

**stricto**  
**SENSU**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - ESTOMATOLOGIA CLÍNICA**

**SANDRA APARECIDA MARINHO**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)  
SOBRE CULTURAS DE *Candida* sp.  
E DE CÉLULAS EPITELIAIS:  
ESTUDO *IN VITRO***

**Porto Alegre  
2006**

SANDRA APARECIDA MARINHO

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) SOBRE CULTURAS DE**

***Candida* sp. E DE CÉLULAS EPITELIAIS: ESTUDO *IN VITRO***

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia Clínica, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**Orientadora: Profa. Dra. Karen Cherubini**

**Co-orientadoras: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira**

**Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado**

Porto Alegre

2006

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M338e Marinho, Sandra Aparecida  
Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de  
*Candida* sp. e de células epiteliais: estudo *in vitro*. / Sandra  
Aparecida Marinho. – Porto Alegre, 2006.  
161 f. : il.

Dissertação (Doutorado em Estomatologia Clínica) -  
Faculdade de Odontologia, PUCRS.  
Orientação: Profa. Dra. Karen Cherubini.  
Co-orientação: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira;  
Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

1. Odontologia. 2. Estomatologia Clínica. 3. Terapia  
Fotodinâmica (PDT). 4. Candidíase Oral. 5. Laser -  
Odontologia. 6. Azul de Metileno. I. Título.

CDD 617.607

Ficha elaborada pela bibliotecária Cíntia Borges Greff CRB 10/1437



PUCRS

---

**DEDICATÓRIA**

A meu pai,

**Nilton de Carvalho Marinho** (*in memoriam*)

"Aqueles que amamos nunca morrem,  
apenas partem antes de nós"

Amado Nervo



PUCRS

---

## AGRADECIMENTOS

"Que bom que não sou o melhor de todos  
Porque ainda me resta um caminho a percorrer para procurar melhorar.  
Que bom que não tenho tudo, só assim me animo a lutar pelo que me falta.  
É realmente bom que não saiba tudo.  
Se soubesse, não teria que aprender.  
Que bom que eu tenho defeitos.  
Se não os tivesse, viveria só, não compreenderia as faltas do meu próximo...  
Que bom que não sou o mais forte do mundo.  
Se o fosse, não precisaria de quem me auxiliasse.  
E não compreenderia a solidariedade e a ajuda, porque tentaria fazer tudo sozinho.  
**Que bom que não estou sozinho.**  
**Se você não existisse, não perceberia o quanto preciso corrigir-me.**  
**Que bom que somos uma equipe,**  
**que necessitamos uns dos outros,**  
**que buscamos caminhos e alternativas para transformar e crescer..."**  
Autor desconhecido

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A **DEUS**, por sempre ter-me dado motivos para agradecer.

À minha orientadora, Dra. **Karen Cherubini**, exemplo de dedicação e seriedade.

"Uns são homens; alguns são professores; poucos são mestres.  
Aos primeiros, escuta-se; aos segundos, respeita-se; aos últimos, segue-se."

Raquel Eckert

À minha co-orientadora, Dra. **Sílvia Dias de Oliveira**, pela disponibilidade, empenho e imprescindível ajuda e por ter aceitado a tarefa de me co-orientar.

"As pessoas que progridem neste mundo são as que se levantam e procuram as circunstâncias que querem e, se não as encontram, criam-nas."

George Bernard

À minha co-orientadora Dra. **Denise Cantarelli Machado**, pela rapidez e praticidade na resolução dos problemas.

"Não basta saber: também é preciso aplicar; não é suficiente querer, também é preciso agir."

Goethe

Aos amigos funcionários do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Biociências, **Ricardo Flores Cazanova**, pelas suas explicações, disponibilidade, boa vontade e boas idéias e **Geneci D'Ávila (D. Gê)**, que muito me auxiliou, na parte mais árdua, que era a lavagem, esterilização e distribuição dos materiais, sem nunca ter-me dito um não. Continuem sempre assim...Não vou esquecer nunca do apoio de vocês.

"O perfume sempre perdura na mão que oferece a rosa."

Halda Béjar

À graduanda de Ciências Biológicas e bolsista de Iniciação Científica, **Alice Becker Teixeira**, mais que uma auxiliar, uma verdadeira amiga e irmãzinha.

Ao graduando de Ciências Biológicas e bolsista de Iniciação Científica, **Otávio Silveira dos Santos (BB)** que, sempre quando necessitei, estava disposto a me ajudar.

"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las."

Aristóteles

## Obrigada

À minha família mineira que, apesar de longe, sempre esteve presente me apoiando, especialmente minha mãe, **Virgínia Coelho Marinho**, e também meus irmãos, cunhadas e sobrinhas.

À minha família gaúcha, **Tânia Rodrigues Abrão, Cristiane Rodrigues Abrão, Jorge Rogério Carvalho, Renata Abrão Carvalho, Natália Abrão Carvalho e Isabel Figueira Leites**, por terem me adotado integralmente, sempre me apoiando e segurando minhas inúmeras barras, desde o início de minha estada em Porto Alegre. Bah, vocês não são apenas minha família adotiva, mas também meus verdadeiros triamigos, tchê!

Ao **CNPq**, imprescindível na disponibilização dos recursos necessários à minha estada em Porto Alegre.

Ao **Programa de Doutorado em Estomatologia**, por ter-me aceitado como aluna.

Às Profas. Dras. **Nilza Pereira da Costa e Liliane Soares Yurgel**, mulheres que admiro e nas quais tento me espelhar, pela compreensão e apoio na fase final desta tese.

Às Profas. Dras. **Karen Cherubini, Liliane Soares Yurgel, Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo e Fernanda Salum**, do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, exemplos de organização e trabalho em equipe.

Ao Prof. Dr. **João Bernardes da Rocha Filho**, da Faculdade de Física da PUCRS, pela disponibilidade, boa vontade, gentileza e pelas muitas consultas inesperadas e testes do laser.

Ao Coordenador do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências, Prof. Dr. **Carlos Alexandre Sanchez Ferreira**, por ter-me aberto as portas do Laboratório de Imunologia e Microbiologia e me auxiliado.

Às Profas Dras. **Nilza Pereira da Costa, Maria Antonieta Lopes de Souza, Márcia Rejane Brücker, Elaine Bauer Veeck, Rosemary Adami Shinkai, Ivete Maria Bolzan Rockenbach**, exemplos de mestras e pessoas, pelo privilégio de termos trabalhado juntas em alguns momentos do Curso. Obrigada pelo incentivo. Espero revê-las!

À Diretora da Faculdade de Farmácia, Profa. Dra. **Flávia Valladão Thiesen** por autorizar-me o uso das dependências da Faculdade.

À Profa. da Disciplina de Microbiologia da PUCRS, Dra. **Renata Medina da Silva**, pela ajuda muito valiosa e empréstimo de material.

Ao Prof. Dr. **Sydney Alves**, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelo envio das cepas-padrão de *Candida albicans* e *C. dubliniensis*.

Ao Grupo de Física do Laser (GFL), do Tecnopuc, na pessoa da Profa. Dra. **Mara Regina Rizzatti**, pela avaliação do aparelho de laser.

Ao Prof. Dr. **Jarbas Rodrigues de Oliveira** e ao biólogo **Eduardo Caberlon**, responsáveis pelo Laboratório de Auxílio à Pesquisa (LAP) da Faculdade de Biociências, pela cessão do espaço físico, onde parte da pesquisa foi realizada.

Ao Prof. **Gilberto José Corrêa da Costa**, da Faculdade de Engenharia, pela gentileza e cavalheirismo.

Aos grandes e verdadeiros amigos **Flaviana Dornela Verli (Flor)** e **José Miguel Amenábar (Fofinho)** que, nos momentos de desespero e de calma, foram verdadeiros companheiros, sempre me auxiliando, dando conselhos e idéias, me ajudando no que estava a seu alcance. Sempre os terei como irmãos.

"Amigo é coisa pra se guardar, do lado esquerdo do peito, mesmo que o tempo e a distância, digam não..." Milton Nascimento

Aos amigos **Tissiana Raquel Rossi Schneider** e **João Guilherme Gabriel**, imprescindíveis na etapa de conclusão do experimento, meu obrigada de coração.

"(...)Qualquer dia, amigo, eu volto a te encontrar..." Milton Nascimento

Aos amigos e colegas do Curso, **Maria Ivete Bolzan Rockenbach (Ivetinha)**, **Lisandrea Rocha Schardosim (Lisa)**, **Gabriela Botelho Martins (Gaby)**, **Alexandre Futterleib** e **Fabiana Vier Pelisser**.

"Qualquer dia, amigo, a gente vai se encontrar..." Milton Nascimento

À graduanda de Ciências Biológicas e ex-estagiária da Imunologia, **Letícia Disconzi Wildner (Lelé)**, pela força e amizade.

À pós-graduanda Profa. **Márcia Kober**, pelas explicações e auxílio.

Ao biólogo **Juliano Romanzini**, responsável pelo Laboratório de Biologia Parasitária da Faculdade de Biociências da PUCRS, pela disponibilização do microscópio.

Aos técnicos **Christian Viezzer** e **Jeremiah Mistrello Lubianca**, funcionários do Laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB) do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo auxílio, disposição e boa vontade. Valeu o apoio.

A **Marcos Aurélio Almeida Pereira**, meu conterrâneo, uai, responsável pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Faculdade de Farmácia, pelo grande auxílio e preciosas explicações.

Ao técnico **Cláudio Rogério Oliveira**, do Laboratório de Patologia, pelo auxílio nas fotografias.

Aos amigos da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia, **Ana Lúcia Silveira Prestes**, **Davenir Menger Brush**, **Marcos Caetano Correa** e **Carlos Eduardo Minossi**, pelos momentos sérios e ao mesmo tempo divertidos e doces.

Aos funcionários e amigos do Hospital São Lucas da PUCRS, **Márcio Fernando de Souza (Fernando)**, **Lindomar Souza da Luz (Lindinho)** e **Artur Bezerra Gazineu dos Santos**, pela excelência com que exercem seu trabalho e pela convivência sempre alegre e otimista.

Às amigas funcionárias da Disciplina de Radiologia, **Carolina Peronio de Santis** e **Ana Roselaine Strossi de Jesus**, pela simplicidade, doçura e respeito no tratamento das pessoas e pela amizade.

Ao funcionário da Faculdade de Biociências e amigo Sr. **Robel Salles dos Santos**, pelo auxílio e amizade.

À **Gisele Peirano**, **Adilson Batista Rocha de Souza** e **Fernanda Gonçalves Salum**, pela ajuda, conselhos, dicas e amizade.

À graduanda de Ciências Biológicas e estagiária do Laboratório de Imunologia **Emily Leffa Dietrich**, pelo auxílio na PCR.

A todos os pacientes que participaram deste estudo.



PUCRS

---

**EPÍGRAFE**

“Ando devagar porque já tive pressa  
E levo esse sorriso porque já chorei demais  
**Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe**  
**Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei...**

Conhecer as manhas e as manhãs  
O sabor das massas e das maçãs  
É preciso amor pra poder pulsar  
É preciso paz pra poder sorrir  
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
compreender a marcha, ir tocando em frente  
Como um velho boiadeiro  
levando a boiada, eu vou tocando os dias  
pela longa estrada eu vou, estrada eu sou

Conhecer ...

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora  
Um dia a gente chega em outro vai embora  
**Cada um de nós compõe a sua história**  
**E cada ser em si carrega o dom de ser capaz**  
**de ser feliz**

Conhecer...

Ando devagar...”

Almir Sater e Renato Teixeira (**Tocando em frente**)



PUCRS

---

**RESUMO**

## RESUMO

O uso indiscriminado de antifúngicos tem acarretado resistência da *Candida* sp., o que requer novas alternativas de tratamento para a candidose oral. A aplicação da terapia fotodinâmica (PDT) tem sido investigada na inativação de microrganismos patogênicos ao hospedeiro humano. O presente estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a ação da PDT sobre a viabilidade da *Candida* sp. e de células epiteliais. Culturas de *Candida* sp. obtidas a partir da coleta de amostras de 38 pacientes portadores de candidose oral e culturas de células HEP-2 foram submetidas à PDT. Foi empregado o laser diodo fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) nas dosimetrias de 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup> associado ao fotossensibilizador azul de metileno na concentração de 100 µg/mL. Após o tratamento, a viabilidade das unidades formadoras de colônias (UFCs) e das células epiteliais foi quantificada. As três dosimetrias empregadas determinaram inativação significativa da *Candida* sp. ( $p < 0,05$ ). A dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup> foi a mais eficaz, inativando 72,42% das UFCs de *Candida* sp., seguida pelas dosimetrias de 270 J/cm<sup>2</sup> e 100 J/cm<sup>2</sup> com inativação média de 45,84% e 22,83% respectivamente. A *Candida albicans* foi significativamente mais sensível ao tratamento, com inativação média de 50,44% das UFCs, enquanto as outras espécies de *Candida* apresentaram inativação média de 41,18% ( $p < 0,05$ ). Depois de submetidas à PDT, as células HEP-2 exibiram viabilidade semelhante nas diferentes dosimetrias ( $p > 0,05$ ). A viabilidade média das células HEP-2, avaliada imediatamente após a PDT, independentemente da dosimetria aplicada, foi de 70,81%, sendo esta significativamente menor do que a do grupo-controle, que foi de 86,21% ( $p < 0,05$ ). A PDT com azul de metileno e laser nas dosimetrias de 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup> determinou inativação significativa da *Candida* sp., sendo a *C. albicans* mais sensível que as outras espécies. As células epiteliais HEP-2 foram menos sensíveis à PDT do que a *Candida* sp., apresentando média de inativação fotodinâmica 2,24 vezes menor que a das células fúngicas, fato que indica a existência de uma margem de segurança para aplicação *in vivo*. São necessários novos estudos *in vitro* e em modelos animais para melhor fundamentarem-se os resultados obtidos.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica. *Candida* sp. Laser. Azul de Metileno. Célula HEP-2.



PUCRS

---

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

The indiscriminated use of antifungal drugs has been associated to *Candida* sp. antifungal resistance, requiring new alternative methods for treatment of oral candidosis. The application of photodynamic therapy (PDT) have been investigated on inactivation of human-host pathogenic microorganisms. The present study was conducted to evaluate *in vitro* PDT action on *Candida* sp. and epithelial cells. Thirty-eight *Candida* sp. cultures obtained from patients' oral candidosis and HEP-2 cell cultures were submitted to PDT. Indium-gallium-aluminum-phosphide (InGaAlP) laser was applied in 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> and 450 J/cm<sup>2</sup> doses associated with 100 mg/mL of methylene blue photosensitiser. After PDT, the viability of CFUs (colony formation units) and epithelial cells were quantified. The three doses applied led to a significant inactivation of *Candida* sp. The 450 J/cm<sup>2</sup> dose was the most efficacious, leading to 72.42% *Candida* sp. CFUs inactivation (P<0.05), followed by 270 J/cm<sup>2</sup> and 100 J/cm<sup>2</sup>, for which inactivation rates were 45.87% and 22.83%, respectively. *Candida albicans* was significant more susceptible to treatment, showing 50.44 % CFUs inactivation rate, while other *Candida* species showed 41.18% (P<0.05). After PDT, HEP-2 cells showed almost the same viability irrespectively the three different doses applied (P>0.05). HEP-2 cells viability, evaluated just after PDT, unrespective the dose applied, was of 70.81%, being significantly lower than that observed in the control-group (86.21%). Methylene blue and laser PDT on 100, 270 and 450 J/cm<sup>2</sup> doses led to significant inactivation of *Candida* sp., being *C. albicans* more susceptible than other *Candida* species. Epithelial cells photodynamic inactivation rate was 2.24-fold lower than the rate observed in *Candida* sp. This fact suggests a safety margin to *in vivo* application. Further *in vitro* and *in vivo* studies employing animal models are needed to better confirm these results.

**Key words:** Photodynamic Therapy. *Candida* sp. Laser. Methylene Blue. HEP-2 Cell.



PUCRS

---

**LISTAS**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Cultura de <i>Candida</i> sp. em agar Sabouraud 4% dextrose .....	90
Figura 2	Fotomicrografia do cultivo de <i>C. albicans</i> em soro fetal bovino, evidenciando o tubo germinativo (ausência de constrição-seta), 400X .....	91
Figura 3	Fotomicrografia do cultivo de <i>C. albicans</i> em soro fetal bovino, evidenciando a pseudo-hifa (presença de constrição-seta), 400X .....	91
Figuras 4 e 5	Fotomicrografias de microcultivo de <i>C. albicans</i> em agar arroz, exibindo clamidoconídios (seta), 400X .....	92
Figura 6	Fotomicrografia de microcultivo de <i>C. albicans</i> em agar arroz, exibindo clamidoconídios (seta preta) e blastoconídios (seta branca), 400X .....	93
Figura 7	Coloração verde das colônias em meio de cultura CHROMAgar™ <i>Candida</i> , indicativo de <i>C. albicans</i> .....	93
Figura 8	Coloração lilás das colônias em meio de cultura CHROMAgar™ <i>Candida</i> , indicativo de <i>C. krusei</i> .....	93
Figura 9	Coloração azulada das colônias em meio de cultura CHROMAgar™ <i>Candida</i> , indicativo de <i>C. tropicalis</i> .....	94
Figura 10	Coloração esbranquiçada das colônias em meio de cultura CHROMAgar™ <i>Candida</i> , indicativo de outra espécie de <i>Candida</i> .....	94
Figura 11	Visualização dos halos de crescimento (setas), indicando assimilação dos carboidratos pela <i>Candida</i> sp. ....	95
Figura 12	Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo: marcador de peso molecular de 100 pb (1); amostras de <i>Candida albicans</i> isoladas de pacientes (2 a 4); <i>C. albicans</i> ATCC 28367 (controle positivo) (5); <i>C. dubliniensis</i> CBS 7987 (6) .....	97
Figura 13	Preparo das soluções para aplicação da PDT .....	98

Figura 14	Aplicação da PDT, com posicionamento da fibra óptica no centro do poço .....	99
Figura 15	Dispositivo posicionador da fibra óptica do laser.....	100
Figura 16	Cultura de células epiteliais HEP-2 .....	101
Figura 17	Câmara de Neubauer contendo células epiteliais em solução com azul de trypan .....	104
Figuras 18 e 19	Células epiteliais viáveis, 400X .....	104
Figura 20	Células epiteliais inviáveis, 400X .....	105
Figura 21	Unidades formadoras de colônias de <i>Candida</i> sp. viáveis (média) nos grupos submetidos à PDT com laser nas dosimetrias de 100 J/cm <sup>2</sup> , 270 J/cm <sup>2</sup> e 450 J/cm <sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006.....	109
Figura 22	Viabilidade percentual média das UFCs de <i>Candida</i> sp. após aplicação da PDT com laser nas dosimetrias de 100 J/cm <sup>2</sup> , 270 J/cm <sup>2</sup> e 450 J/cm <sup>2</sup> . Porto Alegre, 2006 .....	111
Figura 23	Viabilidade percentual média de <i>C. albicans</i> e <i>C. não-albicans</i> após aplicação da PDT com laser nas dosimetrias de 100 J/cm <sup>2</sup> , 270 J/cm <sup>2</sup> e 450 J/cm <sup>2</sup> . Porto Alegre, 2006 .....	112
Figura 24	Viabilidade percentual média das células epiteliais nas dosimetrias de 100 J/cm <sup>2</sup> , 270 J/cm <sup>2</sup> e 450 J/cm <sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006 .....	116
Figura 25	Viabilidade percentual média das células epiteliais nos grupos PDT e controles independentemente da dosimetria aplicada. Porto Alegre, 2006 .....	117

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos utilizados para identificação de <i>C. albicans</i> ...	96
Tabela 2	Unidades formadoras de colônias de <i>Candida</i> sp. viáveis após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 100 J/cm <sup>2</sup> . Porto Alegre, 2006 .....	107
Tabela 3	Unidades formadoras de colônias de <i>Candida</i> sp. viáveis após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 270 J/cm <sup>2</sup> . Porto Alegre, 2006 .....	108
Tabela 4	Unidades formadoras de colônias de <i>Candida</i> sp. viáveis após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 450 J/cm <sup>2</sup> . Porto Alegre, 2006 .....	109
Tabela 5	Viabilidade da <i>Candida</i> sp. após aplicação da PDT com laser nas dosimetrias de 100 J/cm <sup>2</sup> , 270 J/cm <sup>2</sup> e 450 J/cm <sup>2</sup> .....	111
Tabela 6	Viabilidade das células epiteliais após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 100 J/cm <sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006 .....	113
Tabela 7	Viabilidade das células epiteliais após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 270 J/cm <sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006.....	114
Tabela 8	Viabilidade das células epiteliais após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 450 J/cm <sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006 .....	115
Tabela 9	Viabilidade das células epiteliais nos diferentes grupos avaliados, independentemente da dosimetria aplicada. Porto Alegre, 2006 .....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AIDS</b> -	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>ALA</b> -	<i>5- aminolevulinic acid</i> ácido aminolevulínico
<b>AIPc</b> -	<i>aluminum phthalocyanine</i> alumínio ftalocianina
<b>AIPcS4</b> -	<i>aluminum phthalocyanine tetrasulfonate</i> alumínio ftalocianina tetrassulfonada
<b>ANOVA</b> -	<i>analysis of variance</i> análise da variância
<b>APDT</b> -	<i>antimicrobial photodynamic therapy</i> terapia fotodinâmica antimicrobiana
<b>AsGa</b> -	arseneto de gálio
<b>AsGaAl</b> -	arseneto de gálio-alumínio
<b>ATCC</b> -	<i>american type culture collection</i>
<b>ATP</b> -	adenosina trifosfato
<b>AA</b> -	agar arroz
<b>AM</b> -	azul de metileno
<b>BPD</b> -	<i>benzoporphyrin derivative</i> derivado da benzoporfirina
<b>C.</b> -	<i>Cândida</i>
<b>CBS</b> -	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
<b>Ce6</b> -	clorina e6
<b>DMEM</b> -	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> meio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DNA</b> -	<i>desoxiribonucleic acid</i> ácido desoxirribonucléico
<b>DPBS</b> -	<i>Dulbecco's modified phosphate buffered saline</i> tampão fosfato-salina modificado por Dulbecco
<b>EDTA</b> -	<i>ethylenediamine tetracetic acid</i> ácido etilenodiamino tetracético

<b>EROs</b>	-	espécies reativas de oxigênio
<b>5-FC</b>	-	5-flucitosina
<b>5-FU</b>	-	5-fluorouracil
<b>He-Ne</b>	-	hélio neônio
<b>HILT</b>	-	<i>high intensity laser treatment</i> tratamento com laser de alta intensidade
<b>HIV</b>	-	<i>human immunodeficiency virus</i> vírus da imunodeficiência humana
<b>Hp</b>	-	<i>hematoporphyrin</i> hematoporfirina
<b>HpD</b>	-	<i>hematoporphyrin derivative</i> derivado da hematoporfirina
<b>HpDe</b>	-	<i>hematoporphyrin dimethyl ether</i> dimetil éter hematoporfirina
<b>HPV</b>	-	<i>human papillomavirus</i> vírus do papiloma humano
<b>HSL</b>	-	Hospital São Lucas
<b>IgG</b>	-	imunoglobulina G
<b>InGaAIP</b>	-	fosfeto de índio-gálio-alumínio
<b>InGaAsP</b>	-	fosfeto arseneto de gálio-índio
<b>IPB</b>	-	Instituto de Pesquisas Biomédicas
<b>LASER</b>	-	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i> amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
<b>LAP</b>	-	Laboratório de Apoio à Pesquisa
<b>LDL</b>	-	<i>low density lipoprotein</i> lipoproteína de baixa densidade
<b>LED</b>	-	<i>light emitting diode</i> diodo emissor de luz
<b>LILT</b>	-	<i>low intensity level treatment</i> tratamento de baixa Intensidade
<b>LLLT</b>	-	<i>low level laser therapy</i> laserterapia de baixa intensidade
<b>Nd-YAG</b>	-	neodímio ítrio-alumínio-granada

<b>Nd-YAP</b>	-	neodímio ítrio-alumínio-perovisquita
<b>PACT</b>	-	<i>photodynamic antimicrobial chemotherapy</i> quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana
<b>PBS</b>	-	<i>phosphate-buffered saline</i> tampão fosfato-salina
<b>PCR</b>	-	<i>polymerase chain reaction</i> reação em cadeia pela polimerase
<b>PDT</b>	-	<i>photodynamic therapy</i> terapia fotodinâmica
<b>PPC</b>	-	<i>pyridinium zinc (II) phthalocyanine</i> ftalocianina de zinco
<b>pH</b>	-	potencial hidrogeniônico
<b>PpIX</b>	-	protoporfirina IX
<b>PUCRS</b>	-	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
<b>qsp</b>	-	quantidade suficiente para
<b>RNA</b>	-	<i>ribonucleic acid</i> ácido ribonucléico
<b>RNAr</b>	-	ácido ribonucléico ribossômico
<b>SNC</b>	-	sistema nervoso central
<b>SnCe6</b>	-	Sn (IV) clorina e6
<b>sp.</b>	-	Espécie
<b>TG</b>	-	tubo germinativo
<b>TriP[4]</b>	-	<i>5-phenyl- 10,15,20- Tris (N-methyl-4-pyridyl) porphyrin chloride</i> 5-fenil-10,15,20- tris (N-metil-4-piridil) cloreto de porfirina
<b>TE</b>	-	tris EDTA
<b>UFCs</b>	-	unidades formadoras de colônias
<b>UTI</b>	-	unidade de terapia intensiva
<b>YNB</b>	-	<i>yeast nitrogen base</i> base nitrogenada para levedura
<b>YPD</b>	-	<i>yeast peptone dextrose broth</i> caldo de extrato de levedura

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>%</b> -	por cento
<b>β</b> -	Beta
<b>CO<sub>2</sub></b> -	dióxido de carbono
<b>W</b> -	Watt
<b>cm<sup>2</sup></b> -	centímetro quadrado
<b>J</b> -	Joule
<b>W/cm<sup>2</sup></b> -	watt por centímetro quadrado
<b>°C</b> -	grau Celsius
<b>λ</b> -	comprimento de onda
<b>mW</b> -	Miliwatt
<b>Al</b> -	Alumínio
<b>J/cm<sup>2</sup></b> -	joule por centímetro quadrado
<b>nm</b> -	Nanômetro
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> -	peróxido de hidrogênio
<b>˙O<sub>2</sub></b> -	ânion superóxido
<b>mW/cm<sup>2</sup></b> -	miliwatt por centímetro quadrado
<b>mm</b> -	Milímetro
<b>mg/kg</b> -	miligrama por quilograma
<b>cm</b> -	Centímetro
<b>µg/mL</b> -	micrograma por mililitro
<b>®</b> -	marca registrada
<b>mg</b> -	Miligrama
<b>µM</b> -	Micromolar
<b><sup>3</sup>O<sub>2</sub></b> -	oxigênio molecular
<b>˙OH</b> -	radical hidroxila
<b>OH<sup>-</sup></b> -	íon hidroxila
<b>Fe<sup>+3</sup></b> -	íon férrico
<b>Fe<sup>+2</sup></b> -	íon ferroso
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> -	Peroxinitrato

<b>NO<sup>-</sup></b>	óxido nitroso
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	oxigênio singleto
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>µs</b>	Microssegundo
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mg/mL</b>	miligrama por mililitro
<b>X</b>	Vezes
<b>mL</b>	Mililitro
<b>g</b>	Grama
<b>g</b>	Gravidade
<b>cm</b>	Centímetro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>pb</b>	pares de bases
<b>Tris-HCl</b>	tris ácido clorídrico
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>UI/mL</b>	unidades internacionais por mililitro



PUCRS

---

**SUMÁRIO**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1 Candidose</b> .....	<b>36</b>
2.1.1 Fatores Predisponentes à Candidose Oral .....	39
<b>2.2 Drogas Antifúngicas</b> .....	<b>40</b>
2.2.1 Derivados Poliênicos .....	41
2.2.1.1 <i>Nistatina</i> .....	41
2.2.1.2 <i>Anfotericina B</i> .....	42
2.2.2 Derivados Azólicos .....	43
2.2.2.1 <i>Derivados Imidazólicos</i> .....	43
2.2.2.2 <i>Derivados Triazólicos</i> .....	44
2.2.3 Equinocandinas .....	47
2.2.4 Análogo de Nucleosídeo .....	47
<b>2.3 Laser</b> .....	<b>48</b>
2.3.1 Histórico .....	48
2.3.2 Conceitos .....	49
2.3.2.1 <i>Dosimetria, Densidade de Energia, Dose, Fluência</i> .....	49
2.3.2.2 <i>Potência, Output</i> .....	49
2.3.2.3 <i>Taxa de Fluência, Densidade de Potência, Intensidade, Irradiância</i> .....	49
2.3.3 Características da Luz Laser .....	50
2.3.4 Tipos de Laser .....	50
2.3.4.1 <i>Laser Cirúrgico</i> .....	50
2.3.4.2 <i>Laser Terapêutico</i> .....	51
2.3.4.2.1 <i>Ação do Laser Terapêutico</i> .....	52
<b>2.4 Terapia Fotodinâmica (PDT)</b> .....	<b>56</b>
2.4.1 Considerações Gerais .....	56
2.4.2 Fotossensibilizadores .....	57

2.4.2.1 Fenotiazínicos .....	59
2.4.3 Fotofísica da PDT .....	62
2.4.4 Aplicação da Luz .....	65
2.4.5 Mecanismo de Ação da PDT .....	66
2.4.6 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT, <i>Antimicrobial Photodynamic Therapy</i> ) .....	69
2.4.7 Terapia Fotodinâmica Antineoplásica .....	79
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>3.1 Hipótese .....</b>	<b>85</b>
<b>3.2 Objetivos .....</b>	<b>85</b>
3.2.1 Objetivo Geral .....	85
3.2.2 Objetivos Específicos .....	85
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1 Delineamento .....</b>	<b>87</b>
<b>4.2 Variáveis .....</b>	<b>87</b>
4.2.1 Variável Independente .....	87
4.2.2 Variáveis Dependentes .....	87
<b>4.3 Caracterização da Amostra .....</b>	<b>87</b>
4.3.1 Critérios de Inclusão e Exclusão .....	87
4.3.2 Critério Definidor de Candidose .....	88
<b>4.4 Instrumentos .....</b>	<b>88</b>
4.4.1 Laser .....	88
4.4.1.1 <i>Cálculo da Dosimetria</i> .....	88
4.4.1.2 <i>Normas de Segurança</i> .....	88
4.4.2 Fotossensibilizador .....	89
<b>4.5 Procedimentos .....</b>	<b>89</b>
4.5.1 Coleta de Dados .....	89

4.5.2 Coleta de Material da Mucosa Oral .....	89
4.5.3 Cultivo de <i>Candida</i> sp. ....	90
4.5.4 Identificação da <i>Candida</i> sp. ....	90
4.5.4.1 Prova do Tubo Germinativo .....	91
4.5.4.2 Microcultivo em Meio Rico em Amido .....	92
4.5.4.3 Cultivo em Ágar Cromogênico .....	93
4.5.4.4 Prova de Assimilação de Carboidratos .....	94
4.5.4.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) .....	95
4.5.4.5.1 Extração do DNA .....	95
4.5.4.5.2 Oligonucleotídeos Iniciadores .....	96
4.5.4.5.3 Amplificação do DNA .....	96
4.5.5 Diluições Seriadas e Preparo das Soluções para Aplicação da PDT .....	97
4.5.6 Aplicação da PDT nas Culturas de <i>Candida</i> sp. ....	98
4.5.7 Quantificação da Inativação Fotodinâmica da <i>Candida</i> sp. ....	100
4.5.8 Cultivo de Células Epiteliais .....	100
4.5.9 Aplicação da PDT nas Culturas de Células Epiteliais .....	101
4.5.9.1 Dosimetria de 100 J/cm <sup>2</sup> .....	101
4.5.9.2 Dosimetria de 270 J/cm <sup>2</sup> .....	102
4.5.9.3 Dosimetria de 450 J/cm <sup>2</sup> .....	103
4.5.10 Avaliação do Efeito da PDT nas Células Epiteliais .....	103
<b>4.6 Análise dos Dados .....</b>	<b>105</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>107</b>
<b>5.1 <i>Candida</i> sp. ....</b>	<b>107</b>
5.1.1 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 100 J/cm <sup>2</sup> em <i>Candida</i> sp. ....	107
5.1.2 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 270 J/cm <sup>2</sup> em <i>Candida</i> sp. ....	108
5.1.3 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 450 J/cm <sup>2</sup> em <i>Candida</i> sp. ....	108

5.1.4 Viabilidade Percentual Média das UFCs de <i>Candida</i> sp. após Aplicação da PDT com Laser nas Dosimetrias de 100 J/cm <sup>2</sup> , 270 J/cm <sup>2</sup> e 450 J/cm <sup>2</sup> .....	110
5.1.5 Viabilidade Percentual Média das UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. não-albicans</i> após Aplicação da PDT com Laser nas Dosimetrias de 100 J/cm <sup>2</sup> , 270 J/cm <sup>2</sup> e 450 J/cm <sup>2</sup> .....	110
<b>5.2 Células Epiteliais .....</b>	<b>112</b>
5.2 1 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 100 J/cm <sup>2</sup> em Células Epiteliais .....	112
5.2 2 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 270 J/cm <sup>2</sup> em Células Epiteliais .....	113
5.2 3 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 450 J/cm <sup>2</sup> em Células Epiteliais .....	114
5.2.4 Viabilidade Percentual Média das Células Epiteliais nos Diferentes Grupos Independentemente da Dosimetria Aplicada .....	
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>132</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>134</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>152</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>157</b>



PUCRS

---

## 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Candida* sp., principalmente a espécie *C. albicans*, é freqüentemente encontrado como comensal nos tratos digestivo e vaginal do hospedeiro humano (SIDRIM; MOREIRA, 1999). A *C. albicans* participa da microbiota normal dos indivíduos em mais de 60% da população, sem qualquer manifestação clínica, sendo estes considerados portadores do fungo (EPSTEIN; PEARSALL; TRUELOVE, 1981). Já o termo candidose possui conotação genérica e é empregado para denominar as doenças causadas pela *C. albicans* e por outras espécies da levedura e representa a mais freqüente infecção fúngica oportunista (SIDRIM; MOREIRA, 1999). A candidose oral é um problema comum que se instala como uma infecção crônica sem evoluir para grave envolvimento sistêmico, a menos que o indivíduo seja imunocomprometido (JEGANATHAN; CHAN, 1992).

Os tratamentos convencionais para a candidose incluem os derivados poliênicos como a nistatina, que apresenta comprovada eficácia contra *C. albicans*. A droga está disponível na forma de suspensão para bochechos, pode ser deglutida, mas apresenta sabor desagradável, que pode causar náusea e vômito. A anfotericina B, de uso parenteral, é um derivado poliênico reservado para casos sistêmicos graves e possui efeitos colaterais como febre, calafrios, náusea, diminuição da função renal com elevação da concentração de uréia e creatinina e redução dos níveis de potássio (MARQUES; CAMARGO, 1998). O uso de derivados azólicos, como o cetoconazol, o itraconazol e o fluconazol, também é indicado para quadros graves de candidose com envolvimento sistêmico (ANDRADE, 1999). Os efeitos adversos mais comuns do cetoconazol são náusea e prurido e, menos freqüentemente, podem ocorrer problemas gastrintestinais e disfunção hepática (SANZ; NEWMAN, 1997).

Células fúngicas e células humanas são estruturas eucarióticas. Portanto, muitas substâncias com propriedades antifúngicas acarretam uma série de efeitos colaterais ao homem, fato que limita o avanço da terapia antifúngica (ROCHA; SIDRIM, 2004). Em função de os fungos serem eucarióticos, os antifúngicos assemelham-se muito mais a agentes antitumorais que a antibacterianos, que são agentes que têm como alvo seres procarióticos (DE PAUW, 2000). Apesar de a

parede celular do fungo ser diferente da estrutura celular dos mamíferos, o que viabiliza o uso de drogas com mecanismo de ação sobre a parede celular fúngica, existem poucas substâncias antifúngicas eficazes disponíveis, sendo que a maioria delas também é tóxica aos humanos (KORNMAN, 1997).

Na Odontologia, o LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* ou amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) tem sido empregado na anti-sepsia de feridas; em preparos cavitários; na redução da população bacteriana de canais endodônticos e em bolsas periodontais (GARCEZ et al., 2003). Os lasers de alta potência ou cirúrgicos têm sido empregados em cirurgias, enquanto lasers de baixa potência, também denominados terapêuticos ou não-ablativos, têm sido usados em procedimentos terapêuticos clínicos (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

A associação a corantes fotossensibilizadores, como o azul de metileno, potencializa a capacidade de o laser terapêutico produzir inativação microbiana. O processo é denominado terapia fotodinâmica antimicrobiana ou APDT (*Antimicrobial Photodynamic Therapy*). A APDT consiste na associação de um agente fotossensibilizador, geralmente exógeno, administrado por via tópica ou sistêmica, a uma fonte de luz visível, com o objetivo de provocar inativação microbiana (SALVA, 2002; GARCEZ et al., 2003). A APDT não deve ser considerada como substituta dos fármacos antimicrobianos ou de qualquer tratamento convencional, mas como uma nova modalidade de tratamento de infecções localizadas e como tratamento complementar eficaz de infecções bucais (GARCEZ et al., 2003), principalmente em casos de microrganismos resistentes.

A sensibilidade dos microrganismos à PDT (*Photodynamic Therapy*) sugere a aplicabilidade da técnica *in vivo*, em infecções localizadas, de pouca profundidade e de microbiota conhecida. Baixo custo, mínimos efeitos colaterais, ausência de ação sistêmica e baixa toxicidade do azul de metileno, associados à chance de se evitarem gastos com antifúngicos e de reduzir-se a probabilidade de recorrência, são as principais vantagens da terapia (GARCEZ et al., 2003). Além disso, as vantagens da APDT com azul de metileno incluem simplicidade técnica e ausência de risco de resistência fúngica (TEICHERT et al., 2002), características que tornam a técnica uma alternativa viável para aplicação clínica.

Os fotossensibilizadores requerem maior aporte de oxigênio para exercerem sua ação, sendo que, quanto maior o aporte, tanto maior a distribuição do

fotossensibilizador (FREITAS, 1991). As infecções fúngicas bucais são prontamente acessíveis ao fotossensibilizador e ao laser. O fotossensibilizador, por sua vez, pode ser aplicado topicamente, e a cuidadosa manipulação do feixe de laser apenas no tecido corado pode ajudar a minimizar o dano induzido fotoquimicamente aos tecidos saudáveis adjacentes (WILSON; MIA, 1993).

Os testes *in vitro* podem detectar toxicidade de substâncias para uso em seres humanos, principalmente aquelas de aplicação clínica, que não devem causar reações adversas nem lesar o paciente. As culturas de células podem ser empregadas com sucesso para este fim, pois são reprodutíveis, de rápida obtenção e economicamente acessíveis. Métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como limitação do número de variáveis experimentais, obtenção de dados significativos mais facilmente e período de teste mais curto (ROGERO et al., 2003).

O presente estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a eficácia antifúngica da PDT com azul de metileno e laser diodo fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) em culturas de *Candida* sp., bem como seu efeito sobre culturas de células epiteliais.



PUCRS

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Candidose

As leveduras são fungos comuns à microbiota indígena do hospedeiro humano e constituem a principal causa de infecção fúngica da cavidade oral. Pelo menos 25 gêneros e 167 espécies desses microrganismos foram isolados do homem, mas apenas 40 espécies dentro de dez gêneros causam manifestação clínica nesse hospedeiro (STENDERUP, 1990). O gênero *Candida* é, freqüentemente, encontrado como comensal nos tratos vaginal e digestivo (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a). A *C. albicans* é a espécie dominante na cavidade oral, seguida pela *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (STENDERUP, 1990).

Geralmente, mais de uma espécie do fungo é isolada a partir das lesões de candidose oral (STENDERUP, 1990). Assim, juntamente à *C. albicans*, as espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* também estão implicadas em quadros de candidose. As espécies *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. kefyr* (*C. pseudotropicalis*) e *C. guilliermondii* são menos freqüentemente isoladas das lesões (SIDRIM; ROCHA, 2004). De acordo com Edman (1998), as espécies *C. kefyr*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* vivem no solo e, algumas vezes, integram a microbiota humana.

O isolamento de leveduras da cavidade oral de pacientes sem manifestação clínica revela freqüência média de 34,4% de portadores para as espécies de *Candida* em geral e de 17% para a *C. albicans* (STENDERUP, 1990). De acordo com Arendorf e Walker (1979), a língua, o palato e a mucosa jugal são os locais mais afetados pela candidose, já que são os sítios mais freqüente e densamente colonizados em portadores do fungo, sendo que, na presença de fatores predisponentes, são os primeiros locais a alcançar uma concentração de organismos suficiente para causar manifestação clínica.

Segundo Fotos, Vincent e Hellstein (1992), o eritema da mucosa constitui a apresentação clínica mais prevalente da candidose oral. Os autores verificaram que 60% dos pacientes apresentavam candidose eritematosa, 36% apresentavam candidose pseudomembranosa e 24%, a forma hiperplásica. Dos 100 pacientes

avaliados, 39% usavam próteses removíveis. Entre 71 pacientes HIV-positivos avaliados por McCarthy et al. (1991), 37% apresentaram história de candidose. Nestes, a forma eritematosa foi a mais freqüente, acometendo 20% dos indivíduos, seguida pela pseudomembranosa, que acometeu 11% deles.

Ruhnke et al. (1994) isolaram 305 amostras da cavidade oral de 65 indivíduos HIV-positivos, obtidas antes e após terapia com fluconazol, sendo 201 (66%) *C. albicans*, 50 (16,5%) *C. glabrata*, 35 (12%) *C. krusei*, 11 (4%) *C. tropicalis*, três (1,0%) *Geotrichum candidum* e dois (0,5%) *Saccharomyces cerevisiae*. A *C. albicans* foi isolada de todos os pacientes com candidose orofaríngea antes da terapia com fluconazol e em mais de 75% de todos os pacientes após cura clínica da mesma. No mínimo duas espécies de *Candida* foram isoladas de 38 amostras. Nos pacientes com candidose orofaríngea recorrente tratada repetidamente com fluconazol, espécies *C. não-albicans* foram detectadas como único microrganismo isolado ou associado com *C. albicans*, apenas após terapia com fluconazol.

A *C. dubliniensis* é uma espécie associada à infecção e à colonização oral em pacientes HIV-positivos que foi identificada por Sullivan et al. (1995). Essa espécie apresenta características fenotípicas e genotípicas semelhantes às da *C. albicans* (MOSCA et al., 2005), podendo ter sido incorretamente diagnosticada em períodos anteriores à sua identificação. Kantarcioglu e Yücel (2002) reavaliaram 129 amostras identificadas como *C. albicans* isoladas do trato respiratório, da boca, da vagina e das fezes de pacientes imunocomprometidos por neoplasias, corticoterapia, antibioticoterapia, diabetes e com sorologia desconhecida para HIV. Essas amostras tinham sido identificadas previamente como *C. albicans* por meio da produção de tubo germinativo e clamidoconídios. Na reavaliação dos autores, após seis testes baseados em critérios fenotípicos, três (2,3%) foram reconhecidas em todos os testes como *C. dubliniensis*. Os autores relatam que a *C. dubliniensis* também pode ser encontrada como comensal em indivíduos HIV-negativos.

Mosca et al. (2005) avaliaram 12 pacientes portadores de estomatite protética que usavam aparelhos ortopédicos removíveis e identificaram a *C. dubliniensis* como causa primária da lesão em um paciente adolescente imunocompetente. Este foi o primeiro caso de *C. dubliniensis* relatado em adolescente portador de aparelho ortopédico removível.

Finlay, Richardson e Robertson (1996) avaliaram 73 pacientes que desenvolveram candidose oral após radioterapia de cabeça e pescoço. Ao final do

tratamento antifúngico, na maioria dos casos, os organismos isolados foram *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*. As espécies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* foram menos freqüentes.

Borromeo, McCullough e Reade (1992) realizaram estudo com 60 pacientes e verificaram que a *C. albicans* foi isolada em 35% (7/20) dos indivíduos dentados sem candidose, em 50% (10/20) dos desdentados sem candidose e em 85% (17/20) dos portadores de candidose eritematosa.

Cross et al. (2004) verificaram que a *C. albicans* foi a única espécie isolada de amostras de 12 pacientes em um total de 22 portadores de estomatite protética, uma forma de candidose eritematosa. Nos dez restantes, havia associação da *C. albicans* com outras espécies do fungo como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Al-Abeid et al. (2004) avaliaram 95 pacientes portadores de câncer submetidos à quimioterapia, radioterapia e/ou tratamento cirúrgico, e 65 indivíduos saudáveis. Os autores coletaram amostras da cavidade oral e verificaram a prevalência de 31,5% de *C. albicans*, 23,2% de *C. glabrata*, 12,6% de *C. parapsilosis* e 5,3% de *C. tropicalis* nos pacientes portadores de câncer. Os indivíduos saudáveis exibiram prevalência de 27,7% de *C. albicans*, 6,2% de *C. glabrata* e nenhum caso de *C. parapsilosis* ou *C. tropicalis*. A *C. glabrata* e a *C. parapsilosis* foram mais freqüentes em pacientes com leucemia do que em pacientes com tumores sólidos.

Em estudo *in vitro* realizado por Pfaller e Diekema (2004), com 6082 isolados de *Candida* sp. colhidos do sangue de pacientes de 250 centros médicos de 32 países em um período de dez anos (1992-2001), constatou-se que a *C. albicans* foi a espécie predominante (55,9% dos isolados), seguida por *C. glabrata* (16,2%), *C. parapsilosis* (13,1%), *C. tropicalis* (9,6%) e *C. krusei* (2,5%). Os autores também isolaram outras espécies como *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* e achados mais raros como *C. lambica*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. inconspicua*, *C. sake*, *C. norvegensis* e *C. zeylanoides*. Segundo os autores, na América Latina, a *C. tropicalis* foi a segunda espécie mais freqüente nas candidemias. Também foram observados aumento da freqüência da *C. glabrata* e diminuição da *C. parapsilosis* como causadoras de candidemia na maioria das regiões geográficas estudadas.

### 2.1.1 Fatores Predisponentes à Candidose Oral

A passagem do fungo de comensal a patógeno depende da combinação de fatores relacionados ao hospedeiro, fatores dependentes do próprio fungo e fatores que modificam o microambiente da cavidade oral (AGUIRRE URIZAR, 2002). A candidose oral é considerada a "enfermidade do paciente enfermo" (McCARTHY et al., 1991), já que necessita de um ou vários fatores predisponentes para a sua instalação (AGUIRRE URIZAR, 2002). A *C. albicans*, espécie mais virulenta, ocorre como comensal no homem e é capaz de invadir e danificar os tecidos apenas quando as defesas estão local ou sistemicamente comprometidas (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990b). De acordo com Oksala (1990), o tratamento eficaz da candidose requer a correção do fator predisponente, já que, sem o mesmo, torna-se difícil ocorrer doença fúngica.

Os fatores que dispõem o indivíduo à candidose oral são: idade avançada; infância; gravidez; diabetes melito; hipotireoidismo; deficiência de ferro, folato e vitamina B12; leucemia aguda; AIDS; aplasia do timo; uso de corticóides ou antibióticos de amplo espectro; xerostomia; dieta rica em carboidratos; leucoplasia; câncer de boca; tabaco e próteses dentárias removíveis (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a). Imunodepressão, tratamentos medicamentosos para AIDS, rádio e quimioterapia, transplantes de órgãos e de medula óssea (KLEINEGGER; STOECKEL; KURAGO, 2001) e neutropenia (DE PAUW, 2000) também são fatores predisponentes importantes.

O aumento da prevalência de candidose superficial e invasiva verificado nas últimas décadas tem sido associado ao amplo uso de antibióticos e imunossupressores (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a). Além desses medicamentos, os antidepressivos tricíclicos e diuréticos podem atuar como fatores predisponentes à candidose, pois provocam hipossalivação (FOTOS; VINCENT; HELLSTEIN, 1992). De acordo com McCarthy et al. (1991), a candidose é três vezes mais freqüente em portadores de hipossalivação.

A candidose pode provocar disfagia e disgeusia, o que leva à diminuição do apetite e pode afetar gravemente imunocomprometidos que necessitam de uma dieta hipercalórica, como os HIV-positivos, pacientes hospitalizados e idosos (AGUIRRE URIZAR, 2002). A maior freqüência em indivíduos idosos ocorre em

função do uso de medicamentos e de próteses dentárias removíveis. Na boca, a adesão de leveduras à mucosa e à prótese é, provavelmente, um fator inicial importante para a patogênese da infecção (OLSEN, 1990), já que a levedura pode aderir à resina acrílica (BATISTA; BIRMAN; CURY, 1999). As próteses alteram as condições da mucosa oral, podem produzir microtraumatismos, dificultam a chegada de anticorpos salivares e proporcionam a acidificação do meio, o que favorece a proliferação dos fungos (AGUIRRE URIZAR, 2002), principalmente se o uso for contínuo e a limpeza das mesmas, deficiente (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a). Para Cross et al. (2004), a prótese deve ser considerada um reservatório de *Candida* sp. e fonte potencial de reinfecção.

O processo de infecção pela *Candida* sp. inicia com a aderência de organismos comensais às células da mucosa ou queratinócitos, que, provavelmente, envolve a interação de polissacarídeos da célula fúngica com um sítio receptor na célula epitelial (MIDGLEY; CLAYTON; HAY, 1997). A alta frequência de candidose em idosos sugere que, com o avanço da idade, o ambiente bucal torna-se permissivo à *Candida* sp., isto é, a mucosa torna-se mais adesiva, enquanto os níveis de fatores salivares inibitórios contra a adesão e o crescimento do fungo diminuem (TANIDA et al., 2001). Além disso, idosos apresentam capacidade-tampão da saliva mais baixa que indivíduos jovens (MÄHÖNEN; VIRTANEN; LARMAS, 1998).

A candidose também é mais freqüente em mulheres (NEVALAINEN; NÄRHI; AINAMO, 1997). Esta maior frequência pode ser resultado do maior aporte do sexo feminino aos serviços de assistência à saúde, quando comparado ao sexo masculino (MIOTTO; YURGEL; CHERUBINI, 2002). Além disso, há o fato de que homens têm capacidade-tampão salivar mais elevada que a das mulheres (MÄHÖNEN; VIRTANEN; LARMAS, 1998).

## **2.2 Drogas Antifúngicas**

A maioria dos agentes antifúngicos atua sobre os esteróis da membrana celular fúngica ou contra enzimas que regulam a síntese de ácidos nucleicos (AGUIRRE URIZAR, 2002). Embora os agentes antifúngicos sejam eficazes, recorrências após a interrupção do tratamento são comuns em alguns pacientes

(EPSTEIN; PEARSALL; TRUELOVE, 1981). Além disso, o uso indiscriminado de antifúngicos tem proporcionado resistência adquirida nas espécies *C. albicans* e *C. não-albicans* (ÇITAK et al., 2005).

Segundo Budtz-Jørgensen (1990a), o tratamento tópico com antifúngico tem efeito temporário, já que a cavidade oral é reinfectedada pela *Candida* sp. do trato digestivo, e a reinfecção torna-se mais provável se algum fator predisponente estiver presente. A terapia tópica tem a vantagem de ser menos danosa à microbiota indígena, que está em risco durante o tratamento antifúngico sistêmico (WAINWRIGHT, 1998), além de ter baixo risco de interações medicamentosas (TEICHERT et al., 2002). A terapia sistêmica tem a vantagem de alguns medicamentos serem administrados em dose diária única, fator importante em pacientes idosos ou com doenças sistêmicas que apresentam manifestações orais ulcerativas, como pênfigos, líquen plano, síndrome de Behçet, entre outras. Esses pacientes apresentam xerostomia e, freqüentemente, utilizam outros medicamentos tópicos para controlar a dor (FOTOS; VINCENT; HELLSTEIN, 1992).

### 2.2.1 Derivados Poliênicos

A ação dos derivados poliênicos macrolídeos decorre de sua ligação ao ergosterol, um análogo do colesterol dos mamíferos, presente na membrana citoplasmática fúngica (DE PAUW, 2000). Eles desestabilizam a membrana, facilitando a formação de canais que resultam no aumento da permeabilidade da mesma e perda de pequenas moléculas e eletrólitos do meio intracelular, em especial o potássio, o que altera a homeostase do fungo com efeito, fundamentalmente, fungicida (FICA, 2004b; ROCHA; SIDRIM, 2004). Tais alterações da membrana celular, além de reduzirem a adesão da célula fúngica, também inibem sua reprodução (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 1998).

#### 2.2.1.1 Nistatina

A nistatina é uma droga que surgiu em 1951, obtida a partir de culturas de *Streptomyces noursei*. A droga é administrada, por via tópica, em micoses

superficiais de pele e mucosas, quase que exclusivamente causadas por *Candida* sp. O uso parenteral é inviabilizado por sua toxicidade (LACAZ et al. 2002; ROCHA; SIDRIM, 2004) e, em caso de ingestão, possui efeitos adversos como náusea, vômito e diarreia, que desaparecem com redução da dose (SANZ; NEWMAN, 1997; LACAZ et al. 2002). Ellepola, Panagoda e Samaranayake (1999) relatam que breve exposição de isolados de *Candida* sp. à nistatina reduz significativamente a capacidade dos mesmos em aderir às células epiteliais da mucosa oral. Epstein, Pearsall e Truelove (1981) trataram pacientes portadores de estomatite protética com nistatina tópica por duas semanas e verificaram recidiva das lesões 14 dias após a interrupção do tratamento, o que, segundo os autores, indicou que a terapia não obteve benefícios a longo prazo.

#### 2.2.1.2 Anfotericina B

A anfotericina B surgiu nos anos 50 e é derivada do *Streptomyces nodosus* (DE PAUW, 2000). A droga é indicada como tratamento de escolha para a candidose sistêmica, sendo empregada por via endovenosa (LACAZ et al., 2002).

Carrillo Muñoz et al. (1997) testaram, *in vitro*, a sensibilidade a antifúngicos de 181 cepas de *Candida* sp. isoladas da urina de 200 pacientes internados e verificaram que todas as espécies estudadas (*C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*) foram sensíveis à anfotericina B. Embora possa ser eficaz no tratamento da candidose, a anfotericina B apresenta efeitos colaterais imediatos como febre, calafrios e náuseas, sendo a nefrotoxicidade o efeito colateral tardio mais importante (LACAZ et al., 2002).

Outra limitação da anfotericina B é a incompatibilidade com vários medicamentos, tais como aminoglicosídeos, antiinflamatórios, ciclosporina, anti-histamínicos, vitaminas, benzilpenicilina, tetraciclina e clorpromazina (MARQUES; CAMARGO, 1998; LACAZ et al., 2002).

A *C. albicans*, quando se torna resistente à anfotericina B, apresenta um esterol modificado na sua membrana plasmática, embora possam existir outros mecanismos de resistência (LACAZ et al., 2002).

### 2.2.2 Derivados Azólicos

Os derivados azólicos são classificados como imidazólicos e triazólicos. Na década de 70, foram sintetizados os imidazólicos e, posteriormente, os triazólicos, que possuem maior espectro de ação e menos efeitos colaterais. Os derivados triazólicos estão entre os antifúngicos mais eficazes e têm sido indicados como alternativa à anfotericina B (ZAITZ, 1998). Apesar de as novas gerações serem mais aprimoradas, a principal desvantagem dos azóis é a atividade fungistática (VICENTE et al., 2003).

Os azóis interferem na síntese do ergosterol, bloqueando a enzima 14- $\alpha$ -demetilase, presente no citocromo P-450 da membrana da célula fúngica, o que impede a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol (FICA, 2004b). Como o citocromo P-450 tem papel vital na síntese e no metabolismo dos ácidos graxos, esteróides e glicoesteróides do microrganismo (LACAZ et al., 2002), a função da membrana celular é alterada e aumenta sua permeabilidade (FICA, 2004b). De acordo com Fica (2004a), os derivados imidazólicos e triazólicos também atuam no citocromo P-450 da espécie humana, inibindo o metabolismo de outros compostos pela interferência em diferentes isoenzimas desse citocromo, o que provoca interferência metabólica com certos hormônios ou interação com fármacos metabolizados por esse sistema no fígado. O resultado é um potencial aumento dos níveis plasmáticos de outros fármacos, o que facilita o aparecimento de efeitos adversos.

#### 2.2.2.1 Derivados Imidazólicos

Os derivados imidazólicos são dotados de alta versatilidade, com amplo espectro de atividade antimicrobiana, que inclui fungos, protozoários, bactérias e helmintos. O cetoconazol, derivado imidazólico de segunda geração, foi o primeiro antifúngico de uso oral com amplo espectro de ação (LACAZ et al., 2002; ROCHA; SIDRIM, 2004).

O cetoconazol é o derivado imidazólico mais empregado em micoses superficiais e profundas (LACAZ et al., 2002). Tornou-se disponível no início dos anos 80, sendo a droga de escolha por quase uma década para tratamento de

micoses (MAERTENS, 2004). É indicado para indivíduos infectados com fungos resistentes à nistatina e para imunocomprometidos, sendo utilizado para infecções fúngicas sistêmicas. A droga apresenta boa absorção no trato gastrintestinal, e os efeitos adversos mais freqüentes são náusea e prurido e, menos freqüentemente, podem ocorrer problemas gastrintestinais, em função de intolerância gástrica e disfunção hepática (SANZ; NEWMAN, 1997). O uso prolongado também provoca alteração da síntese de esteróides adrenais (KORNMAN, 1997), além de produzir ginecomastia, impotência e perda de libido no homem (ZAITZ, 1998). No estudo de Batista, Birman e Cury (1999), o cetoconazol e o miconazol apresentaram atividade fungistática em 100% das cepas de *Candida* sp. isoladas de pacientes com estomatite protética, sendo que as concentrações do segundo foram inferiores às do primeiro. Nenhum dos azóis investigados exibiu atividade fungicida, fato que aponta para a necessidade de pesquisarem-se novas drogas antifúngicas, principalmente de uso tópico. Além disso, já foram evidenciadas cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* resistentes ao cetoconazol (ROCHA; SIDRIM, 2004).

#### 2.2.2.2 Derivados Triazólicos

A introdução do fluconazol oral e endovenoso, em 1990, e do itraconazol oral em 1992, representou um avanço no tratamento das infecções fúngicas. Ambos são conhecidos como triazóis de primeira geração e apresentam algumas limitações como indução de resistência, desenvolvimento de interações medicamentosas e toxicidade. A segunda geração de triazóis inclui o voriconazol, o posaconazol e o ravuconazol, que são antifúngicos potentes e de maior atividade contra fungos resistentes. Essas drogas exibem toxicidade semelhante ou inferior à dos triazóis de primeira geração (MAERTENS, 2004).

O fluconazol destina-se ao tratamento de candidose orofaríngea, vaginal, peritoneal e geniturinária, bem como para candidose disseminada. Sugizaki et al. (1998) indicam o fluconazol como alternativa terapêutica para candidose, em função de sua eficácia e baixa toxicidade. Constitui boa alternativa ao cetoconazol para candidoses crônicas mucocutâneas, além de não interferir na síntese da testosterona, nem do cortisol (MAERTENS, 2004). Entre os azóis disponíveis, o fluconazol tem sido o fármaco mais empregado na profilaxia da candidose em

pacientes imunodeprimidos (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a; LÓPEZ, 2004). Ao testarem a sensibilidade de 6082 isolados de *Candida* sp. ao fluconazol, Pfaller e Diekema (2004) verificaram que o mesmo foi eficaz contra a maioria das cepas testadas, especialmente contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (91% a 100% de sensibilidade), espécies responsáveis por 78% das candidemias.

Até os anos 90, era incomum a resistência aos azóis. Atualmente, com o uso indiscriminado do fluconazol em pacientes imunocomprometidos, surgiram microrganismos resistentes a esses medicamentos (MAERTENS, 2004). O uso prolongado de fluconazol pode causar resistência da *Candida* sp. (LACAZ et al., 2002). A *C. krusei* apresenta resistência natural ao fluconazol (FICA, 2004a), e outras espécies de *Candida*, como a *C. glabrata*, apresentam resistência adquirida ao medicamento (ROCHA; SIDRIM, 2004). Para Maertens (2004), embora o aumento da frequência de candidemia por *C. krusei* e *C. glabrata* tenha ocorrido em pacientes com câncer, em receptores de transplante de medula óssea e em pacientes de UTI, ainda é incerto se o fato é resultado da introdução do fluconazol.

Ruhnke et al. (1994) isolaram *C. albicans* da cavidade oral de 11 indivíduos HIV-positivos com candidose orofaríngea recorrente que já haviam sido tratados com fluconazol e verificaram, *in vitro*, que, de 201 cepas de *C. albicans* testadas, 33 foram resistentes ao fluconazol. Os autores observaram que a *C. albicans* não possuía resistência primária ao fluconazol e que a resistência clínica ocorria em pacientes após repetidos tratamentos com esse fármaco, tendo sido observada apenas em pacientes gravemente imunocomprometidos, em estágio final da AIDS e em pacientes com infecção bacteriana e neoplasia concomitantes, como sarcoma de Kaposi progressivo.

Os efeitos colaterais do itraconazol são náusea, diarreia e febre. Interage com outras drogas, como inibidores da protease, diazepam e ciclosporina, aumentando a concentração plasmática das mesmas. Os inibidores da protease ritonavir e indinavir aumentam a concentração do itraconazol no plasma (LACAZ et al., 2002).

Cross et al. (2004) avaliaram a taxa de recorrência da estomatite protética e a persistência da *Candida* sp., após três anos, em dez pacientes que haviam recebido itraconazol por via oral durante 15 dias e em 12 pacientes que utilizaram bochechos e deglutiram o itraconazol solução. Os autores verificaram alta incidência de efeitos colaterais gastrintestinais nos pacientes que utilizaram a formulação líquida. Avaliações clínicas e microbiológicas foram realizadas após seis meses e após três

anos do diagnóstico inicial. Metade dos pacientes exibiu recorrência das mesmas espécies de *Candida*, *C. albicans* e/ou *C. glabrata*. Ao avaliarem a recolonização após três anos, em dez pacientes, novas espécies que não haviam sido isoladas anteriormente foram identificadas, como *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*, indicando que houve recolonização por espécies menos sensíveis ao itraconazol. Apesar disso, todas as espécies exibiram sensibilidade dose-dependente ao fármaco, excetuando-se três isolados de *C. glabrata*.

O ravuconazol é um derivado do fluconazol que tem maior espectro de ação que os derivados triazólicos fluconazol e itraconazol, particularmente contra *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans* (MAERTENS, 2004; CATALÁN; MONTEJO, 2006).

O voriconazol compartilha características farmacocinéticas tanto com o fluconazol como com o itraconazol, sendo ativo contra *Candida* sp. (LÓPEZ, 2004). É indicado nos casos em que o paciente apresenta intolerância gastrointestinal e mucosite, que afetam a absorção do itraconazol (LÓPEZ, 2004). O voriconazol apresenta algumas interações medicamentosas que limitam seu uso, e os efeitos adversos incluem distúrbios visuais, reações dermatológicas e hepáticas (DONNELLY; DE PAUW, 2004).

O voriconazol tem espectro de ação mais amplo que o do fluconazol e do itraconazol, sendo superado apenas pela anfotericina B. O espectro inclui espécies de *Candida* com resistência adquirida (*C. albicans* e *C. glabrata*) ou natural (*C. krusei*) ao fluconazol (FICA, 2004a). Porém as cepas de *C. albicans* com sensibilidade diminuída ao fluconazol e ao itraconazol apresentam resistência cruzada ao voriconazol (MAERTENS, 2004). Em pacientes oncológicos com episódios de neutropenia e febre e suspeita de infecção fúngica, somente o itraconazol tem demonstrado eficácia semelhante à da anfotericina B, o que não pôde ser demonstrado para o voriconazol (FICA, 2004a).

Segundo Fica (2004b), o fluconazol é a melhor alternativa para o tratamento da candidose disseminada ou de infecções invasivas associadas à *C. albicans* na ausência de neutropenia. Para infecções disseminadas associadas a *C. não-albicans*, o mesmo recomenda fluconazol, anfotericina B e voriconazol. Em indivíduos com insuficiência renal, o autor sugere o uso do fluconazol em doses ajustadas, considerando a caspofungina para as espécies *C. glabrata* e *C. krusei*. Na presença de insuficiência hepática, a anfotericina B é recomendada pelo autor, já

que os triazólicos não o são em função de seu metabolismo hepático e interação com outros fármacos.

### 2.2.3 Equinocandinas

As equinocandinas são antifúngicos sintéticos aprovados para tratamento da candidose (MOUDGAL et al., 2005), inclusive para quadros invasivos (DE PAUW, 2000). Agem inibindo a enzima  $\beta$  (1,3)-glucano sintetase, envolvida na síntese da parede celular fúngica (FICA, 2004b), impedindo a síntese de  $\beta$ -1,3-D-glucano, um polissacarídeo importante para a manutenção da integridade da parede celular fúngica (ROCHA; SIDRIM, 2004). Como exemplos de equinocandinas, citam-se a caspofungina, a anidulafungina (LY 303366) e a MK 991 (FICA, 2004b; CATALÁN; MONTEJO, 2006).

### 2.2.4 Análogo de Nucleosídeo

A flucitosina (5-FC) pertence à classe de fluoropirimidinas e foi originalmente usada como um agente antineoplásico potente. Consiste em um análogo de nucleosídeo que é capturado pela célula fúngica e convertido a 5-fluorouracil (5-FU), que é fosforilado e incorporado ao RNA da célula fúngica, causando erro de tradução (DE PAUW, 2000). O medicamento é um derivado fluorado da citosina, que apresenta leucopenia e trombocitopenia como principais reações adversas (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Carrillo Muñoz et al. (1997) testaram, *in vitro*, a sensibilidade de 181 cepas de *Candida* sp. a antifúngicos e verificaram que 38,9% das cepas de *C. tropicalis* foram resistentes à 5-FC.

## 2.3 Laser

### 2.3.1 Histórico

As propriedades terapêuticas do laser vêm sendo estudadas desde a sua descoberta por Einstein, em 1917, quando o mesmo formulou a *Teoria da emissão estimulada*, segundo a qual, em condições especiais, o átomo pode ser excitado a partir do *bombardamento* de um meio ativo, o que o eleva a um nível superior de energia. A emissão espontânea de energia ocorre quando o átomo retorna do seu estado excitado para um nível inferior, e o excesso de energia é liberado na forma de um par de fótons coerentes que viaja em uma mesma direção (PINHEIRO, 1998).

De acordo com Midda e Renton-Harper (1991), a teoria converteu-se em realidade quando Maiman, em 1960, construiu o primeiro emissor de laser de rubi, usando uma barra de rubi sintético. Também na década de 60 houve o desenvolvimento dos lasers de hélio-neônio (He-Ne), neodímio-ítrio-alumínio-granada (Nd-YAG) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Em 1964, Goldman et al. demonstraram o efeito do laser de rubi na cárie dental e, em 1965, Goldman et al. verificaram as modificações *in vitro* e *in vivo*, macro e microscópicas, ocorridas no esmalte dentário após aplicação do laser de rubi. Kinersly et al. (1965) descreveram o modo de ação do laser sólido de rubi, além de comentarem sobre alguns experimentos na área odontológica. Lobene e Fine (1966) também avaliaram a ação do laser de rubi em dentes humanos extraídos. Os autores relataram que quanto mais alta a energia utilizada, maior a profundidade de penetração do laser e que alta taxa de fluência pode produzir rápido e intenso aquecimento do esmalte no local da aplicação. Além disso, enfatizaram a necessidade de proteção ocular tanto do paciente quanto do operador.

O laser terapêutico, sem efeito de corte, mas com ação biomoduladora, foi criado em 1965, por Sinclair e Knoll (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003). Mester, em 1968, foi o primeiro a empregá-lo na clínica médica e defendia a idéia de que os lasers de rubi e argônio, em baixa intensidade, aceleravam a cura de úlceras crônicas (REDDY, 2004).

## 2.3.2 Conceitos

### 2.3.2.1 *Dosimetria, Densidade de Energia, Dose, Fluência*

Dosimetria é a relação entre a energia administrada por um emissor laser e a superfície de irradiação do raio de luz laser (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003). O termo expressa a dose de tratamento (GENOVESE, 2000) e refere-se à unidade de superfície irradiada e não à totalidade de energia emitida (ALMEIDA-LOPES; MASSINI JÚNIOR, 2002), sendo o critério de verificação da eficácia e referência da reprodutibilidade da terapia (BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

### 2.3.2.2 *Potência, Output*

Potência é a capacidade de o aparelho fornecer energia e provocar maior ou menor reação fotobiológica (GENOVESE, 2000) e é representada pela fórmula:

$$\text{Potência (W)} = \frac{\text{Energia (J)}}{\text{tempo (segundos)}}$$

### 2.3.2.3 *Taxa de Fluência, Densidade de Potência, Intensidade, Irradiância*

Taxa de fluência é a relação entre potência de saída da luz e unidade de área. Constitui a grandeza física que avalia a possibilidade de efeito térmico (RIBEIRO et al., 2005).

$$\text{Taxa de fluência (W/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência (W)}}{\text{Área (cm}^2\text{)}}$$

Deve-se considerar que variações da taxa de fluência, do tempo de irradiação ou de ambos podem resultar em uma mesma dose de luz (WAINWRIGHT, 1998).

### 2.3.3 Características da Luz Laser

O laser é uma luz pura, pois possui fótons da mesma cor, mesmo comprimento de onda, mesma frequência e energia, característica conhecida como monocromaticidade. É também coerente, devido à emissão estimulada que gera fótons coerentes cujas energias somam-se e propagam-se na mesma direção no tempo e no espaço. Além disso, o feixe de luz laser é praticamente paralelo, com divergência angular muito pequena, característica conhecida como colimação. Essa pequena divergência permite que, por meio de um sistema de lentes, se consiga concentrar toda a energia do laser de uma forma precisa em um ponto focal (MIDDA; RENTON-HARPER, 1991; GENOVESE, 2000; KNAPPE; FRANK; ROHDE, 2004).

### 2.3.4 Tipos de Laser

#### 2.3.4.1 Laser Cirúrgico

O laser cirúrgico é conhecido como laser de alta potência, laser ablativo, *hard laser*, laser de alta intensidade de energia (*HILT-High Intensity Laser Treatment*). Causa fotodestruição celular por elevação da temperatura do tecido com ação fototérmica que desnatura o conteúdo protéico da célula, o que determina propriedades de corte, coagulação, vaporização do conteúdo hídrico da célula e carbonização do tecido (GENOVESE, 2000; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003). À temperatura de 45°C, nenhuma alteração orgânica ocorre e não há dano tecidual irreversível; entre 45°C e 50°C, alterações enzimáticas ocorrem e há desenvolvimento de edema; temperatura acima de 60°C por poucos segundos resulta em desnaturação protéica do tecido. Entre 90°C e 100°C, o citoplasma celular vaporiza e segue-se dessecação e retração do tecido, a temperatura aumenta rapidamente a várias centenas de graus e, então, carboniza, vaporiza e queima (KNAPPE; FRANK; ROHDE, 2004). Os três componentes mais comuns desse grupo são os lasers de argônio, de CO<sub>2</sub> e Nd-YAG (PINHEIRO; FRAME, 1992).

#### 2.3.4.2 Laser Terapêutico

O laser terapêutico possui baixa potência e é também denominado laser clínico ou não-cirúrgico, laser não-ablativo, laser frio, *soft laser*, LILT (*Low Intensity Level Treatment*) ou LLLT (*Low Level Laser Therapy*). Os lasers terapêuticos mais comumente empregados são o He-Ne e o diodo (PINHEIRO, 1998). O He-Ne foi o primeiro laser gasoso desenvolvido e o primeiro a emitir, de forma contínua, raios com dois comprimentos de onda: 632,8 nm (vermelho) e 543,5 nm (verde) (BASFOR, 1995). Já o laser diodo, é um *chip* semicondutor que funciona como um diodo elétrico, com comprimento de onda variando entre 620 nm e 1500 nm nos espectros vermelho e infravermelho, que são determinados pelo tipo de material semicondutor utilizado. Na maioria dos semicondutores, a energia é liberada na forma de calor, porém, em materiais como o gálio, o alumínio e o arsênio, é liberada na forma de fótons (PINHEIRO, 1998). Os lasers mais comuns são variações do gálio: arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl), que emite um espectro na faixa do infravermelho, ou o fosfeto arseneto de gálio-índio (InGaAsP), que emite espectro visível de luz vermelha ( $\lambda=600-680$  nm) com potência entre 10 e 50 mW (WALSH, 1997).

Radiações com comprimento de onda de 632,8 nm ou 660 nm não são capazes de causar mutações por ação direta sobre o DNA, pois a energia desses fótons é muito baixa para causar ruptura das ligações covalentes da molécula. O DNA e o RNA também não têm banda de absorção na região do espectro visível. As mutações podem ser causadas por agentes secundários, como espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que são gerados na atividade normal da mitocôndria. A ação mutagênica decorreria do efeito dessas EROs diretamente na área irradiada, sendo que o resultado pode aparecer nas células descendentes (KARU; BAKEEVA; MANTEIFEL, 2002).

O laser diodo semicondutor arseneto de gálio (AsGa) atua no infravermelho e varia de 830 nm a 920 nm. A adição de alumínio (Al) à mistura de arseneto de gálio permite a produção de lasers visíveis na faixa do vermelho, constituindo o laser diodo semicondutor AsGaAl, que apresenta comprimento de onda desde o vermelho ao infravermelho, variando entre 620 e 830 nm. Os aparelhos são práticos, pequenos, fáceis de utilizar e o laser possui ação na biomodulação celular. O laser

semicondutor apresenta potência que varia de 10 a 100 W. O He-Ne apresenta comprimento de onda na faixa do visível (632,8 nm) de cor vermelha, com características semelhantes aos diodos AsGaAl (GENOVESE, 2000).

#### 2.3.4.2.1 Ação do Laser Terapêutico

O laser terapêutico é empregado na bioestimulação tecidual e promove hemostasia e estimulação da cicatrização após exodontias. A biomodulação celular é determinada pelos efeitos fotoquímicos e fotoelétricos ou fotofísicos do laser e não acarreta efeito fototérmico (PINHEIRO; FRAME, 1992). Aumento de 1°C é observado em consequência do aumento da atividade metabólica celular na área irradiada (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003). A ação analgésica se dá por sua atuação nos receptores periféricos, que dificulta a transmissão do estímulo doloroso até o sistema nervoso central (SNC). A ação antiinflamatória é exercida mediante aceleração da microcirculação, o que determina alterações na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema e inativação de catabólitos intermediários. Por outro lado, o laser aumenta a celularidade dos tecidos irradiados por aceleração da mitose, ação que se observa principalmente na reparação cicatricial das lesões de maior vascularização e formação abundante de tecido de granulação (GENOVESE, 2000). Os efeitos biológicos comprovados da estimulação com laser incluem ativação da produção de adenosina trifosfato (ATP) e da proliferação das fibras colágenas, formação de enzimas específicas, estimulação da drenagem linfática, angiogênese, aumento da síntese de DNA e de proteínas (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003). Os lasers terapêuticos têm efeitos biológicos que incluem ação antiálgica, vasodilatação, resolução de edema, imunoestimulação e aceleração do metabolismo, como ativação enzimática (WILDER-SMITH, 1988). A irradiação com laser terapêutico pode alterar o processo celular de uma maneira não térmica e dependente do comprimento de onda (BASFORD, 1995).

A energia máxima total do laser terapêutico a ser aplicada por sessão, de acordo com Santos et al. (2003), é de 9 J em crianças; de 20 a 30 J em adultos; e de 18 a 20 J em idosos. De acordo com os autores, os lasers com comprimento de onda visível atuam melhor em lesões superficiais.

A ação mais investigada e aplicável do laser terapêutico é a aceleração da cicatrização de feridas cutâneas (BELKIN; SCHWARTZ, 1989). Os efeitos fotobiológicos de estimulação dependem do comprimento de onda, da dosimetria e da intensidade da luz. Irradiação com luz visível monocromática nas regiões do azul, vermelho e vermelho-distante podem aumentar o metabolismo e ativar proliferação celular. A irradiação causa rearranjo do metabolismo celular, sendo que a luz desempenha o papel de gatilho. Os fotorreceptores primários são componentes da cadeia respiratória no caso de estimulação do metabolismo celular. A inibição depende da dose de luz. Em dosimetrias baixas, a irradiação causa regulação redox do metabolismo celular e, em altas dosimetrias, o dano fotodinâmico prevalece (KARU, 1987; KARU, 1989).

Wilder-Smith (1988) relata que a aplicação de laser He-Ne no comprimento de onda de 632,8 nm, potência de 6 mW por 2,5; 3 e 4 minutos no tratamento de gengivite, herpes labial, hipersensibilidade dentinária, bem como após capeamento pulpar, teve apenas efeito placebo, com resultados muito divergentes entre os pacientes avaliados. No tratamento da gengivite, o laser não proporcionou qualquer melhora, enquanto no herpes não foi possível quantificar-se os efeitos.

Belkin e Schwartz (1989) avaliaram os efeitos do laser terapêutico em culturas de células e verificaram que essa forma de iluminação altera consideravelmente o transporte transmembrana de vários cátions, especialmente do cálcio. A interação laser-tecido é fotoquímica, dependente da absorção por um cromóforo tecidual, como uma enzima ou molécula da membrana ou outro constituinte celular ou extracelular. A absorção aumenta a energia do cromóforo e sua atividade é, então, alterada em relação ao meio e, conseqüentemente, o metabolismo da célula é alterado, o que afeta tecidos e órgãos.

Walsh (1997) relata benefícios da laserterapia em processos de cicatrização, na afta, em pulpotomias, na mucosite e na neuralgia pós-herpética. Segundo o autor, o laser terapêutico não promoveu melhora dos casos de gengivite, alveolite, herpes, periodontite, pericoronarite, sinusite aguda e formação de placa bacteriana.

De acordo com Túner e Hode (1998), os efeitos do laser terapêutico não se limitam ao local de aplicação. Pela ação de mediadores químicos, o efeito pode alcançar sítios anatômicos distantes. Sendo assim, quando o indivíduo é seu próprio controle, deve-se considerar tal efeito na interpretação dos resultados. Além disso, o

laser terapêutico tem efeito restrito no tecido saudável e nas feridas experimentais em indivíduos saudáveis.

Ocaña-Quero et al. (1998) avaliaram os efeitos do laser He-Ne em cultura de células neoplásicas de cães (adenoma mamário). Os autores verificaram que repetidas aplicações, por quatro dias consecutivos, uma vez ao dia, com a taxa de fluência de  $12,8 \text{ mW/cm}^2$ , podem produzir tanto estimulação quanto inibição da proliferação das células neoplásicas. A dosimetria mínima requerida para produzir estimulação foi de  $0,13 \text{ J/cm}^2$  e, para produzir inibição, de  $1,04 \text{ J/cm}^2$ . A dosimetria mais eficaz para induzir proliferação celular foi a de  $0,26 \text{ J/cm}^2$  e, para a inibição celular, foi a de  $2,08 \text{ J/cm}^2$ .

A transmissão da radiação óptica na pele humana depende de muitos fatores individuais diferentes para cada camada. Em geral, parte da luz penetra as camadas mais profundas onde se espalha ou é absorvida, de acordo com as propriedades ópticas do tecido (KOLÁROVÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 1999). Os autores avaliaram, *in vitro*, a penetração do laser He-Ne (632,8 nm, 50 mW) e do laser semiconductor (675 nm, 21 mW) em cortes de pele humana obtidos a partir de cirurgia plástica. A penetração foi maior no maior comprimento de onda (675 nm), pertencente ao laser semiconductor. O espécime mais espesso (19 mm) teve penetração de 0,3% do laser He-Ne (632,8 nm) e de 2,1% do laser semiconductor. Na espessura média de 1,5 mm, a porcentagem de penetração foi de 25% em 632,8 nm e de 33% em 675 nm.

Em amostras de tecido de rato, Melo et al. (2001) verificaram que o comprimento de onda de 670 nm foi capaz de penetrar 17 mm na camada gordurosa da parede abdominal. Os autores acreditam que a consistência da gordura e a ausência de pigmentos atenuam minimamente a penetração da luz vermelha, podendo ser realizada a aplicação externa, em vez de cirurgia aberta, em estudos experimentais.

Pinheiro et al. (2002) avaliaram, *in vitro*, os efeitos do laser terapêutico de 635 nm e de 670 nm, com potência de 5 mW, em células HEP-2 originadas de carcinoma de laringe. Os autores aplicaram as dosimetrias de 0,04; 0,06; 0,08; 1,2; 2,4 e  $4,8 \text{ J/cm}^2$  e verificaram que o comprimento de onda de 635 nm não influenciou o comportamento das células irradiadas. Os resultados não foram significativos, apesar de as células irradiadas no comprimento de onda de 670 nm apresentarem aumento da proliferação.

Karu, Bakeeva e Manteifel (2002) avaliaram a estrutura da mitocôndria da levedura *Torulopsis sphaerica* após irradiação com laser He-Ne no comprimento de onda de 632,8 nm e nas dosimetrias de 4,6 J/cm<sup>2</sup> e 11,5 J/cm<sup>2</sup>. Decorridas 18 horas da irradiação, ao examinar-se a mitocôndria à microscopia eletrônica, não foram verificadas alterações degenerativas como dano à membrana interna ou externa, aumento volumétrico ou contração. Porém, em ambos os grupos irradiados, a estrutura dessa organela nas células descendentes diferiu daquela dos controles. As alterações ultra-estruturais quanti e qualitativas foram dose-dependentes, o que poderia ser explicado pela ação sobre o controle da atividade mitocondrial via síntese protéica (controle da transcrição e tradução) o qual é realizado em nível genético.

Albertini et al. (2004) avaliaram a ação antiinflamatória do laser AsGaAl com comprimento de onda de 650 nm em edema induzido em ratos. Os autores verificaram que a maior redução do edema (45,4%) ocorreu na dosimetria de 2,5 J/cm<sup>2</sup>, sendo que, a 1 J/cm<sup>2</sup>, a redução foi de 27%. Houve necessidade de, no mínimo, duas aplicações uma hora após a indução do edema. Os autores também verificaram que 2,5 J/cm<sup>2</sup> produziram efeito antiinflamatório equivalente a uma dose de 1 mg/kg de diclofenaco sódico, administrado intraperitonealmente, imediatamente após a indução do edema.

De acordo com Aimbire et al. (2005), o laser AsGaAl no comprimento de onda de 650 nm, modo contínuo, dosimetria de 2,5 J/cm<sup>2</sup>, no tempo de 80 segundos, aplicado na região de cabeça e pescoço de ratos, após indução de inflamação, teve a capacidade de reduzir significativamente o infiltrado inflamatório.

Maver-Biscanin, Mravak-Stipetic e Jerolimov (2005) investigaram a ação de dois lasers sobre a *C. albicans* em pacientes com estomatite protética grau II. Um paciente foi tratado com laser diodo de comprimento de onda de 685 nm, dosimetria de 3 J/cm<sup>2</sup>, no modo contínuo, aplicado por dez minutos, a uma distância de 0,5 cm entre a fibra óptica e a lesão, por cinco dias consecutivos. O exame físico revelou redução da intensidade da inflamação. A cultura de amostra obtida da lesão após a irradiação da área foi negativa, porém a cultura de amostra da prótese apresentou crescimento considerável. Outro paciente e sua prótese foram irradiados com laser diodo no comprimento de onda de 830 nm, potência de 60 mW, dosimetria de 3 J/cm<sup>2</sup>, no modo contínuo, aplicado por cinco minutos. A área eritematosa foi irradiada durante cinco minutos, com a fibra óptica distante 0,5 cm da superfície

irradiada. A energia total na área irradiada foi de 18 J por dia, por cinco dias consecutivos. Após o tratamento, o exame físico revelou ligeira redução do eritema. A cultura das amostras coletadas da lesão após a irradiação não apresentou crescimento do fungo, e a cultura das amostras obtidas da prótese ainda apresentou algum crescimento fúngico. Os autores relatam que o comprimento de onda de 685 nm apresentou maior efeito antiinflamatório, possivelmente decorrente do efeito bioestimulante pelo maior tempo de exposição. O efeito fungicida foi maior no comprimento de onda de 830 nm, mas a intensidade da inflamação não diminuiu significativamente. Em função da presença de cromóforos fúngicos endógenos, não foi possível concluir se o efeito fungicida do laser resultou de sua ação bioestimulante ou do efeito fotodinâmico relacionado aos cromóforos.

## **2.4 Terapia Fotodinâmica (PDT)**

### **2.4.1 Considerações Gerais**

A PDT envolve a administração de um agente fotossensibilizador seguida pela ativação do mesmo pela luz. A terapia resulta em uma seqüência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que geram produtos fototóxicos danosos à célula-alvo (DOUGHERTY et al., 1998; BLISS et al., 2004).

A primeira demonstração de fotossensibilização letal de células data de 1900, quando Raab verificou que baixas concentrações de acridina que, no escuro, não possuíam efeito sobre o *Paramecium*, podiam, sob exposição à luz normal do dia, determinar a inativação do microrganismo (KESSEL, 2004). Posteriormente, foram empregadas lâmpadas convencionais emitindo luz branca, com o inconveniente do componente térmico e da dificuldade em se calcular a dose de luz (GARCEZ et al., 2003). Já os lasers passaram a ser empregados em função da monocromaticidade, da facilidade de cálculo da dosimetria e da unidirecionalidade (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

Kömerik et al. (2002) pesquisaram a ação da PDT com azul de toluidina, aplicado topicamente, nas concentrações de 25, 50 e 200 µg/mL e laser pulsado de vapor de cobre associado a corante, na potência de 100 mW e comprimento de onda 633 nm em mucosa oral normal de ratos. Compararam-se os tratamentos com

azul de toluidina na concentração de 25 µg/mL e dosimetria de 110 J/cm<sup>2</sup> por cinco minutos; concentração de 50 µg/mL do corante e 170 J/cm<sup>2</sup> por oito minutos; e concentração de 200 µg/mL e dosimetria de 340 J/cm<sup>2</sup> por 16 minutos. Os animais foram mortos três dias após o tratamento e nenhum deles apresentou alteração visível da mucosa oral. À microscopia óptica, em todos os grupos, as fibras musculares, o tecido conjuntivo e o epitélio estavam intactos e inalterados. Nenhum dano aos vasos sanguíneos, nem necrose ou alterações inflamatórias foram detectados.

#### 2.4.2 Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores são agentes, geralmente exógenos, que, sob iluminação em determinado comprimento de onda e na presença de oxigênio, produzem EROs, que são citotóxicas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; RIBEIRO et al., 2005). Os fotossensibilizadores podem ser administrados por via tópica, intralesional e sistêmica antes da subsequente exposição à luz (ORTH et al., 2000).

Os fotossensibilizadores empregados na APDT são, em sua maioria, derivados de corantes vitais e caracterizam-se por não serem tóxicos às células humanas em concentrações superiores às requeridas para a inativação microbiana efetiva (WAINWRIGHT, 1998).

Corantes têm a habilidade de absorver luz visível com eficiência e são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas (MACHADO, 2000). A localização celular do fotossensibilizador depende de sua natureza química: peso molecular, características lipofílicas e anfifílicas, carga iônica e características da ligação protéica, concentração, tempo de incubação, concentração sérica, bem como do fenótipo da célula-alvo. O fotossensibilizador ideal caracteriza-se por baixa toxicidade após a administração, não induzindo reação alérgica nem hipotensão e deve absorver a luz no espectro vermelho ou vermelho-distante. Deve, também, ser facilmente sintetizado, ser um composto puro, hidrossolúvel e ser eliminado rapidamente pelo paciente (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Ainda, deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficaz, seletivo e minimamente tóxico aos tecidos normais (GARCEZ et al., 2003).

Os fotossensibilizadores podem ser hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos. Essa característica afeta os parâmetros fotofísicos e a eficácia do fotossensibilizador, assim como determina a via de administração *in vivo* do mesmo: oral, endovenosa, intraperitoneal ou tópica. Fotossensibilizadores hidrofóbicos têm alta tendência à agregação em meio aquoso e necessitam de conjugação com outras moléculas como, por exemplo, lipossomos (NYMAN; HYNNINEN, 2004). Os fotossensibilizadores hidrofílicos podem acumular-se rapidamente na lesão e rapidamente serem excretados. Essa propriedade pode ser vantajosa para prevenir fotossensibilidade cutânea ao corante (SEGUCHI et al., 2002).

Meyer-Betz, em 1913, foi pioneiro em demonstrar que a hematoporfirina (Hp) causa fotossensibilidade em humanos. O pesquisador, após injetar, em si próprio, 200 mg da substância em solução salina, verificou sintomas de fotossensibilidade nas áreas expostas à luz. A tendência de as porfirinas acumularem-se em tumores foi descoberta em 1924, a partir da observação de fluorescência de porfirinas naturais em tumores (NYMAN; HYNNINEN, 2004).

Os fotossensibilizadores podem ser classificados por sua estrutura química ou por sua família. A primeira família descoberta foram os derivados da hematoporfirina (HpD). O Photofrin<sup>®</sup>, fotossensibilizador mais freqüentemente empregado na PDT, é relativamente seguro e atóxico, porém os pacientes devem evitar a luz solar por, no mínimo, quatro semanas após o uso (SALVA, 2002). O Photofrin<sup>®</sup> é uma preparação semipurificada do HpD e foi o primeiro fotossensibilizador a obter aprovação regular para tratamento de câncer em vários países, inclusive nos Estados Unidos. Esse fotossensibilizador apresenta algumas limitações como fotossensibilidade cutânea tardia, o que requer que os pacientes evitem a luz solar por cerca de oito semanas; falta de absorção em um comprimento de onda maior que 650 nm e ação antineoplásica pouco eficaz (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Já o ácido aminolevulínico (ALA), precursor da hematoporfirina (SALVA, 2002), quando aplicado topicamente, não apresenta fotossensibilidade sistêmica. É uma substância pouco reativa que necessita de alta energia ou tratamentos mais longos e tem o inconveniente de ser acompanhado de sintomatologia dolorosa durante a aplicação. Em geral, a dosimetria empregada é de 150 J/cm<sup>2</sup>, quando se usa o ALA a 20%, aplicado por via tópica quatro horas antes da irradiação (ALLISON et al., 2004). A administração de ALA leva à formação de protoporfirina IX (PpIX), um

precursor do heme, que se forma e acumula preferencialmente em tecidos com rápida renovação (UEHLINGER et al., 2000).

Na família das clorinas, cita-se o Foscan<sup>®</sup>, de administração endovenosa. A irradiação é feita quatro dias após a injeção. O Foscan<sup>®</sup> é um fotossensibilizador eficaz que necessita de apenas 20 J/cm<sup>2</sup> para ser ativado, sendo empregado na PDT de tumores de cabeça e pescoço. Porém também apresenta o inconveniente da dor durante a terapia e fotossensibilidade, enquanto a droga estiver ativa, mesmo na ausência de luz solar. Como o mesmo é injetado quatro dias antes da aplicação da luz, deve-se orientar o paciente para evitar exposição direta à luz solar nesse período e uma semana após o tratamento. A sensibilidade é elevada mesmo à luz ambiente e persiste, no mínimo, por uma semana (ALLISON et al., 2004).

#### 2.4.2.1 Fenotiazínicos

No final do século XIX, o cientista alemão Ehrlich descreveu as propriedades do azul de metileno, um composto tricíclico que mais tarde se tornaria o núcleo de um grupo de compostos derivados que, juntos, constituem as fenotiazinas (AMARAL; VIVEIROS; KRISTIANSEN, 2001). Os fenotiazínicos são corantes com grande propensão à formação de EROs. O modo de ação dos fotossensibilizadores contra espécies microbianas, tanto aeróbias quanto anaeróbias, é mediado pelo oxigênio singlete, sem, no entanto, ser seletivo a elas (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2004). Os fenotiazínicos azul de metileno, azul de toluidina e azure B são considerados hidrofílicos, enquanto o novo azul de metileno (*new methylene blue*) e o dimetil azul de metileno são lipofílicos (WAINWRIGHT et al., 1998).

De acordo com Harris et al. (2004), o DNA foi o alvo primário dos corantes fenotiazínicos azure A, azure B, azure C, azul de toluidina, dimetil azul de metileno, novo azul de metileno, pironina Y, azul cresil brilhante e vermelho neutro, após aplicação de luz incoerente na dosimetria de 3,15 J/cm<sup>2</sup> e taxa de fluência de 1,7 mW/cm<sup>2</sup> por 30 minutos. Desses, o dimetil azul de metileno também tem como alvo as membranas celulares. A maioria dos corantes era lipofílica, com exceção do azul de toluidina e do vermelho neutro. Os autores verificaram que o azul cresil brilhante não possui potencial para agir como fotossensibilizador na PDT, diferentemente de todos os demais fenotiazínicos avaliados.

A banda de absorção do azul de metileno varia entre 620 e 700 nm, com ótima penetração nos tecidos e absorção máxima em 665 nm em solução aquosa (FERNANDEZ; BILGIN; GROSSWEINER, 1997). Para o azul de toluidina (GARCEZ et al., 2003), a banda máxima de absorção é de 636 nm (TUIITE; KELLY, 1993). O uso desses corantes pode ser tópico ou sistêmico e não apresenta toxicidade (MÜLLER et al., 1998). Devido à baixa toxicidade, aceitação no campo médico e potencial antimicrobiano fotoativo, o azul de metileno é o fotossensibilizador ideal para terapêutica antifúngica (TEICHERT et al., 2002).

Os derivados do azul de metileno como 1,9-dimetil azul de metileno (azul de Taylor) e 1-metil azul de metileno são lipofílicos, enquanto o azul de metileno é hidrofílico. Isso explicaria a localização celular diferente dos derivados metilados do azul de metileno e sua maior toxicidade em relação a este último. Além disso, os metilados têm ação tóxica sobre as células na ausência de luz. Uma maior dosimetria, em função do aumento da taxa de fluência, potencializa a fototoxicidade do azul de metileno, mas possui pouco efeito nos seus derivados metilados. Os derivados metilados apresentam-se nas suas formas oxidadas (catiônicas) por tempo maior que o azul de metileno e, conseqüentemente, têm altas concentrações de formas fotoativas (WAINWRIGHT et al., 1997).

Noodt et al. (1998) avaliaram a ação de um derivado do azul de metileno, *in vitro*, em fibroblastos de hamster. Verificaram que a atividade enzimática do complexo de Golgi, dos lisossomos e do retículo endoplasmático não foi afetada. Porém, a atividade da citocromo c oxidase na mitocôndria estava significativamente reduzida, sendo inativada pela PDT. A fluorescência, após 15 minutos, era bem visível nas mitocôndrias, e as membranas nuclear e citoplasmática apresentaram fluorescência fraca. O derivado do azul de metileno na concentração de 0,05 µg/mL, sem a aplicação do laser, apresentou toxicidade às células sem indução de apoptose. Foi verificado que, 24 horas após a PDT, o número de células começou a decrescer proporcionalmente à dose de luz. O derivado do azul de metileno aplicado por uma hora, na concentração de 0,05 µg/mL e a aplicação do laser por 40 segundos induziram apoptose lentamente, com morte de 60% das células 48 horas após a aplicação da PDT. Na concentração de 0,1 µg/mL, a apoptose ocorreu rapidamente, cerca de três horas após a aplicação.

De acordo com Usacheva, Teichert e Biel (2001), a permanência do azul de metileno e do azul de toluidina por uma hora, nas concentrações de 44 a 230 µM, e

entre 4 e 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente, sem aplicação da luz, apresentou efeito bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Como são hidrofílicos, podem passar através dos canais de proteína que são preenchidos por água, presentes na membrana externa das bactérias. Quanto maior essa habilidade de o fotossensibilizador difundir-se através da membrana, maior será o grau de destruição bacteriana. Ainda, quanto maiores a concentração e a permanência do fotossensibilizador, maior o efeito bactericida do mesmo sem a aplicação da luz. O baixo peso molecular desses corantes, suas cargas positivas e a hidrofilia permitem aos mesmos penetrar com sucesso a membrana plasmática bacteriana. Além disso, o azul de toluidina tem coeficiente de partição quase três vezes maior que o do azul de metileno, o que lhe confere solubilidade maior em regiões hidrofóbicas da membrana com conseqüente maior penetração e concentração no interior da célula.

Kömerik et al. (2002) avaliaram a penetração do azul de toluidina em epitélio oral de ratos e verificaram que o tempo de incubação do mesmo influenciava a penetração no epitélio. Quando o período de incubação era de um minuto, o azul de toluidina concentrava-se na camada queratinizada, mas o aumento desse período para dez minutos, resultava em penetração mais profunda através da camada epitelial. A espessura da camada epitelial também influencia a penetração do fotossensibilizador, pois, nos locais em que a queratinização era mais densa, a penetração limitava-se à superfície da camada córnea.

Mellish et al. (2002) verificaram, pela microscopia de contraste de fase, que o azul de metileno corou os lisossomos das células RIF-1 de fibrossarcoma, após exposição por duas horas. Os autores verificaram pontos de fluorescência, inicialmente nos lisossomos e no citoplasma, principalmente na região perinuclear. Após dez minutos de irradiação, verificaram que a fluorescência citoplasmática tornou-se difusa e passou a localizar-se no núcleo.

A eficácia dos fotossensibilizadores é avaliada a partir das propriedades fotofísicas e fotoquímicas de seus monômeros. De acordo com Usacheva, Teichert e Biel (2003), a concentração do azul de metileno e do azul de toluidina para erradicar bactérias depende de sua capacidade de formar dímeros, o que acontece na presença de sais inorgânicos ou com o aumento da concentração dos mesmos. Tal habilidade é conhecida como metacromasia. Com isso, ocorre a mudança da absorção máxima do corante a um comprimento de onda menor. Os autores verificaram que, na ausência de bactérias, esses fotossensibilizadores tinham maior

capacidade de formar dímeros em solução salina do que em água destilada. Tal fato indica que ânions inorgânicos têm capacidade de induzir a agregação dos corantes fenotiazínicos. Quando se adicionaram bactérias à solução, a atividade de ambos aumentou consideravelmente, sendo que os microrganismos Gram-negativos induziram maior dimerização que os Gram-positivos. O azul de toluidina apresentou maior capacidade de dimerização do que o azul de metileno e maior efeito bactericida, tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. A banda de absorção do dímero apresentou comprimento de onda menor, entre 605 e 610 nm para o azul de metileno; e entre 585 nm e 590 nm para o azul de toluidina, em comparação ao monômero, que apresentou comprimentos de onda entre 664 nm para o azul de metileno e 631 nm para o azul de toluidina. Entretanto, o efeito bactericida foi maior, o que evidencia o envolvimento dos dímeros na inativação bacteriana, já que, quando se aumentou a concentração do corante, houve maior dimerização e, no comprimento de onda dos dímeros, houve maior taxa de inativação bacteriana. Como são catiônicos, esses corantes interagem eletrostaticamente com os diferentes polímeros da superfície da célula bacteriana carregados negativamente. Isso induz a dimerização de moléculas de corante ligadas aos sítios aniônicos dos polímeros bacterianos e formação de dímeros ligados à superfície da célula bacteriana. Portanto, hidrofobicidade, indicada pelo coeficiente de partição do corante; ligação de monômeros e dímeros à membrana celular bacteriana; e concentração do fotossensibilizador determinam o potencial bactericida deste.

#### 2.4.3 Fotofísica da PDT

A PDT requer uma fonte de luz para fornecer a energia necessária à produção local de oxigênio singleto e para promover reações redox (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2004). A eficácia da técnica depende da dose de luz aplicada, da concentração do fotossensibilizador e da disponibilidade de oxigênio. Para causar morte celular, o efeito deve exceder certo limiar (NYMAN; HYNNINEN, 2004).

Lasers e lâmpadas têm sido empregados na PDT com a mesma eficácia. Em sítios acessíveis como a pele, em que a luz pode ser aplicada diretamente, as lâmpadas têm a vantagem de dispensarem o acoplamento de fibra óptica

(BRANCALEON; MOSELEY, 2002). Os lasers mais empregados na PDT são os que têm emissão na região vermelha do espectro eletromagnético, sendo que os do tipo diodo AsGaAl são de baixo custo, se comparados aos lasers He-Ne (GARCEZ et al., 2003).

Quando o fotossensibilizador é ativado na presença de oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ), dois tipos iniciais de processos competidores podem ocorrer. A reação tipo I é iniciada pela interação do fotossensibilizador com biomoléculas e resulta na formação de radicais livres provenientes da transferência de íons hidrogênio ou de elétrons que podem degradá-las (LIM et al., 2002). Na reação tipo I, o fotossensibilizador sofre degradação por ação direta da luz, o que o leva a uma reação química e conseqüente formação de EROs, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), íons hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), radicais hidrogênio e ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (RIBEIRO et al., 2005). Os radicais reagem com o oxigênio para produzir mais EROs. O superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que não é reativo nos sistemas biológicos e não causa dano oxidativo, pode reagir com outros radicais superóxido para produzir peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio ( $^3\text{O}_2$ ), uma reação conhecida como dismutação, que pode ser catalisada pela enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é importante no sistema biológico, pois pode atravessar a membrana celular e, uma vez no interior da célula, não pode ser eliminado, sendo necessário à função de muitas enzimas. O superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) é importante para a produção de radicais hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), altamente reativos. Nesse processo, o superóxido age como redutor, não como agente oxidante. O radical doa um elétron para reduzir os íons metálicos, como o íon férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), que agem como catalisadores para converter peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em radical hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ). A reação é chamada de reação de Fenton e constitui evento biológico importante, pois a maioria das células tem algum nível de ferro, cobre ou outros metais, que podem catalisar a reação. O metal reduzido (íon ferroso ou  $\text{Fe}^{+2}$ ), então, catalisa a quebra da ligação oxigênio-oxigênio do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para produzir o radical hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) e o íon hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). O superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) pode reagir com o radical hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) para formar oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), ou com óxido nitroso ( $\text{NO}^-$ ) para produzir peroxinitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), outra molécula altamente reativa. O radical hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) também atravessa a membrana plasmática e não pode ser eliminado da célula. Esse radical altamente reativo pode ligar-se a um substrato orgânico, possuidor de carbono, e também oxidá-lo, recebendo um elétron do mesmo. O substrato oxidado resultante é um

radical e pode reagir com outras moléculas em uma reação em cadeia. Esse tipo de reação em cadeia é comum no dano oxidativo de ácidos graxos e outros lipídeos e demonstra por que radicais como a hidroxila podem causar dano muito maior que o esperado (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

A reação tipo II ocorre quando o fotossensibilizador, em seu estado tripleto, interage com o oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ) e forma oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), que parece representar o principal agente citotóxico da PDT (FERGUSON, 2002; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002). Na reação tipo II, o fotossensibilizador é preservado e participa do processo apenas como um elemento capaz de transferir energia da fonte de luz ao oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ), que é tripleto em seu estado puro, levando-o ao estado singleto excitado ( $^1\text{O}_2$ ) (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; RIBEIRO et al., 2005). O principal papel do estado singleto do fotossensibilizador no processo de fotossensibilização é agir como precursor do estado tripleto, que tem vida mais longa. O estado tripleto do fotossensibilizador é o estado fotoativo, o qual deve gerar espécies citotóxicas pelas reações supracitadas (FERGUSON, 2002; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002). As duas reações (tipos I e II) podem ocorrer simultaneamente, e a proporção entre esses processos depende do fotossensibilizador usado, da concentração do substrato e da presença de oxigênio (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Um dos principais mecanismos de ação da PDT que emprega corantes como fotossensibilizadores é a reação tipo II. A geração de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) pelo fotossensibilizador torna-se um critério importante para a eficácia da PDT. Quanto maior a geração de oxigênio singleto, menos fotossensibilizador é necessário (WU et al., 2000). Como o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) tem vida muito curta, o fotossensibilizador não ligado à célula não é fototóxico (NYMAN; HYNINEN, 2004). De acordo com Floyd, Schneider Júnior e Dittmer (2004), a reação tipo II mais rápida envolvendo o azul de metileno é a formação de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e estado puro de azul de metileno. Pode haver, também, formação de superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), mas muito mais lentamente.

Devido à alta reatividade e à vida curta do oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e dos radicais hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), apenas moléculas e estruturas próximas à área de sua produção, ou seja, nas áreas de localização do fotossensibilizador, são diretamente afetadas pela PDT (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). A vida e raio de difusão curtos resultam da instabilidade e da alta reatividade do oxigênio singleto

( $^1\text{O}_2$ ) (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2004). De acordo com Moan e Berg (1991), a distância de difusão dessa ERO é da ordem de 0,01 a 0,02  $\mu\text{m}$ , e o tempo de vida varia entre 0,01 e 0,04  $\mu\text{s}$ .

A habilidade de uma molécula de fotossensibilizador desencadear reações redox e/ou formar oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) depende da produção suficiente de moléculas no estado tripleto ( $^3\text{O}_2$ ). Esta, por sua vez, depende da taxa de deterioração dos estados tripleto e singleto inicialmente formados (WAINWRIGHT, 1998). As EROs são responsáveis por danos irreversíveis às membranas celulares incluindo a citoplasmática, a mitocondrial, a lisossomal e a nuclear, além de causarem alterações protéicas (FERGUSON, 2002; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002).

O dano fotodinâmico microbiano está, em alguns casos, bem estabelecido. A ocorrência de uma reação tipo I, com água no meio de cultura microbiano, pode ocasionar aumento do radical hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), o qual pode reagir com biomoléculas ou se combinar para formar peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) *in situ* com resultados citotóxicos subseqüentes (WAINWRIGHT, 1998).

#### 2.4.4 Aplicação da Luz

O processo em que as moléculas absorvem energia, conhecido por excitação, envolve a elevação da molécula de seu estado puro, de baixa energia, ao estado excitado, de alta energia, pela absorção da luz (SUGDEN, 2004). A luz, na PDT, quando penetra no tecido, pode ser espalhada ou absorvida, e esses processos dependem do tipo de tecido e do comprimento de onda. O tecido biológico não é homogêneo, e macromoléculas, organelas e camadas intersticiais tornam-no turvo, o que causa espalhamento e perda da direção do feixe de luz. A absorção ocorre pela presença dos cromóforos teciduais como hemoglobina, mioglobina e citocromos. O espalhamento é o principal fator limitante da penetração da luz nos tecidos (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Para Capella e Capella (2003), quando um tecido é exposto à luz, processos de absorção e espalhamento pelas macromoléculas constituintes do tecido podem ocorrer, o que é uma limitação da PDT. No sangue, a hemoglobina é a proteína que mais absorve luz, particularmente nos comprimentos de onda entre 400 e 600 nm.

Portanto, a luz deve ter comprimento de onda maior que 600 nm para assegurar penetração suficiente no tecido-alvo. Os comprimentos de onda terapêuticos variam de 600 a 800 nm, e apenas corantes com picos de absorção nessa faixa são relevantes clinicamente.

#### 2.4.5 Mecanismo de Ação da PDT

A morte celular na PDT pode ser causada por dano à membrana, liberação de enzimas lisossomais, dano ao DNA e inibição do metabolismo energético. O alvo crítico pode ser distinto em diferentes células, ainda que seja empregado o mesmo fotossensibilizador (DUBBELMAN; PENNING, 1991). O dano ao tecido normal é minimizado pelo acúmulo seletivo do fotossensibilizador no tecido-alvo e aplicação da luz em um espaço confinado e de forma focada (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Em função do estresse agudo sofrido pela célula na PDT, há alterações no metabolismo de cálcio e lipídeos e na produção de citocinas. Muitas das respostas celulares estão centradas na mitocôndria. Esses efeitos levam à indução de apoptose via mitocôndria envolvendo caspases e liberação de citocromo c (KESSEL; LUO, 1999; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005a). A liberação de citocromo c está associada à perda do potencial de membrana mitocondrial, e a ativação de caspases é necessária para o aparecimento da morfologia apoptótica, mas não para a perda do potencial de membrana. Porém, apenas a liberação de citocromo c já é suficiente para iniciar uma resposta apoptótica (KESSEL; LUO, 1999). Após a liberação do citocromo c pela mitocôndria, há a ativação das caspases 9 e 3, e subsequente ativação de vias para estágios finais de apoptose. Na cascata apoptótica, o passo após ativação da caspase 3 é a clivagem de numerosos fatores protéicos, os quais são, normalmente, envolvidos na manutenção da estrutura celular, incluindo reparo do DNA (MOOR, 2000).

De acordo com Oleinick, Morris e Belichenko (2002), o caminho mais freqüente para apoptose de células tratadas pela PDT envolve citocromo c e caspases 6 e 9, sendo improvável que haja um mecanismo universal para a resposta das células à PDT. As respostas variam com o tipo, genética e metabolismo

celulares, assim como com a localização intracelular do fotossensibilizador. Segundo Fickweiler et al. (1999), a indução de apoptose pela PDT depende da concentração da droga e da dosimetria da luz. Produtos da fotossensibilização devem danificar a membrana plasmática e a mitocôndria, levando à necrose, enquanto doses mais baixas e subletais resultam em apoptose.

Ball et al. (1998) avaliaram, *in vitro*, o dano ocasionado pela PDT utilizando um derivado catiônico do azul de metileno e luz proveniente de lâmpada halógena em células P388. Os autores empregaram comprimentos de onda entre 610 e 700 nm, taxa de fluência de 5 mW/cm<sup>2</sup> e dosimetria de 1,5 J/cm<sup>2</sup>. O uso da concentração de 0,02 µM e 0,05 µM do fotossensibilizador, seguido pela aplicação de luz por três minutos, resultou em 50% e 90% de diminuição das células sobreviventes, respectivamente, em relação aos controles. Houve dano mitocondrial significativo e, após 24 horas, as células haviam perdido o potencial da membrana mitocondrial. Na concentração de 0,05 µM, o dano coincidiu com alterações nucleares características de células apoptóticas, o que significa que as mesmas apresentavam mitocôndria despolarizada. Os autores relatam que o grau de degradação do DNA aumentou proporcionalmente à concentração do fotossensibilizador, o que acelerou a apoptose.

O mecanismo de morte celular induzido pela PDT é distinto nas diferentes linhagens de células. Células neoplásicas como HL60 (células leucêmicas) morrem via apoptose pela ativação das caspases, e as Raji (células de linfoma) morrem por necrose (NONAKA; IKEDA; INOKUCHI, 2004). Kessel e Luo (2001), ao avaliarem a apoptose em células leucêmicas L1210 *in vitro*, verificaram que, decorridas quatro horas da aplicação da PDT, 70% das células eram apoptóticas. A resposta apoptótica estava associada à liberação de citocromo c pela mitocôndria e liberação de enzimas proteolíticas pelo lisossomo para o citosol, acarretando rápido e substancial aumento da atividade da caspase 3. Fotossensibilizadores que têm como alvo a membrana plasmática não induziram ativação da enzima caspase 3.

Pazos et al. (2003) avaliaram, em células epiteliais não-neoplásicas (CHO-K1) e em células epiteliais neoplásicas (HeLa), o efeito da exposição a duas ftalocianinas por 60 minutos e aplicação de laser diodo no comprimento de onda de 670 nm. Os autores verificaram que a PDT com fotossensibilizador AIPc inativou 95% das células HeLa, avaliadas 24 horas depois. Já a aplicação isolada do laser não apresentou alteração do número de células HeLa nem das células CHO-K1

viáveis. A aplicação da PDT com o AIPc promoveu morte de 99% das células CHO-K1 24 horas após o tratamento. As células HeLa apresentaram condensação da cromatina, cisternas sob a membrana plasmática e núcleo picnótico, características de apoptose. Os autores verificaram que a aplicação do laser na dosimetria de  $0,5 \text{ J/cm}^2$  apresentou efeito inibitório sobre a proliferação celular. Uma característica da apoptose é a integridade da membrana plasmática. Os autores verificaram que, como é hidrofílico, o AIPcS4 é assimilado pelos lisossomos, o que acarretaria necrose celular. Entretanto, nas células HeLa, ocorreu apoptose, sendo a lesão da membrana dos lisossomos seguida por liberação do conteúdo enzimático para o citoplasma e conseqüente digestão enzimática dos componentes celulares evidenciada por alterações nucleares como núcleo picnótico e fragmentação do DNA (COTRAN et al., 1996). Os efeitos da PDT foram mais intensos nas células neoplásicas (HeLa) que nas células não-neoplásicas. Na PDT, não apenas a resposta ao tratamento, mas, também, a morte celular, expressa como apoptose ou necrose, varia de acordo com as características estruturais da molécula do fotossensibilizador e com o tempo de interação deste com as células (PAZOS et al., 2003).

Os diferentes tipos de laser também acarretam diferentes tipos de morte celular. Miyamoto, Umebayashi e Nishisaka (1999) avaliaram a ação da PDT em células HeLa, utilizando HpD por uma hora, na concentração de  $1 \text{ } \mu\text{g/mL}$  e lasers contínuo e pulsado, na dosimetria de 1 a  $10 \text{ J/cm}^2$ . Os autores observaram que, ao utilizarem o laser pulsado, a viabilidade das células foi maior, e a morte ocorreu por apoptose três a seis horas após a PDT. Já o laser contínuo apresentou ação citotóxica maior que o pulsado, levando as células à necrose.

#### 2.4.6 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT, *Antimicrobial Photodynamic Therapy*)

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT), também conhecida por quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT, *photodynamic antimicrobial chemotherapy*) (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2004), consiste na associação de um fotossensibilizador a uma fonte de luz visível, com o objetivo de provocar inativação microbiana (GARCEZ et al., 2003).

Dobson e Wilson (1992), ao estudarem a PDT com laser He-Ne, no comprimento de onda de 632,8 nm, em biofilmes bacterianos *in vitro*, utilizando tanto o azul de metileno nas concentrações de 0,01% e 0,1%, quanto o azul de toluidina a 0,01%, verificaram que, em 30 segundos ( $16,5 \text{ J/cm}^2$ ), foram letais a *Streptococcus sanguinis* (ex *Streptococcus sanguis*), *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. O azul de toluidina foi eficaz em erradicar as bactérias no tempo de dez segundos de irradiação ( $5,5 \text{ J/cm}^2$ ).

Wainwright et al. (1998) avaliaram, *in vitro*, a atividade bactericida dos corantes fenotiazínicos azul de metileno, azul de toluidina, novo azul de metileno, dimetil azul de metileno e azure B contra amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e compararam-na com a dos antibacterianos flucloxacilina e vancomicina. As amostras foram expostas à luz incoerente (*Exal light Box*), no comprimento de onda entre 350 e 800 nm, taxa de fluência de  $1,7 \text{ mW/cm}^2$  e dosimetria de  $6,3 \text{ J/cm}^2$  por uma hora. Os autores verificaram que a aplicação isolada da luz não afetou o crescimento bacteriano. Os dois compostos mais eficazes foram o dimetil azul de metileno e o novo azul de metileno, pois reduziram significativamente cepas de *Staphylococcus aureus*. Por ser lipofílico, o novo azul de metileno apresentou maior produção de oxigênio singlete, o que levou à maior fotossensibilização das bactérias. O azure B foi o que apresentou menor atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* após fotoativação. De acordo com os autores, a aplicação de luz aumentou em quatro vezes a atividade dos fenotiazínicos, exceto do azure B.

De acordo com Soukos et al. (1998), a PDT com luz vermelha até 671 nm associada ao fotossensibilizador clorina e6 (Ce6), aplicado por um minuto, é eficaz contra *Porphyromonas gingivalis*, bactéria Gram-negativa e *Actinomyces naeslundii*

genótipo 2 (ex *Actinomyces viscosus*), Gram-positivo, com redução de 99% e 99,99% desses microrganismos respectivamente. Os autores verificaram que o fotossensibilizador Ce6 catiônico conjugado é mais eficaz quando comparado aos fotossensibilizadores aniônico conjugado, de carga neutra conjugado e não-conjugado. As células epiteliais, após a PDT, não foram afetadas pelos fotossensibilizadores Ce6, mas o fotossensibilizador BPD, um derivado da porfirina, reduziu a viabilidade celular em 90%. Em função de sua hidrofobicidade, este último penetra rapidamente na membrana celular e localiza-se nos sítios-alvo mais sensíveis ao dano fotobiológico. Isso indica que há uma janela terapêutica em que as bactérias são afetadas pelo Ce6 e a célula epitelial não. Todos os fotossensibilizadores conjugados testados foram mais eficazes que o não-conjugado, em ambas as bactérias. O *Actinomyces naeslundii* assimilou quase o dobro do fotossensibilizador catiônico conjugado assimilado pela *Porphyromonas gingivalis*. Ao testarem esses fotossensibilizadores conjugados em células epiteliais orais de hamster (HPC-1), os autores observaram que as bactérias assimilavam 20 a 100 vezes mais Ce6 que as células epiteliais. Os fotossensibilizadores aplicados por um minuto na concentração de 5  $\mu\text{M}$  na ausência de luz, assim como a irradiação de 15 J isoladamente, não afetaram a viabilidade das bactérias, pois a redução da viabilidade foi inferior a 15%. Resultado semelhante ocorreu com as células epiteliais. A explicação da eficácia do fotossensibilizador catiônico conjugado seria a atração eletrostática pela membrana citoplasmática da bactéria carregada negativamente. Ocorreria, também, a repulsão eletrostática entre o fotossensibilizador aniônico e a membrana celular. Os autores realizaram o experimento no próprio meio de cultura, alegando que haveria um efeito protetor do meio em relação ao tampão fosfato-salina (PBS).

Wood et al. (1999) avaliaram, *in vitro*, a ação da PDT com PPC, uma ftalocianina, e luz branca de tungstênio sobre biofilme dentário formado *in vivo*, durante sete dias, em oito voluntários. Utilizaram os parâmetros de 22,5  $\text{mW}/\text{cm}^2$  de taxa de fluência, potência de 400 W e comprimento de onda entre 600 e 700 nm. Os autores verificaram, por meio de microscopia confocal e eletrônica de transmissão, que o fotossensibilizador corou uniformemente o biofilme, afetando tanto bactérias anaeróbias quanto aeróbias. O tipo de morte celular verificada pela microscopia eletrônica de transmissão foi apoptose, sendo os danos mais freqüentemente observados a vacuolação e a condensação do citoplasma. A microscopia eletrônica

de varredura revelou que o dano à membrana bacteriana causou redução da adesão celular dentro do biofilme e subsequente perda da integridade do mesmo.

A aplicação dos fotossensibilizadores 5-ALA e Photofrin<sup>®</sup>, isolada ou associada ao laser pulsado de argônio, provocou diferentes reações em distintas espécies de *Staphylococcus*. A PDT com ALA apresentou redução insuficiente da viabilidade celular do *Staphylococcus aureus* e não teve efeito sobre o *Staphylococcus epidermidis*. Apesar de apresentar efeito dose-dependente nos dois microrganismos, a aplicação da PDT com ALA em *Staphylococcus epidermidis* não exibiu diferença significativa da aplicação isolada do corante. O Photofrin<sup>®</sup>, aplicado isoladamente, apresentou toxicidade dose-dependente tanto para *Staphylococcus aureus*, como para *Staphylococcus epidermidis*, com alta toxicidade a este último. A PDT com Photofrin<sup>®</sup> foi mais eficaz contra *Staphylococcus aureus* do que o foi contra o *Staphylococcus epidermidis* (KARRER et al., 1999).

Na APDT, o tempo de contato do fotossensibilizador com o microrganismo também deve ser considerado. Um fotossensibilizador que é absorvido lentamente pelo microrganismo deve, primeiro, causar dano na parede celular, enquanto efeitos diferentes, como quebra de cadeia de ácidos nucléicos ocorrerão, aparentemente, em tempos de incubação mais longos (WAINWRIGHT, 1998). Lambrechts, Aalders e Van Marle (2005) avaliaram a ação da PDT utilizando uma porfirina catiônica, a TriP[4] e lâmpada halógena a 30 mW/cm<sup>2</sup> sobre cultura de *C. albicans*. Os autores verificaram que a organela-alvo da PDT com esse fotossensibilizador era a membrana citoplasmática. Os seguintes eventos foram observados: antes da irradiação, a TriP[4] liga-se à parede da *C. albicans* e, após irradiação, a membrana celular é danificada e torna-se permeável a ela. Após dano letal à membrana, grande quantidade de TriP[4] penetra na célula. Após a aplicação de uma dosimetria de 5,4 J/cm<sup>2</sup>, 99,8% das células foram fotoinativadas. Os autores verificaram que a lavagem das células, previamente à irradiação, após 30 minutos de incubação com o fotossensibilizador 25 µM, inibiu a PDT completamente, em função da fraca ligação da TriP[4] à célula. De acordo com Böcking et al. (2000), se o dano inicial ocorre na membrana citoplasmática, possivelmente ocorrem alterações oxidativas de lipídeos e proteínas.

Bhatti et al. (2000) compararam, *in vitro*, a ação do azul de toluidina, conjugado e não-conjugado, em associação com o laser He-Ne de comprimento de onda de 632,8 nm e potência de 7,3 mW, contra *Porphyromonas gingivalis* e

*Streptococcus sanguinis*. Os autores verificaram que, quando utilizado fotossensibilizador não-conjugado e aplicação de luz a  $4,4 \text{ J/cm}^2$ , houve 99,99% de redução da contagem de células viáveis de *Streptococcus sanguinis* e 97,5% de redução da contagem de *Porphyromonas gingivalis*. Quando o fotossensibilizador foi aplicado conjugado a um anticorpo específico para *Porphyromonas gingivalis*, houve redução de 2% das células viáveis de *Streptococcus sanguinis* e 100% de redução das células viáveis de *Porphyromonas gingivalis*. A irradiação com laser aplicado isoladamente e aplicação do fotossensibilizador conjugado ou não, sem aplicação de luz, não afetou a contagem de células viáveis. Segundo os autores, o fato de a conjugação do fotossensibilizador ao anticorpo não permitir a penetração na bactéria sugere que o fotossensibilizador não precisa estar, necessariamente, no interior da célula para exercer atividade bactericida.

Rovaldi et al. (2000) investigaram, *in vitro*, a ação da PDT sobre bactérias orais. Os autores empregaram laser com comprimento de onda de 662 nm, taxa de fluência de  $100 \text{ mW/cm}^2$  durante 150 minutos e dois derivados da clorina, o Ce6 e Ce6-5K, este último conjugado. A incubação das células com o laser ou com o fotossensibilizador de forma isolada não afetou a viabilidade das mesmas. Quando empregados em conjunto, ocorria atividade bactericida. Passados 19 segundos (1,9 J), na presença de Ce6-5K a  $5 \mu\text{M}$ , houve erradicação da *Porphyromonas gingivalis*. Segundo os autores, o Ce6 tem atividade contra bactérias Gram-positivas e o Ce6-5K, em combinação com a luz, eliminou tanto bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas.

Usacheva, Teichert e Biel (2001) verificaram que o azul de toluidina requer concentrações 1,5 a 7 vezes inferiores às requeridas pelo azul de metileno para erradicar bactérias. Os lasers empregados foram o pulsado de argônio e o diodo, de comprimentos de onda 630 nm e 664 nm respectivamente. Os microrganismos avaliados foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Segundo os autores, ao aumentar-se a concentração do corante, com a mesma intensidade de luz, houve aumento da fotodestruição dos microrganismos. O mesmo ocorreu com o aumento da potência e da dosimetria, na mesma concentração do fotossensibilizador. Os microrganismos Gram-negativos foram mais resistentes que os Gram-positivos, resultado atribuído às diferenças estruturais e de composição entre esses organismos, em particular, à existência de uma membrana externa nas

bactérias Gram-negativas. Entre os Gram-positivos, o *Streptococcus pneumoniae* foi o mais sensível e o *Staphylococcus aureus*, o mais resistente à PDT. Entre os Gram-negativos, o *Haemophilus influenzae* demonstrou a maior sensibilidade. A *Pseudomonas aeruginosa* só foi erradicada após altas concentrações de azul de toluidina (200  $\mu\text{M}$ ), utilizando-se 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 100  $\text{mW}/\text{cm}^2$ .

Embleton et al. (2002) verificaram, *in vitro*, a seletividade da PDT na inativação de dois microrganismos Gram-positivos. Os autores empregaram o fotossensibilizador SnCe6, uma clorina, e o laser He-Ne, na potência de 35 mW e comprimento de onda de 632,8 nm. Verificaram que a PDT foi capaz de inativar o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina com inativação de 99,1% deste, mas não afetou o *Streptococcus sanguinis*. Observaram, também, que o fotossensibilizador conjugado a uma imunoglobulina G (IgG), cujo alvo era a proteína A da parede celular, mostrou-se mais eficaz contra o *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente do que o fotossensibilizador não-conjugado. A exposição a 8,4  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de SnCe6 eliminou 99,7% dos *Staphylococcus aureus*. Já a dosimetria de 21  $\text{J}/\text{cm}^2$  em cinco minutos de exposição e 6,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IgG-SnCe6, acarretou inativação de 99,99% dos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

Segundo Zeina et al. (2002), muitos patógenos humanos estão, atualmente, multirresistentes a drogas antimicrobianas, e infecções causadas por esses microrganismos são particularmente difíceis de tratar, sendo a PDT uma alternativa viável. Os autores avaliaram a ação da PDT sobre queratinócitos humanos, utilizando luz policromática de um projetor de *slides* com comprimento de onda variando entre 400 e 700 nm, taxa de fluência de 42  $\text{mW}/\text{cm}^2$  e azul de metileno na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Alíquotas de uma mesma suspensão celular foram avaliadas periodicamente. Os resultados exibiram baixa toxicidade contra queratinócitos, sendo que a viabilidade das células, verificada imediatamente após aplicação da PDT por 60 minutos e 90 minutos, foi de 42% e 38% respectivamente. Já a viabilidade celular verificada após seis horas da aplicação da PDT foi de 91% em 60 minutos de PDT e de 68% na PDT de 90 minutos. Para Zeina et al. (2001), esse tipo de tratamento poderia evitar a necessidade de gastos com antibióticos e reduzir o desenvolvimento de resistência microbiana.

Chan e Lai (2003) avaliaram o efeito bactericida do laser He-Ne com comprimento de onda de 632,8 nm; do laser AsGaAl, com comprimentos de onda de 665 nm e 830 nm, potência de 100 mW; e do azul de metileno a 0,01%. Os autores

verificaram que o azul de metileno aplicado isoladamente, assim como a aplicação do laser He-Ne por 60 segundos sem o azul de metileno, não apresentou toxicidade aos grupos testados. A exposição ao laser He-Ne, na dosimetria de  $3,2 \text{ J/cm}^2$  por 30 segundos, causou taxa de inativação entre 55% e 81%. Quando o tempo de exposição dobrou (60 segundos,  $6,4 \text{ J/cm}^2$ ), a taxa de inativação bacteriana variou de 79% a 89%. O laser diodo de 830 nm foi o menos eficaz, com taxa de inativação bacteriana de 40% a 55% na exposição de 60 segundos. O laser diodo de 665 nm e potência de 100 mW foi o mais eficaz, já que, em 30 segundos, provocou inativação de 71% a 88% das bactérias. Quando o tempo de exposição ao laser foi de 60 segundos e dosimetria de  $21,2 \text{ J/cm}^2$ , a inativação bacteriana foi de 99% a 100% para *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus sanguinis*. Esta última foi a espécie mais sensível à PDT. Para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, a taxa de inativação bacteriana foi de 95% e 96% respectivamente. Aumento de temperatura entre  $0,5^\circ\text{C}$  e  $3,9^\circ\text{C}$  causado pelo laser ocorreu com ou sem azul de metileno, o que indica que o corante não converte a energia do laser em calor.

Kömerik et al. (2003) empregaram, em periodontite induzida em ratos, o azul de toluidina, na concentração de um miligrama por mililitro de cloreto de sódio, como agente fotossensibilizador de uso tópico, associado ao laser diodo com comprimento de onda de 630 nm. A terapia foi eficaz contra *Porphyromonas gingivalis*, importante agente etiológico da periodontite, resultando em detecção mínima de bactérias viáveis, com menos de dez UFCs e diminuição da perda óssea associada à periodontite. O exame histológico do periodonto, após a PDT, não exibiu efeitos adversos como ulceração ou inflamação. A microscopia de fluorescência revelou penetração do azul de toluidina através do epitélio, com maior intensidade de fluorescência na camada queratinizada. A concentração de 1 mg/mL de azul de toluidina, sem a presença do laser, também foi tóxica em períodos de quatro e oito minutos. A avaliação histológica demonstrou que a maior energia do laser (48 J) e a maior concentração de azul de toluidina (1 mg/mL), aplicadas isoladamente, não causaram lesão tecidual.

Stefanaki et al. (2003) avaliaram a fluorescência do PpIX após administração de ALA a 20% aplicado topicamente em 12 pacientes portadores de condiloma acuminado. A intensidade da fluorescência foi verificada com auxílio de uma lâmpada de arco de xenônio a cada 30 minutos para as primeiras 12 horas. Áreas

com e sem lesão clinicamente identificável apresentaram fluorescência, o que indicou lesões subclínicas e infecção latente. Pela fluorescência, os autores verificaram que o tempo ótimo para irradiação era de seis a 11 horas, após aplicação do ALA. Uma semana depois, foi aplicada PDT com taxa de fluência de 70 mW/cm<sup>2</sup> e dosimetria de 70 J/cm<sup>2</sup> em dez lesões, e dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> em 27 lesões. Se, em uma semana, as lesões ainda persistiam, nova PDT era realizada a 100 J/cm<sup>2</sup>. A taxa média de cura foi de 72,9% com acompanhamento de 12 meses. Em dois pacientes, as lesões recidivaram após dois meses. Todos os pacientes apresentaram sensação de queimação nos primeiros minutos de exposição à luz e, um dia após, a área perilesional apresentou-se eritematosa. Os efeitos colaterais foram bem tolerados pelos pacientes.

Lee et al. (2004), ao estudarem a PDT com LED (*Light Emitting Diode*) na taxa de fluência de 100 mW/cm<sup>2</sup> e ALA, verificaram que nenhuma célula viável de *Pseudomonas aeruginosa* foi detectada após o tratamento com ALA a 20 mM seguido por aplicação do LED a 120 J/cm<sup>2</sup>.

Krespi et al. (2005) avaliaram a ação da PDT, *in vitro*, sobre as bactérias orais *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*, associadas à periodontite. Os autores utilizaram uma lâmpada de luz halógena de alta intensidade com filtro vermelho, potência de 250 W e comprimento de onda de 650 nm, cuja taxa de fluência aplicada através de uma luz-guia foi de 50 mW/cm<sup>2</sup>. Como fotossensibilizador, foi empregado o azul de metileno, em diferentes concentrações, com exposição por tempo mínimo de um minuto. A fotossensibilização letal ótima, representada por 50% ou mais de inativação bacteriana, ocorreu com as combinações entre 0,05% de azul de metileno e cinco minutos de exposição à luz, e com as combinações entre 0,025% e 0,01% de azul de metileno e 20 minutos de exposição à luz. A aplicação isolada de luz por 20 minutos não foi capaz de exercer atividade bactericida. A aplicação de 0,1% de azul de metileno, na ausência de luz, foi bactericida para *Porphyromonas gingivalis*. As concentrações de 0,075% e de 0,1% de azul de metileno com exposição à luz por um minuto produziram redução significativa dos dois microrganismos avaliados. A concentração de 0,01% de azul de metileno só provocou inativação bacteriana com exposição à luz por dez minutos na dosimetria de 30 J/cm<sup>2</sup>.

De acordo com Teichert et al. (2002), o mecanismo de destruição de fungos pela PDT envolve aumento de permeabilidade da parede e membrana celulares

pelos EROs, o que permite a penetração do fotossensibilizador na célula. Os autores, ao infectarem mucosa oral de camundongos com *Candida* sp. e aplicarem a PDT, verificaram que o efeito desta dependeu da concentração do fotossensibilizador.

Wilson e Mia (1993), por meio de estudo *in vitro*, verificaram que a viabilidade da *Candida* sp. não foi afetada pela exposição aos lasers AsGa e He-Ne na ausência de fotossensibilizadores. Entretanto, após período de cinco minutos de permanência do azul de metileno na concentração de 100 µg/mL, foi aplicado o laser diodo (AsGa) por 120 segundos, na potência de 11 mW, energia de 1,32 J e comprimento de onda de 660 nm e constatada a erradicação do fungo. O tempo de 120 segundos foi considerado pelos autores como conveniente para aplicação clínica, e o azul de toluidina foi o fotossensibilizador de efeito letal mais eficaz, na concentração de 100 µg/mL, utilizado com laser He-Ne, com comprimento de onda de 632,8 nm e potência de 7,3 mW. O azul de toluidina apresentou toxicidade, quando aplicado isoladamente, nas concentrações de 100 µg/mL e 500 µg/mL, reduzindo a contagem de células viáveis em 20% e 24% respectivamente. O azul de metileno apresentou toxicidade à *C. albicans* nas concentrações de 100 µg/mL e 1 mg/mL, reduzindo a contagem de células viáveis em 17% e 35% respectivamente.

Carré et al. (1999) investigaram o efeito da PDT com lâmpada de tungstênio por períodos que variaram entre 10 e 120 minutos, e fotossensibilizador derivado da hematoporfirina em *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores verificaram que as porfirinas anfífilas foram mais fotoativas, penetrando mais facilmente na célula. As porfirinas induziram danos como fragmentação de DNA e perda de clonogenicidade no *Saccharomyces cerevisiae*.

Jackson et al. (1999) verificaram que a PDT com azul de toluidina por cinco minutos e laser He-Ne com comprimento de onda de 632,8 nm, potência de 35 mW e energia de 21 J foi eficaz contra amostras de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. As hifas foram mais sensíveis à PDT do que as leveduras, pois a concentração mais eficaz de azul de toluidina contra hifas foi de 12,5 µg/mL e contra leveduras foi de 25 µg/mL. Ao elevarem-se as concentrações de fotossensibilizador, a inativação diminuiu, pois os sítios-alvo estavam saturados de azul de toluidina não ligado que absorveu os fótons, prevenindo ativação do azul de toluidina ligado à célula. O azul de toluidina não ligado criou espécies citotóxicas que foram eliminadas antes de

causar dano celular. O fotossensibilizador e o laser aplicados isoladamente não afetaram a viabilidade da *C. albicans*.

Böcking et al. (2000) investigaram a ação da PDT sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores verificaram que o azul de toluidina e a luz visível resultaram em rápida oxidação, exaustão do ergosterol e acúmulo de produtos oxidados, os chamados oxisteróis, na membrana plasmática. Esses produtos contribuem para a gradual alteração da estrutura e função da membrana do *Saccharomyces cerevisiae*, que resulta na entrada do corante para o interior da célula com dano de alvos intracelulares e inativação celular.

Strakhovskaya et al. (2002) avaliaram, *in vitro*, o efeito antifúngico da PDT com duas clorinas contra *C. albicans* e *C. guilliermondii*. Os autores empregaram o laser semiconductor com comprimento de onda de 690 nm e taxa de fluência de 20 mW/cm<sup>2</sup> e uma lâmpada de mercúrio como fonte de luz visível de 400 a 600 nm e taxa de fluência de 5 mW/cm<sup>2</sup>. O tempo de incubação não alterou os resultados, já que, em 30 segundos, houve diminuição significativa da capacidade de formação de colônias, ao passo que períodos mais prolongados não intensificaram a inativação das amostras. A lavagem das células após incubação com o corante também reduziu a fotossensibilidade das amostras. Para a *C. guilliermondii*, a sensibilidade foi 1,6 a 1,7 vezes maior que a das amostras de referência de *C. albicans*. A PDT com laser inativou as leveduras, mesmo quando a concentração de células era alta, o que não ocorreu com a PDT com lâmpada de mercúrio, pois a fotossensibilidade das células diminuía abruptamente com o aumento da densidade óptica da cultura.

Bliss et al. (2004) avaliaram a ação *in vitro* da PDT em hifas e leveduras de *Candida* sp. O fotossensibilizador Photofrin<sup>®</sup> foi aplicado por 30 minutos, em várias concentrações, associado a lâmpada de mercúrio por dez minutos com taxa de fluência de 15 mW/cm<sup>2</sup> e dosimetria de 9 J/cm<sup>2</sup>. Os autores verificaram que a ação da PDT em hifas e leveduras de *Candida* sp. apresentou resultados distintos, assim como nas diferentes espécies de *Candida*. Enquanto as hifas foram mais sensíveis à PDT, as leveduras apresentaram relativa resistência, necessitando de mais tempo para assimilação do fotossensibilizador em meio DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*). O meio de cultura em que se encontrava a levedura também influenciou o ensaio, já que, com YPD (*Yeast Peptone Dextrose*), não houve assimilação do fotossensibilizador pelas células. Isso indica que o mecanismo de consumo do Photofrin<sup>®</sup> pela célula ocorre em meios cujas condições nutricionais são

mais restritivas. A *C. krusei* apresentou-se ligeiramente mais resistente que a *C. albicans*, e a *C. glabrata* foi particularmente resistente ao Photofrin<sup>®</sup>, com muito pouca assimilação do mesmo observada à microscopia de fluorescência. A *C. krusei*, que também pode ser resistente ao fluconazol, apresentou sensibilidade semelhante à *C. albicans*, quando a concentração de Photofrin<sup>®</sup> foi maior que 3 µg/mL.

Calzavara-Pinton et al. (2004) trataram micoses interdigitais dos pés em nove pacientes com ALA a 20%. O ALA foi incubado por quatro horas e irradiado com luz vermelha em comprimento de onda variando entre 575 e 700 nm, taxa de fluência de 100 mW/cm<sup>2</sup> e dosimetria de 75 J/cm<sup>2</sup>. As lesões do outro pé de cada paciente serviram de controle. A cultura do esfregaço da lesão revelou a presença de *C. albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. Durante a irradiação, sete pacientes tiveram sintoma de queimação e dois apresentaram dor. A pele mostrou-se eritematosa e edemaciada por poucas horas após o tratamento, e descamação ocorreu após três a cinco dias. Seis dos nove pacientes apresentaram remissão total da lesão, quatro deles após uma sessão e dois, após quatro sessões. Três pacientes foram completamente refratários ao tratamento. Em quatro pacientes ocorreu recidiva e, após quatro semanas do último tratamento, apenas dois pacientes apresentavam remissão persistente das lesões. Para os autores, a razão do insucesso do tratamento pode ter sido a forma irregular e tridimensional dos espaços interdigitais, com algumas áreas não sendo devidamente cobertas pelo creme fotossensibilizador.

São vantagens adicionais da APDT: (1) morte microbiana mais rápida, não sendo necessária a manutenção do fotossensibilizador em altas concentrações na área infectada por tempo prolongado, contrariamente ao que ocorre com as drogas antimicrobianas (ZANIN; GONÇALVES, 2003); (2) prevenção de nova resistência a antifúngicos; (3) inexistência de interações medicamentosas indesejáveis; (4) baixo custo do azul de metileno disponível comercialmente (TEICHERT et al., 2002).

#### 2.4.7 Terapia Fotodinâmica Antineoplásica

Segundo Mang (2004), a PDT antineoplásica emprega os lasers de argônio associados a corante com comprimento de onda de 630 nm e na forma contínua. Esses lasers foram considerados pelo autor como padrão-ouro para PDT clínica.

O tecido neoplásico apresenta baixo pH no líquido intersticial, decorrente da glicólise e da diminuição de suprimento de  $^3\text{O}_2$ . Esse tecido também apresenta alta frequência de receptores LDL (*low density lipoprotein*) em suas membranas celulares, abundância de macrófagos e colágeno neoformado, bem como capilares bastante permeáveis, o que facilita a passagem do fotossensibilizador do sangue para o espaço intersticial do tumor (NYMAN; HYNNINEN, 2004).

A PDT resulta em uma seqüência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que causa dano irreversível aos tecidos tumorais. O Photofrin<sup>®</sup>, fotossensibilizador mais empregado na PDT clínica, tem como alvo a mitocôndria e induz apoptose. O tempo requerido para o início da apoptose varia amplamente. A maioria das células, em resposta ao agente indutor, apresenta um período de latência, com duração variável, que resulta na morte de mais de 80% das células em um a três dias. Os alvos da PDT antineoplásica incluem as células tumorais, a microvasculatura do leito neoplásico, bem como o sistema imunológico e a reação inflamatória do hospedeiro. A combinação de todos esses componentes é requerida para a cura do tumor. Uma forte reação inflamatória é o evento central do mecanismo de destruição neoplásica pela PDT, com linfócitos eliminando focos de células tumorais viáveis (DOUGHERTY et al., 1998). Embora seja um tratamento local, a PDT tem efeito sistêmico e pode ser combinada com vários protocolos de imunoterapia. Além disso, se comparada a outras modalidades de tratamento antineoplásico, a PDT não envolve destruição generalizada de células saudáveis (BRANCALEON; MOSELEY, 2002).

Os tratamentos do câncer - cirurgia, radioterapia e quimioterapia - são agressivos. Segundo Castano, Demidova e Hamblin (2005b), a PDT seria a terapia antineoplásica ideal, já que representa um processo local capaz de destruir eficazmente o tumor e, ao mesmo tempo, sensibilizar o sistema imunológico para rastrear e destruir metástases.

Gregory et al. (1995) trataram três displasias epiteliais severas e um carcinoma de lábio com PDT utilizando Photofrin<sup>®</sup> e laser pulsado com corante, no

comprimento de onda de 628 nm. Após aplicação da PDT, na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> e taxa de fluência de 400 mW/cm<sup>2</sup>, a biópsia demonstrou diminuição do grau da displasia, porém sem cura da lesão. No carcinoma bem-diferenciado, em que foi aplicada dosimetria de 50 J/cm<sup>2</sup> e taxa de fluência de 100 mW/cm<sup>2</sup>, o paciente recusou-se a realizar a biópsia pós-tratamento, mas, ao exame físico 12 meses após a PDT, permanecia sem lesão.

Stockert et al. (1996) avaliaram a ação da PDT em células HeLa *in vitro*. Os autores empregaram um projetor de *slides* a 100 mW/cm<sup>2</sup> e os fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina (300 µg/mL). A PDT perturbou a organização dos microtúbulos das células. A permanência do corante por 18 horas e aplicação de luz vermelha por 15 minutos induziu alteração significativa dos microtúbulos, além de um grande número de pequenas evaginações do citoplasma na superfície celular, possivelmente em função da despolimerização dos microtúbulos. Os controles, sem laser ou sem fotossensibilizador, ou sem ambos, exibiram distribuição normal dos microtúbulos na intérfase. Os microtúbulos fazem parte do citoesqueleto celular e podem ser alvo da PDT. A imunodeteção de alfa tubulina mostrou que o azul de metileno e o azul de toluidina induziram dano significativo nas células HeLa. A aplicação do fotossensibilizador por uma hora e irradiação por 15 minutos determinou desorganização reversível, ao passo que a aplicação do fotossensibilizador por 18 horas e irradiação por 15 minutos, acarretou desorganização irreversível na interfase. O mecanismo de ação responsável pela desorganização do citoesqueleto ainda não está explicado, mas parece constituir evento importante na fotoinativação de células tumorais.

Luksiene, Kalvelyte e Supino (1999) avaliaram a PDT em células de carcinoma transplantadas em camundongos, preparadas *ex vivo*. Os autores empregaram lâmpada de tungstênio equipada com filtros, com comprimentos de onda variando entre 370 nm e 680 nm, taxa de fluência de 30 mW/cm<sup>2</sup> e o fotossensibilizador dimetil éter hematoporfirina (HpDe) com tempos de incubação variando entre 90 e 180 segundos. Decorridas duas horas da PDT, os autores verificaram perda da integridade da membrana plasmática com 10% de células apoptóticas, enquanto nos controles a taxa de apoptose foi de 1%. Porém o tipo de morte dominante, após duas horas, foi necrose (47%) sem aberrações cromossômicas. Ao compararem PDT e radioterapia com cobalto 60, os autores observaram 33% e 38% de inibição do crescimento tumoral respectivamente. A

radioterapia não alterou a integridade da membrana celular, mas provocou alterações do DNA.

Orth et al. (2000) investigaram a ação da PDT com laser pulsado de argônio em adenocarcinomas transplantados em 16 camundongos. Foi empregada luz laser na faixa de 662 nm, taxa de fluência de 50 a 200 mW/cm<sup>2</sup> e dosimetria de 100 a 200 J/cm<sup>2</sup> associada ao azul de metileno nas concentrações de 0,1% e 0,01%, injetado em vários locais do tumor, uma hora antes da aplicação da luz. A pele foi dissecada para exposição do tumor previamente à irradiação. A PDT era repetida após duas semanas com nova injeção do fotossensibilizador, caso o tumor não tivesse sido destruído na primeira aplicação. Os animais foram mortos na quinta semana, quando os tumores do grupo-controle alcançaram tamanho dez vezes superior ao do tumor inicial. Em 75% dos animais, a dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> levou à completa regressão macroscópica do tumor no fim da terceira semana, após a segunda aplicação de PDT ter sido realizada. O exame histológico confirmou a erradicação da lesão. A concentração de 1% (31 mM) de azul de metileno sem aplicação da luz inibiu o crescimento tumoral em até três semanas e foi bem tolerada pelos camundongos. A concentração de 0,1% de azul de metileno apresentou fototoxicidade reduzida com inibição do crescimento tumoral, e a concentração de 0,01% não induziu qualquer fototoxicidade.

Abdel-Hady et al. (2001) avaliaram a resposta à PDT em neoplasias vulvares intra-epiteliais de 32 pacientes. A fonte de luz foi uma lâmpada de Paterson de comprimento de onda de 630 nm, dosimetrias de 50 J/cm<sup>2</sup> e 100 J/cm<sup>2</sup> e o fotossensibilizador ALA a 20%, aplicado topicamente, com cinco horas de incubação. Os autores verificaram que as lesões unifocais responderam melhor que as multifocais e pigmentadas. Onze casos tiveram uma segunda aplicação da PDT depois do primeiro tratamento ter falhado. Pela biópsia, foi detectado DNA do vírus do papiloma humano (HPV) em 72% das pacientes. O HPV 16 foi o mais prevalente, e as pacientes portadoras do mesmo apresentaram lesões com pobre resposta à PDT. Os autores também verificaram aumento de linfócitos CD8 em pacientes que responderam ao tratamento, fato que confirma a indução de resposta imunológica pela terapia.

Sierón et al. (2003) trataram 12 leucoplasias livres de alterações displásicas, em nove pacientes fumantes, com ALA tópico a 10% e laser de argônio com corante. Foram empregados os parâmetros de 635 nm de comprimento de onda, dosimetria

de  $100 \text{ J/cm}^2$  por sessão com aplicações de 15 minutos e taxa de fluência de  $150 \text{ mW/cm}^2$ . A cada duas semanas, era realizada nova sessão de tratamento em caso de necessidade. Resposta completa, com desaparecimento total da leucoplasia ao exame físico, foi verificada em dez lesões, e uma recidiva foi observada após seis meses. Os efeitos colaterais foram dor moderada durante o tratamento, edema e eritema localizados, observados imediatamente após a exposição à luz e nos primeiros dois dias consecutivos ao tratamento.

De acordo com Takahashi et al. (2004), o efeito antiproliferativo máximo alcançado pela PDT com laser diodo e fotossensibilizador ATX-S10(Na), uma clorina hidrofílica, foi obtido nas dosimetrias entre  $150 \text{ J/cm}^2$  e  $200 \text{ J/cm}^2$ . Dosimetrias entre  $50 \text{ J/cm}^2$  e  $75 \text{ J/cm}^2$  suprimiram proliferação de queratinócitos sem acentuada necrose, enquanto as superiores a  $100 \text{ J/cm}^2$  resultaram em necrose da epiderme de camundongos. O efeito antineoplásico em carcinomas epidermóides transplantados nesses animais foi alcançado com  $150 \text{ J/cm}^2$ , e os carcinomas de células basais foram eliminados com  $100 \text{ J/cm}^2$ .

Segundo Babilas et al. (2005), para tratamento de tumores malignos, a dosimetria de luz vermelha é de  $100$  a  $150 \text{ J/cm}^2$  com taxa de fluência de  $100$  a  $200 \text{ mW/cm}^2$ . Os efeitos da PDT antineoplásica são: (a) efeito antivascular, que leva à trombose e hemorragia dos vasos nutrientes tumorais, e conseqüente morte tumoral via privação de oxigênio e nutrientes; (b) morte tumoral via apoptose ou necrose, pelas EROs, após ativação do fotossensibilizador; (c) ativação da resposta imunológica, com inflamação aguda e liberação de citocinas, o que pode levar a um influxo de leucócitos que auxiliariam na destruição tumoral e estimulação do sistema imunológico a reconhecer e destruir células, mesmo em sítios distantes (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005a).

A PDT com aplicação tópica do fotossensibilizador apresenta como efeitos colaterais dor e sensação de queimação, entretanto a prévia aplicação tópica de anestésicos não é recomendada devido à interação e possível inativação dos fotossensibilizadores. Após o tratamento, ocorrem edema e eritema localizados, seguidos por necrose seca restrita à área tumoral. Entre dez e 21 dias após o tratamento, as crostas desaparecem e completa reepitelização é observada. Durante essa fase, a maioria dos pacientes relata ligeiro desconforto (BABILAS et al., 2005).

As vantagens da PDT antineoplásica são: (a) possibilidade de tratamento simultâneo de lesões múltiplas e incipientes; (b) tempo de cura relativamente curto;

(c) inibição de crescimento tumoral em pacientes imunocomprometidos como transplantados; (d) boa tolerância do paciente ao tratamento e (e) resultado cosmético excelente (BABILAS et al., 2005), além da possibilidade de repetição do tratamento sem acúmulo de toxicidade (SIERÓN et al., 2003).



PUCRS

---

**3 PROPOSIÇÃO**

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Hipótese

A PDT com azul de metileno e laser InGaAIP exerce inativação eficaz sobre culturas de *Candida* sp. sem causar dano significativo às culturas de células epiteliais.

#### 3.2 Objetivos

##### 3.2.1 Objetivo Geral

-O presente estudo tem por objetivo testar, *in vitro*, o efeito da PDT sobre culturas de *Candida* sp. e de células epiteliais empregando-se o azul de metileno associado ao laser InGaAIP, em distintas dosimetrias.

##### 3.2.2 Objetivos Específicos

-Verificar se a PDT com azul de metileno e laser InGaAIP, nas dosimetrias de 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup>, exerce inativação sobre culturas de *Candida* sp., tanto *C. albicans* como *C. não-albicans*.

-Verificar o efeito da PDT com azul de metileno e laser InGaAIP, nas dosimetrias de 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup>, sobre a viabilidade de culturas de células epiteliais HEP-2.



PUCRS

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento

Estudo experimental verdadeiro com grupo-controle pré e pós-teste (CAMPBELL; STANLEY, 1979).

### 4.2 Variáveis

4.2.1 Variável Independente: terapia fotodinâmica (PDT).

4.2.2 Variáveis Dependentes: unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Candida* sp. e células epiteliais viáveis.

### 4.3 Caracterização da Amostra

A amostra foi constituída por culturas de *Candida* sp. obtidas de 38 pacientes adultos portadores de candidose oral, de ambos os sexos, atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS.

O outro componente da amostra consistiu em culturas de células da linhagem HEP-2 ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA) CCL-23<sup>®</sup>, derivadas de carcinoma de laringe, conforme descrito no item 4.5.8.

#### 4.3.1 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram excluídos da amostra os indivíduos sob terapia antifúngica em curso até o 15º dia prévio à coleta. Só foram incluídos os pacientes que, após esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

### 4.3.2 Critério Definidor de Candidose

O diagnóstico de candidose foi estabelecido de acordo com a classificação sugerida por Holmstrup e Axéll (1990): aguda (pseudomembranosa e eritematosa), crônica (pseudomembranosa, eritematosa, em placa, nodular) e associada a outras lesões (queilite angular, estomatite protética e glossite romboidal mediana).

## 4.4 Instrumentos

### 4.4.1 Laser

Foi empregado o laser diodo (meio ativo: InGaAlP) Thera Lase (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP), com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 685 nm e divergência de 1,5°. A emissão do laser foi contínua, com o modo de operação pontual. A potência útil foi de 35 mW. As dosimetrias aplicadas foram 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup>, com energia total de 2,8 J; 7,5 J e 12,6 J, respectivamente, considerando-se a área do feixe de 0,028 cm<sup>2</sup>.

#### 4.4.1.1 Cálculo da Dosimetria

Para o cálculo da dosimetria, aplicou-se a fórmula-padrão:

$$\text{Densidade de Energia (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência (W)} \times \text{tempo (segundos)}}{\text{Área (cm}^2\text{)}}$$

#### 4.4.1.2 Normas de Segurança

A aplicação do laser foi realizada em ambiente isolado, identificado com caracteres e simbologia internacional para área em uso ou presença de radiação e observando-se os procedimentos de segurança recomendados para o tratamento com luz laser (BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991). O laser utilizado pertence à classe IIIb da norma norte-americana *21CRF Parts 1000 and 1040*

(ALMEIDA-LOPES; MASSINI JÚNIOR, 2002). Nessa classe, encontram-se os lasers que podem produzir efeitos deletérios se observados diretamente, porém a visão por reflexão difundida de um feixe desfocado não é perigosa, desde que seja mantida a distância mínima de 13 centímetros e o tempo de exposição não ultrapasse dez segundos (PINHEIRO, 1995; GENOVESE, 2000). O operador usou um par de óculos de proteção, que acompanha o equipamento, quando em manejo do laser.

#### 4.4.2 Fotossensibilizador

Foi empregado o corante azul de metileno (Sigma, St Louis, MO), preparado como solução de estoque na concentração de 200 mg/mL em pH 7. O corante foi acondicionado em recipiente de cor âmbar, mantido sob proteção da luz e acondicionado em geladeira à temperatura de 4°C a 8°C. Para aplicação do tratamento, o corante foi utilizado na concentração de 100 µg/mL (ZEINA et al., 2001).

### 4.5 Procedimentos

#### 4.5.1 Coleta de Dados

O presente estudo foi desenvolvido no Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Buco-Maxilo-Facial do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS, no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Biociências da PUCRS e no Laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital São Lucas da PUCRS.

#### 4.5.2 Coleta de Material da Mucosa Oral

Os pacientes foram submetidos à coleta de material da mucosa oral por meio de *swabs* (Newprov, Pinhais, PR) estéreis e secos, que foram suavemente friccionados na mucosa afetada por candidose.

#### 4.5.3 Cultivo de *Candida* sp.

O material coletado da mucosa oral foi cultivado em placa de Petri contendo meio de cultura agar Sabouraud 4% dextrose (Merck, Damstadt, Alemanha) com cloranfenicol (16 mg/mL, Neo Química, Anápolis, GO) e incubado a 30°C por 48 horas (Figura 1). Três colônias de coloração creme e de consistência mole, sugestivas de *Candida* sp., foram inoculadas em caldo YPD (*Yeast Peptone Dextrose*, extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, Sigma, St Louis, MO) e mantidas em estufa a 30°C por 48 horas. Ao término deste período, uma alíquota de 1,5 mL de cada cultivo de *Candida* sp. foi adicionada a 0,5 mL de glicerol, acondicionada em microtubos estéreis e congelada a -20°C para posterior identificação.



Figura 1: Cultura de *Candida* sp. em agar Sabouraud 4% dextrose

#### 4.5.4 Identificação da *Candida* sp.

Para identificação das culturas de *Candida* sp., uma alíquota da cultura congelada foi transferida para o caldo YPD, onde permaneceu a 30°C por 48 horas. Após esse período, uma alíquota do cultivo foi semeada em agar Sabouraud 4%

dextrose com cloranfenicol (16 mg/mL, Neo Química, Anápolis, GO) e incubada a 30°C por 48 horas. Os testes para identificação das espécies de *Candida* tiveram como controles a *C. albicans* ATCC 28367, *C. dubliniensis* CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda) 7987 e *C. krusei* ATCC 6250 e foram realizados pelos testes descritos a seguir. A identificação da *C. albicans* por meio dos testes fenotípicos, teve posterior confirmação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

#### 4.5.4.1 Prova do Tubo Germinativo

A capacidade de formar tubo germinativo (efeito de Reynolds-Braudi ou filamentação no soro) foi empregada para identificação de *C. albicans*. Retirou-se, com o auxílio de uma alça de inoculação com capacidade para 10 µL, uma pequena quantidade da colônia previamente cultivada por 48 horas em agar Sabouraud a 30°C, que foi inoculada em 0,5 mL de soro fetal bovino e incubada a 37°C por um período de 2,5 a 3 horas (SOUZA, 1998). Uma alíquota da suspensão foi retirada com auxílio de pipeta de Pasteur, transferida para uma lâmina de microscopia estéril e coberta por lamínula estéril. À microscopia óptica, nas objetivas de 10 e 40X, considerou-se tubo germinativo a formação de um tubo delgado, de paredes retas, não-septado e sem constrição no sítio de união com a célula-mãe [GATICA et al., 2002 (Figuras 2, 3, Apêndice B)].

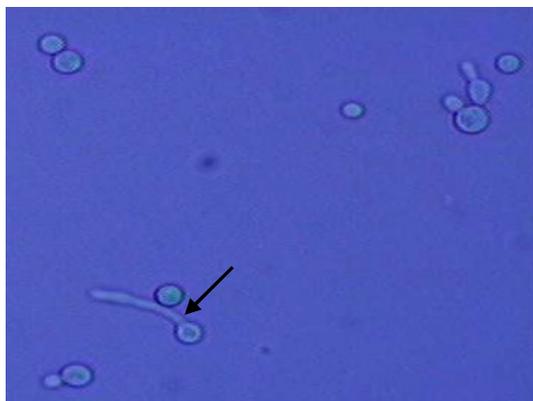


Figura 2: Fotomicrografia do cultivo de *C. albicans* em soro fetal bovino, evidenciando o tubo germinativo (ausência de constrição-seta), 400X

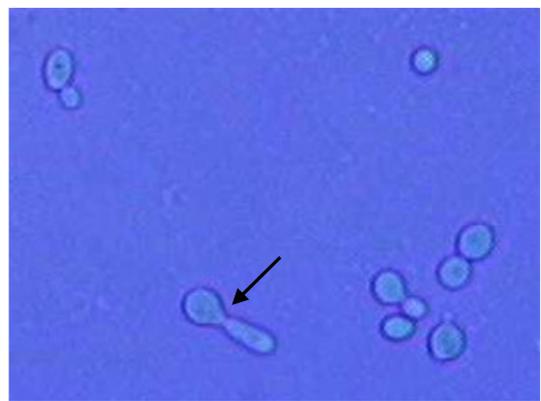


Figura 3: Fotomicrografia do cultivo de *C. albicans* em soro fetal bovino, evidenciando a pseudo-hifa (presença de constrição-seta), 400X

#### 4.5.4.2 Microcultivo em Meio Rico em Amido

A identificação das espécies de *C. albicans* também foi efetuada observando-se o seu desenvolvimento em microcultivo em meio rico em amido. O meio utilizado foi o agar arroz (10 g de grãos de arroz, 10 g de agar bacteriológico, 100 mL de água destilada qsp) suplementado com 1% de Tween 80 (polissorbato). A partir de um cultivo prévio de 48 horas a 30°C em agar Sabouraud, as amostras foram semeadas em três estrias paralelas em blocos retangulares de agar arroz, medindo 3,5 x 3 cm, já colocados assepticamente sobre lâmina de microscopia estéril. Os microcultivos foram cobertos por lamínula estéril e incubados em câmara úmida a 30°C por 72 horas, para, então, serem examinados à microscopia óptica com objetivas de 10 e 40X (GATICA et al., 2002). A câmara úmida foi confeccionada com uma placa de Petri contendo um chumaço de algodão umedecido em água destilada e a lâmina com o microcultivo. Ao microscópio óptico, a presença de clamidoconídios sob a forma de esporos arredondados com paredes duplas, isolados ou agrupados nas extremidades das pseudo-hifas, constituiu indicação presuntiva de *C. albicans* [PAULA, 1998 (Figuras 4,5,6, Apêndice B)].



Figuras 4 e 5: Fotomicrografias de microcultivos de *C. albicans* em agar arroz, exibindo clamidoconídios (setas), 400X



Figura 6: Fotomicrografia de microcultivo de *C. albicans* em agar arroz, exibindo clamidoconídios (seta preta) e blastoconídios (seta branca), 400X

#### 4.5.4.3 Cultivo em Agar Cromogênico

Para a identificação presuntiva em meio cromogênico, as colônias foram semeadas em meio CHROMAgar<sup>®</sup> *Candida* (CHROMAgar Microbiology, Paris, França), a partir de um cultivo em agar Sabouraud incubado a 30°C por 48 horas. As placas semeadas em CHROMAgar<sup>®</sup> foram incubadas a 30°C por 48 horas. As cepas foram identificadas de acordo com as instruções do fabricante, considerando-se as colônias de cor verde como *C. albicans* (Figura 7) (GATICA et al., 2002), as de cor lilás como *C. krusei* (Figura 8), as de coloração azulada como *C. tropicalis* (Figura 9) e as colônias que apresentaram a cor esbranquiçada foram consideradas como outras espécies de *Candida* (Figura 10; Apêndice B).



Figura 7: Coloração verde das colônias em meio de cultura CHROMAgar<sup>®</sup> *Candida*, indicativo de *C. albicans*



Figura 8: Coloração lilás das colônias em meio de cultura CHROMAgar<sup>®</sup> *Candida*, indicativo de *C. krusei*

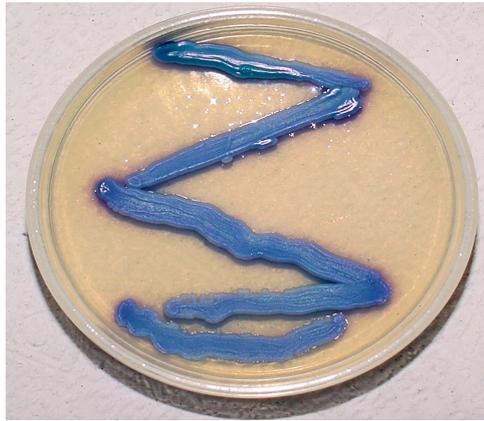


Figura 9: Coloração azulada das colônias em meio de cultura CHROMAgar<sup>®</sup> *Candida*, indicativo de *C. tropicalis*



Figura 10: Coloração esbranquiçada das colônias em meio de cultura CHROMAgar<sup>®</sup> *Candida*, indicativo de outra espécie de *Candida*

#### 4.5.4.4 Prova de Assimilação de Carboidratos

A prova de assimilação de carboidratos foi realizada a partir do cultivo das amostras em caldo YPD por 48 horas a 30°C. Os cultivos foram centrifugados a 2790 g por 5 minutos e o sobrenadante contendo o meio de cultura foi descartado. Após, foram realizadas 3 lavagens sucessivas com solução salina por meio de centrifugação a 2790 g por 5 minutos. Ao sedimento foram adicionados 2 mL de solução salina, e a turbidez da suspensão foi ajustada de acordo com o padrão número 5 da escala de McFarland. O meio YNB (*Yeast Nitrogen Base, Difco Laboratories, Sparks, MD*) foi preparado, previamente, de acordo com as instruções do fabricante e mantido sob refrigeração. Alíquotas de 30 mL de agar bacteriológico foram esterilizadas em tubos Falcon e mantidas em banho-maria a 55°C. Após breve resfriamento em água e adição de 300 µL do meio YNB e de 1,5 mL da solução de *Candida* sp. ao tubo Falcon, homogeneizou-se e verteu-se a solução em placas de Petri estéreis. Após a solidificação, cada placa foi colocada sobre uma cartela-guia, os discos foram embebidos em carboidratos a 2% (0,02 g em 1 mL de água MilliQ) com auxílio de pinças estéreis e distribuídos de acordo com a cartela-guia. Os carboidratos utilizados foram: maltose, trealose, xilose, galactose, lactose, sacarose e glicose, este último sendo o controle-positivo. As placas foram incubadas a 30°C por 96 horas. A leitura foi realizada, diariamente, com a placa colocada contra a luz,

sendo a positividade representada pelo surgimento de um halo de crescimento na área correspondente a cada fonte de carboidrato (Figura 11; Apêndice C).

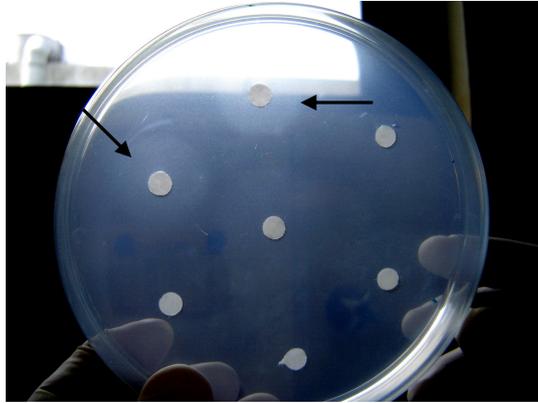


Figura 11: Visualização dos halos de crescimento (setas), indicando assimilação dos carboidratos pela *Candida* sp.

#### 4.5.4.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A identificação fenotípica da *C. albicans* foi confirmada pela PCR.

##### 4.5.4.5.1 Extração do DNA

Após o descongelamento das amostras, as mesmas foram cultivadas em caldo YPD a 30°C por 48 horas, e, posteriormente, cultivadas em agar Sabouraud dextrose a 30°C por 48 horas.

Para extração do DNA da *Candida* sp., foi colhida uma colônia do cultivo em agar Sabouraud dextrose, que foi adicionada a 20 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) e homogeneizada. O material foi aquecido por 10 minutos em banho-maria a 100°C. Após esse período, o mesmo foi aquecido em forno de microondas ajustado para uma potência alta por 2 minutos. A extração de DNA e a PCR tiveram como controles positivo e negativo, as cepas de referência *C. albicans* ATCC 28367 e *C. dubliniensis* CBS 7987, respectivamente.

#### 4.5.4.5.2 Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores selecionados foram descritos previamente por Mannarelli e Kurtzman (1998) (Tabela 1). Os mesmos têm como alvo um fragmento de 175 pares de bases (pb) de um gene que codifica RNA ribossômico (RNAr) da *C. albicans*.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a identificação de *C. albicans*

Oligonucleotídeos iniciadores	Gene Alvo	Seqüência (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb)
CAL5	RNAr	TGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG	175
NL4CAL		AGATCATTATGCCAACATCCTAGGTTAAA	

#### 4.5.4.5.3 Amplificação do DNA

A reação de amplificação foi constituída por tampão 10X (Tris–HCl 10 mM pH 8.0, KCl 5 mM), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 mM de dNTPs (LGC Biotecnologia, Cotia, SP), 20 pmol/μL de cada oligonucleotídeo iniciador (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, IA), 1 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WS ), 1 μL do lisado celular e água milliQ para completar o volume total de 25 μL.

As amplificações foram realizadas em um termociclador Minicycler<sup>®</sup> (MJ Research, San Francisco, CA), adaptando as condições de amplificação descritas por Mannarelli e Kurtzman (1998). A desnaturação inicial foi de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 4 minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2 % corado com brometo de etídeo (5 μg/mL, Vetec, Rio de Janeiro, RJ) e visualizados sob luz ultravioleta, sendo comparados com marcador de peso molecular de 100 pb (*GE Healthcare*, Fairfield, CT ) (Figura 12 ).

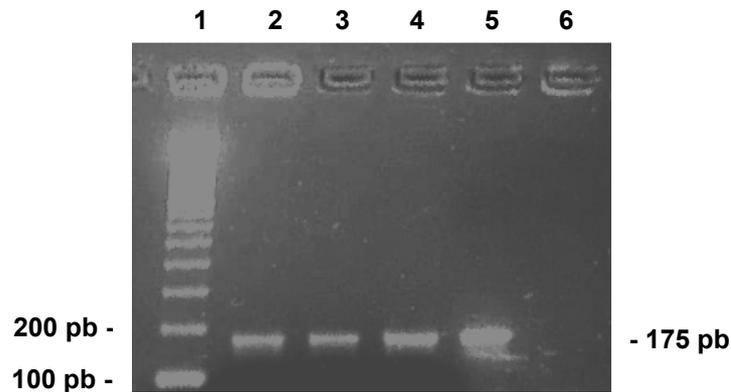


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo: marcador de peso molecular de 100 pb (1); amostras de *Candida albicans* isoladas de pacientes (2 a 4); *C. albicans* ATCC 28367 (controle positivo) (5); *C. dubliniensis* CBS 7987 (6).

#### 4.5.5 Diluições Seriadas e Preparo das Soluções para Aplicação da PDT

Após o descongelamento, 10  $\mu\text{L}$  de cada uma das 38 amostras das culturas de *Candida* sp. foram inoculados em caldo YPD e incubados a 30°C por 48 horas. Após esse período, 1 mL do caldo foi transferido para 9 mL de solução salina estéril NaCl 0,85%. Foram realizadas diluições seriadas 1:10 em 4 alíquotas sucessivas e colhidas 2 alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  da última diluição ( $10^{-4}$ ), que foram semeadas em placas de Petri de 9 cm contendo agar Sabouraud dextrose e incubadas a 30°C por 48 horas. Para o cálculo das UFCs, foram selecionadas placas que continham de 30 a 300 colônias (Figura 13).

Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-4}$  foram utilizadas para aplicação dos tratamentos. Estas foram transferidas para microtubos de 3 mL. Nos microtubos-teste foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de PBS e 10  $\mu\text{L}$  de azul de metileno, com incubação de 5 minutos. Nos microtubos-controle, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Dos microtubos, as soluções foram transferidas para placas de 96 poços de cultura, com 8 mm de diâmetro cada poço, em que foram aplicados os tratamentos (Figura 13). O grupo-controle também foi transferido do microtubo para o poço da placa e, deste, para um novo microtubo estéril.

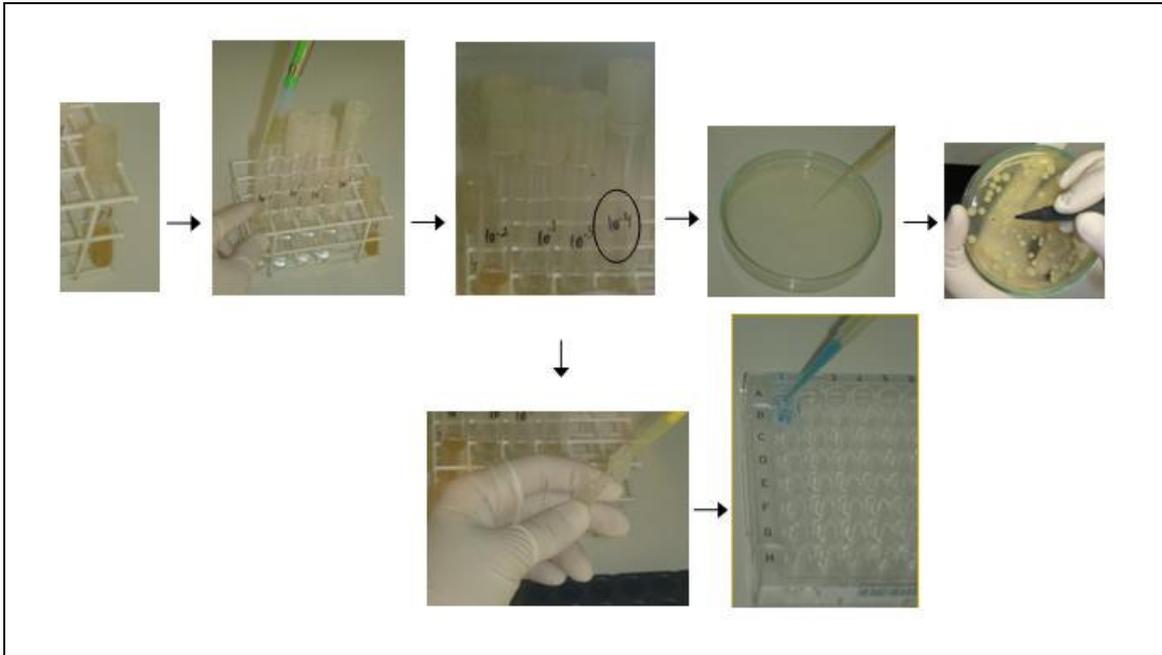


Figura 13: Preparo das soluções para aplicação da PDT

#### 4.5.6 Aplicação da PDT nas Culturas de *Candida* sp.

As 38 amostras de colônias de *Candida* sp. em solução salina foram distribuídas, em duplicata, nas placas de cultura como é descrito a seguir.

##### a) Grupos-teste:

- grupo  $100 \text{ J/cm}^2$ : 76 poços de cultura de *Candida* sp. contendo, cada poço,  $100 \mu\text{L}$  da diluição  $10^{-4}$  de *Candida* sp.,  $90 \mu\text{L}$  de PBS e  $10 \mu\text{L}$  de azul de metileno, com concentração final de azul de metileno de  $100 \mu\text{g/mL}$ . O azul de metileno foi incubado por 5 minutos e, após esse período, foi realizada irradiação com laser por 1 minuto e 21 segundos, na dosimetria de  $100 \text{ J/cm}^2$  em aplicação única, com a ponteira tocando a tampa da placa posicionada perpendicularmente a esta e na parte central do poço (Figura 14). A energia aplicada foi de  $2,8 \text{ J}$ .

- grupo  $270 \text{ J/cm}^2$ : 76 poços de cultura de *Candida* sp. contendo, cada poço,  $100 \mu\text{L}$  da diluição  $10^{-4}$  de *Candida* sp.,  $90 \mu\text{L}$  de PBS e  $10 \mu\text{L}$  de azul de metileno, com concentração final de azul de metileno de  $100 \mu\text{g/mL}$ . O azul de metileno foi incubado por 5 minutos e, após esse período, foi realizada irradiação com laser por 3

minutos e 37 segundos, na dosimetria de  $270 \text{ J/cm}^2$  em aplicação única, com a ponteira tocando a tampa da placa posicionada perpendicularmente a esta e na parte central do poço. A energia aplicada foi de 7,5 J.

- grupo  $450 \text{ J/cm}^2$ : 76 poços de cultura de *Candida* sp. contendo, cada poço,  $100 \mu\text{L}$  da diluição  $10^{-4}$  de *Candida* sp.,  $90 \mu\text{L}$  de PBS e  $10 \mu\text{L}$  de azul de metileno, com concentração final de azul de metileno de  $100 \mu\text{g/mL}$ . O azul de metileno foi incubado por 5 minutos e, após esse período, foi realizada irradiação com laser por 6 minutos e 1 segundo, na dosimetria de  $450 \text{ J/cm}^2$ , em aplicação única, com a ponteira tocando a tampa da placa de cultura posicionada perpendicularmente a esta e na parte central do poço. A energia aplicada foi de 12,6 J.

b) Grupos-controle:

- grupos 1, 2 e 3: 76 poços de cultura em cada grupo, contendo, cada poço,  $100 \mu\text{L}$  da diluição  $10^{-4}$  de *Candida* sp. e  $100 \mu\text{L}$  de PBS, em que não foi aplicado nenhum tratamento, sendo manipulado e avaliado, cada um deles, simultaneamente a um dos grupos-teste.

A manipulação dos grupos foi realizada na ausência de luz direta, e as culturas foram protegidas por uma caixa plástica fosca no intuito de evitar-se ação da luz ambiente durante os tratamentos. Foi empregado um dispositivo para manutenção da fibra óptica sempre na mesma posição em todas as aplicações (Figura 15).



Figura 14: Aplicação da PDT, com posicionamento da fibra óptica no centro do poço

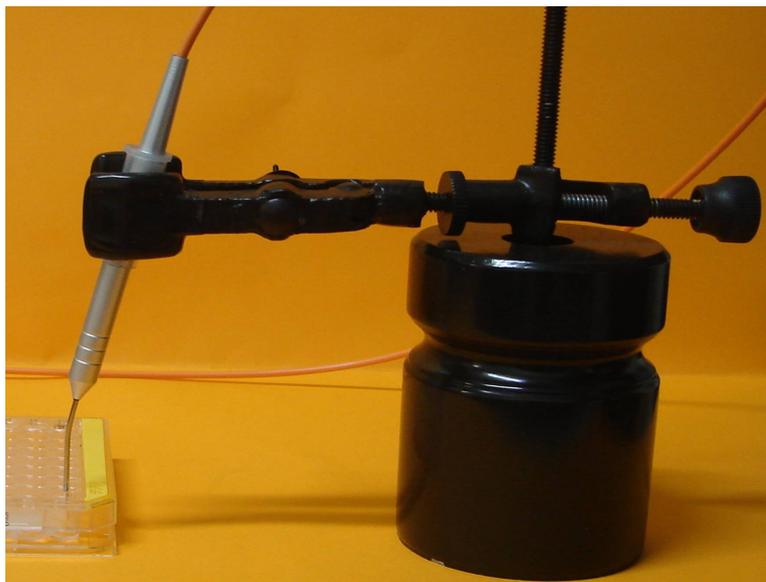


Figura 15: Dispositivo posicionador da fibra óptica do laser

#### 4.5.7 Quantificação da Inativação Fotodinâmica da *Candida* sp.

Imediatamente após os tratamentos, as soluções foram transferidas para microtubos estéreis para remoção do corante. Este foi removido com PBS em 3 lavagens sucessivas, por meio de centrifugação durante 3 minutos a 21°C e 8500 g. A cada lavagem, eram retirados 150  $\mu$ L, sendo repostos este volume com PBS. Após a centrifugação, alíquotas de 100  $\mu$ L de cada microtubo foram semeadas em placa de Petri de 9 cm contendo agar Sabouraud dextrose e incubadas a 30°C por 48 horas. Após este período, efetuou-se a contagem das UFCs.

#### 4.5.8 Cultivo de Células Epiteliais

Células epiteliais da linhagem HEP-2 ATCC CCL-23™ foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma, St Louis, MO), suplementado com penicilina (100 UI/mL, Sigma, St Louis, MO), estreptomicina (100  $\mu$ g/mL, Sigma, St Louis, MO), gentamicina (50  $\mu$ g/mL, Sigma, St Louis, MO) e 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY, Figura 16). As culturas foram incubadas e mantidas em estufa umidificada a 37°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio

de crescimento foi repostado a cada 3 dias. Após 7 dias, as células alcançaram confluência, formando uma monocamada celular. As células foram lavadas com PBS e tripsinizadas com solução de tripsina/ EDTA (0,25% de tripsina/0,02% de EDTA-ácido etilenodiamino tetracético) por 10 minutos a 37°C e, após, centrifugadas a 8500 g durante 3 minutos para obter-se uma suspensão celular (ZEINA et al., 2002).

Após cultivo, as células foram ressuspensas em PBS, e a suspensão foi transferida às placas de cultura de 96 poços, em alíquotas de 100 µL com densidade de  $2 \times 10^6$  células/mL, determinada pela contagem em câmara de Neubauer.



Figura 16: Cultura de células epiteliais HEp-2

#### 4.5.9 Aplicação da PDT nas Culturas de Células Epiteliais

As amostras foram distribuídas em grupos, de acordo com a dosimetria empregada.

##### 4.5.9.1 Dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup>

-Grupo-teste (PDT): 3 poços de cultura contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais, 90 µL de PBS e 10 µL de azul de metileno na concentração de 100 µg/mL, incubado por 5 minutos. Após esse período, foi realizada irradiação com laser na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> por 1 minuto e 21

segundos, com energia de 2,8 J, em aplicação única. As culturas foram contadas imediatamente após o tratamento.

-Grupo-controle 1 (laser): 3 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais e 100 µL de PBS, irradiados com laser na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup>, em aplicação única. As culturas foram contadas imediatamente após o tratamento.

-Grupo-controle 2 (azul de metileno): 3 poços de cultura contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais, 90 µL de PBS e 10 µL de azul de metileno na concentração de 100 µg/mL e incubado por 5 minutos. As culturas foram contadas imediatamente após o tratamento.

-Grupo-controle 3 (sem laser e sem azul de metileno): 3 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais e 100 µL de PBS, aos quais não foi aplicado qualquer tratamento, sendo manipulado e avaliado no mesmo momento do seu grupo experimental.

#### *4.5.9.2 Dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup>*

-Grupo-teste (PDT): 3 poços de cultura contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais, 90 µL de PBS e 10 µL de azul de metileno a 100 µg/mL, incubado por 5 minutos. Após esse período, foi realizada irradiação com laser na dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup> por 3 minutos e 37 segundos, com energia de 7,5 J, em aplicação única. As culturas foram contadas imediatamente após o tratamento.

-Grupo-controle 1 (laser): 3 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais e 100 µL de PBS, irradiados com laser na dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup>, em aplicação única. As culturas foram contadas imediatamente após o tratamento.

-Grupo-controle 2 (azul de metileno): 3 poços de cultura contendo 100 µL da suspensão de células epiteliais, 90 µL de PBS e 10 µL de azul de metileno na concentração de 100 µg/mL, incubado por 5 minutos. As culturas foram contadas imediatamente após o tratamento.

-Grupo-controle 3 (sem laser e sem azul de metileno): 3 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais e 100 µL de PBS,

aos quais não foi aplicado qualquer tratamento, sendo manipulado e avaliado no mesmo momento do seu grupo experimental.

#### 4.5.9.3 Dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup>

-Grupo-teste (PDT): 3 poços de cultura contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais, 90 µL de PBS e 10 µL de azul de metileno a 100 µg/mL, incubado por 5 minutos. Após esse período, foi realizada irradiação com laser na dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup> por 6 minutos e 1 segundo, com energia de 12,6 J, em aplicação única. As culturas foram contadas imediatamente após o tratamento.

-Grupo-controle 1 (laser): 3 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais e 100 µL de PBS, irradiados com laser na dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup> em aplicação única. As culturas foram contadas imediatamente após o tratamento.

-Grupo-controle 2 (azul de metileno): 3 poços de cultura contendo 100 µL da suspensão de células epiteliais, 90 µL de PBS e 10 µL de azul de metileno na concentração de 100 µg/mL, incubado por 5 minutos. As culturas foram contadas imediatamente após o tratamento.

-Grupo-controle 3 (sem laser e sem azul de metileno): 3 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células epiteliais e 100 µL de PBS, aos quais não foi aplicado qualquer tratamento, sendo manipulado e avaliado no mesmo momento do seu grupo experimental.

As culturas foram mantidas em ambiente escuro e, durante os tratamentos, foram protegidas da luz ambiente por uma caixa plástica fosca.

#### 4.5.10 Avaliação do Efeito da PDT nas Células Epiteliais

Após os tratamentos, as células dos grupos-teste e dos grupos-controle foram transferidas para microtubos estéreis, e as amostras foram centrifugadas a 8500 g por 3 minutos em 3 lavagens sucessivas. A cada lavagem, eram retirados 150 µL,

sendo repostado este volume com PBS. Na última lavagem, foram repostos 50  $\mu\text{L}$  de PBS e adicionados 100  $\mu\text{L}$  de azul de trypan (0,4% peso/volume) à suspensão celular. A suspensão foi homogeneizada e 20  $\mu\text{L}$  da mesma foram transferidos para a câmara de Neubauer (Optik Labor; Figura 17) para avaliação em microscópio de luz com objetiva de 40X. A viabilidade das células epiteliais foi verificada pela assimilação do azul de trypan, quantificando-se as células coradas e não coradas presentes nos 16 campos da câmara. Foram consideradas viáveis as células que não assimilaram o azul de trypan (Figuras 18 e 19) e inviáveis, as que assimilaram o corante (Figura 20).

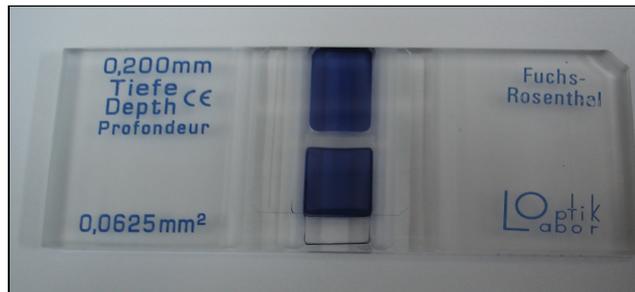
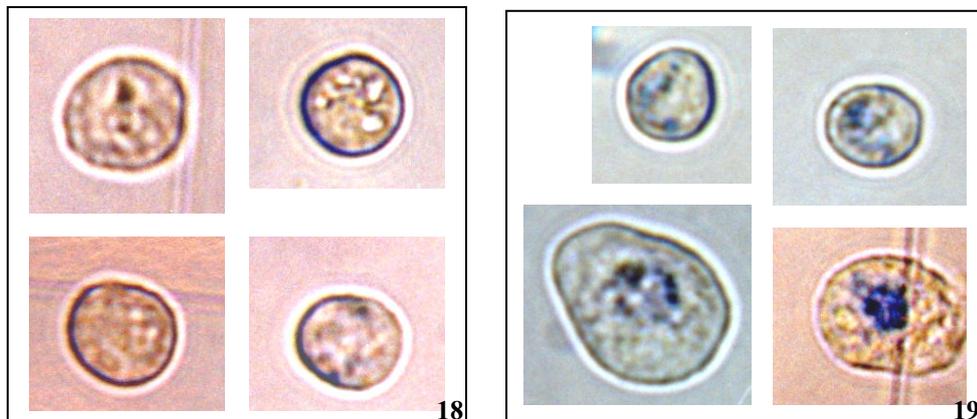


Figura 17: Câmara de Neubauer contendo células epiteliais em solução com azul de trypan



Figuras 18 e 19: Células epiteliais viáveis, 400X

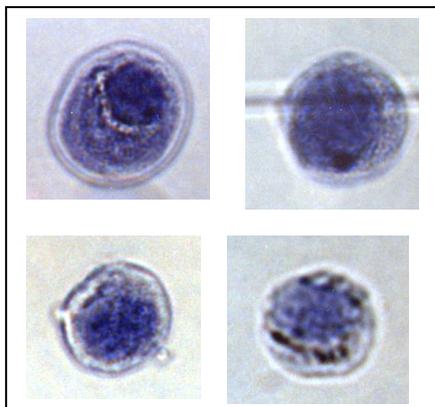


Figura 20: Células epiteliais inviáveis, 400X

#### 4.6 Análise dos Dados

Os resultados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva e dos testes  $t$  de Student para amostras pareadas e análise da variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, considerando-se o nível de significância de 5%.



PUCRS

---

**5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *Candida* sp.

De um total de 38 amostras de *Candida* sp. coletadas dos pacientes, foram identificadas 24 *C. albicans* e 14 *C. não-albicans* (Apêndice B).

#### 5.1.1 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> em *Candida* sp.

Após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup>, observou-se valor médio de UFCs de *Candida* sp. equivalente a 78,28 com desvio-padrão de 27,79. Nessa dosimetria, o valor mínimo de UFCs observado entre as amostras foi 22 e o valor máximo foi 120,5. Para o grupo-controle, o valor médio de UFCs foi 99,78 com desvio-padrão de 23,52 e valores mínimo e máximo, respectivamente, de 53,5 e 146. Ao aplicar-se o teste *t* para amostras pareadas, o valor de UFCs de *Candida* sp. exibiu diferença significativa entre o grupo submetido à PDT com o laser na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> e seu respectivo controle (teste *t* para amostras pareadas,  $p < 0,05$ , Tabela 2).

Tabela 2: Unidades formadoras de colônias de *Candida* sp. viáveis após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup>. Porto Alegre, 2006

Grupos	UFCs			
	Média	Desvio-padrão	Valor mínimo	Valor máximo
Grupo-teste	78,28	27,79	22	120,5
Grupo-controle	99,78	23,52	53,5	146

$p < 0,05^*$

\*Teste *t* para amostras pareadas

### 5.1.2 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup> em *Candida* sp.

Após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup>, observou-se valor médio de UFCs de *Candida* sp. igual a 52,93 com desvio-padrão de 19,54, correspondendo o valor mínimo de UFCs viáveis a 11,5, e o valor máximo a 88,5. No grupo-controle correspondente, o valor médio de UFCs foi 100,74 com um desvio-padrão de 29,71, e os valores mínimo e máximo foram, respectivamente, 29 e 145,5. Ao aplicar-se o teste *t* para amostras pareadas, o valor de UFCs de *Candida* sp. exibiu diferença significativa entre o grupo submetido à PDT com laser na dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup> e seu respectivo controle (teste *t* para amostras pareadas,  $p < 0,05$ , Tabela 3).

Tabela 3: Unidades formadoras de colônias de *Candida* sp. viáveis após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup>. Porto Alegre, 2006

Grupos	UFCs			
	Média	Desvio-padrão	Valor mínimo	Valor máximo
Grupo-teste	52,93	19,54	11,5	88,5
Grupo-controle	100,74	29,71	29	145,5

$p < 0,05^*$

\*Teste *t* para amostras pareadas

### 5.1.3 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup> em *Candida* sp.

Após aplicação da PDT com o laser na dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup>, foi observado valor médio de UFCs viáveis de *Candida* sp. igual a 28,87 com desvio-padrão de 15,71 e valores mínimo e máximo de 8,5 e 80 respectivamente. No grupo-controle correspondente, a média de UFCs viáveis foi igual a 103,54 com desvio-padrão de 26,30 e valores mínimo e máximo, respectivamente, de 49 e 157,5 UFCs. Os valores obtidos para os grupos teste e controle exibiram diferença estatisticamente significativa (teste *t* para amostras pareadas,  $p < 0,05$ , Tabela 4).

Tabela 4: Unidades formadoras de colônias de *Candida* sp. viáveis após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup>. Porto Alegre, 2006

Grupos	UFCs			
	Média	Desvio-padrão	Valor mínimo	Valor máximo
Grupo-teste	28,87	15,71	8,5	80
Grupo-controle	103,54	26,30	49	157,5

p<0,05\*

\*Teste *t* para amostras pareadas

A figura 21 representa graficamente os resultados obtidos para os grupos-teste e seus respectivos controles após aplicação da PDT sobre as culturas de *Candida* sp. nas diferentes dosimetrias de laser empregadas.

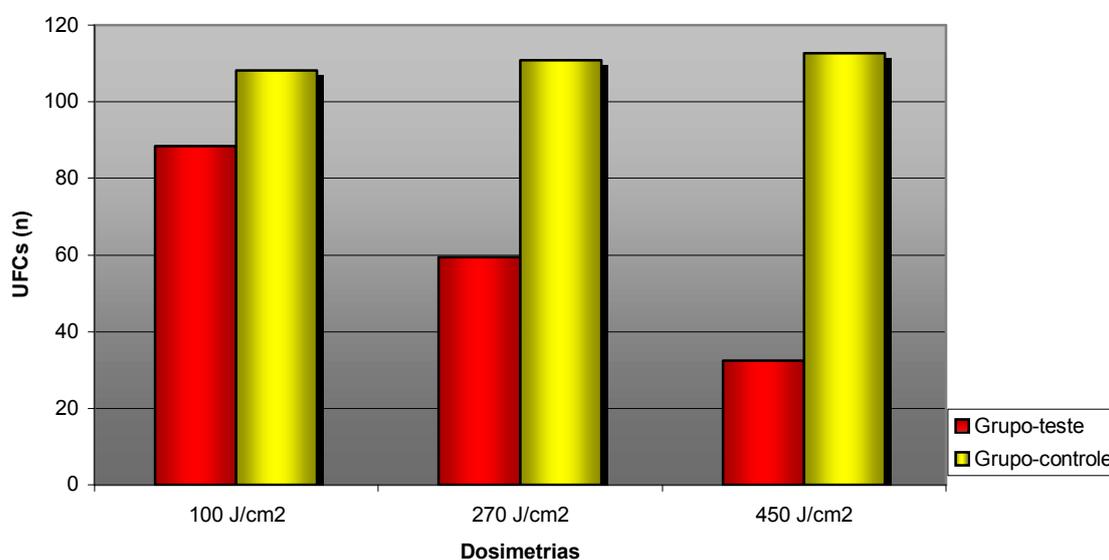


Figura 21: Unidades formadoras de colônias de *Candida* sp. viáveis (média) nos grupos submetidos à PDT com laser nas dosimetrias de 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup>, 450 J/cm<sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006

#### 5.1.4 Viabilidade Percentual Média das UFCs de *Candida* sp. após Aplicação da PDT com Laser nas Dosimetrias de 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup>

Ao calcular-se a viabilidade percentual média de UFCs após a aplicação da PDT com o laser nas diferentes dosimetrias, foram obtidos os seguintes resultados: 77,17% ( $\pm 18,32$ ) de UFCs viáveis para 100 J/cm<sup>2</sup>, 54,16% ( $\pm 19,73$ ) para 270 J/cm<sup>2</sup> e 27,58% ( $\pm 12,26$ ) para 450 J/cm<sup>2</sup>. Quando submetidos ao tratamento estatístico, esses valores exibiram diferença significativa (ANOVA, teste Tukey para comparações múltiplas,  $p < 0,05$ , Tabela 5, Figura 22).

#### 5.1.5 Viabilidade Percentual Média das UFCs de *C. albicans* e *C. não-albicans* após Aplicação da PDT com Laser nas Dosimetrias de 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup>

Ao considerarem-se as diferentes espécies de *Candida*, a viabilidade média da espécie *C. albicans* foi de 49,56% com um desvio-padrão de 26,12, enquanto para as espécies *C. não-albicans* este valor foi de 58,82% com desvio-padrão de 26,35. Ao aplicar-se o teste estatístico, esses valores exibiram diferença significativa, isto é, independentemente da dosimetria, a *C. albicans* apresentou percentual médio de viabilidade significativamente menor do que as *C. não-albicans* (ANOVA, teste Tukey para comparações múltiplas,  $p < 0,05$ , Tabela 5).

Na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup>, a viabilidade percentual média da *C. albicans* foi de 75,60%, com desvio-padrão de 17,68 e, para a *C. não-albicans*, 79,88% com desvio-padrão de 19,74. Para a dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup>, os valores foram 49,82% com desvio-padrão de 18,03 para *C. albicans* e 61,60% com desvio-padrão de 20,95 para as *C. não-albicans*. Ao aplicar-se a dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup>, os valores de viabilidade observados foram 23,27% com desvio-padrão de 6,34 e 34,98% com desvio-padrão de 16,22, respectivamente, para as espécies *C. albicans* e *C. não-albicans*. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade de *C. albicans* e *C. não-albicans* nas diferentes dosimetrias empregadas (ANOVA,  $p > 0,05$ , Tabela 5, Figura 23).

Tabela 5: Viabilidade da *Candida* sp. após aplicação da PDT com laser nas dosimetrias de 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup>. Porto Alegre, 2006

Dosimetria	Viabilidade				Total	
	<i>C. albicans</i> (n=24)		<i>C. não-albicans</i> (n=14)		<i>Candida</i> sp. (n=38)	
	Média (%)	Desvio-padrão	Média (%)	Desvio-padrão	Média (%)	Desvio-padrão
100 J/cm <sup>2</sup>	75,60	17,68	79,88	19,74	77,17 <sup>A</sup>	18,32
270 J/cm <sup>2</sup>	49,82	18,03	61,60	20,95	54,16 <sup>B</sup>	19,73
450 J/cm <sup>2</sup>	23,27	6,34	34,98	16,22	27,58 <sup>C</sup>	12,26
Média	49,56 <sup>b</sup>	26,12	58,82 <sup>a</sup>	26,35	52,97	26,47

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente ANOVA em blocos casualizados, teste Tukey ao nível de significância de 5%

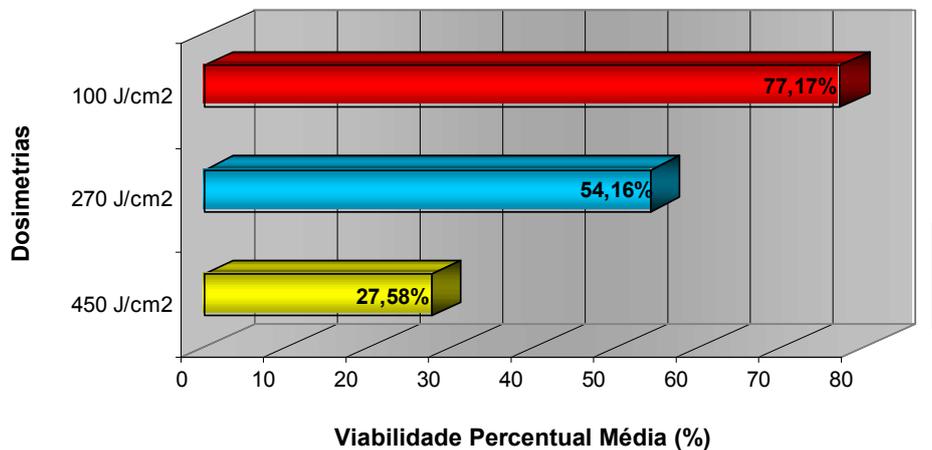


Figura 22: Viabilidade percentual média das UFCs de *Candida* sp. após aplicação da PDT com laser nas dosimetrias de 100J/cm<sup>2</sup>, 270J/cm<sup>2</sup> e 450J/cm<sup>2</sup>. Porto Alegre, 2006

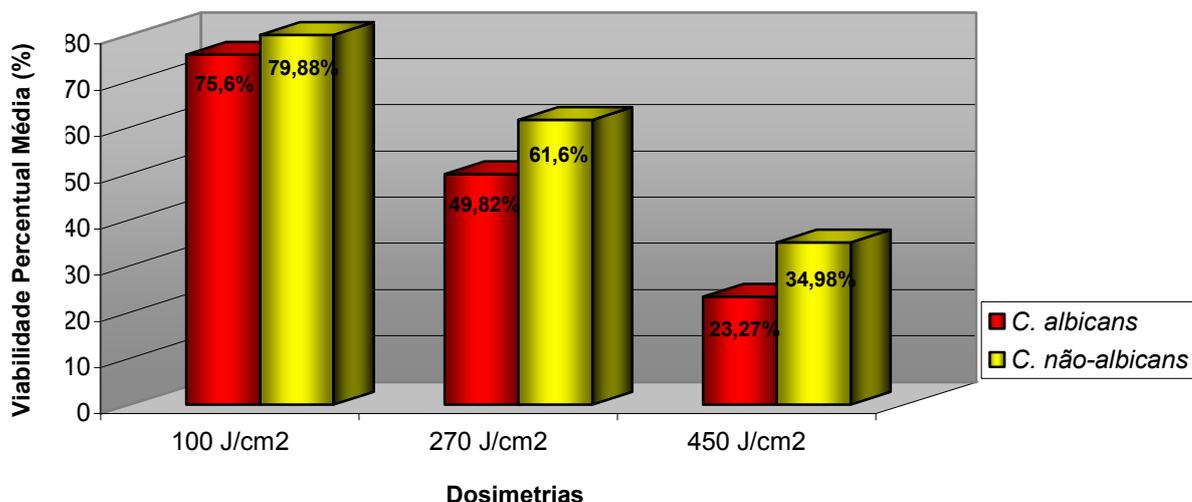


Figura 23: Viabilidade percentual média de *C. albicans* e *C. não-albicans* após aplicação da PDT com laser nas dosimetrias de 100J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup>. Porto Alegre, 2006

## 5.2 Células Epiteliais

### 5.2.1 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> em Células Epiteliais

Após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup>, foi verificada viabilidade percentual média das células epiteliais de 77,23% ( $\pm 3,31$ ). Os valores mínimo e máximo de viabilidade verificados nessa dosimetria foram, respectivamente, 75,07% e 81,04%.

No grupo-controle 1 (laser), a viabilidade percentual média observada foi de 86,53% ( $\pm 9,55$ ). Os valores mínimo e máximo de viabilidade verificados neste grupo foram, respectivamente, 77,1% e 96,19%.

O grupo-controle 2 (azul de metileno) exibiu viabilidade percentual média das células epiteliais de 78,83% ( $\pm 6,30$ ). O valor mínimo foi 73,66%, e o máximo foi 85,84%.

No grupo-controle 3 (sem laser e sem azul de metileno), foi observada viabilidade percentual média de 90,23% ( $\pm 0,70$ ) e valores mínimo e máximo, respectivamente, de 89,59% e 90,97%.

Ao aplicar-se o teste ANOVA, não foi verificada diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ , Tabela 6, Figura 24).

Tabela 6: Viabilidade das células epiteliais após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006

Viabilidade das Células Epiteliais				
Grupos	Média (%)	Desvio-padrão	Valor mínimo (%)	Valor máximo (%)
Grupo PDT	77,23	3,31	75,07	81,04
Grupo-controle 1 (laser)	86,53	9,55	77,1	96,19
Grupo-controle 2 (AM)	78,83	6,30	73,66	85,84
Grupo-controle 3 (sem laser e sem AM)	90,23	0,70	89,59	90,97

ANOVA,  $p > 0,05$

AM: azul de metileno

### 5.2.2 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup> em Células Epiteliais

Ao empregar-se a dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup>, a viabilidade percentual média do grupo PDT foi de 69,82% ( $\pm 6,08$ ), correspondendo o valor mínimo a 64,09% e o máximo a 76,19%.

O grupo-controle 1 (laser), com a aplicação da dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup>, apresentou viabilidade percentual média de 79,29% ( $\pm 12,91$ ), correspondendo os valores mínimo e máximo, respectivamente, a 68,32% e 93,51%.

O grupo-controle 2 (azul de metileno) exibiu viabilidade percentual média das células epiteliais de 80,27% ( $\pm 4,08$ ). A viabilidade mínima observada nesse grupo foi de 76,59% e a viabilidade máxima, de 84,66%.

Para o grupo-controle 3 (sem laser e sem azul de metileno), a viabilidade percentual média das células epiteliais foi de 80,56% ( $\pm 14,58$ ). A viabilidade mínima foi equivalente a 64,67% e a máxima a 93,33%.

Ao aplicar-se o teste ANOVA, não foi verificada diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ , Tabela 7, Figura 24).

Tabela 7: Viabilidade das células epiteliais após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 270J/cm<sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006

Viabilidade das Células Epiteliais				
Grupos	Média (%)	Desvio-padrão	Valor mínimo (%)	Valor máximo (%)
Grupo PDT	69,82	6,08	64,09	76,19
Grupo-controle 1 (laser)	79,29	12,91	68,32	93,51
Grupo-controle 2 (AM)	80,27	4,08	76,59	84,66
Grupo-controle 3 (sem laser e sem AM)	80,56	14,58	64,67	93,33

ANOVA,  $p > 0,05$

AM: azul de metileno

### 5.2.3 Aplicação da PDT com Laser na Dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup> em Células Epiteliais

Na dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup>, as células epiteliais do grupo PDT apresentaram viabilidade percentual média de 65,39% ( $\pm 1,77$ ), correspondendo os valores mínimo e máximo, respectivamente, a 63,58% e 67,12%.

No grupo-controle 1 (laser), a viabilidade média foi de 85,65% ( $\pm 10,08$ ), correspondendo os valores mínimo e máximo, respectivamente, a 74,18% e 93,09%.

Para o grupo-controle 2 (azul de metileno) a viabilidade média das células epiteliais foi de 66,47% ( $\pm 16,17$ ). O valor mínimo de viabilidade encontrado foi de 53,66% e o valor máximo, de 84,64%.

O grupo-controle 3 (sem laser e sem azul de metileno) exibiu viabilidade percentual média de 87,85% ( $\pm 8,22$ ). As respectivas viabilidades mínima e máxima, neste grupo, foram 79,67% e 96,11%.

Ao aplicar-se o teste ANOVA, não foi verificada diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ , Tabela 8, Figura 24).

Tabela 8: Viabilidade das células epiteliais após aplicação da PDT com laser na dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006

Viabilidade das Células Epiteliais				
Grupos	Média (%)	Desvio-padrão	Valor mínimo (%)	Valor máximo (%)
Grupo PDT	65,39	1,77	63,58	67,12
Grupo-controle 1 (laser)	85,65	10,08	74,18	93,09
Grupo-controle 2 (AM)	66,47	16,17	53,66	84,64
Grupo-controle 3 (sem laser e sem AM)	87,85	8,22	79,67	96,11

ANOVA,  $p > 0,05$

AM: azul de metileno

#### 5.2.4 Viabilidade Percentual Média das Células Epiteliais nos Diferentes Grupos Independentemente da Dosimetria Aplicada

A viabilidade média das células epiteliais no grupo PDT, independentemente da dosimetria aplicada, foi de 70,81% ( $\pm 6,29$ ) e não diferiu significativamente do valor obtido para o grupo-controle 2 (azul de metileno), que correspondeu a 75,19% ( $\pm 11,07$ ) (ANOVA, teste Tukey para comparações múltiplas,  $p > 0,05$ , Tabela 9).

No grupo-controle 1 (laser), a viabilidade média foi de 83,82% ( $\pm 10,08$ ) e, no controle 3 (sem laser e sem azul de metileno), 86,21% ( $\pm 9,44$ ). Ao serem comparados com o grupo PDT, ambos, grupo-controle 1 (laser) e grupo-controle 3 (sem laser e sem azul de metileno), exibiram viabilidade significativamente maior. Entretanto, ao serem comparados com o grupo-controle 2 (azul de metileno), não foi verificada diferença significativa de viabilidade das células epiteliais (ANOVA, Tabela 9, Figura 25).

Tabela 9: Viabilidade das células epiteliais nos diferentes grupos avaliados, independentemente da dosimetria aplicada. Porto Alegre, 2006

Grupos	Viabilidade Média (%)	Desvio-padrão
Grupo PDT	70,81 <sup>B</sup>	6,29
Grupo-controle 1 (laser)	83,82 <sup>A</sup>	10,08
Grupo-controle 2 (AM)	75,19 <sup>AB</sup>	11,07
Grupo-controle 3 (sem laser e sem AM)	86,21 <sup>A</sup>	9,44

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente ANOVA e teste Tukey ao nível de significância de 5%  
AM: azul de metileno

Viabilidade Percentual Média (%)

#### Dosimetrias

Figura 24: Viabilidade percentual média das células epiteliais nas dosimetrias de 100 J/cm<sup>2</sup>, 270 J/cm<sup>2</sup>, 450 J/cm<sup>2</sup> e seus respectivos controles. Porto Alegre, 2006

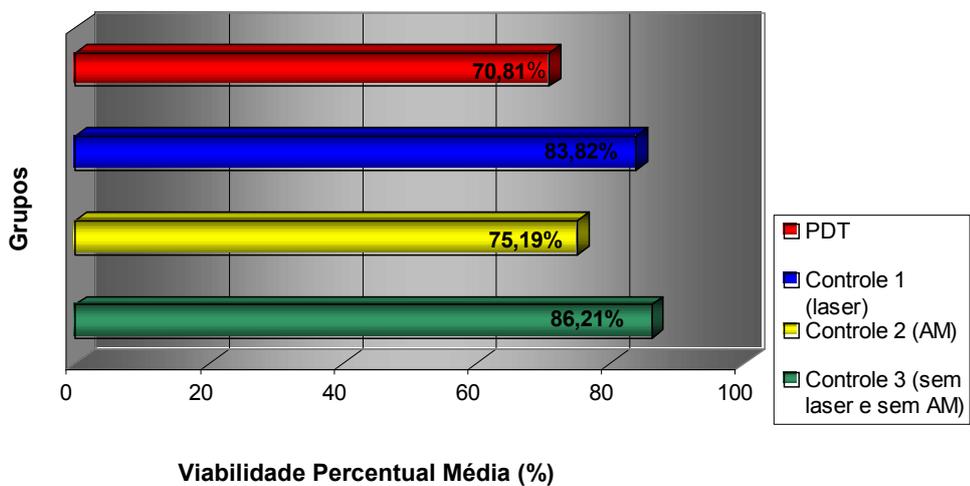


Figura 25: Viabilidade percentual média das células epiteliais nos grupos PDT e controles independentemente da dosimetria aplicada. Porto Alegre, 2006



PUCRS

## 6 DISCUSSÃO

Ao avaliar-se o efeito da PDT com azul de metileno e luz laser sobre as culturas de *Candida* sp., foi verificada diferença estatisticamente significativa de UFCs viáveis nos grupos teste e controle para as três dosimetrias de laser empregadas. Isto é, tanto a dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup>, quanto 270 J/cm<sup>2</sup> ou 450 J/cm<sup>2</sup> determinaram inativação significativa do fungo ( $p < 0,05$ ). A inativação da *Candida* sp. foi diretamente proporcional à dosimetria de laser aplicada.

Entretanto, se for considerado o critério de taxa de inativação ótima da fotossensibilização de 50% (KRESPI et al., 2005), observa-se que a PDT empregando a luz laser na dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup>, inativou 22,83% das UFCs de *Candida* sp. Tal dosimetria tem sido aplicada na PDT clínica antineoplásica (HOPPER, 1996; ABDEL-HADY et al., 2001; SIERÓN et al., 2004; BABILAS et al., 2005) com resultados satisfatórios. O fato de a PDT eliminar tecido hospedeiro, mesmo que neoplásico, e não conseguir inativar um microrganismo sugere que dosimetrias maiores sejam necessárias para tal fim, correndo-se o risco de toxicidade ao hospedeiro. Porém, há que se considerar outros fatores, como a potência útil do laser que, associada ao tempo empregado na terapia, determina o total de energia aplicado no local. No presente estudo, a dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> forneceu energia de 2,8 J. Em contrapartida, apesar de, na PDT antineoplásica, a dosimetria ser de 100 J/cm<sup>2</sup>, os tempos de aplicação da luz são maiores, o que determina deposição de maior dose de energia no local, além de serem empregadas várias sessões por paciente (LANGMACK et al., 2001). Segundo Orth et al. (2000), em estudo conduzido em ratos, a dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> associada ao azul de metileno a 1% determinou a remissão completa do tumor em 75% dos animais após duas sessões. Ao dobrarem essa dosimetria, os autores verificaram a mesma resposta. Sierón et al. (2003) aplicaram a dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup>, em cinco sessões, para tratamento de leucoplasia oral, utilizando laser de argônio com corante associado ao ALA e verificaram resposta completa em dez pacientes, com desaparecimento total da leucoplasia.

A aplicação da PDT com laser na dosimetria de 270 J/cm<sup>2</sup> eliminou 45,84% da *Candida* sp. e foi considerada satisfatória segundo o critério de taxa de inativação

ótima de 50% empregado por Krespi et al. (2005). A dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup> foi a mais eficaz, inativando 72,42% das culturas de *Candida* sp. Kömerik et al. (2002) verificaram que a PDT na dosimetria de 340 J/cm<sup>2</sup> e potência de 100 mW não provocou alterações clínicas nem histológicas em mucosa oral de ratos. Em humanos, dosimetrias de 250 a 300 J/cm<sup>2</sup> foram aplicadas em pele na PDT antineoplásica (BAGNATO et al., 2005), com recuperação do epitélio após poucas semanas. Porém, na cavidade oral, os autores não aplicaram mais que 200 J/cm<sup>2</sup>.

A energia fornecida pela maior dosimetria do presente estudo foi de 12,6 J. Wilson, Burns e Pratten (1996) aplicaram energia de 12,2 J em biofilmes bacterianos *in vitro* e verificaram inativação eficaz de *Streptococcus sanguinis*. Langmack et al. (2001) utilizaram 108 J *in vivo*, ao aplicarem dosimetria de 12,6 J/cm<sup>2</sup>, por 30 minutos, para tratamento de carcinoma basocelular. A maioria dos pacientes foi tratada em duas sessões de PDT, totalizando 216 J. Os efeitos colaterais observados pelos autores foram eritema moderado e ligeira descamação. Em um ano de acompanhamento, foi observada taxa de 84% de sucesso. No estudo desses autores, apesar de a dosimetria empregada ter sido baixa (12,6 J/cm<sup>2</sup>), a energia aplicada foi alta (108 J), em função do longo tempo de aplicação, que foi de 30 minutos. De acordo com Peng et al. (1997), com luz incoerente, as dosimetrias empregadas em humanos podem chegar a 540 J/cm<sup>2</sup> na PDT utilizando fotossensibilizador tópico, porém, com a luz laser, o emprego de dosimetrias altas não é usual.

A PDT com luz laser foi capaz de determinar inativação significativa da *Candida* sp. nas três dosimetrias empregadas. Entretanto, ao considerar-se o critério de taxa de inativação ótima de 50% (KRESPI et al., 2005), a dosimetria de 100 J/cm<sup>2</sup> não foi considerada eficaz, enquanto a de 270 J/cm<sup>2</sup> foi satisfatória e a de 450 J/cm<sup>2</sup> foi a mais eficaz. É possível que o emprego da energia fornecida pela dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup> fracionada em sessões de 100 J/cm<sup>2</sup> seja uma alternativa viável a ser testada *in vivo*.

No presente trabalho, a PDT foi aplicada em *Candida* sp. na forma de levedura, uma vez que foram empregados cultivos em caldo YPD. De acordo com Jackson et al. (1999), tanto a forma de levedura como a forma filamentosa de *Candida* sp. são sensíveis à terapia, embora a hifa seja mais susceptível. Os autores empregaram energia de 21 J, isto é, 1,66 vezes superior à fornecida pelos 450 J/cm<sup>2</sup> do presente estudo, e verificaram que a sensibilidade das hifas foi 175 vezes

superior à das leveduras. A maior susceptibilidade pode estar associada a diferenças entre hifas e leveduras na expressão dos sítios que constituem o alvo da ação de substâncias citotóxicas e de antioxidantes protetores (JACKSON et al., 1999). Se 72,42% das leveduras do presente estudo foram sensíveis à PDT na dosimetria de  $450 \text{ J/cm}^2$ , é provável que as hifas, que constituem a forma patogênica da candidose, o sejam em maior grau. Tal suposição deve ser investigada por meio de pesquisas *in vitro* com indução de formação de hifas.

Bliss et al. (2004) verificaram que leveduras de *Candida* sp. em meio YPD não assimilaram satisfatoriamente o fotossensibilizador Photofrin<sup>®</sup>, pois este ligou-se ao meio de cultura e ficou indisponível à célula. Foram necessários 60 minutos de incubação com o Photofrin<sup>®</sup>, após a retirada do meio de cultura, para que as leveduras o assimilassem. Segundo os autores, a assimilação do fotossensibilizador pela célula é maior em meio de cultura com condições mais restritivas ou na presença de alterações na composição da parede celular tanto de hifas como de leveduras em diferentes condições fisiológicas, o que permite transporte passivo mais eficiente do composto para o interior da célula. Células cultivadas em meio 199, que induz crescimento de hifa, não apresentaram problemas na assimilação do fotossensibilizador. No presente estudo, foram empregadas culturas diluídas em solução salina, evitando-se, assim, interferência do meio de cultura na assimilação e na sensibilidade dos microrganismos ao azul de metileno.

O período de incubação do fotossensibilizador preconizado na PDT antimicrobiana varia de um a dez minutos (RIBEIRO et al., 2005). No presente estudo, a permanência do azul de metileno em contato com as células, previamente à aplicação do laser, foi de cinco minutos. Jackson et al. (1999) verificaram, *in vitro*, que o período ideal de incubação do azul de toluidina foi de cinco minutos para leveduras de *C. albicans*, e o aumento do tempo até 180 minutos não intensificou a inativação celular. Este último tempo já ocasionava toxicidade às células, sem aplicação de luz.

Ao empregar-se a dosimetria de  $450 \text{ J/cm}^2$ , o tempo total da PDT (incubação do corante e aplicação do laser) do presente estudo foi de 11 minutos. O tempo total de aplicação da PDT, ao utilizar-se a dosimetria de  $270 \text{ J/cm}^2$ , foi de 8 minutos e 37 segundos e, na dosimetria de  $100 \text{ J/cm}^2$ , foi de 6 minutos e 21 segundos. Esses seriam os tempos que, na clínica, o paciente deveria ser mantido com a boca aberta para aplicação da PDT, o que parece ser uma situação tolerável. Já na PDT

antineoplásica, o tempo de incubação do fotossensibilizador é longo e há o inconveniente de sua aplicação por via endovenosa (HOPPER, 1996) que, na maioria dos casos, requer um período de espera até o fotossensibilizador atingir o sítio-alvo (BAGNATO et al., 2005). Ainda, ocorre um período de fotossensibilidade residual, que pode ser superior a duas semanas (HOPPER, 1996; ALLISON; MOTA; SIBATA, 2004), o que não acontece na aplicação tópica em boca. A aplicação tópica em pele, utilizando o ALA, também tem o inconveniente da fotossensibilidade residual e período de incubação longo (BABILAS et al., 2005), porém é indicada para tratamento de lesões múltiplas (PENG et al., 1997; BABILAS et al., 2005).

No presente estudo, independentemente da dosimetria aplicada, a *C. albicans* apresentou-se significativamente mais sensível à PDT do que as espécies *C. não-albicans*, com taxas de inativação, respectivamente, de 50,44% e 41,18%. Este parece ser um resultado satisfatório, ao considerar-se que a *C. albicans* é a espécie predominante do fungo na cavidade oral (EPSTEIN; PEARSALL; TRUELOVE, 1981). Por outro lado, Strakhovskaya et al. (2002) verificaram maior sensibilidade da *C. guilliermondii*, que foi 1,6 a 1,7 vezes mais sensível que a *C. albicans*. Souza et al. (2006) observaram que a PDT com energia de 10,5 J, fornecida pela dosimetria de 28 J/cm<sup>2</sup>, aplicada por cinco minutos, com o laser diodo e azul de metileno, inativou 91,6% das UFCs de *C. krusei*, 88,6% das *C. albicans*, 84,8% das *C. dubliniensis* e 82,3% das *C. tropicalis*. Esse resultado difere dos achados do presente estudo, em que a maior energia aplicada, 12,6 J, fornecida pela dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup>, eliminou 76,73% das *C. albicans* e 65,02% das *C. não-albicans*.

No presente estudo, a aplicação da PDT em sessão única sobre as culturas de *Candida* sp. exibiu resultados satisfatórios. Lee et al. (2004) verificaram, em estudo *in vitro* com biofilme bacteriano, que a recolonização bacteriana não ocorreu após as primeiras 12 horas da PDT, mas sim após 24 horas, e foram necessárias duas aplicações de PDT para erradicar as bactérias. É provável que a candidose *in vivo* necessite de mais de uma aplicação da PDT em dosimetrias fracionadas. Isso não acarretaria desequilíbrio da microbiota oral, pois na PDT tópica, a ação da terapia limita-se ao sítio de aplicação do fotossensibilizador e da luz. Além disso, o desenvolvimento de resistência por parte da *Candida* sp. é improvável, já que a inativação do microrganismo é mediada pelo oxigênio singlete (EMBLETON et al., 2002).

Após a centrifugação das células fúngicas, o sedimento não foi visualizado em função da baixa concentração de células de *Candida* sp. Conseqüentemente, não foi realizada a lavagem das culturas após a aplicação do fotossensibilizador e antes da aplicação da luz, pois células da amostra poderiam ser descartadas. Alguns autores (WAINWRIGHT et al., 1997; SOUKOS et al., 1998; WOOD et al., 1999; PAZOS et al., 2003; BLISS et al., 2004; KAWAUCHI et al., 2004; LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005) fazem a lavagem das culturas após aplicação do fotossensibilizador para remover seu excesso. Strakhovskaya et al. (2002) verificaram que uma única lavagem acarretou diminuição da fotossensibilização das amostras da ordem de 2 a 2,2 vezes. A fotossensibilidade das culturas de células fúngicas decresce com a lavagem após a aplicação do corante, o que sugere sensibilidade predominantemente mediada por fotossensibilizador livre ou por fotossensibilizador ligado à superfície celular (STRAKHOVSKAYA et al., 2002). Mesmo após 30 minutos de incubação do fotossensibilizador, a lavagem pode inibir totalmente a PDT (LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005).

Durante a aplicação do laser, as placas de cultura tanto de *Candida* sp. quanto das células epiteliais, permaneceram tampadas para se evitar contaminação (SOUKOS et al., 1998). Segundo Dobson e Wilson (1992), a tampa em posição causa algum espalhamento da luz, evidenciado pelo aumento do diâmetro de seu feixe, além de ser um anteparo para a ponta da fibra óptica, o que padroniza a distância entre a cultura e a saída do feixe de luz. Os autores observaram que não houve diferença significativa da aplicação da PDT com e sem a tampa da placa de Petri, apesar de uma zona maior de inibição de crescimento microbiano ter sido verificada nas culturas com tampa.

Alguns autores verificaram que a aplicação isolada do laser não afeta a viabilidade das células microbianas (WILSON; MIA, 1993; JACKSON et al., 1999; ROVALDI et al., 2000). Tal fato também é observado com o emprego de luz incoerente (KRESPI et al., 2005). Jackson et al. (1999) aplicaram energia de 21 J em leveduras e hifas de *Candida* sp. e não verificaram alteração da viabilidade das mesmas. Por esta razão, não foi testada a aplicação isolada do laser nas culturas de *Candida* sp. no presente estudo. Por outro lado, Souza et al. (2006) verificaram que a aplicação isolada do laser provocou redução das UFCs de *C. tropicalis*, o que sugere susceptibilidade desta espécie à luz laser.

Independentemente da dosimetria empregada, a viabilidade média das células epiteliais foi de 70,81%, com inativação de 29,19% das células pela PDT, o que parece fornecer uma margem de segurança para aplicação da terapia *in vivo*. Ao considerar-se a PDT na dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup>, a viabilidade média das células epiteliais foi de 65,39%. Ou seja, a dosimetria mais eficaz na inativação da *Candida* sp. empregada pelo presente estudo também parece permitir uma margem de segurança para sua aplicação *in vivo*. Embora não tenha exibido diferença estatisticamente significativa entre as distintas dosimetrias, a viabilidade das células epiteliais na PDT mostrou-se inversamente proporcional à dosimetria de laser aplicada.

A viabilidade média das células epiteliais no grupo PDT foi de 70,81%, enquanto no grupo em que foi aplicado o azul de metileno isoladamente, isto é, sem o laser, foi de 75,19%. Não houve diferença significativa entre esses dois grupos. Tal achado sugere efeito similar da PDT e do azul de metileno sobre as células epiteliais. A ausência de diferença significativa da viabilidade das células epiteliais entre o grupo azul de metileno e o grupo isento de tratamento, por sua vez, sugere que o corante não exerce efeito lesivo sobre as células. O grupo PDT, entretanto, diferiu significativamente do grupo isento de tratamento, isto é, inativou uma quantidade de células epiteliais significativamente maior que a deste grupo. Portanto, apesar de ter um efeito semelhante ao do azul de metileno aplicado isoladamente, a PDT tem efeito mais lesivo que este às células epiteliais. A aplicação isolada de luz visível na energia de 452 J não afetou a proliferação dos queratinócitos, energia esta capaz de afetar a viabilidade de bactérias (ZEINA et al., 2001; ZEINA et al., 2002). Bhatti et al. (2000) verificaram que a PDT foi mais eficaz em eliminar bactérias que as aplicações isoladas do fotossensibilizador e do laser. Chan e Lai (2003) não observaram redução da contagem de bactérias na aplicação isolada do fotossensibilizador e, na aplicação isolada do laser, mais de 50% delas permaneceram viáveis. A viabilidade das células epiteliais do presente estudo não exibiu diferença significativa entre o grupo isento de tratamento (86,21%) e o grupo laser (83,82%). Entretanto, ao serem comparados com o grupo PDT (70,81%), ambos exibiram viabilidade significativamente maior, o que indica que a aplicação isolada do laser não afetou, pelo menos de forma imediata, a viabilidade das células, enquanto a PDT foi capaz de exercer esse efeito.

Zeina et al. (2003) investigaram, *in vitro*, o efeito da PDT sobre queratinócitos. Os autores empregaram azul de metileno a 100 µg/mL e energia de 452 J, com taxa de fluência de 42 mW/cm<sup>2</sup>, fornecida por um projetor de *slides*. Embora tivesse ocorrido 90% de lise celular, os autores não verificaram dano genotóxico às células. As energias aplicadas no presente estudo variaram entre 2,8 J e 12,6 J, o que poderia sugerir ausência de dano genotóxico à célula epitelial.

A aplicação isolada de 12,6 J do laser diodo nas células epiteliais não determinou diferença significativa da viabilidade celular em comparação ao grupo isento de tratamento. Isso também foi verificado por Zeina et al. (2002), cujo estudo demonstrou que a luz visível incoerente não afetou a proliferação de queratinócitos humanos *in vitro* após aplicação de energia 35,87 vezes superior (452 J) à do presente estudo.

A viabilidade das células epiteliais do grupo que sofreu aplicação isolada do azul de metileno não diferiu significativamente daquela verificada para o grupo isento de tratamento e para o grupo laser. Tal achado sugere que o fotossensibilizador na concentração de 100 µg/mL não apresenta toxicidade às células epiteliais, ainda que a viabilidade celular, após sua aplicação, apresentasse valor intermediário entre o do grupo PDT e o do grupo isento de tratamento. Zeina et al. (2002) também não verificaram alterações significativas do número de queratinócitos após aplicação isolada de 100 µg/mL de azul de metileno. Porém, uma variedade de fotossensibilizadores associada a várias doses de luz tem suscitado diferentes respostas em estudos experimentais (KÖMERIK et al., 2002), o que dificulta a comparação entre eles.

As células epiteliais empregadas na presente pesquisa foram as HEP-2, derivadas de carcinoma de laringe, que exibiram taxa de sensibilidade à PDT igual a 29,19%, independentemente da dosimetria empregada. Talvez, na aplicação *in vivo*, as células epiteliais orais se apresentem ainda mais resistentes à terapia, já que, de acordo com Pazos et al. (2003), células epiteliais neoplásicas são mais sensíveis à PDT do que células epiteliais não-neoplásicas. Mesmo assim, a dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup>, em aplicação única, deverá ser testada em modelos animais, para avaliação de sua toxicidade, já que não é comumente aplicada na PDT em humanos.

Diferentes dosimetrias conseguem ser bem sucedidas na inativação de bactérias, tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas (KARRER et al., 1999; ROVALDI et al., 2000; KÖMERIK et al., 2003). Entretanto, o fungo *Candida* sp. é um

microrganismo eucarioto, assim como as células epiteliais, e ambos apresentam maior número de organelas-alvo para ligação do fotossensibilizador, se comparados às bactérias, o que justifica a maior sensibilidade das células bacterianas em relação às leveduras e células hospedeiras. O volume celular também deve ser considerado, já que espécies de *Candida* e queratinócitos são 25 a 50 vezes maiores que bactérias como *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. (ZEINA et al., 2002). Isso torna difícil a comparação do efeito antimicrobiano da PDT entre bactérias, que são os microrganismos mais estudados *in vitro*, e fungos, que são o alvo do presente estudo.

Zeina et al. (2002) verificaram que a taxa de morte dos queratinócitos era, em média, 18 vezes menor que a da *Candida* sp. e 200 vezes menor que a das bactérias. Tal achado está de acordo com os resultados do presente estudo, já que as células epiteliais HEP-2 foram mais resistentes do que a *Candida* sp. à PDT. Pazos et al. (2003) observaram que as células epiteliais neoplásicas HeLa foram mais sensíveis à PDT que as células epiteliais não-neoplásicas CHO-K1. Deve-se considerar que as células HEP-2 são derivadas de carcinoma, sendo, portanto, neoplásicas e mais sensíveis à PDT do que os queratinócitos. Os resultados do presente estudo sugerem, portanto, uma margem de segurança para aplicação da PDT *in vivo*.

Zeina et al. (2002) aplicaram, em queratinócitos humanos *in vitro*, 452 J de energia fornecida por luz incoerente em aplicação única e não verificaram alteração do número de células. Pinheiro et al. (2002) observaram que a aplicação de dosimetrias entre 0,04 J/cm<sup>2</sup> e 4,8 J/cm<sup>2</sup> durante sete dias consecutivos acarretou aumento da proliferação de células HEP-2, as mesmas empregadas no presente estudo. Ocaña-Quero et al. (1998) verificaram que o laser He-Ne na dosimetria de 0,13 J/cm<sup>2</sup> produziu efeito proliferativo em cultura de células de adenoma mamário de cães, enquanto dosimetrias superiores a 1,04 J/cm<sup>2</sup> produziram efeito inibitório em aplicações durante quatro dias consecutivos, com aplicação total de 6,4 J na maior dosimetria utilizada. De acordo com Kreisler et al. (2003), culturas de fibroblastos do ligamento periodontal expostas ao laser AsGaAl nas dosimetrias entre 1,96 e 7,84 J/cm<sup>2</sup> apresentaram efeito proliferativo semelhante. As dosimetrias testadas por esses autores foram inferiores às empregadas no presente estudo, cuja viabilidade celular, após aplicação isolada do laser, não exibiu diferença significativa em relação ao grupo isento de tratamento. Entretanto, tal achado não descarta a

possibilidade de o laser exercer efeito inibitório a longo prazo, após aplicações consecutivas das dosimetrias testadas.

O fato de a irradiação das células com luz visível e conseqüente absorção desta pelas moléculas teciduais suscitar tanto efeito proliferativo quanto inibitório, pode ser explicado por dois processos que envolvem excitação eletrônica (KARU, 1989). A luz é absorvida pelos componentes da cadeia respiratória, sendo que os efeitos primários ocorrem na mitocôndria (KARU, 1987). Um dos processos que ocorrem é a aceleração da transferência de elétrons nas reações redox em algumas fases da cadeia respiratória da mitocôndria e o outro é a transferência de energia ao oxigênio, sendo que o citocromo funciona como fotossensibilizador. Em baixas dosimetrias, o primeiro processo predomina e, em altas, o dano fotodinâmico ocorre (KARU, 1989).

Miyamoto, Umebayashi e Nishisaka (1999) verificaram que a lise celular ocorre entre seis e 24 horas após a aplicação da luz na PDT com HpD, ao utilizar-se o modo contínuo do laser. Zeina et al. (2003) verificaram que, após 90 minutos de aplicação da PDT, a viabilidade imediata de queratinócitos humanos foi de 38%. Após retirar nova alíquota da mesma amostra, seis horas depois, a viabilidade verificada foi de 68%, sugerindo recuperação celular. Os autores verificaram, também, que, após 60 minutos de PDT, a viabilidade celular imediata foi de 42%, e avaliação após seis horas demonstrou viabilidade de 91%. Para os autores, um tempo maior de aplicação de PDT induziu proporção maior de dano irreversível às células. No presente estudo, o tempo de incubação do fotossensibilizador somado ao tempo da maior dosimetria aplicada foi de 11 minutos e, portanto, inferior ao tempo de PDT empregado por Zeina et al. (2003). Isso sugere a possibilidade de recuperação celular após os tratamentos aplicados. Entretanto, tal fato não foi investigado no presente estudo, porque a viabilidade foi avaliada em período imediato ao tratamento e não o foi em períodos subseqüentes.

A localização lisossomal do azul de metileno poderia ter acarretado a coloração azulada das células HEp-2 na microscopia de luz, estando as células ainda viáveis. Mellish et al. (2002) verificaram que o azul de metileno corou os lisossomos das células RIF-1 após exposição por duas horas. Os autores observaram pontos de fluorescência inicialmente nos lisossomos e na região perinuclear. Após dez minutos de irradiação, verificaram fluorescência citoplasmática difusa, com localização nuclear. A fluorescência nuclear foi observada entre três e

nove minutos de exposição à luz. Como, no presente estudo, a exposição à luz nas dosimetrias de 270 J/cm<sup>2</sup> e 450 J/cm<sup>2</sup> foi de 3 minutos e 37 segundos e de 6 minutos, respectivamente, é provável que o azul de metileno também se tenha redistribuído na região perinuclear após este período.

A dosimetria de 45 J/cm<sup>2</sup> é recomendada pelo fabricante do aparelho de laser empregado neste estudo para obtenção de efeito proliferativo tecidual, sendo que dosimetrias superiores aplicadas a tecidos moles já provocariam efeito inibitório (ALMEIDA-LOPES; MASSINI JÚNIOR, 2002). Ainda que seja considerada alta, a dosimetria de 450 J/cm<sup>2</sup> forneceu energia de 12,6 J, estando dentro dos parâmetros de aplicação do laser sugeridos por Santos et al. (2003) para obtenção de efeito biomodulador. Os autores recomendam a energia máxima por sessão de 9 J para crianças, 20 a 30 J para adultos e 18 a 20 J para idosos. O número de sessões por paciente, segundo o fabricante do aparelho, é de uma a dez, na frequência de uma ou duas vezes por semana. As dosimetrias recomendadas para uso do laser InGaAlP chegam até 130 J/cm<sup>2</sup>. De acordo com os autores, dosimetrias mais altas são reservadas para áreas de inflamação crônica (ALMEIDA-LOPES; MASSINI JÚNIOR, 2002).

Segundo Zeina et al. (2003), a PDT é um método suficientemente seletivo para inativação de fungos em infecções superficiais, já que as dosimetrias requeridas para inativação desses microrganismos são inferiores às dosimetrias lesivas a células animais. Tal idéia está de acordo com os achados do presente estudo, já que o dano às células epiteliais foi 2,24 vezes menor que o dano causado à *Candida* sp. Ao extrapolar-se tal resultado para estudos de candidose mucocutânea em humanos, a aplicação tópica do fotossensibilizador torna-se alternativa viável, e concentrações eficazes podem ser obtidas com efeitos colaterais mínimos (BLISS et al., 2004). A aplicação tópica, principalmente para o tratamento de infecções superficiais, tem forte apelo por não ser invasiva e não ter complicações sistêmicas (TEICHERT et al., 2002), porém a estabilidade do agente fotossensibilizador deve ser mantida até sua ativação pela fonte de luz, assim como a penetração através da pele e da mucosa deve ser adequada (RIBEIRO et al., 2005). Na aplicação da PDT *in vivo*, deve ser levada em consideração a presença de saliva (KÖMERIK et al., 2003) que, por sua ação detergente, pode remover o fotossensibilizador.

A PDT não substitui a terapia antimicrobiana convencional, mas é uma opção de tratamento local rápido e de baixo custo, além de ser mais seletiva do que a antibioticoterapia sistêmica (WAINWRIGHT, 1998). Além disso, a PDT tópica não tem risco de *overdoses* e efeitos colaterais. Distúrbios na microbiota de outros sítios da boca não ocorreriam (CHAN; LAI, 2003). Apesar de a fibra óptica do laser ser direcionada para a lesão fúngica especificamente, pode, também, eliminar algumas células bacterianas dos sítios adjacentes, porém em uma área restrita (EMBLETON et al., 2002). Como a população bacteriana oral é maior que a de leveduras (MARSH; MARTIN, 2005), isso não deverá constituir problema.

Na presente pesquisa, assim como nos estudos de Wilson e Mia (1993), Bliss et al. (2004) e Souza et al. (2006), aplicou-se a PDT em culturas isoladas de *Candida* sp. Porém deve-se salientar que a susceptibilidade desses organismos pode ser diferente na cavidade oral, com uma microbiota diversificada que inclui inúmeras bactérias e a presença da *Candida* sp. tanto na forma de levedura quanto de hifa. A falta de seletividade da PDT *in vivo* dificulta a generalização dos resultados obtidos pelo presente estudo. Tal limitação poderia ser contornada pela conjugação do fotossensibilizador a um anticorpo específico para *Candida* sp. (WILSON; MIA, 1993; EMBLETON et al., 2002).

Espécies de *Candida* têm-se tornado muito prevalentes em infecções sistêmicas. Além disso, a resistência da *Candida* sp. a antifúngicos tradicionais tem aumentado, com espécies como a *C. krusei* exibindo resistência natural ao fluconazol (BLISS et al., 2004). Tal fato acarreta a necessidade de novas estratégias para tratamento de infecções fúngicas. O número de fungos patogênicos está aumentando devido à maior ocorrência de infecções hospitalares em pacientes imunocomprometidos e, atualmente, poucos são os antifúngicos seguros, e a maioria deles é fungistática. Ainda, o uso intensivo de antibioticoterapia leva, progressivamente, ao aparecimento de cepas resistentes (CARRÉ et al., 1999).

Sabe-se que um dos efeitos colaterais da administração sistêmica de antibióticos é a alteração da microbiota normal em sítios não-alvos. Com a PDT, a resistência microbiana pode ser evitada, uma vez que seu desenvolvimento à ação fotoquímica mediada por radicais livres é improvável (KARRER et al., 1999). Também em função de o mecanismo de destruição fúngica da PDT ser agudo, é improvável o aparecimento de resistência ao tratamento. Como a terapia é local, não há interações medicamentosas (TEICHERT et al., 2002). O emprego da PDT com

azul de metileno pode constituir alternativa viável ao uso de antibióticos e anti-sépticos para tratamento de infecções localizadas, particularmente as causadas por organismos resistentes aos agentes antimicrobianos convencionais. A cavidade oral, por ser um sítio de fácil acesso, torna-se ideal para esse tratamento. Porém é importante levar em consideração o tecido hospedeiro (KÖMERIK et al., 2002) e, por essa razão, testou-se também a ação da PDT nas células epiteliais.



PUCRS

---

**7 CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

7.1 A PDT com azul de metileno e laser InGaAIP, nas dosimetrias de  $100 \text{ J/cm}^2$ ,  $270 \text{ J/cm}^2$  e  $450 \text{ J/cm}^2$ , determina inativação significativa das culturas de *Candida* sp.

7.2 A *C. albicans* é mais sensível que as *C. não-albicans* à PDT com azul de metileno e laser InGaAIP, sem haver diferença significativa de sensibilidade entre as espécies ao considerarem-se as diferentes dosimetrias aplicadas.

7.3 A dosimetria de  $450 \text{ J/cm}^2$  é mais eficaz que as dosimetrias de  $100 \text{ J/cm}^2$  e  $270 \text{ J/cm}^2$  na inativação de UFCs de culturas de *Candida* sp.

7.4 As culturas de células epiteliais são menos sensíveis à PDT com azul de metileno e laser InGaAIP que as culturas de *Candida* sp.



PUCRS

---

**REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ABDEL-HADY, E.-S. et al. Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 61, n. 1, p. 192-196, Jan. 2001.

AGUIRRE URIZAR, J.M. Candidiasis orales. **Rev. Iberoam. Micol.**, Bilbao, v. 19, n. 1, p. 17-21, marzo 2002.

AIMBIRE, A. et al. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 20, n. 1, p. 11-20, June 2005.

AL-ABEID, H.M. et al. Isolation and characterization of *Candida spp.* in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. **Jpn. J. Infect. Dis.**, Tokyo, v. 57, n. 6, p. 279-284, Dec. 2004.

ALBERTINI, R. et al. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 74, n. 2-3, p. 101-107, May 2004.

ALLISON, R.R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 1, n. 1, p. 27-42, May 2004.

ALLISON, R.R.; MOTA, H.C.; SIBATA, C.H. Clinical PD/PDT in North America: an historical review. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 1, n. 4, p. 263-277, Dec. 2004.

ALMEIDA-LOPES, L.; MASSINI JÚNIOR, R. **Laseres e suas aplicações: manual do usuário**. São Paulo. 2002. 30p.

AMARAL, L.; VIVEIROS, M.; KRISTIANSEN, J.E. Phenothiazines: potential alternatives for the management of antibiotic resistant infections of tuberculosis and malaria in developing countries. **Trop. Med. Int. Health**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1016-1022, Dec. 2001.

ANDRADE, E.D. Protocolos indicados na Prática Odontológica. In: \_\_\_\_\_.  
**Terapêutica medicamentosa em odontologia.** São Paulo: Artes Médicas, 1999. p.  
149-183.

ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. Oral candidal populations in health and disease.  
**Br. Dent. J.**, London, v. 147, n. 10, p. 267-272, Nov. 1979.

BABILAS, P. et al. Photodynamic therapy in dermatology- an update.  
**Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v. 21, n. 3, p. 142-149,  
June 2005.

BAGNATO, V.S. et al. PDT experience in Brazil: a regional profile. **Photodiag.**  
**Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 2, n. 2, p. 107-118, June 2005.

BALL, D.J. et al. The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue  
derivative. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 42, n. 2, p. 159-163, Feb.  
1998.

BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool.  
**Lasers Surg. Med.**, New York, v. 16, n. 4, p. 331-342, 1995.

BATISTA, J.M.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas  
de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Rev. Odontol.**  
**Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 343-348, out./dez. 1999.

BELKIN, M.; SCHWARTZ, M. New biological phenomena associated with laser  
radiation. **Health Phys.**, New York, v. 56, n. 5, p. 687-690, May 1989.

BHATTI, M. et al. Antibody-targeted lethal photosensitization of *Porphyromonas*  
*gingivalis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 44, n. 10, p. 2615-2618,  
Oct. 2000.

BLISS, J.M. et al. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of  
photofrin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 48, n. 6, p. 2000-2006,  
June 2004.

BÖCKING, T. et al. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast  
*Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.267, n. 6, p. 1607-1618, Mar.  
2000.

BORROMEIO, G.L.; McCULLOUGH, M.J.; READE, P.C. Quantitation and morphotyping of *Candida albicans* from healthy mouths and from mouths affected by erythematous candidosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 477-480, 1992.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 17, n. 3, p.173-186, Aug. 2002.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; VILLA, R.G.; GENOVESE, W.J. **Laser na Odontologia**. São Paulo: Pancast, 1991. 61 p.

BRUGNERA JÚNIOR, A. et al. **Atlas de laserterapia aplicada à Clínica Odontológica**, São Paulo: Santos, 2003. 119 p.

BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, Estocolmo, v. 48, n. 1, p. 61-69, Feb. 1990a.

BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. **Acta Odontol. Scand.**, Estocolmo, v. 48, n. 1, p. 37-43, Feb. 1990b.

CALZAVARA-PINTON, P.G. et al. Photodynamic therapy of interdigital mycosis of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v. 20, n. 3, p. 144-147, June 2004.

CAMPBELL, D.T.; STANLEY, J.C. Três autênticos delineamentos experimentais. In: \_\_\_\_\_. **Delineamentos experimentais e quase-experimentais de pesquisa**. São Paulo: EDUSP, 1979. p. 25-60.

CAPELLA, M.A.; CAPELLA, L.S. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. **J. Biomed. Sci.**, Basel, v. 10, n. 4, p. 361-366, July/Aug. 2003.

CARRÉ, V. et al. Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 48, n. 1, p. 57-62, Jan. 1999.

CARRILLO MUÑOZ, A.-J. et al. Resistencia *in vitro* al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* sp. y *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 14, n. 2, p. 50-54, June 1997.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Phothodiag. Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 1, n. 4, p. 279-293, Dec. 2004.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two- cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Phothodiag. Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 2, n. 1, p. 1-23, Mar. 2005a.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three-photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Phothodiag. Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 2, n. 2, p. 91-106, June 2005b.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J.C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 23, n. 1, p. 39-49, marzo 2006.

CHAN, Y.; LAI, C.-H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 18, n. 1, p.51-55, Mar. 2003.

COTRAN, R.S et al. Lesão celular e morte celular. In:\_\_\_\_\_. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5 ed., 1996. p. 1-30.

CROSS, L.J. et al. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 97, n. 3, p. 351-358, Mar. 2004.

ÇITAK, S. et al. *In vitro* susceptibility of *Candida* species isolated from blood culture to some antifungal agents. **Jpn. J. Infect. Dis.**, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 44-46, Feb. 2005.

DE PAUW, B. Is there a need for new antifungals agents? **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v. 6, suppl. 2, p. 23-28, Aug. 2000.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, n. 11, p. 883-887, Nov. 1992.

DONNELLY, J.P.; DE PAUW, B.E. Voriconazole- a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v. 10, suppl. 1, p. 107-117, Mar. 2004.

DOUGHERTY, T.J. et al. Photodynamic therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 90, n. 12, p. 889- 905, June 1998.

DUBBELMAN, T.M.A.R.; PENNING, L.C. New photosensitizers in photodynamic therapy. Cellular aspects. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 9, n. 3-4, p. 393-395, June 1991.

EDMAN, J.C. Micología Médica. In: Brooks et al. **Jawetz, Melnick, Adelberg. Microbiología médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 420-443.

ELLEPOLA, A.N.B; PANAGODA, G.J.; SAMARANAYAKE L.P. Adhesion of oral *Candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 14, n. 6, p. 358-363, Dec. 1999.

ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 999-1007, Dec.1998.

EMBLETON, M.L. et al. Selective lethal photosensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using an IgG-tin (IV) chlorin e6 conjugate. **J. Antimicrobial Chemother.**, London, v. 50, n. 6, p. 857-864, Dec. 2002.

EPSTEIN, J.B.; PEARSALL, N.N.; TRUELOVE, E.L. Oral candidiasis: effects of antifungal therapy upon clinical signs and symptoms, salivary antibody, and mucosal adherence of *Candida albicans*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 51, n. 1, p. 32-36, Jan. 1981.

FERGUSON, J. Photosensitivity due to drugs. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v. 18, n. 5, p. 262-269, Oct. 2002.

FERNANDEZ, J.M.; BILGIN, M.D.; GROSSWEINER, L.I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 37, n. 1-2, p. 131-140, Jan. 1997.

FICA, A.C. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Rev. Chil. Infectol.**, Santiago, v. 21, n. 1, p. 26-38, 2004a.

FICA, A.C. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. III parte: anfotericina B, aspectos farmacoeconómicos y decisiones terapéuticas. **Rev. Chil. Infectol.**, Santiago, v. 21, n. 4, p. 317-326, dic. 2004b.

FICKWEILER, S. et al. Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-( $\beta$ -methoxyethyl)-porphycene) *in vitro*: mechanism of action. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 48, n. 1, p. 27-35, Jan. 1999.

FINLAY, P.M.; RICHARDSON, M.D.; ROBERTSON, A.G. A comparative study of the efficacy of fluconazole and amphotericin B in the treatment of oropharyngeal candidosis in patients undergoing radiotherapy for head and neck tumours. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 34, n. 1, p. 23-25, Feb. 1996.

FLOYD, R.A.; SCHNEIDER JÚNIOR, J.E.; DITTMER, D.P. Methylene blue photoinactivation of RNA viruses. **Antiviral Res.**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 141-151, Mar. 2004.

FOTOS, P.G.; VINCENT, S.D.; HELLSTEIN, J.W. Oral candidosis: clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 74, n. 1, p. 41-49, July 1992.

FREITAS, I. Inflammation and photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 8, n. 3, p. 340-341, Feb. 1991.

GARCEZ, A.A. et al. Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 223-225, maio/jun. 2003.

GATICA, J.L.M. et al. Utilidad del agar cromocandida para el diagnostico diferencial de *Candida* spp. aisladas de muestras vaginales. **Rev. Chil. Obstet. Ginecol.**, Santiago, v. 67, n. 4, p. 300-304, 2002.

GENOVESE, W.J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000, 175 p.

GOLDMAN, L. et al. Effects of laser beam impacts on teeth. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 70, p. 601-606, Mar. 1965.

GOLDMAN, L. et al. Impact of the laser on dental caries. **Nature**, London, v. 203, n. 4943, p. 417, July 1964.

GREGORY, G.F. et al. Photodynamic therapy and lip vermilion dysplasia: a pilot study. **Eur. J. Cancer B Oral Oncol.**, Oxford, v.31B, n.5, p.346-347, Sept. 1995.

HARRIS, F. et al. An investigation into the potential of phenothiazinium-based photosensitisers to act as PDT agent. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 1, n. 3, p. 231-239, Nov. 2004.

HOLMSTRUP, P.; AXÉLL, T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v. 48, n. 1, p. 57-59, Feb. 1990.

HOPPER, C. The role of photodynamic therapy in the management of oral cancer and precancer. **Eur. J. Cancer B Oral Oncol.**, Oxford, v. 32B, n. 2, p. 71-72, Mar. 1996.

JACKSON, Z. et al. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 14, n. 2, p. 150-157, June 1999.

JEGANATHAN, S.; CHAN, Y.C. Immunodiagnosis in oral candidiasis. A review. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 74, n. 4, p. 451-454, Oct. 1992.

KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 19, n. 1, p. 44-48, Mar. 2002.

KARRER, S. et al. Photodynamic inactivation of *Staphylococci* with 5-aminolaevulinic acid or Photofrin. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 14, n. 1, p. 54-61, Mar. 1999.

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J. Quantum Electr.**, New York, v. 23, n. 10, p. 1703-1717, Oct. 1987.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, New York, v. 56, n. 5, p. 691-704, May 1989.

KARU, T.I.; BAKEEVA, L.E.; MANTEIFEL, V.M. Could irradiation with monochromatic light of visible spectral region cause genetic effects? Disponível em <<http://www.photobiology.com/photobiology99/contribu/karu/index.html>>. Acesso em: 5 nov. 2002.

KAWAUCHI, S. et al. Differences between cytotoxicity in photodynamic therapy using a pulsed laser and a continuous wave laser: study of oxygen consumption and photobleaching. **Lasers Med. Sci.**, v. 18, n. 4, p. 179-183, Mar. 2004.

KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 1, n. 1, p. 3-7, May 2004.

KESSEL, D.; LUO, Y. Intracellular sites of photodamage as a factor in apoptotic cell death. **J. Porphyrins Phthalocyanines**, Bourgogne, v. 5, n. 2, p. 181-184, Feb. 2001.

KESSEL, D.; LUO, Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. **Cell Death Differ.**, London, v. 6, n. 1, p. 28-35, Jan. 1999.

KINERSLY, T. et al. Laser effects on tissue and materials related to dentistry. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 70, n. 3, p. 593-600, Mar. 1965.

KLEINEGGER, C.L.; STOECKEL, D.C.; KURAGO, Z.B. A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 92, n. 1, p. 62-67, July 2001.

KNAPPE, V.; FRANK, F.; ROHDE, E. Principles of lasers and biophotonic effects. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 22, n. 5, p. 411-417, Oct. 2004.

KOLÁROVÁ, H.; DITRICHOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin *in vitro*. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 24, n. 3, p. 231-235, May 1999.

KÖMERIK, N. et al. Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue O on rat buccal mucosa. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 17, n. 2, p. 86-92, June 2002.

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

KONAN, Y.N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 66, n. 2, p. 89-106, Mar. 2002.

KORNMAN, K.S. Agentes antifúngicos e antivirais. In: NEWMAN, M.; KORNMAN, K. **O uso de antibióticos e antimicrobianos na prática odontológica**. São Paulo: Quintessence, 1997. p. 110-113.

KRESPI, Y.P. et al. Lethal photosensitization of oral pathogens via red-filtered halogen lamp. **Oral Dis.**, Copenhagen, v. 11, suppl. 1, p. 92-95, Mar. 2005.

KREISLER, M. et al. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an *in vitro* study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 30, n. 4, p. 353-358, Apr. 2003.

LACAZ, C.S. et al. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. Provas de sensibilidade *in vitro*. Dosagem sanguínea. In:\_\_\_\_\_. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 9 ed., 2002. p. 998-1067.

LAMBRECHTS, S.A.G.; AALDERS, M.C.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, Washington, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, May 2005.

LANGMACK, K. et al. Topical photodynamic therapy at low fluence rates: theory and practice. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 60, n. 1, p. 37-43, Apr. 2001.

LEE, C.-F. et al.  $\delta$ -Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 75, n. 1-2, p. 21-25, July 2004.

LIM, D.-S. et al. Photoinactivation of vesicular stomatitis virus by a photodynamic agent, chlorophyll derivatives from silkworm excreta. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 67, n. 3, p. 149-156, July 2002.

LOBENE, R.R.; FINE, S. Interaction of laser radiation with oral hard tissues. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 16, n. 3, p. 589-597, May/June 1966.

LÓPEZ, L.V. Importancia clínica de los azoles em la terapia antifúngica: tratamiento o profilaxis com los nuevos azoles en hematología. **Rev. Esp. Quimioter.**, Barcelona, v. 17, n. 1, p. 98-100, marzo 2004.

LUKSIENE, Z.; KALVELYTE, A.; SUPINO, R. On the combination of photodynamic therapy with ionizing radiation. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 52, n. 1-3, p. 35-42, Sept./Oct. 1999.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 237-243, mar./abr. 2000.

MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v. 10, suppl. 1, p. 1-10, Mar. 2004.

MÄHÖNEN, K.; VIRTANEN, K.; LARMAS, M. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 304-310, Apr. 1998.

MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, London, v. 187, n. 4736, p. 493-494, Aug. 1960.

MANNARELLI, B.M.; KURTZMAN, C.P. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1634-1641, June 1998.

MANG, T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 1, n. 1, p. 43-48, May 2004.

MARQUES, S.A.; CAMARGO, R.M.P. Paracoccidiodomicose. In: ZAITZ, C. et al. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998. p. 231-263.

MARSH, P.; MARTIN, M.V. A microflora oral residente. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia oral**. São Paulo: Santos, 4 ed., 2005. p. 17-33.

MAVER-BISCANIN, M.; MRAVAK-STIPETIC, M.; JEROLIMOV, V. Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 23, n. 3, p. 328-332, June 2005.

McCARTHY, G.M. et al. Factors associated with increased frequency of HIV-related oral candidiasis. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 20, n. 7, p. 332-336, Aug. 1991.

MELLISH, K.J. et al. *In vitro* photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 392-397, Apr. 2002.

MELO, C.A. et al. Characterization of light penetration in rat tissues. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 19, n. 4, p. 175-179, Aug. 2001.

MIDDA, M.; RENTON-HARPER, P. Lasers in dentistry. **Br. Dent. J.**, London, v. 170, n. 9, p. 343-346, May 1991.

MIDGLEY, G.; CLAYTON, Y.M.; HAY, R.J. Superficial Mycosis. In: \_\_\_\_\_ **Diagnosis in color: medical mycology**. Chicago: Mosby-Wolfe, 1997. p. 17-93.

MIOTTO, N.M.L.; YURGEL, L.S.; CHERUBINI, K. Candidíase oral em pacientes do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS. **Rev. Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 17, n. 38, p. 354-361, out./dez. 2002.

MIYAMOTO, Y.; UMEBAYASHI, Y.; NISHISAKA, T. Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 53, n. 1-3, p. 53-59, Nov./Dec. 1999.

MOAN, J. BERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 53, n. 4, p. 549-553, Apr. 1991.

MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 57, n. 1, p. 1-13, Aug. 2000.

MOSCA, C.O. et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis, **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v. 10, n.1, p.28-31; 25-28, English, Spanish, Jan./Feb. 2005.

MOUDGAL, V. et al. Multiechinocandin and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 49, n. 2, p. 767-769, Feb. 2005.

MÜLLER, S. et al. Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 42, n. 1, p. 67-70, Jan. 1998.

NEVALAINEN, M.J.; NÄRHI, T.O.; AINAMO, A. Oral mucosal lesions and oral hygiene habits in the home-living elderly. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 332-337, May 1997.

NONAKA, M.; IKEDA, H.; INOKUCHI, T. Inhibitory effect of heat shock protein 70 on apoptosis induced by photodynamic therapy *in vitro*. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 79, n. 1, p. 94-98, Jan. 2004.

NOODT, B.B. et al. Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells. **Int. J. Cancer**, Genève, v. 75, n. 6, p. 941-948, Mar. 1998.

NYMAN, E.S.; HYNINEN, P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 73, n. 1-2, p. 1-28, Jan. 2004.

OCAÑA-QUERO, J.M. et al. Effect of Helium-Neon (He-Ne) laser irradiation on dog neoplasm cells in culture. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 13, n. 2, p. 143-147, June 1998.

OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v. 48, n. 1, p. 71-74, Feb. 1990.

OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **Photochem. Photobiol. Sci.**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 1-21, Jan. 2002.

OLSEN, I. Oral adhesion of yeasts. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v. 48, n. 1, p. 45-53, Feb. 1990.

ORTH, K. et al. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 57, n. 2-3, p. 186-192, Sept. 2000.

PAULA, C.R. Candidíases. In: ZAITZ, C. et al. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998. p. 99-107.

PAZOS, M.C. et al. Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. **Biocell**, Mendoza, v. 27, n. 3, p. 301-309, Dec. 2003.

PENG, Q. et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: clinical research and future challenges. **Cancer**, New York, v. 79, n. 12, June 1997.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v. 10, suppl. 1, p. 11-23, Mar. 2004.

PINHEIRO, A.L.B. Bases físicas dos lasers. In: BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. p. 27-44.

PINHEIRO, A.L.B. Normas de segurança quando na utilização de laser. **R.G.O.**, Porto Alegre, v. 43, n. 4, p. 227-232, jul./ago., 1995.

PINHEIRO, A.L.B.; FRAME, J.W. Laser em Odontologia. Seu uso atual e perspectivas futuras. **R.G.O.**, Porto Alegre, v. 40, n. 5, p. 327-332, set./out., 1992.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Effects of low-level laser therapy on malignant cells: *in vitro* study. **J. Clin. Laser. Med. Surg.**, New York, v. 20, n. 1, Feb. 2002.

REDDY, G.K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 22, n. 2, p. 141-150, Apr. 2004.

RIBEIRO, M.S. et al. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. In: **Livro virtual, 23º CIOSP**, São Paulo, 2005, 26p. Disponível em <<http://www.netodonto.com.br/ciosp/index.php>>. Acesso em 10 nov. 2005.

ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C. Drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 50-62.

ROGERO, S.O. et al. Teste *in vitro* de toxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, abr./jun. 2003.

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

RUHNKE, M. et al. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n. 9, p. 2092-2098, Sept. 1994.

SALVA, K.A. Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages or indications. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v. 20, n. 5, p. 571-581, Sept./Oct. 2002.

SANTOS, A.E.C.G. et al. Aplicação do laser terapêutico: orientações preliminares. In: BRUGNERA JÚNIOR, A. et al. **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Santos, 2003. p. 13-15.

SANZ, M.; NEWMAN, M.G. Drogas individuais. In: NEWMAN, M.; KORNMAN, K. **O uso de antibióticos e antimicrobianos na prática odontológica**. São Paulo: Quintessence, 1997. p. 68-88.

SEGUCHI, K. et al. Critical parameters in the cytotoxicity of photodynamic therapy using a pulsed laser. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 17, n. 4, p. 265-271, Oct. 2002.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 289 p.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Candidíase. In: \_\_\_\_\_. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 265-274.

SIERÓN, A. et al. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of oral leukoplakia. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 32, n. 6, p. 330-336, July 2003.

SIERÓN, A. et al. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of malignant skin tumors. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, Yorkshire, v. 1, n. 4, p. 311-317, Dec. 2004.

SOUKOS, N.S. et al. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 42, n. 10, p. 2595-2601, Oct. 1998.

SOUZA, S.C. et al. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 83, n.1, p. 34-38, Apr. 2006.

SOUZA, V.M. Técnicas laboratoriais utilizadas em micologia médica. In: ZAITZ, C. et al. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998. p. 51-63.

STEFANAKI, I.M. et al. *In vivo* fluorescence kinetics and photodynamic therapy in condylomata acuminata. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 149, n. 5, p. 972-976, Nov. 2003.

STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v. 48, n. 1, p. 3-10, Feb. 1990.

STOCKERT, J.C. et al. Photodynamic damage to HeLa cell microtubules induced by thiazine dyes. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, Berlin, v. 39, n. 1-2, p. 167-169, Nov. 1996.

STRAKHOVSKAYA, M.G. et al. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. **Dokl. Biochem. Biophys.**, Moscow, v. 384, n. 1-6, p. 155-158, May 2002.

SUGDEN, J.K. Photochemistry of dyes and fluorochromes used in biology and medicine: some physicochemical background and current applications. **Biotech. Histochem.**, Oxford, v. 79, n. 2, p.71-90, Apr. 2004.

SUGIZAKI, M.F. et al. Prevalence and *in vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp isolated from clinical specimens in São Paulo, Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 15, n. 1, p. 16-18, Mar. 1998.

SULLIVAN, D.K. et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, Washington, v. 141, n.7, p. 1507-1521, July 1995.

TAKAHASHI, H. et al. A novel ATX-S10(Na) photodynamic therapy for human skin tumors and benign hyperproliferative skin. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v. 20, n. 5, p. 257-265, Oct. 2004.

TANIDA, T. et al. Influence of aging on candidal growth and adhesion regulatory agents in saliva. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 328-335, July 2001.

TEICHERT, M.C. et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 93, n. 2, p. 155-160, Feb. 2002.

TUITE, E.M.; KELLY, J.M. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 21, n. 2-3, p. 103-124, Dec. 1993.

TÚNER, J.; HODE, L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 16, n. 5, p. 245-248, Oct. 1998.

UEHLINGER, P. et al. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 54, n. 1, p. 72-80, Jan. 2000.

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. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 29, n. 2, p. 165-173, Aug. 2001.

USACHEVA, M.N.; TEICHERT, M.C.; BIEL, M.A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 71, n. 1-3, p. 87-98, Oct. 2003.

VICENTE, M.F. et al. Microbial natural products as a source of antifungals. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 15-32, Jan. 2003.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 42, n. 1, p. 13-28, July 1998.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K.B. Photosensitising agents-circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, Barking, v. 53, n. 2, p. 119-126, Mar. 2004.

WAINWRIGHT, M. et al. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 40, n. 3, p. 233-239, Oct. 1997.

WAINWRIGHT, M. et al. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 160, n. 2, p. 177-181, Mar. 1998.

WALSH, L.J. The current status of low laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 42, n. 4, p. 247-254, Aug. 1997.

WILDER-SMITH, P. The soft laser: therapeutic tool or popular placebo? **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 66, n. 6, p. 654-658, Dec. 1988.

WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using light-activated antimicrobial agent. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 37, n. 2, p. 377-381, Feb. 1996.

WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 22, n. 8, p. 354-357, Sept. 1993.

WOOD, S. et al. An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 50, n. 1, p. 1-7, May 1999.

WU, T. et al. Photodynamic action of amino substituted hypocrellins: EPR studies on the photogenerations of active oxygen and free radical species. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 57, n. 1, p. 14-21, Aug. 2000.

ZAITS C. Terapêutica das micoses. In: ZAITS, C. et al. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998. p. 407-412.

ZANIN, I.C.J.; GONÇALVES, R.B. Novas perspectivas do uso do laser terapêutico: ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica. In: BRUGNERA JÚNIOR, A. et al. **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Santos, 2003. p. 99-106.

ZEINA, B. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes *in vitro*. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 148, n. 2, p. 229-232, Feb. 2003.

ZEINA, B. et al. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes *in vitro*. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 146, n. 4, p. 568-573, Apr. 2002.

ZEINA, B. et al. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 144, n. 2, p. 274-278, Feb. 2001.



PUCRS

---

**APÊNDICES**

## APÊNDICE A

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### Título da Pesquisa: “EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) SOBRE CULTURAS DE *Candida* sp. E DE CÉLULAS EPITELIAIS: ESTUDO *IN VITRO*”

**I- Justificativa:** A candidose é uma infecção provocada pelo fungo *Cândida* sp., principalmente a espécie *C. albicans*. A maioria de nós possui esse fungo na boca sem provocar doença, mas, se houver algum fator local (por exemplo, o uso de próteses) ou alterações nas nossas defesas orgânicas (imunodepressão), a *Candida albicans* passará a ter a capacidade de provocar candidose bucal (doença).

**II- Objetivo:** Nesta pesquisa, pretende-se avaliar, em laboratório, a eficácia de um tratamento alternativo para a candidose.

**III- Procedimento de coleta:** O (A) Sr (a) será submetido(a) a um exame clínico de sua boca e, caso haja a presença de candidose, será coletado material da área atingida, com auxílio de um *swab* (espécie de cotonete) estéril e descartável.

**IV- Desconforto ou riscos:** O procedimento de coleta não trará prejuízos a sua boca, ao seu tratamento e a sua saúde. O (A) sr (a) sentirá apenas um leve toque na mucosa, sem dor.

**V- Ficha de coleta e privacidade:** Os dados referentes à sua identificação, saúde e tratamento serão anotados em uma ficha de coleta numerada e elaborada por mim, que ficará em meu poder, com a garantia de que haverá sigilo quanto a sua identidade. A coleta será identificada apenas por um número.

**VI- Benefícios:** Ao ser examinado(a), se for constatada presença clínica de candidose bucal, o (a) Sr (a) será submetido ao tratamento adequado.

**VII- Dúvidas:** Qualquer dúvida, não receie em perguntar tantas vezes quantas se façam necessário.

**VIII- Abandono:** caso não deseje participar dessa pesquisa, seu material não será coletado e em nada mudará o tratamento a que está se submetendo. Caso a coleta seja realizada e o (a) Sr (a) quiser desistir da pesquisa, poderá fazê-lo em qualquer momento.

Eu, \_\_\_\_\_, RG número \_\_\_\_\_, abaixo assinado, declaro que concordo em participar do Trabalho intitulado "EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) SOBRE CULTURAS DE *Candida* sp. E DE CÉLULAS EPITELIAIS: ESTUDO *IN VITRO*", Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido de que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa sem que isso implique prejuízo ao meu tratamento e que não preciso apresentar justificativas para isso. Sei também que todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos na pesquisa só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato de esses poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa. Concordo, também, em responder às questões contidas no formulário que me foi apresentado. Qualquer dúvida, contatarei Sandra Marinho, pelo telefone (51) 9835-3914 e Karen Cherubini, pelo telefone (51) 9981- 6987. Assim, concordo em participar da pesquisa em questão. Declaro ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Porto Alegre, \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente : \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_,  
por Sandra Marinho enquanto eu estava presente.

Nome da testemunha \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B

Tabela 1A: Identificação de *Candida* sp. por meio da formação de tubo germinativo (TG), microcultivo em agar arroz (AA), cultivo em CHROMAgar® *Candida* e PCR. Porto Alegre, 2006

Amostra	TG	AA	CHROMAgar®	Espécie provável	PCR
5A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
6A	-	-	Lilás	<i>C. krusei</i>	
7A	-	+	azulado fosco	<i>C. tropicalis</i>	
8A	+	-	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
12A	-	-	lilas	<i>C. krusei</i>	
13A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
15A	-	-	Lilás	<i>C. krusei</i>	
27B	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
28B	-	-	Lilás	<i>C. krusei</i>	
33A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
34A	-	+	azul fosco+branco	<i>C. tropicalis</i>	
35B	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
38A	-	-	lilas	<i>C. krusei</i>	
40B	-	-	Lilas	<i>C. krusei</i>	
41A	-	-	cinza-branco arroxeadado	Outra espécie	
42A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
43A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
44A	-	+	cinza azulado	<i>C. tropicalis</i>	
45A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
46A	-	+	cinza azulado	<i>C. tropicalis</i>	
47B	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
48A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
49A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
51A	-	-	Lilas	<i>C. krusei</i>	
55A	+	+	verde bandeira fosco	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
57A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
58A	-	-	Lilás	<i>C. krusei</i>	
59A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
60A	-	+	azul fosco	<i>C. tropicalis</i>	
61A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
62A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
63A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
64A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
66A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
67A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
68A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
69A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
71A	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i> 28367 ATCC	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i> 7987CBS	+	+	Verde	<i>C. dubliniensis</i>	
<i>C. krusei</i> 6250 ATCC	-	-	Lilás	<i>C. krusei</i>	

## APÊNDICE C

Tabela 2A: Provas de assimilação de carboidratos das espécies de *Candida* sp. Porto Alegre, 2006

AMOSTRA	CARBOIDRATO						
	Trealose	Xilose	Glicose	Galactose	Maltose	Lactose	Sacarose
5A	+	+	+	+	+	-	+
8A	+	+	+	+	+	-	+
13A	+	+	+	+	+	-	+
27B	+	+	+	+	+	-	+
33A	+	+	+	+	+	-	+
35B	+	+	+	+	+	-	+
42A	+	+	+	+	+	-	+
43A	+	+	+	+	+	-	+
45A	+	+	+	+	+	-	+
47B	+	+	+	+	+	-	+
48A	+	+	+	+	+	-	+
49A	+	+	+	+	+	-	+
55A	+	+	+	+	+	-	+
57A	+	+	+	+	+	-	+
59A	+	+	+	+	+	-	+
61A	+	+	+	+	+	-	+
62A	+	+	+	+	+	-	+
63A	+	+	+	+	+	-	+
64A	+	-	+	+	+	-	+
66A	+	+	+	+	+	-	+
67A	+	+	+	+	+	-	+
68A	+	+	+	+	+	-	+
69A	+	+	+	+	+	-	+
71A	+	+	+	+	+	-	+
7A	+	+	+	+	+	-	+
34A	+	+	+	+	+	-	+
44A	+	+	+	+	+	-	+
46A	+	+	+	+	+	-	+
60A	+	+	+	+	+	-	+
6A	-	-	+	-	-	-	-
12A	-	-	+	-	-	-	-
15A	-	-	+	-	-	-	-
28B	-	-	+	-	-	-	-
38A	-	-	+	-	-	-	-
40B	-	-	+	-	-	-	-
51A	-	-	+	-	-	-	-
58A	-	-	+	-	-	-	-
41A	+	+	+	+	+	-	+
<i>C. albicans</i> ATCC 28367	+	+	+	+	+	-	+



**PUCRS**

---

**ANEXOS**

## ANEXO A

### Aprovação do Projeto de Tese pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

Porto Alegre 18 de março de 2005.

#### O Projeto de: Tese

**Protocolado sob nº:** 0001/05

**Intitulado:** *Efeito da Terapia Fotodinâmica (PDT) sobre Culturas de Candida albicans e de Células Epiteliais: Estudo In Vitro.*

**do(a) aluno(a):** *Sandra Aparecida Marinho, Denise Cantarelli Machado, Sílvia Dias de Oliveira, Liliane Soares Yurgel*

**Programa de:** *Odontologia*

**do curso de:** *Estomatologia Clínica*

**Nível:** *Doutorado*

**Orientado pelo(a):** *Profa. Dra. Karen Cherubini*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 18 de março de 2005.

  
**Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

**ANEXO B****Aprovação do Projeto de Tese pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 343/05-CEP

Porto Alegre, 22 de abril de 2005.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida albicans* e de células epiteliais: estudo in vitro".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Délio José Kipper  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Dout Sandra Aparecida Marinho  
N/Universidade

## ANEXO C

### Relatório espectralradiométrico do Thera Lase



LABORATÓRIO DE IRRADIAÇÃO E RADIOMETRIA  
GRUPO DE FÍSICA DAS RADIAÇÕES – GFR  
NÚCLEO DE PESQUISA EM INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA  
CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM FÍSICA - PUCRS

1/3



Relatório Espectralradiométrico

Nº 0007IEI/05 - GFR

Data 13/09/05

### MEDIDA DE IRRADIÂNCIA ESPECTRAL E IRRADIÂNCIA

#### 1. REQUERENTE

**Razão Social/Nome:** Faculdade de Odontologia da PUCRS – Karen Cherubini  
**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 6  
**Cep:** 90619-900  
**Cidade:** Porto Alegre – RS  
**Telefone:** 3320-4318 / 91676979

#### 2. DESCRIÇÃO DOS ITENS ENSAIADOS <sup>[1]</sup>

A tabela 2.1 identifica as duas fontes lasers ensaiadas do seguinte equipamento:

- **Marca:** DMC.
- **Modelo:** Thera Laser.
- **Tensão:** 127 V.
- **Número de série:** TLSR0356.

2.1 Tabela de Identificação:

Código	Tipo	Potência	Obs.
0007IEI/05 – 01	Fonte Laser Vis	35 mW	---
0007IEI/05 – 02	Fonte Laser IR	100 mW	---

[1] Informações fornecidas pelo requerente.

#### 3. INSTRUMENTO DE MEDIDA

- Espectralradiômetro: Detecção espectral entre 250-1100 nm em intervalos de 1 nm, com largura de banda não excedendo a 2,5 nm.
- Certificado de Calibração nº 506074717 de 07/06/05.

#### 4. MÉTODO DE MEDIDA

Método realizado de acordo com o Procedimento Técnico Interno de Medida de Irradiância Espectral Difusa.

- Distância fonte - detector:  $(2,5 \pm 0,1)$  cm.
- Intervalos de medida: 400 - 800 nm e 750 - 1100 nm.



## Relatório Espectrorradiométrico

Nº 0007IEI/05 - GFR

Continuação

Data 13/09/05

### 5. RESULTADO DAS MEDIDAS <sup>[2]</sup>

Tabela com Valores da Irradiância Difusa e Espectros das fontes identificadas pelo código da Tabela 2.1.

#### 5.1 Tabela de Irradiância Difusa e Comprimento de Onda:

Código	Comprimento de Onda	Irradiância Difusa
0007IEI/05 – 01	684 nm	1,57 Wm <sup>-2</sup>
0007IEI/05 – 02	828 nm	5,38 Wm <sup>-2</sup>

5.2 Anexo I: Espectros de Irradiância Espectral Difusa x Comprimento de Onda, para as fontes de radiação identificada pelo código da Tabela 2.1.

[2] Observações:

- Incerteza das medidas: 251-400 nm : ± 4.0 %; 400-900nm: ± 3.3 %; 900-1000: ± 5.1%; 1000-1100: ± 8.0%.
- Para as medidas de irradiância de barreiras (filtros, óculos, tecidos, entre outros) será acrescida ao código da fonte empregada a seguinte identificação: letra A para a primeira barreira, letra B para segunda e assim, sucessivamente.
- Esse relatório espectrorradiométrico é válido exclusivamente para as amostras identificadas na Tabela 2.1, não sendo extensivo a quaisquer lotes, mesmo que similares.
- O relatório espectrorradiométrico pode ser reproduzido somente com autorização por escrito do GFR.

Esclarecimento:

O presente Relatório Espectrorradiométrico nº 0007IEI/05 – GFR está inserido na rede de convênio-cooperação desse Laboratório com o solicitante desse serviço. Como consequência toda divulgação dessas medidas deverá ser acompanhada com a descrição: “Resultados concedidos pelo Grupo de Física das Radiações (GFR-PUCRS)”.

Outrossim, informamos que o valor dessa prestação de serviço corresponde ao montante de R\$ 400,00 e está isenta de pagamento.

Porto Alegre, 13 de setembro de 2005.

**Dra. M. R. Rizzatti**  
Coordenadora do GFR-PUCRS



## ANEXO I (3/3)

