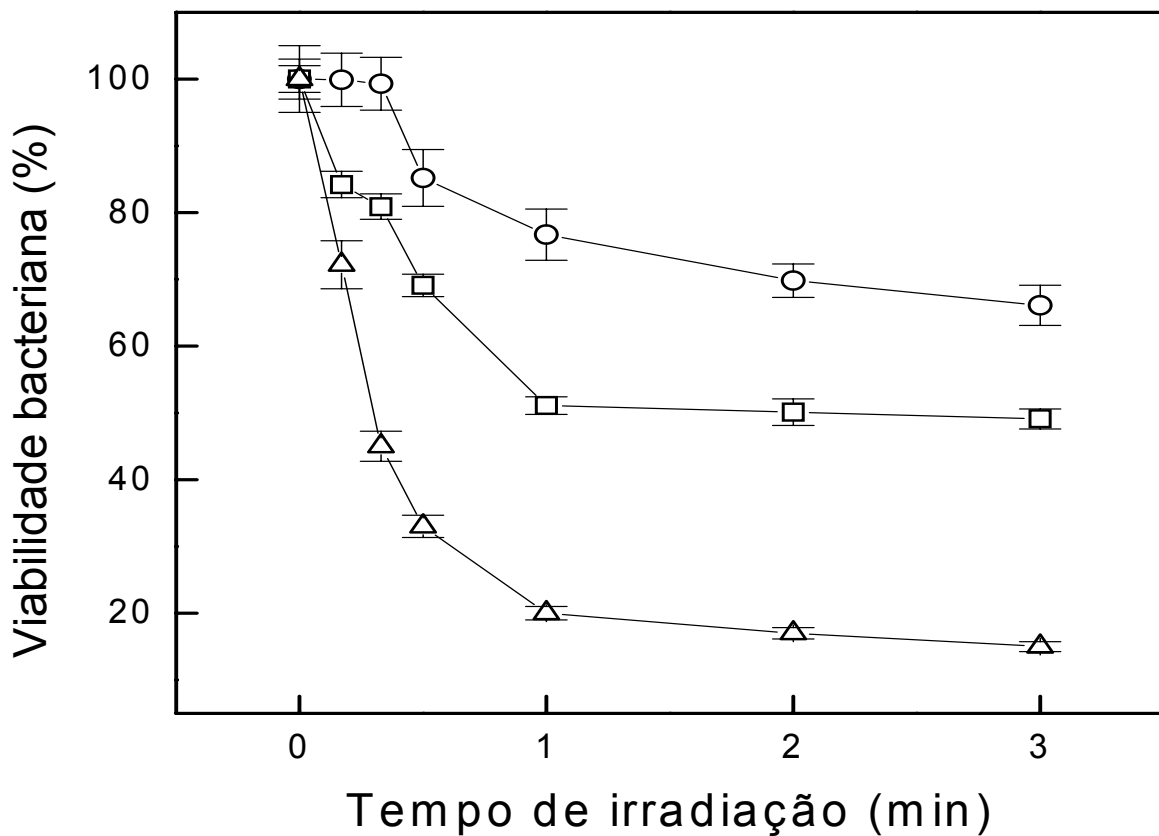


Figura 13. O efeito do tempo de irradiação sobre a viabilidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, incubada com diferentes concentrações de Rose bengal. Um mL (10^3 UFC) da suspensão bacteriana foi pré-incubada com 0,01 µM (círculos) e 0,1 µM (quadrados) e 0,5 µM (triângulos), e irradiada por 1, 2 e 3 minutos. Posteriormente 50 µL da suspensão foi inoculada em meio TSB. As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia por 72 horas para determinar as células viáveis, conforme descrito em Materiais e Métodos.

droga antes da irradiação passa a ser de 30 minutos, é observado que com um minuto de irradiação uma viabilidade de 50,6% e três minutos de irradiação, uma viabilidade de 45,6 % de células bacterianas (Figura 14).

Observando esses resultados verificamos que para a concentração de 1,0 μM Rose Bengal o melhor tratamento é manter 30 minutos de contato com o corante antes de irradiar, e aumentar o tempo de irradiação para três minutos.

Em todas as condições estudadas, o aumento da dose de luz resultou em uma diminuição da viabilidade bacteriana (Figura 13) que claramente indica que os compostos produzidos pela foto ativação são responsáveis pela morte das células bacterianas. Similares resultados foram observados por outros autores, que usaram diferentes corantes, fonte de luz e organismo. Por exemplo, Bhatti et al. (1998) usaram azul de toluidina e laser HeNe ($0,88 \text{ J/cm}^2$) para fotoinativar *Porphyromonas gingivalis*, que juntamente com *A. actinomycetemcomitans* é dos patógenos periodontais. Paulino et al. (2005a; 2005b) fotoinativaram *S. mutans* usando um fotopolimerizador como fonte de luz ($\sim 0,5 \text{ J/cm}^2$) e Rose Bengal como corante fotossensibilizador. Além disso, estes mesmos autores mostraram que a morte de *S. mutans* induzida depois da TFD foi obtida sem incubação prévia com o corante, demonstrando que a toxicidade para essas células é provavelmente devido à produção de espécies reativas no meio extracelular e não exclusivamente no meio intracelular. Isso pode não ocorrer com *A. actinomycetemcomitans*, que é uma bactéria Gram negativa que apresenta estruturas na superfície da

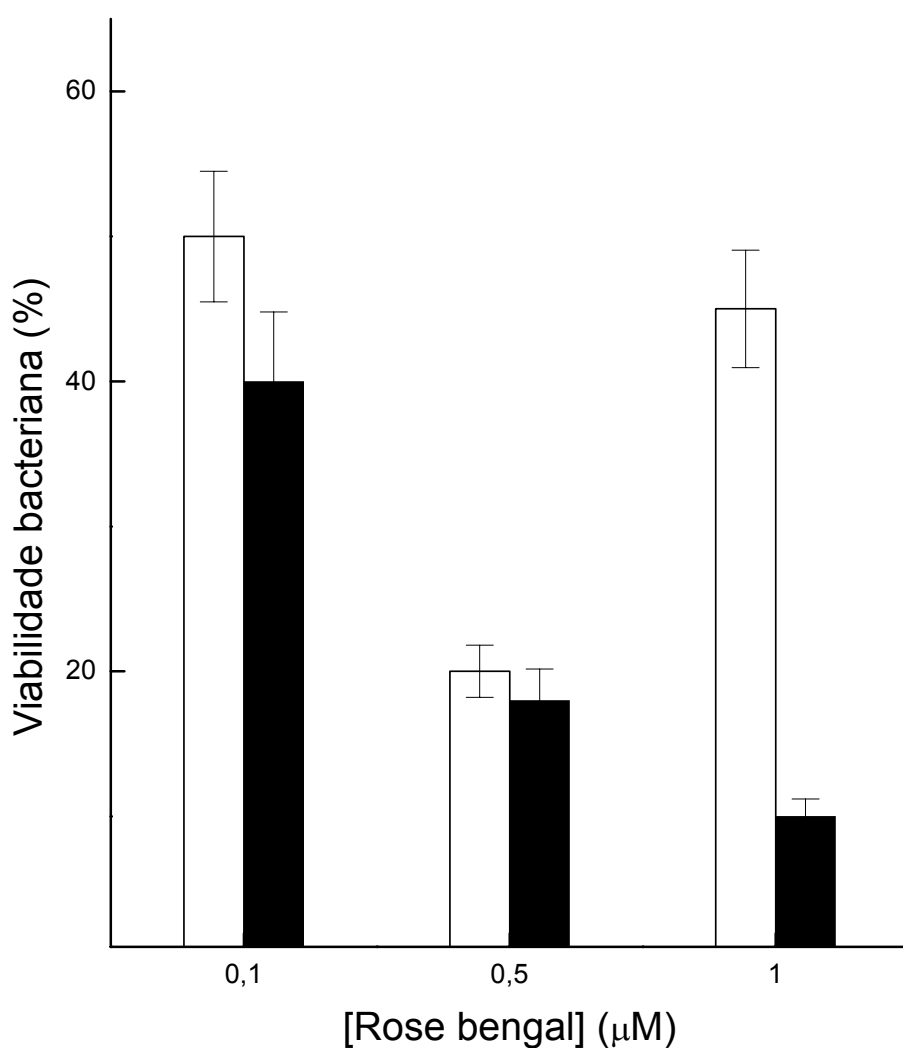


Figura 14. O efeito do tempo de pré-incubação com Rose bengal sobre a viabilidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Um mL (10^3 UFC) da suspensão bacteriana foi pré-incubada por 10 (barra aberta) e 30 minutos (barra cheia) com diferentes concentrações de Rose bengal e irradiada por um minuto. Posteriormente 50 µL da suspensão foi inoculada em meio TSB. As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia por 72 horas para determinar as células viáveis, conforme descrito em Materiais e Métodos.

membrana bem diferentes que *S. mutans* (Gram positiva). Para esse organismo, algum tempo de contato com o corante, antes da irradiação é necessário (Figura 14), provavelmente para permitir a interação do Rose Bengal com a parede celular, preencher o espaço periplasmático, da membrana plasmática ou ainda o seu acúmulo no citoplasma. De fato, 30 minutos de contato com o corante antes da irradiação é o período mais eficiente para inativar *A. actinomycetemcomitans* em todas as concentrações de Rose Bengal usada.

Na Figura 14 também pode ser observado que, quando 1,0 μM de Rose Bengal é usado houve uma significativa variação da viabilidade bacteriana depois da TFD com 10 ou 30 minutos de pré-incubação. Isto é porque em altas concentrações o corante pode formar agregadas, diminuindo sua eficiência e requerendo um tempo adicional para alcançar o local de ação efetiva. As características fotoquímicas e fotofísicas de Rose Bengal relativas a produção de oxigênio singlete, rendimento quântico, emissão de fluorescência, absorção transiente, decaimento triplete, emissão de fosforescência e rendimento quântico para produção de EROs, são bem descritas (Larkin et al., 2002; Rodríguez et al., 2004) mostrando que, em condições experimentais específicas, esse corante poderá formar dímeros, ou outros agregados superiores, que resultam em um amplo espectro de absorção e variações nas propriedades fluorescentes, reduzindo significativamente a produção de EROs (Bilski et al., 1997). Atualmente, estudos usando sistemas de desagregação de

corante revelaram uma melhora de eficiência e foram capazes de aumentar a fotoatividade nos estudos de TFD (Simioni et al., 2008).

4.3.2 Azul de metileno

4.3.2.1 Caracterização fotoquímica do Azul de metileno

Um outro fotossensibilizador estudado foi o corante fenotiazínico Azul de Metileno o qual absorve luz na região de 665 nm, podendo ser irradiado com o fotopolimerizador de resina odontológica como pode ser observado na Figura 15.

Azul de Metileno é um corante que é rotineiramente empregado na medicina e na odontologia sem causar toxicidade a células humanas. Por exemplo, Soukos et al. (1996) e Wainwright (1998) mostraram que Azul de metileno é usado em procedimentos cirúrgicos em concentrações relativamente altas (1% (p/v), que corresponde a 26,7 mM) sem causar toxicidade humana. Azul de metileno também é usado clinicamente a mais de cem anos para tratar encefalopatia, metemoglobinemia, urolitiasi e envenenamento por cianeto. Uma dosagem de 13,4 mM é comumente usado para corar o esôfago de pacientes com historia de esôfago Barrett's e lesões bronquiais (Aghahosseine et al., 2006).

Não foram realizados os testes de toxicidade de Azul de Metileno sobre fibroblastos uma vez que as concentrações usadas nesse trabalho foram menores que as empregadas em uso clínico, como descrito anteriormente, que podem ser administradas em humanos por via oral e

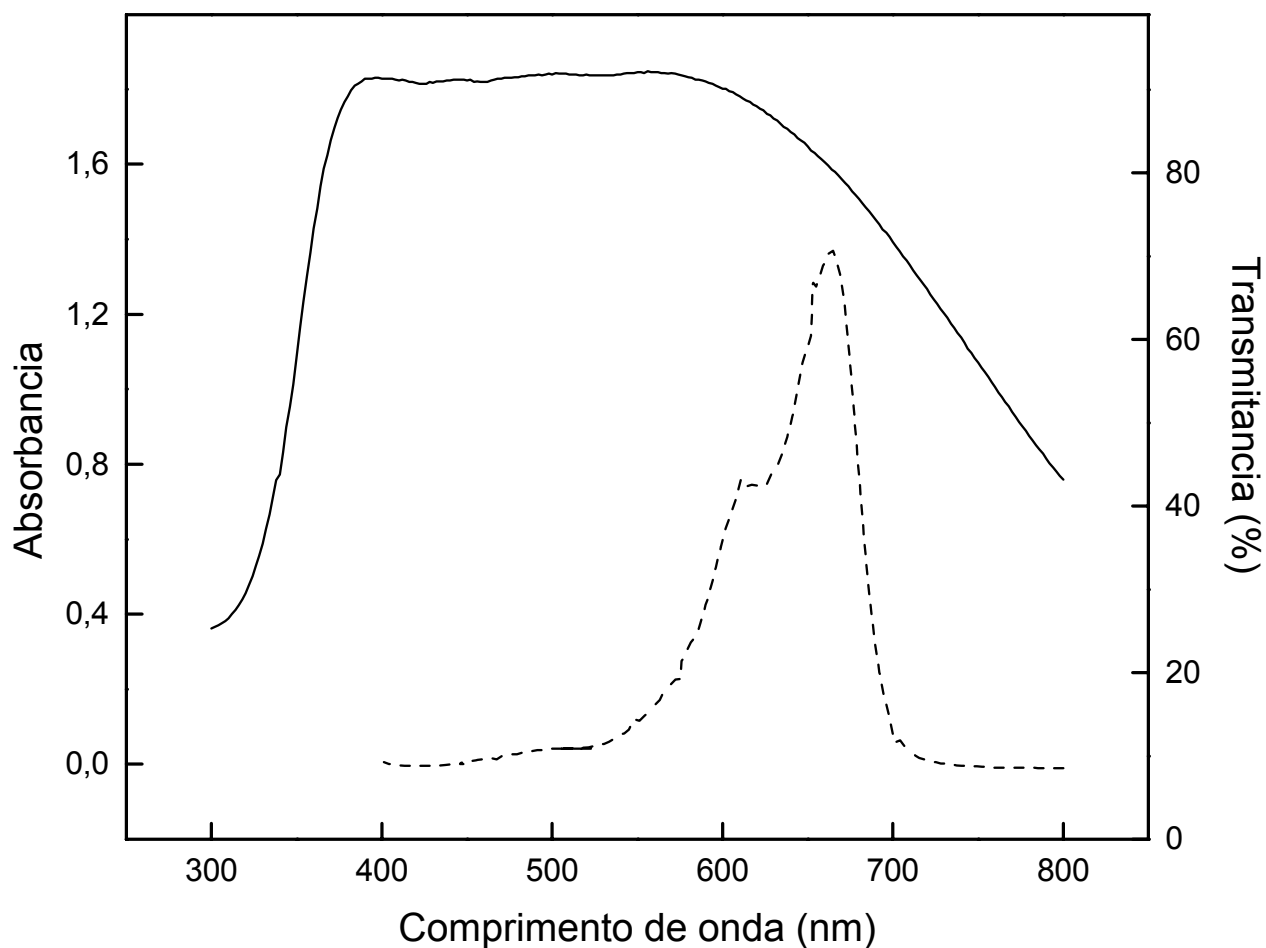


Figura 15. Espectro de absorção do Azul de Metileno 26 μM em água destilada (linha pontilhada) e espectro de transmitância do filtro do fotopolimerizador de resina odontológica (linha sólida).

endovenosa em altas doses sem causar nenhum efeito tóxico (Aghahosseine et al., 2006).

4.3.2.2 Efeito da toxicidade no escuro e da TFD sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em meio planctônico utilizando-se o Azul de Metileno

Para verificar a toxicidade no escuro de Azul de Metileno utilizamos dois tempos de pré-incubação 10 minutos e 30 minutos. Com 10 minutos de pré-incubação a concentração 0,05 μM não apresentou nenhuma toxicidade para as células de *A. actinomycetemcomitans*, o mesmo efeito foi observado quando o tempo de pré-incubação foi 30 minutos nesta mesma concentração. Por outro lado, 0,1 μM apresentou pouca toxicidade, pois foi observado 95% de viabilidade de *A. actinomycetemcomitans*, com 10 minutos de pré-incubação e 98% de viabilidade com 30 minutos de pré-incubação. A concentração de 0,5 μM apresentou 82% com 10 minutos e 84% com 30 minutos, 1,0 μM com 10 minutos de pré-incubação apresentou 80% de viabilidade e com 30 minutos 76% de viabilidade. 5,0 μM apresentaram 80,7% e 72% de viabilidade com 10 e 30 minutos de pré-incubação respectivamente. 10 μM observamos 76% e 69% de viabilidade, 15 μM foi a concentração que apresentou maior toxicidade com 59% e 50% de viabilidade nos respectivos tempos de pré-incubação de 10 e 30 minutos (Figura 16).

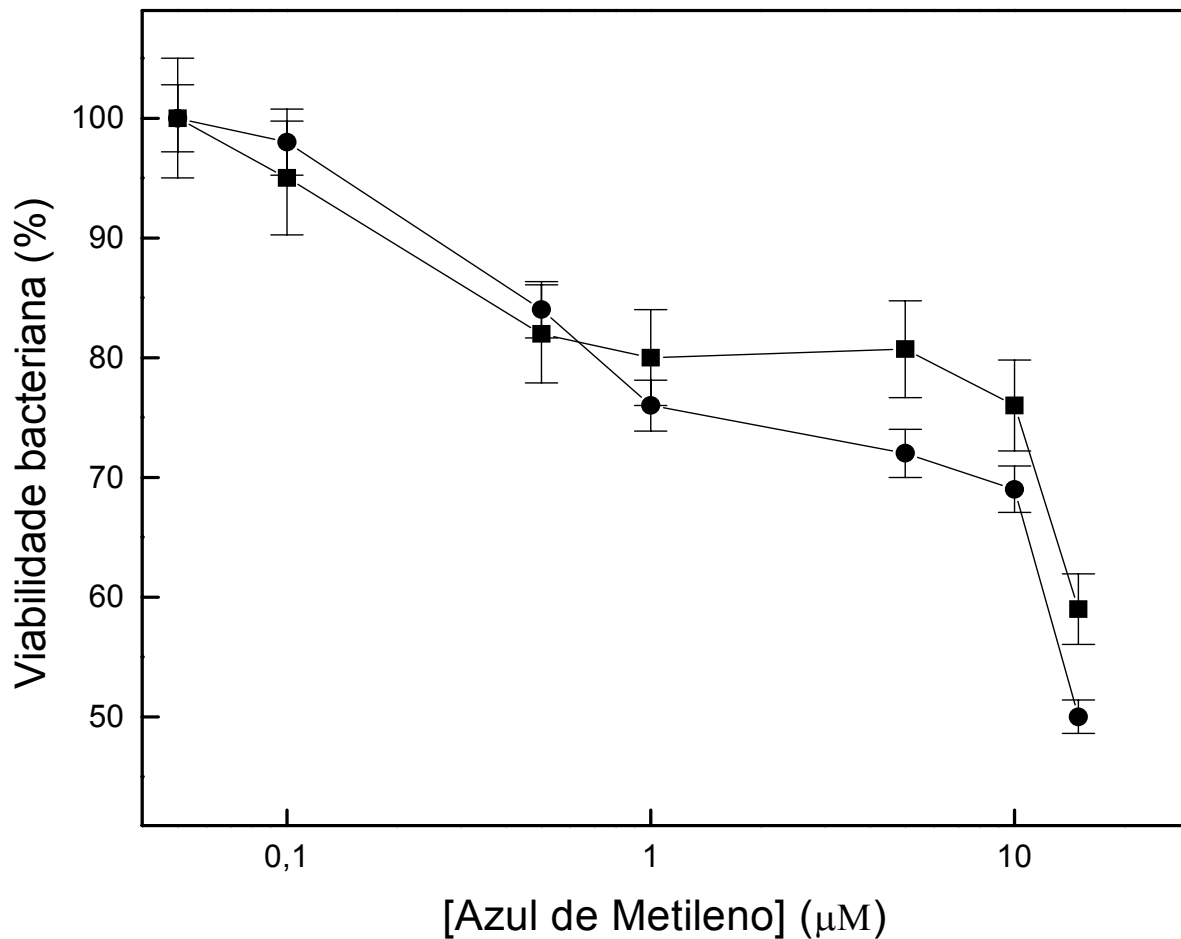


Figura 16. O efeito da concentração de azul de metileno (no escuro) sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Um mL (10^3 UFC) da suspensão bacteriana foi pré-incubado com diferentes concentrações de Azul de Metileno, por 10 minutos (quadrados) e 30 minutos (círculos), 50 μ L da suspensão foi inoculado em meio TSB. As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia por 72 horas para determinar as células viáveis, conforme descrito em Materiais e Métodos.

A fotossensibilização de *A. actinomycetemcomitans* com o corante Azul de Metileno 0,5 μM irradiada durante um minuto (0,65 J/cm²) proporcionou que a viabilidade de 84% (sem irradiação) diminuísse para 75%, e com 3 minutos de irradiação para 66%. Com 1,0 μM a diminuição foi ainda maior de 76% (sem irradiação) para 59% com 1 minuto e 50% com 3 minutos de irradiação (Figura 17). Esses resultados nos mostram que a fotossensibilização de *A. actinomycetemcomitans* empregando Azul de Metileno é relativamente eficiente. Segundo Ploi (2008) e Usacheva et al. (2001), isso provavelmente se deve ao fato da facilidade que este corante tem em atravessar a parede celular de bactérias, porque sua carga positiva lhe permite interagir facilmente ao lipopolissacarídeo de carga negativa presente na parede celular de bactérias Gram negativa e desenvolver sua atividade fotodinâmica.

Os maiores efeitos da fotossensibilização sobre a viabilidade da bactéria, usando Azul de metileno foi com a concentração de 1,0 μM . Esta concentração esta abaixo da usualmente empregadas em procedimentos cirúrgicos e para tratamento de diversas doenças (Wainwright, 1998; Soukos et al., 1996; Aghahosseine et al., 2006).

Ploi et al., (2008) verificou que o azul de metileno usado como fotossensibilizador, foi eficiente para inibir o crescimento tanto de organismos procariontes e eucariontes, quanto de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Chan e Lai (2003) também verificaram que aproximadamente 0,27 μM de Azul de Metileno associado a um laser diodo emitindo 21,2 J/cm² promove a morte de 40% de muitas espécies

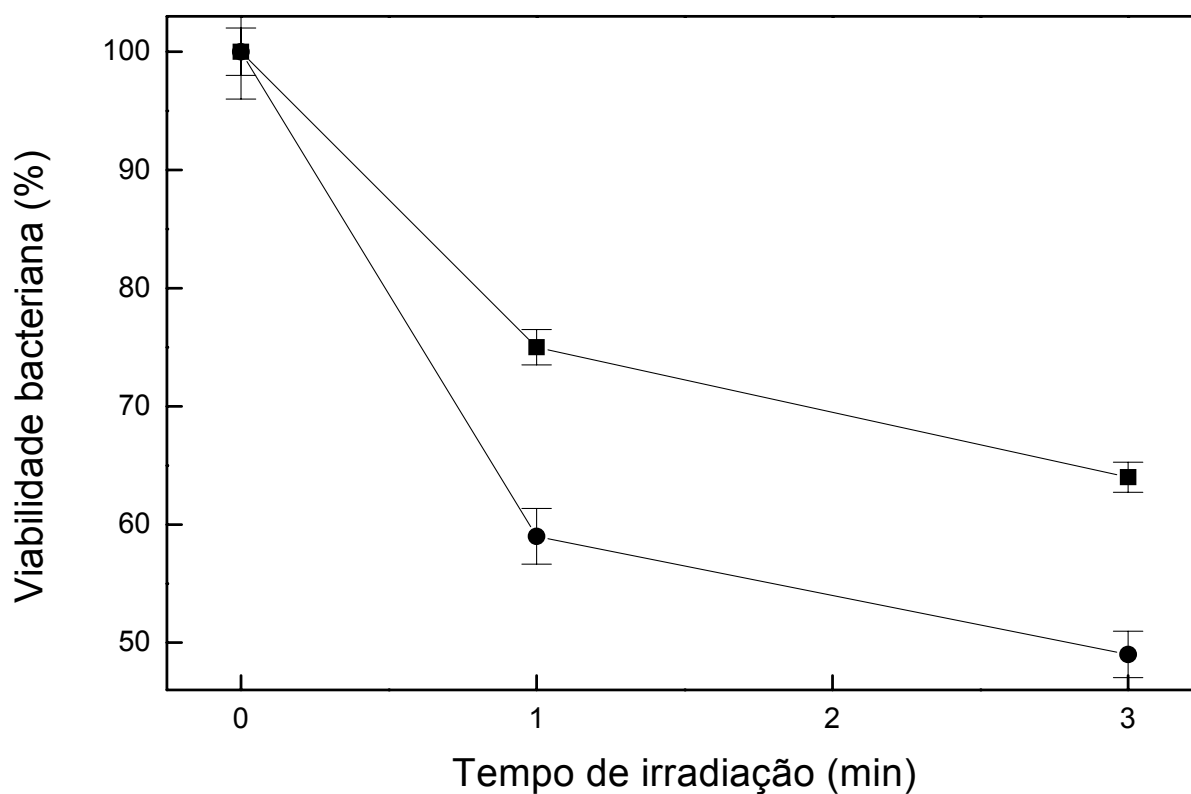


Figura 17. O efeito do tempo de irradiação sobre a viabilidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, incubada com diferentes concentrações de Azul de Metileno. Um mL (10^3 UFC) da suspensão bacteriana foi pré-incubado com Azul de metileno nas concentrações 0,5 µM (quadrados) e 1,0 µM (círculos), e irradiada por 1 e 3 minutos, conforme descrito em Materiais e Métodos.

de microrganismos pertencentes a microbiota oral, e essa combinação de corante e laser pode eliminar 95% das células de *A. actinomycetemcomitans*.

4.3.3 Eritrosina

4.3.3.1 Caracterização fotoquímica da Eritrosina

O ultimo corante empregado nesse estudo foi a Eritrosina que apresenta espectro de absorção em 536 nm, estando também dentro da faixa de emissão de luz do fotopolimerizador de resina odontológica que varia de 300 a 800 nm (Figura 18).

Eritrosina tem atividade antimicrobial contra bactérias Gram (+) e Gram (-), é usada em procedimentos odontológicos para visualizar placa dental em concentrações de 9 a 25 μM (Wood et al., 2006; Perussi, 2007).

4.3.3.2 Efeito da toxicidade no escuro e da TFD sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em meio planctônico utilizando-se a Eritrosina

Para verificar a toxicidade no escuro de Eritrosina foram empregadas as concentrações variando de 0,001 a 10,0 mM e também foi utilizado dois tempos de pré-incubação 10 e 30 minutos. Com 10 minutos de pré-incubação a concentração 0,1 μM não apresentou nenhuma toxicidade

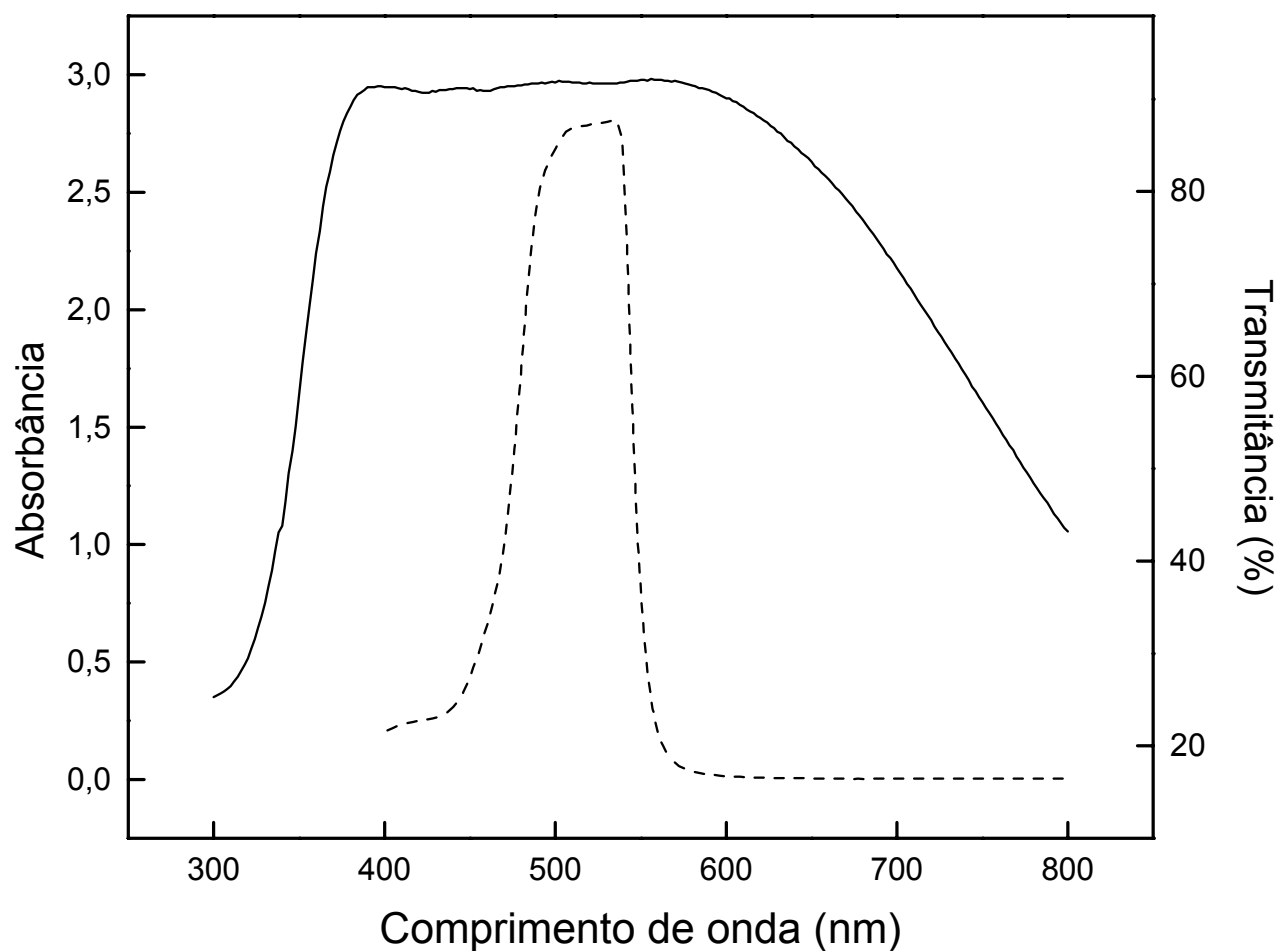


Figura 18. Espectro de absorção da Eritrosina 0,1 μ M em água destilada (linha pontilhada) e espectro de transmitância do filtro do fotopolimerizador de resina odontológica (linha sólida).

para as células de *A. actinomycetemcomitans*, o mesmo efeito foi observado quando o tempo de pré-incubação foi 30 minutos nesta mesma concentração. A concentração de 0,5 μ M apresentou pouca toxicidade pois foi observado 98% de viabilidade das células de *A. actinomycetemcomitans*. com 10 minutos de pré-incubação e 95% de viabilidade com 30 minutos de pré-incubação. A concentração de 1 μ M apresentou 87% com 10 minutos e 86% com 30 minutos, 0,01 mM com 10 minutos de pré-incubação apresentou 82% de viabilidade e com 30 minutos 79% de viabilidade. Já na concentração de 0,1 mM apresentou 68% e 59% de viabilidade com 10 e 30 minutos de pré-incubação respectivamente. 1,0 mM observamos 59% e 55% de viabilidade, 10 mM foi a concentração que apresentou maior toxicidade com 43% e 48% de viabilidade nos respectivos tempos de pré-incubação de 10 e 30 minutos (Figura 19).

Eritrosina apresentou menor toxicidade *per se* à linhagem bacteriana *A. actinomycetemcomitans* do que o Azul de Metileno e Rose Bengal, em todas as concentrações estudadas. O tempo de pré-incubação de 30 minutos promoveu uma maior toxicidade do que o tempo de 10 minutos (exceto para a concentração de 10 mM), indicando provavelmente que a permeabilidade de Eritrosina à membrana biológica de *A. actinomycetemcomitans* é mais efetiva do que a do Azul de Metileno. Apesar da concentração de 10 mM de Eritrosina ter apresentado um efeito tóxico para *A. actinomycetemcomitans* este corante é rotineiramente empregada em procedimentos odontológicos, para visualizar placa dental

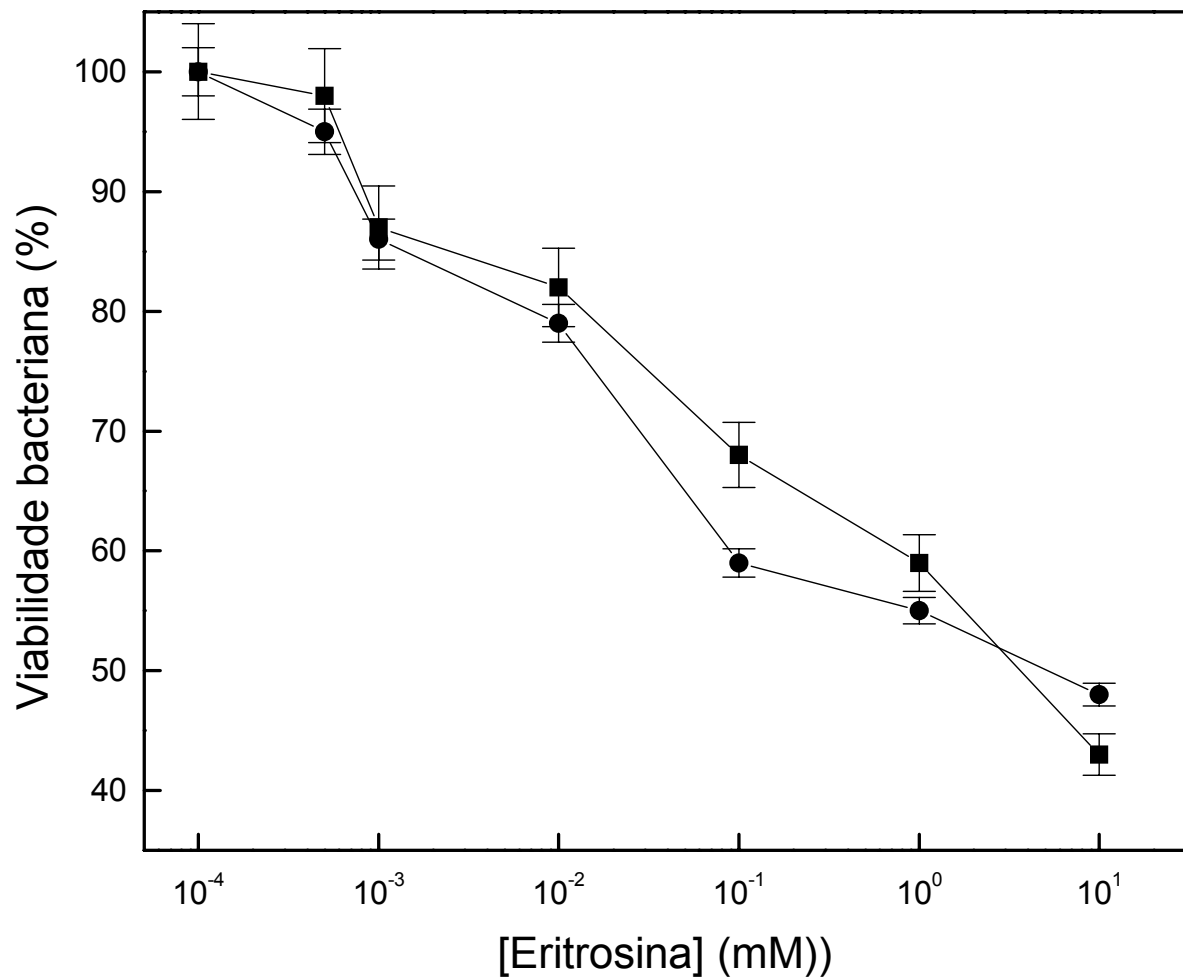


Figura 19. O efeito da concentração de Eritrosina (no escuro) sobre a viabilidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Um mL (10^3 UFC) da suspensão bacteriana foi pré-incubado com diferentes concentrações de Eritrosina, por 10 minutos (quadrados) e 30 minutos (círculos), 50 μ L da suspensão foi inoculado em meio TSB. As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia por 72 horas para determinar as células viáveis, conforme descrito em Materiais e Métodos.

em concentrações bem mais altas do que as concentrações empregadas nesse experimento (Wood et al., 2006).

Para verificar o efeito da fotossensibilização do corante Eritrosina foi empregado o tempo de pré-incubação de 30 minutos que demonstrou ser o mais efetivo sobre a sensibilização das células de *A. actinomycetemcomitans* e as concentrações de 0,5 e 1,0 μM .

A irradiação da bactéria na presença de Eritrosina durante 1 minuto na concentração de 0,5 μM apresentou viabilidade de 61% e com 3 minutos de irradiação 41%. Com 1,0 μM a redução foi ainda maior 56% com 1 minuto de irradiação e 25% com 3 minutos de irradiação (Figura 20), diminuindo 30% da viabilidade observada sem a irradiação.

Verificamos que a Eritrosina apresentou uma atividade bactericida na aplicação da terapia fotodinâmica, muito maior que a observada quando usamos Rose Bengal e Azul de Metileno. O mesmo foi observado por Wood et al. (2006) quando comparou o uso de Eritrosina com Fotofrim e Azul de metileno para fotossensibilizar o biofilme de *Streptococcus mutans*. Metcalf et al. (2006) também verificou que Eritrosina é um eficiente agente fotossensibilizador, principalmente quando se aplica irradiação contínua.

Na Tabela 1 podemos comparar a viabilidade da cultura de *A. actinomycetemcomitans* em meio planctônico, no escuro e diante da TFD com os três agentes fotossensibilizadores usados nesse trabalho. A Eritrosina foi o agente fotossensibilizador que apresentou maior efeito sobre a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* (75% de redução da

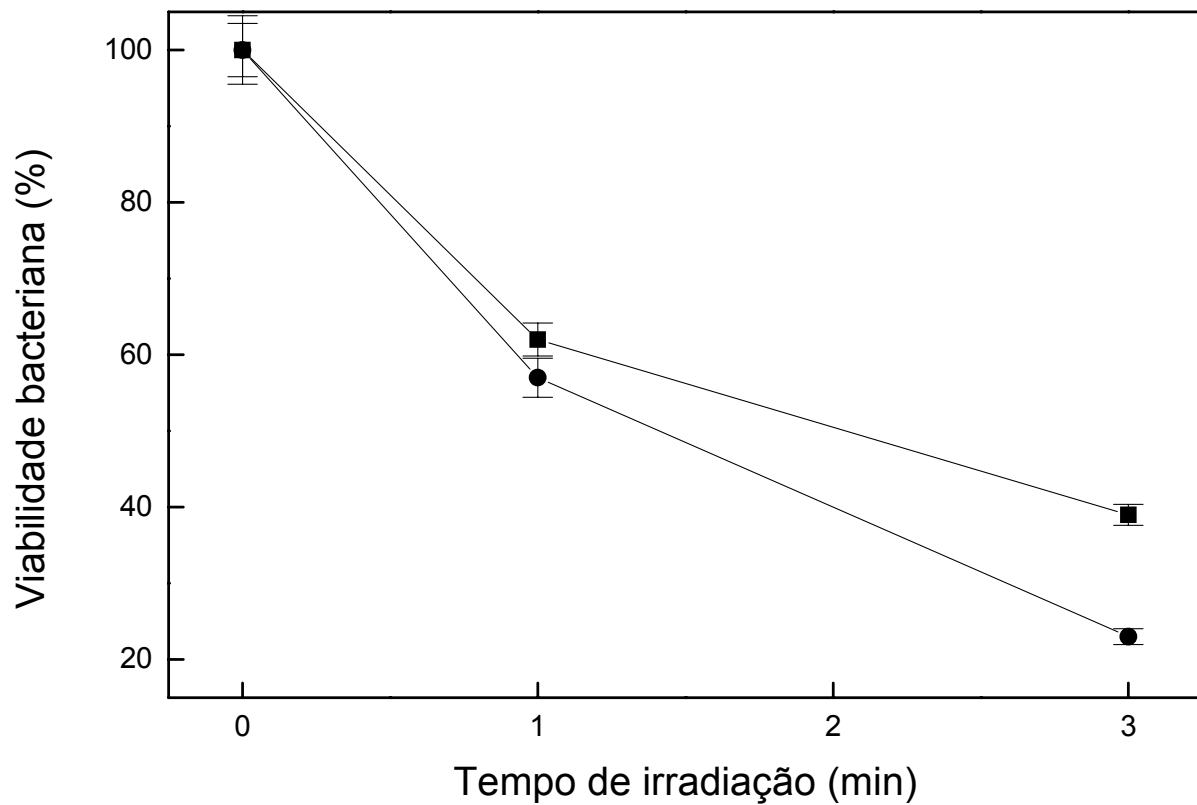


Figura 20. O efeito do tempo de irradiação sobre a viabilidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, incubada com diferentes concentrações de Eritrosina. Um mL (10^3 UFC) da suspensão bacteriana foi pré-incubado com concentrações de Eritrosina de 0,5 µM (quadrados) e 1,0 µM (círculos), e irradiada por 1 e 3 minutos, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 1. Efeito da TFD sobre a cultura de *A. actinomycetemcomitans* em meio planctônico e em biofilme. Foram considerados os dados de viabilidade obtidos após 30 minutos de contato com o corante antes da TFD com 3 minutos de irradiação, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Viabilidade (%) no escuro			
[Corante] μ M	Rose Bengal	Azul de Metileno	Eritrosina
0,1	82,4	-	-
0,5	-	84	95
1,0	58,8	76	86
Viabilidade (%) da cultura em meio planctônico de <i>Aggregatibacter actynomicetemcomitans</i> depois da TFD			
0,5	64,8	66	41
1,0	45,6	50	25
Viabilidade (%) da cultura em Biofilme de <i>Aggregatibacter actynomicetemcomitans</i> depois da TFD			
0,5	67,0	66,8	69,6
1,0	55,1	46,7	32,8

viabilidade) e a menor toxicidade no escuro. Rose Bengal foi o segundo fotossensibilizador que mais reduziu a viabilidade da linhagem bacteriana (54,4%) porém sua toxicidade no escuro é maior do que a do Azul de metileno que reduziu a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* em 50% (Tabela 1).

4.4 Avaliação dos efeitos citotóxicos da TFD aplicada ao biofilme de *A. actinomycetemcomitans*

4.4.1 Formação do biofilme

A linhagem bacteriana *A. actinomycetemcomitans* se desenvolve em uma comunidade chamada de biofilme, que se caracteriza pelo desenvolvimento de diferentes microrganismos de diferentes espécies, altamente organizados capazes de colonizar a cavidade oral e desenvolver varias doenças, entre elas a doença periodontal (Rickard et al., 2003).

As bactérias que se desenvolvem em biofilmes são mais resistentes a agentes antimicrobianos, por conta disso verificamos o efeito da TFD sobre o biofilme de *A. actinomycetemcomitans*.

O desenvolvimento do biofilme de *A. actinomycetemcomitans* foi monitorado durante 36 horas conforme pode ser observado na Figura 21. O tempo de cultivo para obtenção do biofilme escolhido para esses experimentos foi o de 24 horas, pois decorrido esse período pode-se observar a formação do biofilme por toda base da placa de cultura que macroscopicamente apresenta a aparência opaca.

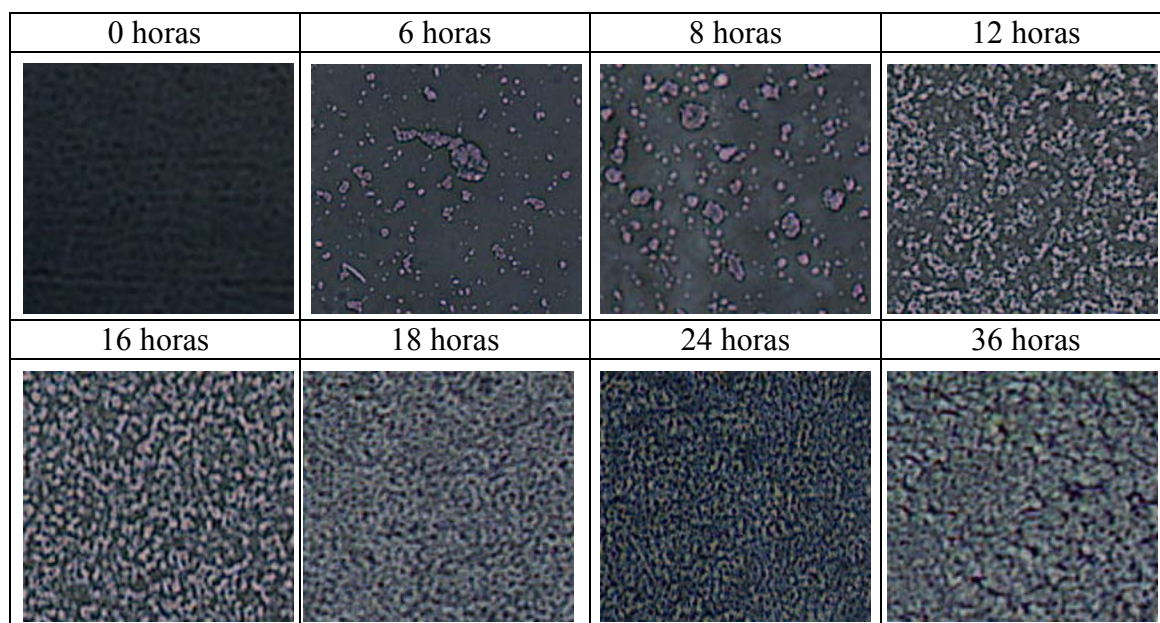


Figura 21. Micrografia da curva de crescimento do biofilme formado por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (50x) monitorado por 36 horas em meio TSB. A imagem do poço vazio sem desenvolvimento de biofilme pode ser observada no tempo 0 horas.

4.4.2 Efeitos citotóxicos da TFD aplicada ao biofilme de *A. actinomycetemcomitans* usando Rose Bengal, Azul de Metileno e Eritrosina

O efeito de Rose Bengal sobre o biofilme de *A. actinomycetemcomitans* pode ser observado na Figura 22, que indica que o biofilme não é afetado quando se usa apenas Rose Bengal ou apenas luz. Quando se aplicou a TFD associando luz e corante podemos observar uma redução do biofilme dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração do corante e a dose de luz maior é o efeito da TFD. A maior concentração de Rose Bengal usada foi a que mais afetou o biofilme onde podemos observar o desprendimento das células do biofilme. Essas reduções do biofilme podem ser observadas na Figura 23, onde se usou cristal violeta para quantificar o biofilme de *A. actinomycetemcomitans*. Houve uma redução de 45% do biofilme quando se usou 1 μM de corante e 3 minutos de irradiação.

Depois do tratamento do biofilme de *A. actinomycetemcomitans* usando a TFD com Azul de metileno (Figura 24) observamos que quando foi usado 0,5 μM com um minuto de irradiação (0,65 J/cm²) não houve alteração no biofilme de *A. actinomycetemcomitans*, porém quando se aumentou o tempo de irradiação (2 J/cm²) algumas áreas sem o desenvolvimento do biofilme foram observadas, indicando que a TFD causa o desprendimento das células do biofilme previamente aderidas no poço da placa de cultura. E quando 1,0 μM com 1 e 3 minutos de irradiação foram usados, grandes áreas com o desprendimento do


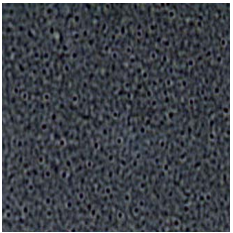
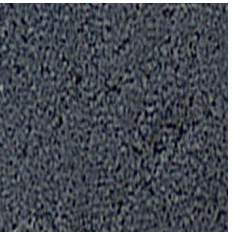


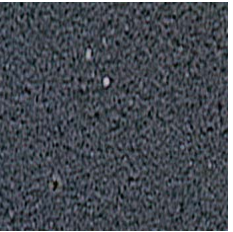

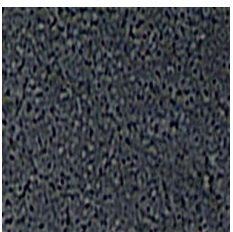
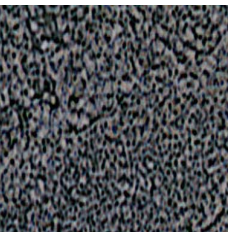
ROSE BENGAL	TEMPO DE IRRADIAÇÃO (MIN)		
	0	1	3
0.01 $\mu\text{mol/L}$			
0.1 $\mu\text{mol/L}$			
0.5 $\mu\text{mol/L}$			

Figura 22. O efeito da TFD sobre o biofilme formado por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* depois de crescer por 24 horas em microaerofilia. O biofilme previamente formado foi incubado com diferentes concentrações de Rose Bengal 0.01 μM , 0.1 μM , 0.5 μM e irradiado por 1 minuto e 3 minutos. As placas foram incubadas a 37 °C em microaerofilia por 24 horas e foram fotomicrografadas conforme descrito em Materiais e Métodos.

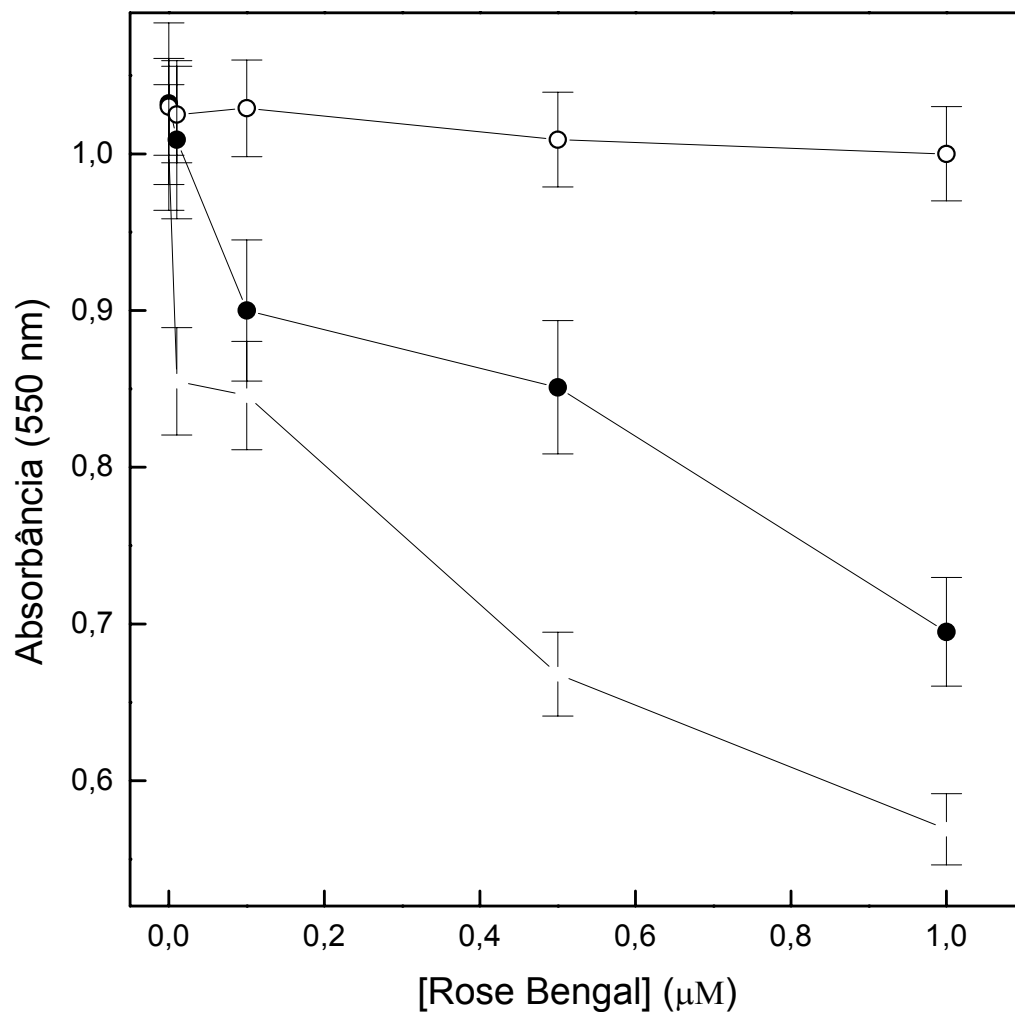


Figure 23. O efeito da TFD sobre o biofilme de *A. actinomycetemcomitans* crescido durante 24 horas e incubado em microaerofilia. O biofilme previamente formado foi incubado com diferentes concentrações de Rose Bengal durante 30 minutos como descrito em materiais e métodos. (circulo aberto) sem fotoirradiação (circulo fechado) 1 minuto e (quadrado fechado) 3 minutos de fotoirradiação. As placas foram incubadas a 37 °C em microaerofilia por 24 horas para quantificar as células do biofilme com cristal violeta conforme descrito em Materiais e Métodos.


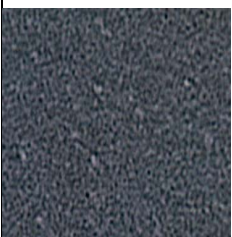
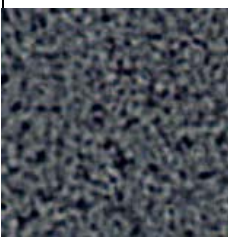
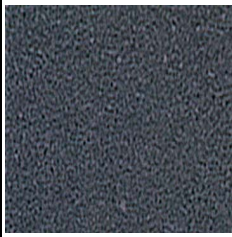

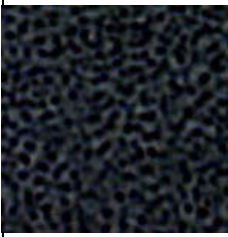
AZUL DE METILENO	TEMPO DE IRRADIAÇÃO (MIN)		
	0	1	3
0.5 $\mu\text{mol/L}$			
1.0 $\mu\text{mol/L}$			

Figura 24. O efeito da TFD sobre o biofilme formado por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* depois de crescer por 24 horas em microaerofilia. O biofilme previamente formado foi incubado com diferentes concentrações de Azul de metileno 0.5 μM , 1.0 μM e irradiado por 1 minuto e 3 minutos. As placas foram incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ em microaerofilia por 24 horas e foram fotomicrografadas conforme descrito em Materiais e Métodos.

biofilme foram observadas, e quando se quantificou o biofilme tratado com TFD e Azul de metileno (Figura 25) esses dados foram confirmados.

Eritrosina 0,5 μM com 1 e 3 minutos de irradiação tiveram similares redução do biofilme, mas quando a concentração de Eritrosina aumentou para 1,0 μM , um aumento da redução do biofilme foi observado principalmente quando aumentou o tempo de irradiação (Figura 26). A quantificação das bactérias presente no biofilme (Figura 27) e a visualização microscópica do biofilme mostraram que Eritrosina foi mais eficiente do que Rose Bengal e Azul de metileno, para inativar o biofilme de *A. actinomycetemcomitans* usando TFD.

A eficiência da TFD sobre biofilmes é amplamente estudada por vários pesquisadores. Zanin et al. (2005) verificou que a TFD usando 100 mg/L de Azul de toluidina com um laser He-Ne ou LED (49 e 294 J/cm²) promoveu a redução do biofilme de *Streptococcus mutans* em 99%. Wilson et al. (1996) mostrou que a viabilidade do biofilme de *Streptococcus sanguis* é reduzida pela TFD usando laser diodo arseniato de gálio e alumínio (4,1 J/cm²) combinado com alumínio ftalocianina como fotossensibilizador. Wood et al. (1999) relatou uma significativa morte do biofilme quando ele foi tratado com o fotossensibilizador Zn(II) ftalocianina e exposto durante 30 minutos a 400 W (lâmpada com filamento de tungstênio).

Wood et al. (2006) comparou o uso de três diferentes agentes fotossensibilizadores. Eritrosina, Photofrin e Azul de metileno (todos na concentração de 22 μM) para fotoinativar o biofilme de *S. mutans*, usando

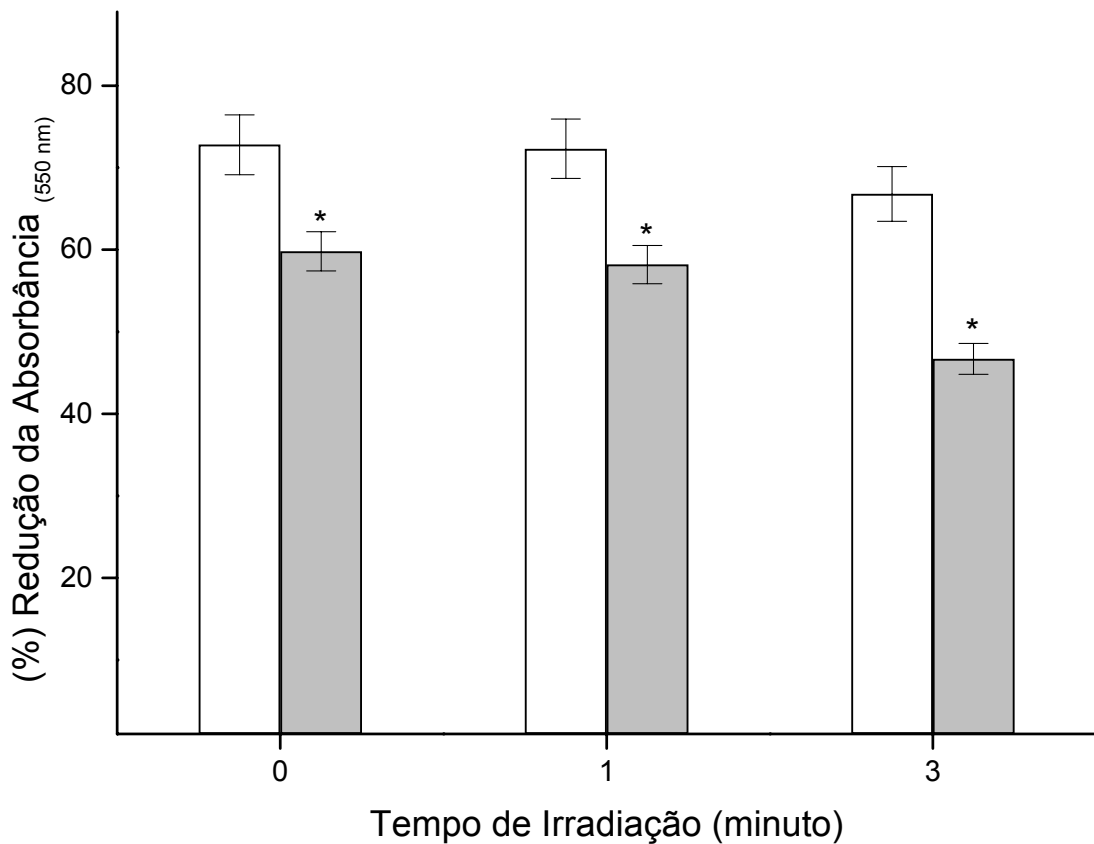


Figura 25. O efeito da TFD sobre o biofilme de *A. actinomycetemcomitans* crescido durante 24 horas e incubado em microaerofilia. O biofilme previamente formado foi incubado com diferentes concentrações de Azul de metileno durante 30 minutos como descrito em materiais e métodos. 0.5 μM (barra aberta) ou 1.0 μM (barra cheia) durante 1 minuto e 3 minutos de fotoirradiação. As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia por 24 horas para quantificar as células do biofilme pela metodologia do cristal violeta como descrito em Materiais e Métodos. * $p < 0.05$.

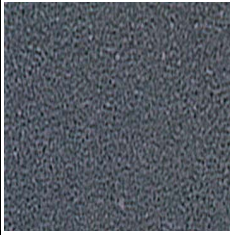
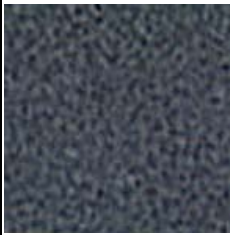

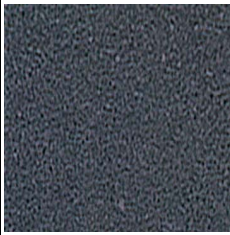
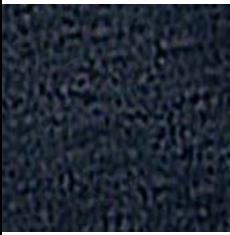

ERITROSINA	TEMPO DE IRRADIAÇÃO (MIN)		
	0	1	3
0.5 $\mu\text{mol/L}$			
1.0 $\mu\text{mol/L}$			

Figura 26. O efeito da TFD sobre o biofilme formado por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* depois de crescer por 24 horas em microaerofilia. O biofilme previamente formado foi incubado com diferentes concentrações de Eritrosina 0.5 μM , 1.0 μM e irradiado por 1 minuto e 3 minutos. As placas foram incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ em microaerofilia por 24 horas e foram fotomicrografadas conforme descrito em materiais e métodos.

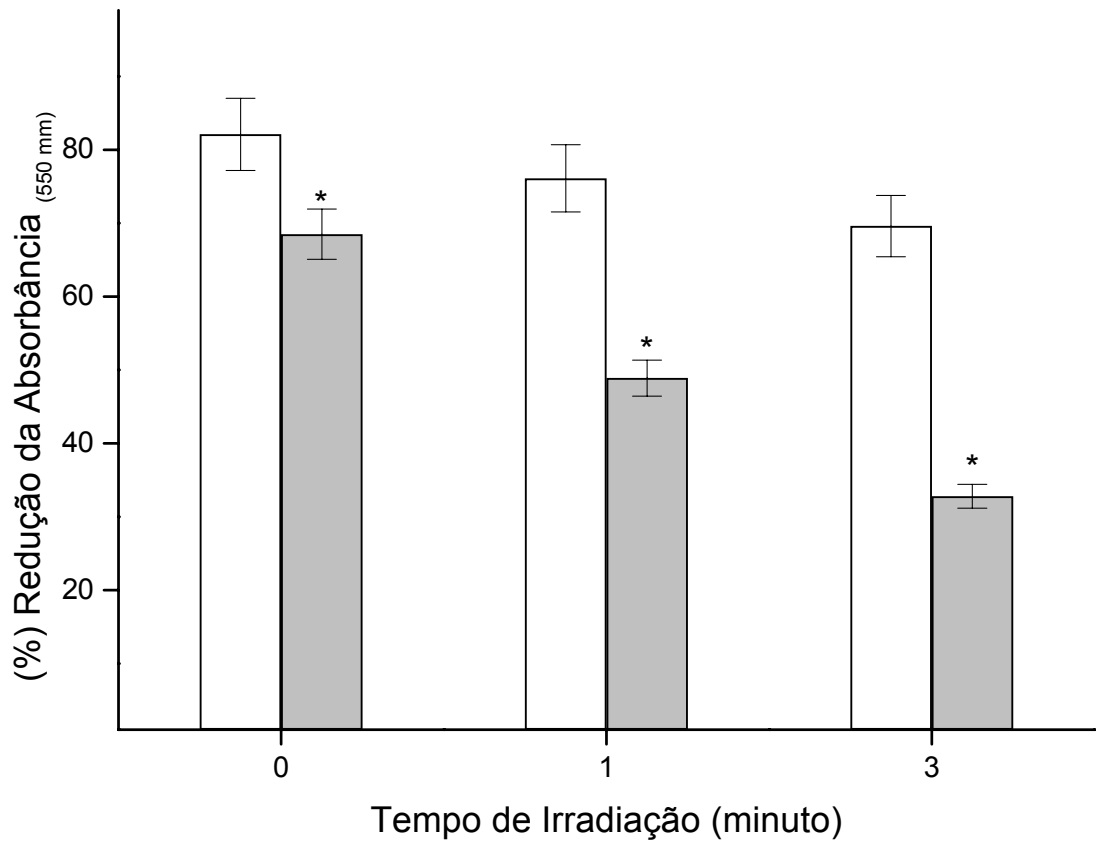


Figure 27. O efeito da TFD sobre o biofilme de *A. actinomycetemcomitans* crescido durante 24 horas e incubado em microaerofilia. O biofilme previamente formado foi incubado com diferentes concentrações de Eritrosina durante 30 minutos como descrito em materiais e métodos. 0.5 μ M (barra aberta) ou 1.0 μ M (barra cheia) durante 1 minuto e 3 minutos de fotoirradiação. As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia por 24 horas para quantificar as células do biofilme pela metodologia do cristal violeta como descrito em Materiais e Métodos. * $p < 0.05$.

uma lâmpada de tungstênio de 400 W com uma intensidade de luz de 22,7 mW/cm² para Eritrosina e 22,5 mW/cm² para Photofrin e Azul de metileno. Eritrosina foi mais efetiva do que Photofrin e Azul de metileno, reduzindo o biofilme de *S. mutans* em 48% comparado com 41% quando se usou Azul de metileno e 0,04% com Photofrin.

Finalmente Metcalf e colaboradores (2006), também verificaram o efeito da TFD sobre o biofilme de *S. mutans* usando Eritrosina a 22 µM com uma dose de luz de 6,75 J/cm², observaram uma redução de 57% nas células do biofilme.

Os resultados desse trabalho nos mostra que a exposição do biofilme de *A. actinomycetemcomitans* a luz do fotopolimerizador de resina odontológica que emite baixa intensidade de energia (0,65 e 2 J/cm²) em presença de Rose Bengal, Azul de metileno e Eritrosina como agentes fotossensibilizadores promovem a redução desse biofilme, sendo que essa redução é mais significativa quando se usa Eritrosina como agente fotossensibilizador que promoveu uma redução de 67,2% do biofilme enquanto que azul de Metileno e Rose Bengal promoveram 53,3% e 45% de redução respectivamente (Tabela 1).

Também podemos observar que apesar da Eritrosina ser o agente fotossensibilizador mais efetivo sobre a linhagem de *A. actinomycetemcomitans* tanto em meio planctônico quanto em biofilme a redução da viabilidade observada sobre a cultura em meio planctônico foi maior do que a observada no biofilme. Azul de Metileno apresentou uma pequena variação de seu efeito como agente fotossensibilizador sobre a

cultura em meio planctônico e em biofilme reduzindo 3,3% a mais a cultura de *A. actinomycetemcomitans* em biofilme e Rose Bengal apresentou maior redução sobre a cultura em meio planctônico.

Verificamos que a TFD foi mais efetiva em reduzir a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* quando cultivada em meio planctônico.

Fontana et al. (2009), também verificou que bactérias da cavidade oral organizadas em biofilme são menos afetadas pela TFD do que quando cultivadas em meio planctônico. A redução do efeito da TFD sobre o biofilme se deve ao fato de que quando uma comunidade de microrganismos esta agregada sobre uma determinada superfície, formando um biofilme, elas tendem a ser mais resistentes a agentes antimicrobianos e a TFD como demonstrado nesse trabalho (Zanim et al., 2005; Fontana et al., 2009).

5. CONCLUSÃO

A metodologia padronizada em nosso trabalho possibilitou o cultivo de *Aggregatibacter actinomycetencomitans* em meio líquido (planctônico) ou na forma de biofilme, tornando-se possível assim a realização de testes com a aplicação da Terapia Fotodinâmica. A realização da curva de crescimento dessa linhagem bacteriana nos permitiu avaliar as características e o comportamento durante o seu crescimento, onde atingiu a fase exponencial com 50 horas de cultivo.

Podemos observar que uma importante bactéria periodontopatogênica, pode ser fotoinativada pela luz do fotopolimerizador de resina odontológica (que se encontra disponível em quase todos os consultórios odontológicos, sendo de baixo custo, fácil manuseio, além de não apresentar emissão de luz UV-A ou UV-B) associado com os corantes fotossensibilizadores Rose Bengal, Azul de metileno ou Eritrosina.

A maior concentração dos corantes usadas nesse experimento (1,0 µM) é uma concentração que pode ser aplicada em uma terapia, pois esta abaixo das concentrações que podem causar alguma toxicidade para células humanas. Nessa concentração Rose Bengal não apresentou toxicidade às células de fibroblastos e foi efetivo (toxicidade no escuro) em inativar 41,2% das células da linhagem bacteriana *Aggregatibacter actinomycetencomitans* cultivadas em meio planctônico. Azul de Metileno é usado em procedimentos clínicos em concentrações bem maiores e, da mesma forma, Eritrosina também é usada em produtos odontológicos em concentrações mais altas da empregada no presente estudo.

A Terapia Fotodinâmica foi efetiva para inativar células de *Aggregatibacter actinomycetencomitans* cultivadas em meio planctônico e em biofilme. A diferença entre as concentrações de corante que causa a morte de bactérias na presença e na ausência de luz indica que os compostos produzidos pela fotoativação são os responsáveis pela morte celular.

Dos três corantes estudados Eritrosina foi o corante que promoveu uma maior redução da viabilidade celular de *Aggregatibacter actinomycetencomitans* cultivada em meio planctônico e em biofilme 75% e 67,2% respectivamente, e foi o corante que apresentou menor redução da viabilidade celular bacteriana *per se* 14%. Diante dos resultados a Eritrosina é o melhor corante para ser usado na TFD nas condições estudadas nesse trabalho.

Azul de Metileno proporcionou uma redução da viabilidade de *Aggregatibacter actinomycetencomitans* em 50% quando cultivada em meio planctônico e 53,3% em biofilme, Rose Bengal reduziu a viabilidade de *Aggregatibacter actinomycetencomitans* em 54,4 e 45% em meio planctônico e em biofilme respectivamente. Diante desses resultados, Azul de Metileno foi o segundo corante mais efetivo em diminuir a viabilidade bacteriana de *Aggregatibacter actinomycetencomitans* em biofilme e Rose Bengal foi o terceiro corante mais efetivo em diminuir a viabilidade bacteriana cultivada em biofilme.

A sensibilidade a TFD das células bacterianas cultivadas em biofilme é uma indicação clara de que essa terapia pode ser uma opção efetiva

para o tratamento clínico da doença periodontal, que esta diretamente associada à formação de biofilme bacteriano, tendo a vantagem de não apresentar efeitos colaterais como a terapia medicamentosa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, 74(5):656-669, 2001.
- Aghahosseini, F.; Arbabi-Kalati, F.; Fashtami, L.A.; Fateh, M.; Djavid, G.E. Treatment of oral lichen planus with photodynamic therapy mediated methylene blue: a case report. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, 11:E126-129, 2006.
- Azarpazhooh, A.; Shah, P. S.; Tenenbaum, H. C.; Goldberg, M.B. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J. Periodontol.**, 2009; DOI:10.1902/Jop.2009.090285.
- Beck, J.; Garcia, R.; Heiss, G.; Vokonas, P.S.; Offenbacher, S. Periodontal disease and cardiovascular disease. **J. Periodontol.**, 67(10): 1123-1137, 1996.
- Begue, W.J.; Bard, R.C.; Koehne. G.W. Microbial inhibition by erythrosine. **J. Dent. Res.**, 45: 1464-1467, 1966.
- Bertoloni, G.; Salvato, B.; Dall'Acqua, M.; Vazzoler, M.; Jori, G. Hematoporphirin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. **Photochem. Photobiol.**, 39: 811-816, 1984.
- Bhatti, M; Marcroberi, M.A.; Meghji, S.; Henderson, W.M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem. Photobiol.**,

68(3):370-376, 1998.

Bilski, P.; Holt, R.N.; Chignell, C.F. Premicellar aggregates of Rose Bengal with cationic and zwitterionic surfactants. **J. Photochem. Photobiol. A.**, 110:67-74, 1997.

Bonito, A.J.; Lux, L.; Lohs, K.N. Impact of local adjuncts to scaling and root planning the periodontal disease therapy: a systematic review. **J. Periodontol.**, 76:1227-1236, 2005.

Bowyer, J. D.; Holroyd, C.; Chandna, A. The use of the fluorescein disappearance test in the management of childhood epiphora. **Orbit**, 20(3):181-187, 2001.

Brasseur, R.; De Loof, H.; Ruysschaert. J. M.; Rosseneu, M. Conformational analysis of lipid-associating proteins in a lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta*, 943(1):95-102, 1988.

Burns, T.; Wilson, M.; Pearson, G. J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, 29: 192-197, 1995.

Chan, Y.; Lai, C.H. Bacterial effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Laser Med.**, 18: 51-55, 2003.

Cohen, L.B.; Salzberg, B.M.; Davila, H.V.; Ross, W.N; Landowne, D.; Waggoner, A.S.; Wang, C.H. Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. **J. Membr. Biol.**, 19(1):1-36, 1974.

Cortelli, S.C.; Costa, F.O.; Kawai,T.; Aquino, D.R.; Franco, G.C.N.; Ohara,

- K.; Torres, C.V.G.R.; Cortelli, J.R. Diminished Treatment Response of Periodontally Disease Patients Infected whit the JP2 Clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*.J. **Clin. Microbiol.**, 47(7):2018-2025, 2009.
- Fine, D.H.; Markowitz, K.; Furgang, D.; Fairlie, K.; Ferrandiz, J.; Nasri, C.; McKiernan, M.; Gunsolley, J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and Its Relationship to Initiation of Localized aggressive periodontitis: Longitudinal Cohort Study of Initially Healthy Adolescents. **J. Clin. Microbiol.**, 45(12):2859-3869, 2007.
- Fotana, C.R.; Abernethy, A.D.; Som, S.;Ruggiero, K.;Doucette, S.; Marcantonio, R.C.; Boussious, C.I.; Kent, R.; Goodson, J.M.; Tanner, N.S.; Soukos, N.S. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **J. Periodont. Res.**, 44:751-759, 2009.
- Foote, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochem. Photobiol.**, 54(5):659-664, 1991.
- Gaffney, D.K.; Sieber, F. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of soluble and membrane-bound enzymes in L1210 leukemia cells. **Cancer Res.**, 50(24):7765-7769, 1990.
- Gallant, C.V.; Sedic, M.; Chicoine, E.A.; Ruiz, T.; Mintz, K.P. Membrane Morphology and Leukotoxin Secretion Are associated with a Novel Membrane Protein of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J. Bacteriol.**, 190(17):5972-5980, 2008.

- Galvão, R.; Ferreira, C.E.A.; Catão, V.V. **Utilização de antibióticos locais e sistêmicos em periodontia**. In: Periodontia Ciência e Clínica.(Oppermann, R.V.; Rosing, C. K) Ed. Artes Médicas. São Paulo, 2001:234-247.
- Garcez, A.S.; Ribeiro, M.S.; Lage-Marques, J.L.; Jorge, A.O.C. **Terapia Fotodinâmica em Odontologia**. In: Congresso da Associação Brasileira de Laser em Odontologia. Maceió, ABLO, 2002. V.1.
- Gomer, C.J.; Rucker, N.; Ferrario, A.; Wong, S. Properties and applications of photodynamic therapy. **Radiat. Res.**, 120(1):1-18, 1989.
- Goulart, R.C.; Bolean, M.; Paulino, T.P.; Thedei, Jr.G.; Souza,S.L.S; Tedesco, A.C.; Ciancaglini, P. Photodynamic Therapy in Planktonic and Biofilm Cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomed. Laser Surg.**, 2009; DOI: 10.1089/pho.2009.2591.
- Grossi, S.G.; Genco, R.J. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. **Ann. Periodontol.**, 3(1):51-61, 1998.
- Haake, S.K.; Newman, M.G.; Nisengard, R.J.; Sanz, M. **Microbiologia Periodontal**. In. Periodontia Clínica, (Newman, M. G.; Takei, H. H.; Carranza, F.A) Editora Guanabara Koogam, 2004. Cap 6:86-100.
- Henderson, B.W.; Dougherty, T.J. How does photodynamic therapy work? **Photochem. Photobiol.**, 55(1):145-157, 1992.
- Jakobsson, E. Interactions of cell volume, membrane potential, and membranetransport parameters. **Am. J. Physiol.**, 238(5):C196-206, 1980.

- Kaplan, J.B.; Meyenhoder, M.F.; Fine, D.H. Biofilm Growth and Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Bacteriol.**, 185: 1399-1404.
- Kessel, D.; Luo, Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. **Cell Death Differ.**, 6(1):28-35, 1999.
- Kochevar, I.E.; Lambert, C.R.; Lynch, M.C.; Tedesco, A.C. Comparison of photosensitizer plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochim. Biophysic. Acta.**, 1280(2):223-230, 1996.
- Konig, K.; Teschke, M.; Sigusch, B.; Glockmann, E.; Eich, S.; Pfister, W. Red light kills bacteria via photodynamic action. **Cell. Mol. Biol.**, 46(17):1297-1303, 2000.
- Larkin, J.M.; Donaldson, W.R.; Knox, R.S.; Foster, T.H. Reverser intersystem crossing in rose Bengal II. Fluence dependence of fluorescence following 532 nm laser excitation. **Photochem. Photobiol.**, 75:221-228, 2002.
- Lakowicz, JR.; Keating-Nakamoto, S. Red-edge excitation of fluorescence and dynamic properties of proteins and membranes. **Biochemistry**, 23(13):3013-3021, 1984.
- Lotufo, R.; Pannuti, C. **Recursos para o diagnostico microbiológico em periodontia**. In: Periodontia Ciência e Clínica. (Oppermann, R.V.; Rosing, C.K) Ed. Artes Médicas. São Paulo, 2001:31-38.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. **Microbiologia de Brock**. Ed. Prentice Hall, São Paulo, 2004:127-154.

- Matthews, T.D.; Newman, J.T.; Sangandares-Bernal, F.; Juddy, M.M.; Chanh, T.C. Photodynamic therapy of viral contaminants with potential for blood banking applications. **Transfusion**, 28:81-83, 1988.
- Meisel, P.; Kocher, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. **J. Photochem. Photobiol. B.**, 79:159-170, 2005.
- Merchat, M.; Spikes, J.D.; Bertoloni, G.; Jori, G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. **J. Photochem. Photobiol.**, 35: 149-157, 1996.
- Meulen, F.W.; Ibrahim, K.; Sterenborg, H.G.; Alphen, L.V.; Maikoe, A.; Dankert, J. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins. **J. Photochem. Photobiol B.**, 40(3):204-208, 1997.
- Metcalf, D. ; Robison, C. ;Devine, D. ; Wood, S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. **J. Antimicrob. Chemother.**, 58:190-192, 2006.
- Mousavi, H.S.; Zhang, X.D.; Sharifi, A.M.;Hersey, P. Study of Rose Bengal-induced cell death in melanoma cells in the absence of light. **Iranian J. Basic Medical Sci.**, 9:216-222, 2006.
- Murant, R.S.; Gibson, S.L.; Hilf, R. Photosensitizing effects of Photofrin II on the sete-selected mitochondrial enzymes adenilate kinase and monoamine oxidase. **Cancer Research**, 47(16):4323-4328, 1987.
- Nishihara, T.; Koseki, T. Microbial etiology of periodontitis. Periodontol.

2000, 34:14-26, 2004.

Oliveira, R.R.; Schwartz-Filho, H.O.; Novaes, A.B.J.; Garlet, G.P.; Souza, R.F.; Taba, Jr.M.; Souza, S.L.S.; Ribeiro, F.J. Antimicrobial Photodynamic therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive periodontitis: Cytokine Profile in Givival Crevicular Fluid, Preliminary Results. **J. Periodontol.**, 80:98-105, 2009.

Oliveira, R.R.; Schwartz-Filho, H.O.; Novaes, A.B.J.; Taba, M. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary ramdomized controlled clinical study. **J. Periodontol.**, 78:965-973, 2007.

Ovchinnikov, I.S.; Tuchin, V.V. **Photodynamic action on some pathogenic microorganisms oral cavity**. In: Bimgruber R, Van Den Bergh, H. eds. Laser Tissue Interaction, Therapeutic Applications, and Photodynamic Therapy. Ed. Spie, Washington, 2001:160-168.

Paczkowski, J.; Lamberts, J.J.; Paczkowska, B.; Neckers, D.C. Photophysical properties of rose bengal and its derivatives (XII). **J. Free Radic. Biol. Med.**, 1:341-351,1985.

Paulino, T.P.; Magalhães, P.P.; Thedei Jr.G.; Tedesco, A.C.; Ciancaglini, P. Use of visible light-based photodynamic trtherapy to bacterial photoinactivation. **Biochem. Mol. Bio. Educ.**, 33(1):46-49, 2005a.

Paulino, T.P.; Ribeiro, K.F.; Thedei Jr.G.; Tedesco, A.C.; Ciancaglini, P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, 50:353-359, 2005b.

Peloi,L.S.; Soares, R.R.S.; Biondo, C.E.G.; Souza, V.R.; Hioka, N.;

- Kimura, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J. Biosci.**, 33:231-237, 2008.
- Perussi, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, 30(4): 988-994, 2007.
- Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Laser Med. Sci.**, 24:259-268, 2009.
- Penning, L.C.; Dubbelman, T.M. Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. **Anticancer Drugs**, 5(2):139-146, 1994.
- Perez, B.A.; Planet, P.J.; Kachlany, S.C.; Tomich, M.; Fine, D.H.; Figurski, D.H. Genetic analysis of the requirement for *flp-2*, *tadV*, and *rcpB*, in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm formation. **J. Bacteriol.**, 188:6361-6375, 2006.
- Prates, R.A.; Yamada, Jr. A.M.; Suzuki, L.C.; Hashimoto, M. C. E.; Cai, S.; Gouw-Soares, S.; Gomes, L.; Ribeiro, MS. Bacterial effect of malachite green and red laser on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J. Photochem. Photobiol. B.**, 86:70-76, 2007.
- Prinsze, C.; Tijssen, K.; Dubbelman, T.M.; Van Steveninck, J. Potentiation of hyperthermia-induced haemolysis of human erythrocytes by photodynamic treatment. Evidence for the involvement of the anion transporter in this synergistic interaction. **Biochem. J.**, 277:183-188,

1991.

Raghavendra, M.; Koregol, A.; Bhola, S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. **Aust. Dent. J.**, 54:(1 suppl): S102-S109, 2009.

Rodrigu  z, H.B.; Lagorio, M.G.; Román, E.S. Rose Bengal absorbed on microgranular cellulose: evidence on fluorescent dimmers. **Photochem. Photobiol.**, 3:674-680, 2004.

Ross, W.N.; Salzberg, B.M.; Cohen, L.B.; Grinvald, A.; Davilla, H.V.; Wang, C.H. A large change in dye absorption during the action potential. **Biophys. J.**, 14:983-986, 1977.

Rovaldi, C.R.; Pievsky, A.; Sole, N.A.; Friden, P.M.; Rothstein, D.M.; Spacciapoli, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens In vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 44(12):3364-3367, 2000.

Rickard, A.H.; Gilbert, P.; Higt, N.J.; Kolenbrander, P.E.; Handley, P.S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol.**, 11: 94-100, 2003.

Schick, E.; Kaufmann, R.; Ruck, A.; Hainzl, A.; Boehncke, W.H. Influence of activation and differentiation of cells on the effectiveness of photodynamic therapy. **Acta Dermatol. Venereol.**, 75(4):276-279, 1995.

Scotti, R.; Lima, E.C.; Benvenutti, E.V.; Piatnicki, C.M.S.; Dias, S.L.P. Azul de metileno imobilizado na cellulose/ TiO₂ e SiO₂/TiO₂: Propriedades eletroqu  micas e planejamento fatorial. **Química Nova**, 29:208-212,

2006.

- Sharman, W.M.; Allen, C.M.; van Lier, J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **DTT**, 4(11) November, 1999.
- Shawar, R.; Cooper, B.H. Comparative kinetics of hematoporphyrin derivative uptake and susceptibility of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus faecalis* to photodynamic action. **Photochem. Photobiol.**, 52(4):825-830, 1990.
- Sieber, F.; Spivak, J.L.; Sutcliffe, A.M. Selective killing of leukemic cells by merocyanine 540-mediated photosensitization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 81(23):7584-7587, 1984.
- Simioni, A.R.; Vaccari, C.; Re, M.I.; Tedesco, A.C. PHBV/PCL microspheres as biodegradable drug delivery systems (DDS) for photodynamic therapy (PDT). **J. Materials Sci.**, 43:580-584, 2008.
- Singh, J.K.; Dhawahir, F.E.; Hamid, A.F.; Chell, P.B. The use of dye in ophthalmology. **J. Audiov. Media. Med.**, 27:62-67, 2004.
- Skiles, H.; Juddy, M.M.; Newman, T.J. Photodynamic inactivation of viruses with hematoporphyrin derivative. **Ann. Meet. Soc. Microbiol.**, P.8 (Abstract) 1985.
- Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clinical Microbiol.**, 15:606-609, 1982.
- Slots, J.; Ting, M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. **Periodontol.**, **2000.**, 20:82-121, 2000.
- Socransky, S.S.; Haffajee, A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic

- targets. **Periodontol.**, **2000**, 28:12-55, 2002.
- Soukos, N.S.; Mulholland, S.E.; Socransky, S.S.; Doukas, A.G. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Laser in Surg. Med.**, 33:161-168, 2003.
- Soukos, N.S.; Wilson, M.; Burns, T.; Speight, P.M. Photodynamic effects of toluidine blue on human keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. **Lasers in Surg. Med.**, 18:253-259, 1996.
- Sporn, L.A.; Foster, T.H. Photofrin and light induces microtubule depolymerization in cultured human endothelial cells. **Cancer Research**, 52(12):3443-3448, 1992.
- Stiel, H.; Teuchner, K.; Paul, A.; Leopold, D.; Kochevar, I.E. Quantitative comparison of excited state properties and intensity-dependent photosensitization by rose Bengal. **J. Photochem. Photobiol. B**, 33:245-254, 1996.
- Takamatsu, N.; Yano, K.; He, T.; Umeda, M.; Ischikawa, I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontol.**, 70:574-580, 1999.
- Tang, G.; Kitten, T.; Munro, C.L.; Wellman, G.C.; Mintz, K.P. EmaA, a Potential Virulence Determinant of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Infective Endocarditis. **Infect. Immun.**, 76(6):2316-2324, 2008.

- Touma, D.J.; Szeimies, R.M. **Terapia fotodinâmica tópica.**In; **Envelhecimento cutâneo** (Gichrest, B.A. e Krutmann, J.) Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2007:207-218.
- Usacheva, M.N.; Teichert, M.C. ; Biel, M.A. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-negative Microorganisms. **Laser in Surg. Med.**, 29:165-173, 2001.
- Venezio, F.R.; Di Vennenzo, C. Sehrman, R.; Reichman, M.; Oritano, T.; Thompson, K. ; Reichman, O.H. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphirin derivative. **J. Infect. Dis.**, 151:166-169, 1985.
- Waggoner, A.S. The use of cyanine dyes for the determination of membrane potentials in cells, organelles, and vesicles. **Methods Enzymol.**, 55:689-695, 1979.
- Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, 42:13-28, 1998.
- Watchter, E.; Dees, C.; Harkins, J.; Scott, T.; Peterse, M.; Rush, R. E.; Cada, A. Topical rose Bengal: Pre-clinical evaluation of pharmacokinetics and safety. **Laser Surg. Med.**, 32(2):101-110, 2003.
- Wilson, M.; Burns, T.; Pratten, J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. **J. Antimicrob. Chemother.**, 37:377-381, 1996.
- Wilson, M.; Dobson, J.; Sarkar, S. Sensitization of periodontopathogenic

- bacteria to killing by light from a low power laser. **Oral Microbiol. Immunol.**, 8:182-187, 1993.
- Wilson, M.; Garrard, P.; McGinness, S. The unit structure of the locust compound eye. **Cell Tissue Res.** 195(2): 205-226, 1978.
- Wilson, M.; Henderson, B. Virulence factors of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. **FEMS Microbiol. Rev.**, 17:365-397, 1995.
- Wood, S.; Metcalf, D.; Devine, D.; Robinson, C. Erytrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, 57:680-684, 2006.
- Wood, S.; Nattress, B.; Kirkham, J.; Shore, R.; Brookes, S.; Griffiths, J.; Robinson, C. An in vitro study of the use photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **J. Photochem. Photobiol. B**, 50:1-7, 1999.
- Yamada, Jr.A.M.; Hayek, R.R.A.; Ribeiro, M.S. O emprego da tearapia Fotodinamica (PDT) na Redução Bacteriana em Periodontia e Implantodontia. **RGO.**, 52(3):207-210, 2004.
- Zambon, J.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **J. Clinical Periodontol.**, 12:1-20, 1985.
- Zanin, I.C.J.; Gonçalves, R.B.; Brugnera, Jr.A.; Hope, C.K.; Pratten, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. **J. Antimicrob. Chemother.**, 56: 324-330, 2005.