



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**TERAPIA FOTODINÂMICA EM INFECÇÃO INDUZIDA POR
Pseudomonas aeruginosa MULTIRRESISTENTE. ESTUDO *IN VIVO***

Maria Cristina Eiko Hashimoto

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientadora: Prof. Dra. Martha Simões Ribeiro

São Paulo

2010

Dedicatória

Dedico este trabalho em especial ao meu filho Vicente, meu companheirinho de todas as horas, por ser meu maior incentivador, pela sua compreensão e pelo seu amor que me faz superar toda e qualquer adversidade.

Aos meus pais, por proporcionarem condições para que eu chegasse até aqui, pelo amor recebido, e principalmente por nunca deixarem de acreditar em mim, dedico esta pequena obra.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela proteção, pela minha vida e pela oportunidade de realização de todos os meus sonhos.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, pelas oportunidades de crescimento, pelo carinho, pela paciência e amizade e por todos os momentos ao longo desse trajeto, o meu mais sincero agradecimento.

À minha irmã Maria Célia, pelo incentivo e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu irmão Júlio, pela solidariedade.

Ao meu grande amigo e mestre Prof. Dr. Eduardo Makoto Adachi, a quem sempre terei como exemplo de caráter, expresso não só minha gratidão, mas também minha profunda admiração.

Ao Renato e à Ilka, pela amizade e pelo auxílio durante todas as fases deste trabalho, e, por serem grandes companheiros de jornada, muito obrigada.

À Silvia, por ceder o LED para a utilização neste trabalho e pelas discussões e sugestões que foram essenciais ao desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Lília Coronato Courrol, pelo preparo e discussões a respeito da hipocrelina.

Ao Daniel, pelo auxílio nos experimentos com a hipocrelina.

À Dra. Cristiane Padron França, da Universidade Nove de Julho – UNINOVE - SP, pela histologia das queimaduras.

À Dra. Simone do Instituto de Infectologia Emílio Ribas por ceder as amostras de *P. aeruginosa*.

À Profa. Dra. Silvana Cai, do Laboratório de Microbiologia Oral do ICB-USP, pelo uso do freezer para armazenamento das cepas de *P. aeruginosa* e por manter sempre aberta a porta de seu laboratório, obrigada pela confiança e carinho.

À Neide, e todos os funcionários do biotério do IPEN, pela sua eficiência e boa vontade.

À Cláudia, da Biotecnologia do IPEN, pelos ensinamentos sobre as coletas sanguíneas.

À Dani, China, Aécio, Aguinaldo, Daiane, Antônio, Priscila, Alessandra, Melissa, Claudinha, Patrícia, Marcelo, Marcos, Moisés, Cacau, Carol, Juca, Thiago e todos os amigos do CLA, que me acompanharam ao longo destes anos, obrigada pelo carinho e amizade recebidos.

Ao IPEN e ao CLA, pela estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pela montagem do laboratório utilizado.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao biotério do IPEN, pelos animais utilizados neste trabalho.

A todos os professores do CLA, pela ajuda e colaboração.

A todos os funcionários do CLA, pela atenção e carinho recebidos.

A todos os funcionários da Divisão de Ensino do IPEN.

E por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização deste trabalho, muito obrigada!

“Se a princípio a ideia não é absurda, então não há esperança para ela”.

Albert Einstein

*“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido
ficar crianças toda a vida”.*

Albert Einstein

TERAPIA FOTODINÂMICA EM INFECÇÃO INDUZIDA POR *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTE. ESTUDO *IN VIVO*

Maria Cristina Eiko Hashimoto

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar se a PDT pode reduzir infecção local em queimaduras de 3º grau infectadas por *P. aeruginosa* MR em camundongos e prevenir bacteremia. *In vitro*, a PDT foi realizada com azul de metileno (AM) associado a laser de $\lambda=660$ nm em *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PaATCC) e multi-resistente (PaMR). HB:La⁺³ foi irradiada com LED azul e vermelho em cepas de PaMR. Verapamil® (Vp) foi testado como inibidor de bombas de efluxo associado tanto a HB:La⁺³ como a AM. *In vivo*, foi realizado teste de letalidade para a HB:La⁺³ e desenvolvido um modelo de infecção em queimaduras de 3º grau em camundongos onde a PDT foi realizada em uma e duas sessões. O número de UFC/mL de PaMR após a PDT foram avaliadas localmente e na circulação sanguínea, e os animais foram observados quanto ao tempo de sobrevivência. *In vitro*, ocorreu redução de um log de PaATCC após 8 J/cm² e de PaMR após 32 J/cm². HB:La⁺³ reduziu 5 logs de PaMR após 24 J/cm². Não houve diferença quando Vp foi associado à HB:La⁺³, porém quando associado a AM a redução foi de 2 logs após 16 J/cm². *In vivo*, o modelo de queimadura e infecção proposto foi capaz de induzir infecção letal em 24 horas. O teste de letalidade para HB:La⁺³ não demonstrou efeito letal em camundongos. PDT reduziu 2 logs de PaMR localmente, retardou bacteremia e manteve a carga bacteriana sanguínea 2 logs menos comparados ao controle. A PDT, em uma e duas sessões, aumentou o tempo de sobrevivência dos animais em 24 horas. Conclusão: *In vitro*, PaMR necessita de uma taxa de fluência maior para ser eliminada do que PaATCC; houve maior redução de PaMR utilizando HB:La⁺³ quando comparado a AM. Não houve diferença quando Vp foi associado à HB:La⁺³, mas a redução de PaMR foi maior com AM associado à Verapamil. *In vivo*, o modelo de queimadura e infecção induziu infecção letal; HB:La⁺³ não causou efeito letal; PDT reduziu PaMR localmente, retardou bacteremia, manteve a carga bacteriana sanguínea mais baixa e aumentou a sobrevivência dos camundongos. Não houve diferença quando a PDT foi realizada em uma ou duas sessões.

**PHOTODYNAMIC THERAPY IN INDUCED INFECTION BY MULTI-RESISTANT
Pseudomonas aeruginosa. IN VIVO STUDY**

Maria Cristina Eiko Hashimoto

ABSTRACT

The aim of this study was verify if PDT can reduce a local infection in third degree burned mice infected with multi-resistant *P. aeruginosa* (MRPa) and avoid bacteremia. In the first part of the study, PDT was performed *in vitro*, on *P. aeruginosa* ATCC 27853 (ATCCPa) and multi-resistant *P. aeruginosa* (MRPa), using methylene blue (MB) associated to $\lambda=660\text{nm}$ laser. Hypocrellin B:lanthanum (HB:La⁺³) was associated to blue and red LED on MRPa and Verapamil[®] was tested as efflux pump inhibitor associated both to HB:La⁺³ and AM on MRPa. In the *in vivo* study, lethality test for HB:La⁺³ was performed and a model infection for third degree burned mice was developed where PDT was performed using single and double session. Number of viable cells of *P. aeruginosa* MR after PDT was assessed both in burn wounds and in bloodstream, as well as animals were observed for survival. *In vitro*, ATCCPa reduction was 1 log after 8J/cm² and MRPa reduction was 1 log after 32J/cm². MRPa reduction with HB:La⁺³ and with HB:La⁺³/Verapamil was 5 logs after 24J/cm². MRPa reduction with AM/Verapamil was 1 log after 16J/cm² and 2 logs after 64 J/cm². *In vivo*, the infection model induced death in mice within 24h and HB:La⁺³ did not cause lethal effect in mice. PDT reduced 2 logs of MRPa in burn wounds, delayed bacteremia and kept bacterial levels in bloodstream 2 logs lower compared to control group. Mice PDT-treated survived 24h more than control group and there was not any difference between single or double-PDT. Conclusion: *in vitro*, MRPa needs more fluence rate for killing by PDT than ATCCPa; there was more MRPa killing using HB:La⁺³ compared to MB; there was not difference when HB:La⁺³ was associated to Verapamil but AM associated to Verapamil increased MRPa killing. *In vivo*, the infection model proposed induced death in mice in 24h; HB:La⁺³ did not cause lethal effect in mice; PDT reduced MRPa in burn wounds, delayed bacteremia, kept lower bacterial levels in bloodstream and increased the mice survival time in 24h. There was not any significant difference when single or double PDT was performed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Jablonski modificado.....	26
Figura 2: Fórmula estrutural do AM.....	28
Figura 3: Espectro de absorção óptica do AM.....	29
Figura 4 - Hipocrelina B (C ₃₀ H ₂₄ O ₉).....	30
Figura 5 - Hipocrelina B associada a lantânio (HB:La ⁺³).....	30
Figura 6 - Espectro de absorção de HB e HB:La ⁺³ (Toffoli et al., 2009).....	31
Figura 7 - <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	35
Figura 8 - <i>P. aeruginosa</i> MR.....	35
Figura 9 - Irradiação das amostras em placas de 96 poços.....	37
Figura 10 - Representação esquemática da diluição seriada de 10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	38
Figura 11- Diluição seriada de 10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	39
Figura 12- Plaqueamento das amostras após diluição seriada.....	39
Figura 13-a - Irradiação com LED de 460±20nm.....	40
Figura 13-b- Irradiação com LED de 645±10nm.....	40
Figura 14- Dispositivo para confecção da queimadura em contato com a pele do animal.....	44
Figura 15 - Aspecto da lesão imediatamente após a queimadura.....	45
Figura 16 - Inoculação de <i>P. aeruginosa</i> MR após a queimadura de 3º. grau.....	45
Figura 17- Inoculação subcutânea da HB:La ⁺³ na área da queimadura de 3º. grau.....	46
Figura 18 - Irradiação da lesão com LED de λ=470±20nm.....	47
Figura 19 - Irradiação da lesão com LED de λ=645±10nm.....	47
Figura 20 - Valores médios ± DP de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 e <i>P. aeruginosa</i> MR após PDT com AM.....	51
Figura 21 - Valores médios ± DP de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR, após PDT com HB:La ⁺³	52
Figura 22 - Valores médios ± DP de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR após PDT com HB:La ⁺³ e AM.....	53
Figura 23 - Valores médios ± DP de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR após PDT com AM e AM associado a Verapamil.....	54

Figura 24 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR após PDT com HB:La ⁺³ e HB:La ⁺³ /Verapamil.....	55
Figura 25 – Pele de camundongo com aspectos histológicos de normalidade....	56
Figura 26 – Aspectos histológicos de uma queimadura de 2º. grau em pele de camundongos com destruição total de epiderme (e) e parte da derme (d) e perda de definição das fibras colágenas (fc).....	57
Figura 27 – Queimadura de 3º. grau com destruição total de epiderme (e) e derme (d) e a presença de áreas de hialinização (h).	58
Figura 28 - Curva de sobrevivência de camundongos após inoculação de <i>P. aeruginosa</i> MR.....	59
Figura 29 - Curva de sobrevivência de camundongos após o teste de letalidade para HB:La ⁺³	60
Figura 30 - Valores médios \pm DP do número de UFC/g de <i>P. aeruginosa</i> MR em camundongos com queimaduras infectadas após PDT em uma sessão.....	61
Figura 31 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após PDT em sessão única..	64
Figura 32 - Curva de sobrevivência de camundongos após PDT em sessão única.....	65
Figura 33 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após duas sessões de PDT .	68
Figura 34 - Curva de sobrevivência de camundongos após duas sessões de PDT.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após PDT em sessão única..	63
Tabela 2 – Tempos de sobrevivência dos camundongos após PDT em sessão única.	66
Tabela 3 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após duas sessões de PDT .	67
Tabela 4– Tempos de sobrevivência dos camundongos após duas sessões de PDT.....	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação das queimaduras de acordo com a profundidade	19
Quadro 2: Antimicrobianos testados em <i>P. aeruginosa</i> MR.....	36
Quadro 3: Divisão dos grupos do experimento com AM associado a laser em <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 e <i>P. aeruginosa</i> MR	38
Quadro 4: Divisão dos grupos do experimento HB:La ⁺³ associada a LED de $\lambda=460\text{nm}\pm 20\text{nm}$ e de $\lambda=645\text{nm}\pm 10\text{nm}$ em <i>P. aeruginosa</i> MR.....	41
Quadro 5: Divisão dos grupos do experimento com AM associado a Verapamil (Vp) em <i>P. aeruginosa</i> MR.....	42
Quadro 6: Divisão dos grupos do experimento com HB:La ⁺³ associada a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em <i>P. aeruginosa</i> MR	43
Quadro 7: Divisão dos grupos do experimento de indução da infecção.	46
Quadro 8: Divisão dos grupos para teste de letalidade para HB:La ⁺³	47
Quadro 9: Divisão dos grupos para determinação do número de UFC/g após PDT em sessão única em queimadura infectada com <i>P. aeruginosa</i> MR.....	48
Quadro 10: Divisão dos grupos para determinação do número de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR na circulação sanguínea após PDT em uma sessão.	49
Quadro 11: Divisão dos grupos para determinação do número de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> MR na circulação sanguínea após PDT em duas sessões.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PDT	Terapia fotodinâmica (<i>Photodynamic Therapy</i>)
HB	Hipocrelina B
AM	azul de metileno
TBO	azul de toluidina
La ⁺³	íon lantânio
HB:La ⁺³	hipocrelina B:lantânio
PaMR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente
PaATCC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
PBS	solução salina fosfatada (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
TSA	ágar triptona de soja (<i>Tryptic Soy Agar</i>)
TSB	caldo triptona de soja (<i>Tryptic Soy Broth</i>)
SPS	Poliatenol Sulfonato de Sódio
LED	Diodo emissor de luz
Fs	Fotossensibilizadores
Vp	Verapamil
λ	comprimento de onda
I	intensidade
UFC/mL	unidades formadoras de colônia por mililitro
UFC/g	unidades formadoras de colônia por grama
μ L	micro litro
μ M	micro molar
mg	miligrama
g	grama
mM	milimolar
MR	multirresistente
MDR	multi-droga resistente
LPS	lipopolissacáride
TPI	tempo de pré-irradiação
J/cm ²	joule por centímetro quadrado

mW/cm ²	miliwatt por centímetro quadrado
mW	miliwatt
nm	nanometro
DP	desvio padrão
SC	superfície corporal

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1. Queimaduras.....	19
3.2. Bacteremia e sepse.....	21
3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3.4. Terapia fotodinâmica.....	25
3.4.1. Conceito.....	25
3.4.2. Histórico.....	27
3.5. Fotossensibilizadores.....	28
3.5.1. Azul de metileno (AM).....	28
3.5.2. Hipocrelina B: lantânio (HB:La ⁺³).....	29
3.6. Fontes de luz.....	31
3.7. PDT em <i>P. aeruginosa</i>	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Estudo <i>in vitro</i>	35
4.1.1. Azul de metileno associado a laser de $\lambda=660\text{nm}$ em duas cepas distintas de <i>P. aeruginosa</i>	35
4.1.2. HB:La ⁺³ associada a LED de $\lambda= 460\text{nm}\pm 20\text{nm}$ e $\lambda= 645\text{nm}\pm 10\text{nm}$ em <i>P. aeruginosa</i> MR.....	39
4.1.3. AM associado a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em cepas de <i>P. aeruginosa</i> MR.....	41

4.1.4. HB:La ⁺³ associada a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em cepas de <i>P. aeruginosa</i> MR.....	42
4.2. Estudo <i>in vivo</i>	43
4.2.1. Modelo de queimadura de 3º. grau	43
4.2.2. Indução da infecção.....	45
4.2.3. Teste de letalidade para HB:La ⁺³	46
4.2.4. Terapia fotodinâmica em única sessão em queimadura infectada e contagem bacteriana local.....	48
4.2.5. Terapia fotodinâmica em única sessão em queimadura infectada e contagem bacteriana na circulação sanguínea.....	49
4.2.6. Análise do tempo de sobrevivência após uma sessão de PDT	50
4.2.7. Terapia fotodinâmica em duas sessões em queimadura infectada e contagem bacteriana na circulação sanguínea.....	50
4.2.8. Análise do tempo de sobrevivência após duas sessões de PDT.....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1. Estudo <i>in vitro</i>	51
5.1.1. Azul de metileno associado a laser de $\lambda=660\text{nm}$ em duas cepas distintas de <i>P. aeruginosa</i>	51
5.1.2. HB:La ⁺³ associada à LED de $\lambda=460\pm 20\text{nm}$ e LED de $\lambda=645\pm 10\text{nm}$ em cepas de <i>P. aeruginosa</i> MR.....	52
5.1.3. AM associado a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em cepas de <i>P. aeruginosa</i> MR.....	54
5.1.4. HB:La ⁺³ associada a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em cepas de <i>P. aeruginosa</i> MR.....	55
5.2. Estudo <i>in vivo</i>	56
5.2.1. Modelo de queimadura de 3º. grau.....	56
5.2.2. Indução da infecção.....	59
5.2.3. Teste de letalidade para HB:La ⁺³	60
5.2.4. Terapia fotodinâmica em única sessão em queimadura infectada e contagem bacteriana local.....	61
5.2.5. Terapia fotodinâmica em única sessão em queimadura infectada e contagem bacteriana na circulação sanguínea.....	62
5.2.6. Análise do tempo de sobrevivência após PDT em uma sessão.....	65

5.2.7. Terapia fotodinâmica em duas sessões em queimadura infectada e contagem bacteriana na circulação sanguínea.....	67
5.2.8. Análise do tempo de sobrevivência após duas sessões de PDT.....	69
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	76
ANEXOS.....	77
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A resistência microbiana a antibioticoterapia é assunto de preocupação mundial e infecções causadas por patógenos oportunistas lideram a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunossuprimidos e imunocomprometidos (SUÁREZ *et al.*, 2009).

Pacientes com queimaduras severas se enquadram nesta categoria por apresentar um quadro de imunossupressão e maior susceptibilidade a infecções devido à destruição das barreiras cutâneas que servem como proteção à invasão de agentes externos. Também, proteínas desnaturadas presentes no local da queimadura proporcionam um ambiente nutricional favorável ao desenvolvimento microbiano (KUMA *et al.*, 2002 e CHURCH *et al.*, 2006).

Complicações causadas por acidentes com queimaduras merecem atenção especial, uma vez que estas são consideradas uma das formas bastante comuns de trauma. Segundo dados da OMS (Organização Mundial de Saúde), ocupam o segundo lugar entre as injúrias físicas decorrentes de acidentes (SUÁREZ *et al.*, 2009).

Indivíduos com sérias injúrias termiais necessitam de hospitalização imediata, uma vez que a integridade da pele é importante para a manutenção da homeostase de fluidos corpóreos e termo-regulação. Dentro de ambientes hospitalares, principalmente nos centros de tratamento de queimados, é comum a presença de cepas antibiótico-resistentes. VOSTRUGINA *et al.*, em 2006, demonstrou que microrganismos isolados em centros de tratamento de queimados mostraram um maior aumento à resistência a antibióticos. Dessa forma, uma infecção local se torna potencialmente perigosa e muito difícil de ser controlada, uma vez que acomete rapidamente a circulação sanguínea do paciente fazendo com que esta bacteremia atinja níveis muito elevados e evolua facilmente para sepse, levando estes pacientes a óbito.

Pseudomonas aeruginosa é considerado um dos principais patógenos que representam ameaça à vida em ambientes hospitalares (PRUITT *et al.*, 1998 e CUNHA *et al.*, 2001). Recente estudo mostrou que infecções causadas por *P. aeruginosa* são em sua maioria adquiridas em ambientes hospitalares e podem

evoluir rapidamente para septicemia, podendo ter como consequência a morte do paciente (SUÁREZ *et al.*, 2009).

Infecções superficiais como as queimaduras são particularmente tratáveis através da terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*), devido à imediata acessibilidade ao local tanto pelo fotossensibilizador (Fs) quanto pela fonte de luz. A terapia fotodinâmica tem sido sugerida como uma alternativa para o tratamento de infecções locais, uma vez que estudos demonstram que microrganismos, tais como bactérias, fungos e vírus, podem ser inativados através da PDT (PERLIN *et al.*, 1987; WILSON *et al.*, 1992; ZEINA *et al.*, 2001; PRATES *et al.*, 2007; GARCEZ *et al.*, 2007; GARCEZ *et al.*, 2008; ZOLFAGHARI *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010; CHABRIER-ROSELLÓ *et al.*, 2010).

Trabalhos na literatura reportam a susceptibilidade de espécies antibiótico-resistentes à PDT (WAINWRIGHT *et al.*, 1998; SONCIN *et al.*, 2002; ASHKENAZI *et al.*, 2003). Além disso, repetidas fotossensibilizações de células microbianas não induzem a uma seleção de cepas resistentes (LAURO *et al.*, 2002; LUKSIENE *et al.*, 2009, MAISCH, 2009). Neste contexto, a utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana como tratamento de infecções locais em pacientes com queimaduras severas poderia ser extremamente interessante, considerando que a redução microbiana no local da lesão pode prevenir a invasão de microrganismos oportunistas na circulação sanguínea, de forma a evitar a septicemia e, conseqüentemente, o óbito destes pacientes.

2. OBJETIVOS

Gerais:

- Desenvolver um modelo de queimadura de 3°. grau em camundongos;
- Desenvolver um modelo de infecção local e sistêmica por *P. aeruginosa* MR em camundongos com queimaduras de 3°. grau;
- Investigar a ação da terapia fotodinâmica no modelo de infecção proposto.

Específicos:

In vitro:

- Investigar a ação da terapia fotodinâmica com AM associado a laser de $\lambda=660\text{nm}$ em duas cepas distintas de *P. aeruginosa*: ATTC 27853 (PaATCC) e multirresistente (PaMR);
- Investigar a redução de PaMR *in vitro* após terapia fotodinâmica com HB:La⁺³ associada a LED de $\lambda=460\text{nm}\pm 20\text{nm}$ e $\lambda=645\text{nm}\pm 10\text{nm}$;
- Investigar a ação de um inibidor da atividade de bombas de efluxo associado a AM e HB:La⁺³ em cepas de PaMR;

In vivo:

- Realizar teste de letalidade para HB:La⁺³;
- Investigar a redução de PaMR localmente após PDT;
- Investigar a PDT em sessão única e em duas sessões na prevenção de infecção sistêmica em camundongos;
- Avaliar o tempo de sobrevivência dos camundongos após a PDT.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Queimaduras

As queimaduras são lesões na pele, provocadas geralmente pelo calor ou pelo frio, mas que podem também ser provocadas pela eletricidade ou por contato com certos produtos químicos, por radiações, ou até por fricção. A queimadura compromete a integridade funcional da pele, responsável pela manutenção da homeostase hidroeletrolítica, controle da temperatura interna, lubrificação da superfície corporal e principalmente barreira externa contra infecções. Portanto, a magnitude do comprometimento dessas funções depende da extensão e profundidade da queimadura (SHERIDAN, 2003).

De acordo com a profundidade, as queimaduras podem ser classificadas de acordo com o quadro 1:

Quadro 1: Classificação das queimaduras de acordo com a profundidade

Lesão de 1º. Grau	Atinge a epiderme e não provoca alterações na hemodinâmica. Clinicamente caracteriza-se por eritema e dor local sem a presença de bolhas
Lesão de 2º. Grau	Atinge tanto a derme quanto a epiderme. A característica mais marcante em humanos é a presença de bolhas
Lesão de 3º. Grau	Atinge todas as camadas da pele e pode atingir também outros tecidos como músculos e ossos. A lesão característica apresenta-se com aspecto duro, inelástico, esbranquiçado ou marmóreo, perda de sensibilidade no local, presença de vasos trombosados e áreas de hialinização

(CONNOR-BALLARD, 2009)

No entanto, muitas vezes a diferenciação entre os graus de lesão pode ser difícil e o diagnóstico de certeza só pode ser realizado através de histopatologia do tecido.

A injúria térmica provoca no organismo uma resposta local que se manifesta por necrose de coagulação tecidual e progressiva trombose dos vasos

adjacentes num período de 12 a 48 horas. A ferida da queimadura a princípio é estéril, porém o tecido necrótico rapidamente pode ser colonizado por bactérias, evoluindo rapidamente para uma bacteremia (LEÃO, 1999).

Nas grandes queimaduras, além da resposta local, o dano térmico desencadeia ainda uma reação sistêmica do organismo, em consequência da liberação de mediadores pelo tecido lesado. Nas queimaduras extensas, o sistema imune é incapaz de delimitar a infecção, que, sistematizando-se, pode dificultar a sobrevivência nesses casos. (HETTIARATCHY *et al.*, 2004).

Os riscos gerais do paciente queimado dependem fundamentalmente da extensão da área queimada, sendo a repercussão sistêmica proporcional à área afetada. Essa área é calculada em porcentagem da superfície corporal total (SC), sendo consideradas apenas as áreas queimadas com profundidade de segundo e terceiro grau.

A queimadura compromete a integridade funcional da pele, responsável pela homeostase hidroeletrolítica, controle da temperatura interna, flexibilidade e lubrificação da superfície corporal. Portanto, a magnitude do comprometimento dessas funções depende da extensão e profundidade da queimadura (SHERIDAN, 2003).

Para uma avaliação mais precisa da extensão da queimadura em humanos, existe um método denominado regra dos nove de Wallace, ou seja:

- cabeça e pescoço 9%
- membro superior 9% (x2)
- quadrante do tronco 9% (x4)
- coxa 9 (x2)
- perna e pé 9% (x2)
- genitais e períneo 1%

Total= 100%

As queimaduras de segundo e terceiro grau que acometem acima de 15% da superfície corpórea (SC) em adultos, e 10% em crianças são consideradas graves e requerem hospitalização imediata.

O grande risco para estes pacientes é que grande parte do corpo fica exposta ao ambiente hospitalar devido à destruição da barreira cutânea. Todo o local da queimadura torna-se um ambiente propício à colonização bacteriana pela

presença de proteínas desnaturadas e esta infecção local quando não controlada, se alastra e atinge a circulação sanguínea. O quadro de imunossupressão que o paciente queimado geralmente apresenta contribui para que esta bacteremia atinja níveis muito elevados e evolua rapidamente para sepse, podendo levar estes pacientes a óbito.

3.2. Bacteremia e Sepsis

A bacteremia é o principal meio pelo qual as infecções locais se espalham para órgãos distantes, conhecido como dispersão hematogênica. Esta geralmente é temporária, devido a uma resposta vigorosa do sistema imune quando a bactéria é detectada no sangue. A bacteremia, freqüentemente exige uma resposta vigorosa do sistema imune e os diversos acontecimentos relacionados a esta resposta como febre, calafrios ou hipotensão são conhecidos como sepse. No caso de distúrbios mais severos na temperatura, respiração, batimento cardíaco ou contagem de células brancas do sangue, a resposta é caracterizada como síndrome séptica, choque séptico, e pode resultar em síndrome de disfunção múltipla de órgãos (TAVARES e MARINHO, 2007).

A bacteremia é um critério de diagnóstico para a sepse, representando grande perigo para pacientes queimados devido ao aumento de mediadores inflamatórios, que por sua vez, pode predispor ao desenvolvimento de falência múltipla dos órgãos que é a principal causa de mortalidade em pacientes queimados (KUMA *et al.*, 2002; FITZWATER *et al.*, 2003).

A septicemia é uma infecção geral grave do organismo por germes patogênicos e se refere a presença de bactérias ou suas toxinas na circulação sanguínea e pode ser definida como o conjunto de manifestações patológicas devido à invasão, por via sanguínea, do organismo por germes patogênicos provenientes de um foco infeccioso. A sepse ou septicemia é uma urgência infecciosa e muitas vezes não se pode aguardar os resultados dos exames laboratoriais para se iniciar a terapia antimicrobiana.

Os macrófagos, que são células do sistema imune do hospedeiro, se ligam à membrana externa das bactérias compostas principalmente por lipopolissacarídeos (LPS), e uma vez ligados desencadeiam a ativação do sistema imune. Com a ativação do sistema imune, são produzidos fatores ativadores de plaquetas e citocinas antiinflamatórias. A sepse leva à formação de

substâncias pró-coagulantes e à diminuição de substâncias anticoagulantes. Com isso há a formação de microtrombos, podendo desencadear coagulação intravascular disseminada (CIVD), hemorragias e disfunção em múltiplos órgãos (TAVARES e MARINHO, 2007).

A descoberta dos antibióticos modernos permitiu num primeiro instante, o controle eficaz dessas infecções. No entanto, devido à velocidade com que estes microrganismos sofrem mutações e desenvolvem mecanismos de resistência a esses fármacos, tais infecções em organismos enfraquecidos, debilitados ou no caso de defesas imunitárias insuficientes se tornam potencialmente perigosas.

Apesar dos avanços no que diz respeito ao tratamento de queimados, a principal causa de mortalidade desses pacientes ainda é a infecção oportunista e suas conseqüências posteriores. Sendo assim, o tratamento de tais enfermidades ainda é considerado um desafio na prática clínica (FITZWATER *et al.*, 2003).

3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é atualmente considerada um dos principais patógenos encontrados em ambientes hospitalares que representam risco potencial à vida de pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos, como é o caso de pacientes com queimaduras severas, além de ser responsável por outros tipos de infecções secundárias de difícil tratamento como infecções do trato urinário e respiratório, dermatites, infecções de tecidos moles, ósseas e articulares, gastrintestinais e uma ampla variedade de infecções sistêmicas, podendo levar a bacteremia septicemia e morte (CUNHA *et al.*, 2001).

Infecções por *P. aeruginosa*, quando acomete a circulação sanguínea do paciente representa altos índices de mortalidade, além de altos custos para o seu tratamento (MICEK *et al.*, 2005).

Recente estudo mostrou que infecções sanguíneas causadas por *P. aeruginosa* são em sua maioria adquiridas em ambientes hospitalares e evoluem rapidamente para septicemia (EDWARD-JONES e GREENWOOD, 2003).

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa medindo aproximadamente 0,5µm a 0,8µm por 1,5µm a 3µm. O teste conhecido como coloração de Gram, classifica as bactérias em Gram-positivas ou Gram-negativas, de acordo com a composição e estrutura da parede celular. As bactérias Gram-positivas apresentam na composição desta parede, proteínas, lipídios, ácidos teicóicos e

peptiteoglicanos, que são encontrados em maior quantidade nas bactérias Gram-positivas, proporcionando maior rigidez e espessura da parede celular. As bactérias Gram-negativas possuem parede celular menos espessa, porém apresentam uma membrana externa composta por fosfolipídeos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS) que recobre a camada de peptiteoglicano, compondo então uma dupla membrana (SALTON e KIM, 1996). A baixa permeabilidade desta membrana constitui uma barreira efetiva contra produtos tóxicos à célula provenientes do ambiente externo, em particular os antibióticos e também os F_s (NIKAIDO, 1989).

P. aeruginosa possui a capacidade de crescer em ambiente pobre em nutrientes, o que lhe confere uma característica de grande resistência. A temperatura ideal para crescimento é de 37°C, mas pode crescer em temperaturas acima de 42°C. Possui dois pigmentos importantes, com variações de acordo com o fenótipo bacteriano que são a pioverdina, capaz de exibir fluorescência no ultravioleta e a piocianina, que é produzida quando há escassez de ferro no meio e é responsável pela tonalidade azul-esverdeada da colônia bacteriana (FITZWATER *et al.*, 2003).

Para iniciar a infecção, *P. aeruginosa* necessita primeiramente de uma quebra na primeira linha de defesa, ou seja, no caso das queimaduras de 3º grau, a destruição da derme e epiderme são a porta de entrada para esses microrganismos oportunistas. Desvios da normalidade cutânea, por exemplo, por traumas ou cirurgias ou ainda a ruptura do equilíbrio da flora bacteriana normal da mucosa pelo uso de antibióticos de amplo espectro também podem favorecer a entrada destes microrganismos na circulação sanguínea do paciente, assim como alterações do mecanismo imunológico ou defeitos no mecanismo de limpeza da mucosa podem contribuir para a instalação de uma infecção.

No caso de uma queimadura, o primeiro passo para a infecção é a colonização do epitélio alterado. A aderência de *P. aeruginosa* ao epitélio alterado segundo ALLEN *et al*, 2005 é mediado pelo pili tipo 4, uma estrutura que confere tanto aderência como motilidade à esta bactéria. Os flagelos, que são primariamente responsáveis pela motilidade, também atuam como adesinas às células epiteliais, favorecendo então o início da infecção (VAN DELDEN e IGLEWSKI, 1998).

A piocianina, presente na maioria das cepas de *P. aeruginosa*, reduz a capacidade de defesa do hospedeiro, uma vez que a sua produção leva a diminuição de neutrófilos, e dificulta também o processo de cicatrização das queimaduras, por ser potente inibidor da proliferação de fibroblastos (ALLEN *et al.*, 2005; MULLER *et al.*, 2009). Portanto, a presença de *P. aeruginosa* nas queimaduras significa um risco maior de bacteremia ao paciente queimado, já que a presença destes fatores de virulência interfere no fechamento da ferida, favorecendo a entrada de microrganismos na circulação sanguínea.

Após a colonização, *P. aeruginosa* produz produtos extracelulares que podem causar extensos danos aos tecidos, invasão circulatória e disseminação sistêmica, entre elas a exotoxina A, elastases e protease alcalina.

Exotoxina A é produzida pela maioria das cepas de *P. aeruginosa* que causam infecções clínicas, sendo a responsável pela destruição dos tecidos, invasão bacteriana e inibição da atividade dos macrófagos.

As enzimas elastases LasA/LasB e protease alcalina desempenham importante papel durante a fase aguda da infecção pois possuem a habilidade de destruir a proteína elastina, um importante componente de vasos sanguíneos responsável pela resiliência. A elastase LasB, além de degradar elastina, degrada também fibrina e colágeno, dificultando a formação de nova derme e epiderme (NICAS e IGLEWSKI, 1985).

Algumas cepas de *P. aeruginosa* desenvolveram um mecanismo de resistência denominado bombas de efluxo MDR (multi-droga resistente), que são reconhecidos como um dos principais mecanismos de resistência microbiana a muitas classes de antibióticos e que consistem de proteínas localizadas na membrana externa dessas bactérias que bombeiam substâncias para fora das células, incluindo os antibióticos e também os Fs. No entanto, a expressão destas bombas varia de cepa para cepa, mesmo se tratando de uma mesma espécie bacteriana (TEGOS *et al.*, 2006; TEGOS *et al.*, 2008, TSENG *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, *P. aeruginosa* tem ocupado o lugar de maior patógeno oportunista com papel importante em infecções que representam ameaça à vida em ambientes hospitalares. Diversidade metabólica, capacidade de transporte e adaptabilidade regulatória permite à *P. aeruginosa* predominar e competir com outros microrganismos em vários nichos ecológicos (PRUITT JR, 1998 e CUNHA *et al.*, 2001). Além da adaptação proporcionada pelo processo

regulatório, adaptações às mudanças ambientais têm facilitado o aparecimento de subpopulações. Quando introduzido a uma nova condição, o genótipo ancestral rapidamente se diversifica, produzindo uma gama de genótipos morfológicamente distintos com um ganho funcional, que são mantidos por seleção. Este é basicamente o princípio da resistência bacteriana (RAINEY e TRAVISANO, 1998; SPIERS *et al.*, 2002).

A terapia fotodinâmica surge então nesse cenário como uma promissora alternativa de tratamento.

3.4. Terapia fotodinâmica

3.4.1. Conceito

A terapia fotodinâmica consiste em uma modalidade de tratamento que requer o uso de um fotossensibilizador (Fs) capaz de ser absorvido pela célula alvo e de uma fonte de luz de comprimento de onda (λ) ressonante com o agente fotossensibilizador. Estes fotossensibilizadores absorvem a energia luminosa e são levados a um estado excitado, que por sua vez interagem com o oxigênio do meio, e espécies altamente reativas de oxigênio, como radicais livres e oxigênio singleto são produzidos resultando em injúria e morte celular (DOUGHERTY *et al.*, 1998; KESSEL *et al.*, 2004; OLGIBY, 2006).

As espécies reativas de oxigênio podem ser responsáveis pela indução de reações em cadeia de componentes celulares, bem como pela oxidação de uma ampla variedade de biomoléculas, levando dessa forma à morte da célula alvo.

O efeito fotodinâmico no qual se baseia a PDT ocorre quando a molécula do fotossensibilizador absorve um fóton, que por sua vez sai de seu estado fundamental e vai para o estado excitado singleto. Neste momento, pode ocorrer a perda de energia por processos de fluorescência ou conversão interna do estado excitado para o estado fundamental e/ou ocorrer o processo de cruzamento entre sistemas, levando a molécula para o estado excitado tripleto. Uma vez no estado tripleto, a molécula pode ainda perder energia excedente via emissão fosforescente (SIBATA *et al.*, 2000). O fotossensibilizador em seu estado tripleto excitado pode interagir com o meio através de dois processos distintos denominados de mecanismo tipo I e tipo II. No mecanismo tipo I, as reações de transferência de elétrons ocorrem entre o Fs e o substrato, ou seja, o meio biológico, o solvente ou ainda outra molécula do Fs, formando então espécies

altamente reativas e radicais livres. No mecanismo tipo II, ocorre transferência de energia do Fs ao oxigênio no estado fundamental, havendo a formação de oxigênio singleto. O oxigênio neste estado é quimicamente muito ativo e pode induzir várias reações em cadeia com componentes da célula tais como DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, tendo como resultado a morte da célula (OSCHNER *et al.*, 1997; HULTÉN *et al.*, 1999; MOOR *et al.*, 2000). Ambos os mecanismos levam ao estresse oxidativo, originando lesões na célula alvo. Esses processos podem ser mais facilmente compreendidos através do diagrama de níveis de energia também conhecido como Diagrama de Jablonski (Figura 1).

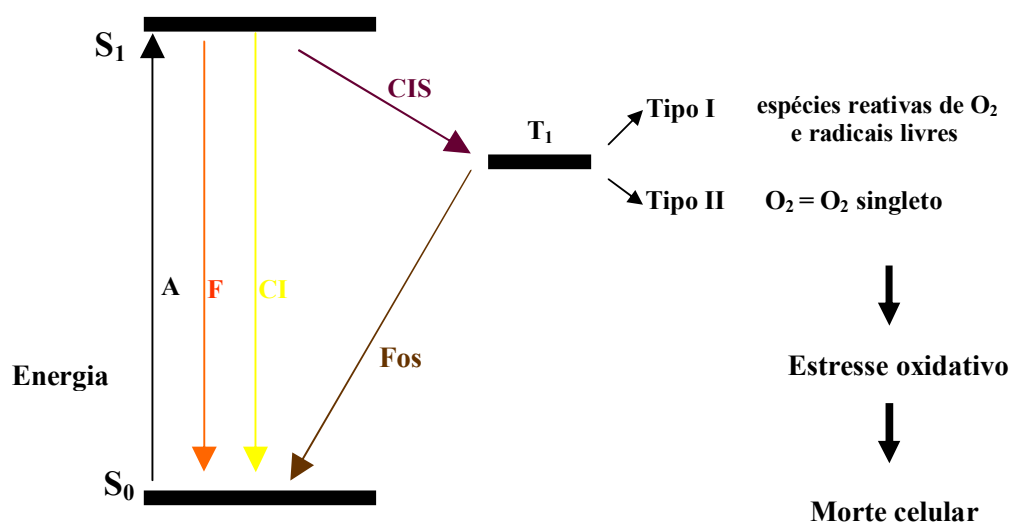


Figura 1 - Diagrama de Jablonski modificado. Processos fotoquímicos sofridos pelos Fs. S_0 corresponde ao estado singleto fundamental, S_1 ao estado excitado singleto, A à absorção, F à fluorescência, CI à conversão interna, CIS ao cruzamento intersistemas, Fos à fosforescência e T_1 ao estado tripleto do Fs. (Modificado de JOSEFSEN e BOYLE, 2008).

Todas essas reações dependem dos respectivos rendimentos quânticos para que ocorra cada uma delas, ou seja, dependem da quantidade relativa de reação obtida por fóton absorvido pela molécula. Dessa forma, o rendimento quântico para o estado tripleto depende da velocidade dos processos de CIS (cruzamento intersistemas), CI (conversão interna) e F (fluorescência), sendo estas dependentes da molécula e do meio em que se encontram (SIMPLÍCIO *et al.*, 2002).

3.4.2. Histórico

Existem relatos na literatura da utilização de cerca de 4000 anos atrás, de povos egípcios que associavam ingestão de plantas com a exposição à luz solar para tratamentos de doenças como o vitiligo (STERNBERG *et al.*, 1998; DANIEL *et al.*, 1991).

Em 1900, Oscar Raab em experimento com o organismo unicelular paramécio, descobriu acidentalmente que se colocasse esse organismo injetado com corante em contato com a luz solar, a célula morria em seis minutos, não ocorrendo o mesmo quando o organismo era colocado em um recipiente escuro. Em outro experimento, utilizando corantes em placas de Petri contendo protozoários, observou-se que, quando os experimentos eram realizados durante o dia, ocorria morte destes organismos, o que não ocorria quando eram realizados durante a noite. A partir daí, o autor provou a conexão entre a ativação desses corantes pela luz com resultados terapêuticos.

Em 1903, Niels Finsen descobriu que o tratamento com luz poderia controlar as manifestações na pele da tuberculose, uma doença muito comum na época (EDELSON *et al.*, 1988).

Apesar destes relatos, a PDT propriamente dita começou a ser utilizada apenas a partir dos anos setenta, com as investigações sobre o uso dos derivados da hematoporfirina (HpD) associados a lasers de baixa intensidade para tratamento de neoplasias. Na década de 70, com o advento do Photofrin[®], um derivado hematoporfirínico, a PDT foi reconhecida como técnica de tratamento de câncer (VENEZIO *et al.*, 1985; DOUGHERTY *et al.*, 1993). Porém, somente em meados dos anos 90 é que o Photofrin foi aperfeiçoado e aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration – EUA*) para uso clínico como Fs (DOUGHERTY

et al., 1998), sendo posteriormente aprovado em países como França, Canadá, Alemanha, Japão, Holanda e Brasil (SIMPLÍCIO *et al.*, 2002).

3.5. Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores dentro da terapia fotodinâmica são as ferramentas que permitem a transferência da energia luminosa em um tipo de reação química, cujos produtos finais resultam numa rápida cito e vaso-citotoxicidade que são condições indispensáveis para a terapia fotodinâmica (KONAN *et al.*, 2002).

Para que um composto seja considerado um bom fotossensibilizador deve apresentar algumas propriedades como alto coeficiente de absorção na região do espectro de excitação da luz, estado tripleto de apropriada energia, alto tempo de vida do estado tripleto e alta fotoestabilidade (DE ROSA e CRUTCHLEY, 2002).

Deve-se levar em consideração também uma baixa toxicidade, eficiência fotoquímica, seletividade pela célula alvo e estabilidade biológica (WAINWRIGHT *et al.*, 1998).

3.5.1. Azul de metileno (AM)

O azul de metileno é um Fs pertencente à família das fenotiazinas, com uso bastante estabelecido na literatura (WAKAYAMA *et al.*, 1980; ITO, 1983; MENEZES *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1993; WILSON *et al.*, 1995; WAINWRIGHT *et al.*, 1996; WAINWRIGHT *et al.*, 1997).

O azul de metileno é um composto heteroaromático tricíclico (Figura 2) que, em baixas concentrações não produzem ação citotóxica e nem danos às células humanas como queratinócitos e fibroblastos (WAINWRIGHT *et al.*, 1998). Possui bandas de absorção entre $\lambda=550\text{nm}$ e 670nm (Figura 3).

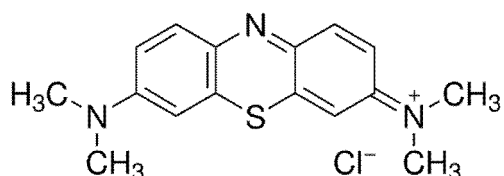


Figura 2: Fórmula estrutural do AM

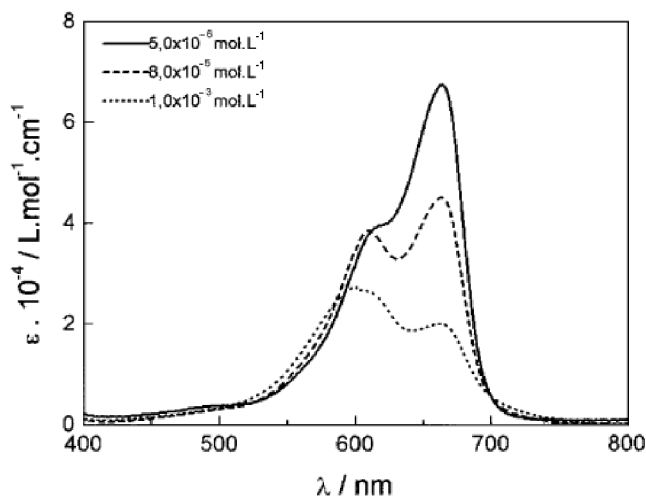


Figura 3: Espectro de absorção óptica do AM

3.5.2. Hipocrelina B: lantânio (HB:La⁺³)

Hipocrelina B (HB) é um fotossensibilizador de última geração, oriundo de um pigmento nativo extraído do fungo *Hypocrella bambusae*, freqüentemente encontrado em florestas asiáticas, principalmente em países como a China e Sri Lanka. Este composto tem sido alvo de estudos nas duas últimas décadas devido à possibilidade de uso como agente fotossensibilizador. Possui fortes bandas de absorção em $\lambda=460\text{nm}$, $\lambda=546\text{nm}$ e $\lambda=584\text{nm}$ (MA *et al.*, 2001; DIWU *et al.*, 1992).

As hipocrelinas são usadas como agentes medicinais populares para tratamento de doenças de pele, particularmente em países da Ásia, tendo sido relatados sua aplicação também em casos de artrite reumatóide e doenças gástricas (ALI *et al.*, 2002; CHALOUPKA *et al.*, 1998).

A primeira evidência da possibilidade de utilização da hipocrelina como agente fotossensibilizador se deu no final dos anos 50 através de um caso onde se deu a administração oral de hipocrelina e observou-se sensibilidade da pele à luz visível. Posteriormente, por volta dos anos 80, foi observado que a fotossensibilização ocorria apenas em ambientes ricos em oxigênio. A partir daí começaram as investigações sobre a possibilidade de seu uso como agente fotossensibilizador (MEI *et al.*, 1958; WAN *et al.*, 1981).

A utilização da hipocrelina é conhecida na medicina popular chinesa por vários séculos, visto que apresenta baixa toxicidade. São de fácil preparo, de

purificação simples e alta farmacocinética, além de apresentar bandas de absorção no visível de $\lambda=400\text{nm}$ até aproximadamente $\lambda=600\text{nm}$ (DIWU *et al.*, 1992; HALDER *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2005).

Quando associada a íons lantânio, ocorre aumento de absorção e deslocamento da banda para a região do vermelho (TOFFOLI *et al.*, 2008). Portanto, complexos de HB com íons metálicos possui propriedades ópticas e fotodinâmicas mais notáveis. A figura 4 mostra a estrutura química da Hipocrelina B (HB).

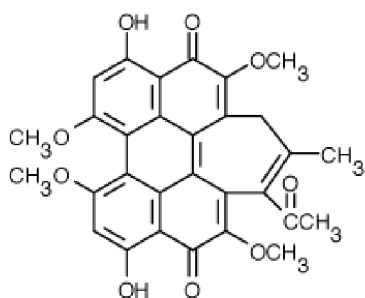


Figura 4 - Hipocrelina B ($\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_9$)

A figura 5 ilustra a estrutura química da Hipocrelina B associada a íons lantânio ($\text{HB}:\text{La}^{+3}$).

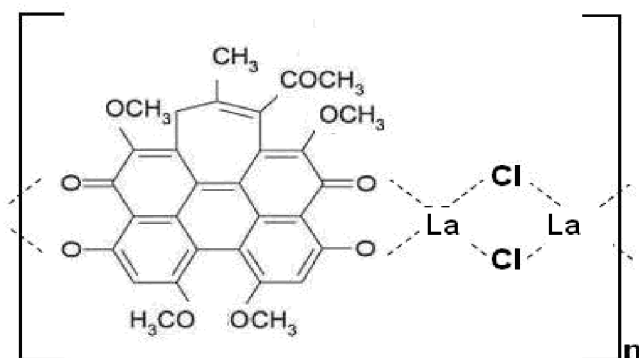


Figura 5 - Hipocrelina B associada a lantânio ($\text{HB}:\text{La}^{+3}$)

A figura 6 mostra o espectro de absorção óptica de soluções de HB e HB:La⁺³. Pode ser observado que HB:La⁺³ apresenta uma banda de absorção muito maior no visível, indo de $\lambda= 400\text{nm}$ a $\lambda= 650\text{nm}$.

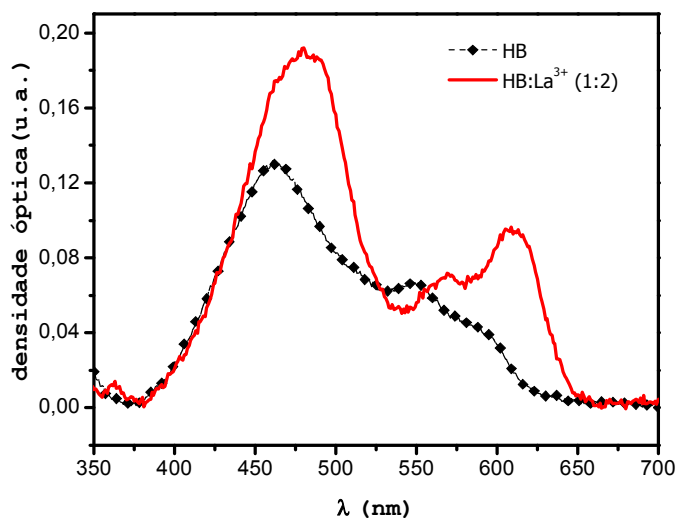


Figura 6 - Espectro de absorção de HB e HB:La⁺³ (Toffoli *et al.*, 2009)

Recente estudo com o microorganismo *Candida albicans* mostrou que apenas 10 μM de HB:La⁺³ seguidos de 10s de irradiação foram necessários para eliminar totalmente células em cultura (TOFFOLI *et al.*, 2009).

3.6. Fontes de luz

As primeiras fontes de luz utilizadas em terapia fotodinâmica foram lâmpadas convencionais. Estas apresentavam um forte componente térmico, além de serem não coerentes e policromáticas (ACKROYD *et al.*, 2001).

Lasers se tornaram fontes padrão para aplicações em PDT, por seu caráter monocromático, facilidade de acoplamento de fibras ópticas, potência controlada de saída e variedade de comprimentos de onda.

Os diodos emissores de luz (LEDs) passaram a ser utilizados, uma vez que estes também apresentam potências adequadas, e também estão disponíveis em vários comprimentos de onda. Somado a seu baixo custo, tornou-se uma alternativa bastante viável.

O diodo emissor de luz consiste num dispositivo com meio ativo semicondutor composto de várias camadas de semicondutores dopados adequadamente e que emitem luz quando uma determinada tensão é aplicada entre as camadas (CRAFORD *et al.*, 2001).

Ao contrário de uma fonte de luz com alta intensidade monocromática, o LED é capaz de produzir uma alta intensidade sobre uma banda espectral mais abrangente (BRANCALEON e MOSELEY, 2002).

3.7. PDT em *P. aeruginosa*

A PDT antimicrobiana tem sido assunto de interesse na última década, principalmente devido ao fato de que microrganismos patogênicos se tornam resistentes a fármacos antimicrobianos a uma velocidade cada vez mais crescente, fazendo com que essas infecções sejam muito difíceis de serem controladas.

A ação antimicrobiana da PDT consiste basicamente na aplicação de um Fs na região a ser tratada, seguida de intervalo de tempo necessário para o acúmulo deste Fs no alvo de interesse, e posterior iluminação por uma fonte de luz de comprimento de onda ressonante à banda de absorção do Fs. A partir daí, através da excitação do Fs, ocorrem reações fotofísicoquímicas que serão responsáveis pela morte da célula microbiana.

Diferenças na ação bactericida de cada Fs são atribuídas, entre outros fatores, a variações estruturais da membrana externa de cada microrganismo.

Em estudo sobre redução de *P. aeruginosa in vitro*, foi observada uma maior dificuldade de eliminação deste microrganismo pela PDT. Os autores sugeriram que essa dificuldade se deve principalmente à constituição da membrana externa dessas bactérias, o que dificulta a difusão do fotossensibilizador para o interior da célula. Segundo os autores, diferentes efeitos na interação da membrana de lipopolissacáride (LPS) com o Fs podem variar de acordo com a natureza química e com locais para ligações disponíveis na superfície dessa membrana, que por sua vez é determinado pela composição e conformação molecular (USACHEVA *et al.*, 2003).

Em outro estudo sobre concentrações de Fs, foi demonstrado que a eficiência fotodinâmica varia conforme o gênero e a espécie do microrganismo, existindo diferenças nos valores de concentração do Fs e eficiência fotodinâmica,

e que existe um platô de eficiência fotodinâmica onde mesmo aumentando a concentração de Fs, nenhum efeito fotodinâmico adicional pode ser observado. Para *P. aeruginosa* ATCC 27853, o valor desse platô quando utilizado o Fs azul de metileno (AM) foi de 150 μ M-56 μ g/mL, sendo necessária uma concentração maior de Fs quando comparado com outras espécies bacterianas (USACHEVA *et al.*, 2001).

SHARMA *et al.* em 2005, obtiveram uma redução de *P. aeruginosa* de 3 logs utilizando azul de orto toluidina (TBO), um fotossensibilizador também pertencente à família das fenotiazinas, na concentração de 150 μ M com 36 J/cm².

Outros estudos *in vitro* demonstraram o potencial bactericida da terapia fotodinâmica sobre *P. aeruginosa* e também a inativação de fatores de virulência como a fosfolipase C e proteases, que são responsáveis principalmente pela destruição da integridade do tecido e degradação do sistema imune do hospedeiro (MINNOCK *et al.*, 1996; USACHEVA *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2005). A destruição destes fatores de virulência bacterianos pela PDT é importante, já que a produção destas enzimas impede o processo de cicatrização.

RESKA *et al.*, em 2006 demonstrou a efetividade da PDT na inativação da piocianina, um importante componente de *P. aeruginosa* e responsável por inibir a produção de fibroblastos, importantes na reconstituição da derme do hospedeiro.

Em 2006, Tegos e Hamblin, observaram que *P. aeruginosa* é mais difícil de ser eliminada pela PDT, mesmo comparada a outras espécies Gram-negativas como a *E. coli*. Neste estudo, foi necessário utilizar uma concentração maior de Fs para *P. aeruginosa*. Os autores atribuíram o fato à presença de bombas de efluxo MDRs. Segundo os autores, os Fs fenotiazínicos como o AM e TBO podem agir como substratos dessas bombas fazendo com que maiores concentrações sejam necessárias para que haja o efeito fotodinâmico (TEGOS e HAMBLIN, 2006).

DONELLY *et al.*, em 2007, realizaram um estudo com cepas de *P. aeruginosa* com o intuito de avaliar se a PDT poderia eliminar estas cepas tanto em formas planctônicas como em biofilmes, em presença de muco produzido artificialmente. É conhecido que uma das características deste microrganismo é produzir muco, o que dificulta a erradicação deste microrganismo pela dificuldade de difusão de fármacos no local. A redução deste microrganismo foi bastante

significativa tanto na forma planctônica como em biofilme. No ensaio realizado na presença de muco, porém, a taxa de redução bacteriana caiu para 80% (DONELLY *et al.*, 2007).

Tseng *et al.*, em 2009, demonstraram efeitos similares em quatro cepas distintas de *P. aeruginosa*, três multirresistentes e uma susceptível a antibióticos, após a PDT. Apesar dos ensaios sobre acúmulo do Fs utilizado neste estudo indicarem que o TBO, utilizado neste estudo, pode ser um substrato de bombas de efluxo MDRs, a PDT produziu atividade bactericida similar em 60 cepas multirresistentes com e sem o fenótipo de bombas de efluxo MDRs e em 19 cepas susceptíveis a antibióticos, mesmo com baixas concentrações de TBO, entre 5 e 10 μM .

Estudo em feridas cirúrgicas infectadas de camundongos, permitiu a visualização em tempo real de uma região infectada após a terapia fotodinâmica. O enfoque deste trabalho foi apresentar um modelo de monitoramento óptico de lesões infectadas utilizando um gene bioluminescente conjugado à *P. aeruginosa* ATCC 19660 (HAMBLIN *et al.*, 2002; HAMBLIN *et al.*, 2003). Os autores observaram perda total de luminescência, ou seja, redução bacteriana total no local da lesão utilizando o Fs denominado conjugado e₆.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Estudo *in vitro*

4.1.1. Azul de metileno associado a laser de $\lambda=660\text{nm}$ em duas cepas distintas de *P. aeruginosa*

Bactéria: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PaATCC) (Figura 7) e *P. aeruginosa* multirresistente (PaMR) (Figura 8).

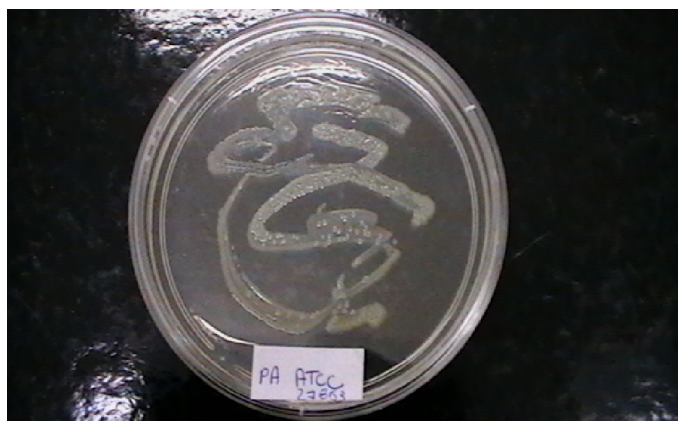


Figura 7 - *P. aeruginosa* ATCC 27853

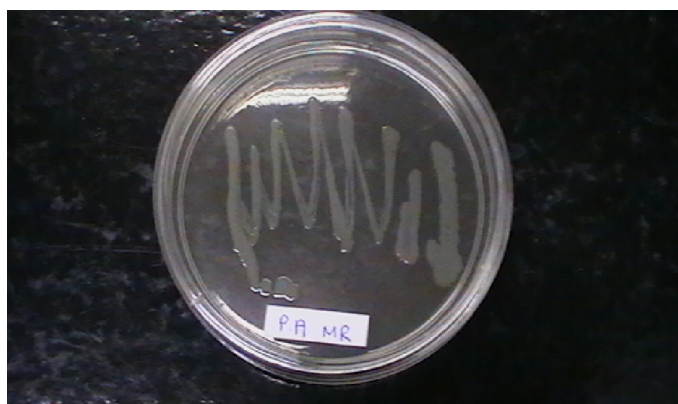


Figura 8 - *P. aeruginosa* MR

Fotossensibilizador (Fs): azul de metileno (AM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

Fonte de luz: laser de diodo de $\lambda=660\text{nm}$ (Twin Laser, MMOptics, São Carlos, Brasil), com potência de 40mW, e $I=133\text{ mW/cm}^2$.

Tempo de pré-irradiação: 30 s.

As amostras bacterianas utilizadas no estudo foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Infectologia do Hospital Emílio Ribas e foram mantidas em estoque em caldo de triptone soja (TSB) com 15% de glicerol à temperatura de -70°C .

A cepa multirresistente foi coletada de cateter intravascular de um paciente com septicemia e isolada segundo padrões do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) e os testes de susceptibilidade a antibióticos indicaram resistência a doze tipos de antimicrobianos (quadro 2).

Quadro 2 - Antimicrobianos testados em *P. aeruginosa* MR

ANTIMICROBIANO	S	R	I	NT
1 – Amicacina				NT
2 – Aztreonam			I	
3 – Cefepime		R		
4 – Cefotaxima		R		
5 – Ceftriaxona		R		
6 – Ceftazidima		R		
7 – Ciprofloxacina		R		
8 – Cloranfenicol		R		
9 – Gentamicina		R		
10 – Imipenem		R		
11 – Meropenem		R		
12 – Netilmicina				NT
13 – Piperacilina + Tazobactam		R		
14 – Polimixina B*	S			
15-Sulfametoxazol+ Trimetoprim		R		
16 –Ticarcilina + Ac. Clavulânico		R		
17 – Tobramicina				NT

S – Sensível

R – Resistente

I – Intermediário

NT – Não Testado

Para a confecção das suspensões iniciais, as amostras foram trazidas à temperatura ambiente, semeadas em ágar triptona de soja (TSA), e levadas à estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 24h.

As amostras das duas cepas bacterianas foram coletadas e colocadas em solução salina fosfatada (PBS) para serem submetidas à leitura em espectrofotômetro com calibração de transmitância de 68% em $\lambda=620\text{nm}$, que correspondeu a uma concentração bacteriana de 3×10^8 UFC/mL. O número de UFC/mL das suspensões iniciais de ambas as cepas foram confirmadas através da cultura de amostras coletadas das suspensões calibradas em espectrofotômetro.

O azul de metileno (AM) foi utilizado na concentração de $150\mu\text{M}$ e armazenado no escuro até o momento do experimento. O tempo de pré-irradiação foi de 30s.

As irradiações foram realizadas em placas de 96 poços (Figura 9), um grupo de cada vez, por $8\text{J}/\text{cm}^2$, $16\text{J}/\text{cm}^2$, $32\text{J}/\text{cm}^2$, $48\text{J}/\text{cm}^2$ e $64\text{J}/\text{cm}^2$ e as amostras foram processadas imediatamente após os testes.

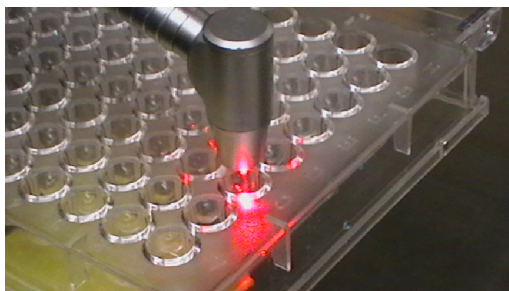


Figura 9 - Irradiação das amostras em placas de 96 poços

Os grupos foram divididos conforme mostra o quadro 3:

Quadro 3: Divisão dos grupos do experimento com AM associado a laser em *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *P. aeruginosa* MR

ATCC+	Somente PaATCC 27853;
MR+	Somente PaMR;
ATCC+AM-L+	PaATCC 27853 + laser (8min/64J/cm ²);
MR+AM-L+	PaMR + laser (8min/64J/cm ²);
ATCC+AM+L-	PaATCC 27853+ AM (8min30s) sem iluminação;
MR+AM+L-	PaMR + AM (8min30s) sem iluminação;
PDT ATCC 1	PaATCC 27853 + AM + laser (1min/8J/cm ²);
PDT ATCC 2	PaATCC 27853 + AM + laser (2min/16J/cm ²);
PDT ATCC 4	PaATCC 27853+ AM + laser (4min/32J/cm ²);
PDT ATCC 6	PaATCC 27853+ AM + laser (6min/48J/cm ²);
PDT ATCC 8	PaATCC 27853+ AM + laser (8min/64J/cm ²);
PDT MR 1	PaMR+ AM + laser (1min/8J/cm ²);
PDT MR 2	PaMR+ AM + laser (2min/16J/cm ²);
PDT MR 4	PaMR + AM + laser (4min/32J/cm ²);
PDT MR 6	PaMR+ AM + laser (6min/48J/cm ²);
PDT MR 8	PaMR+ AM + laser (8min/64J/cm ²).

Após a PDT, as amostras de todos os grupos passaram por diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-5} (Figura 10 e 11) e $10\mu\text{L}$ de cada diluição foram retirados e semeados em placas de Petri contendo TSA (Figura 12), e levadas à estufa de crescimento bacteriano por 12h para posterior contagem de UFC/mL. Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente com o teste ANOVA e diferenças entre resultados foram analisados com teste Tukey ($p < 0,05$).

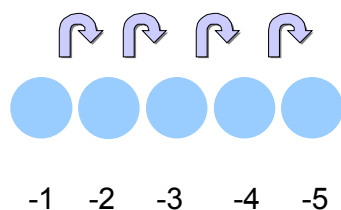


Figura 10 - Representação esquemática da diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-5}

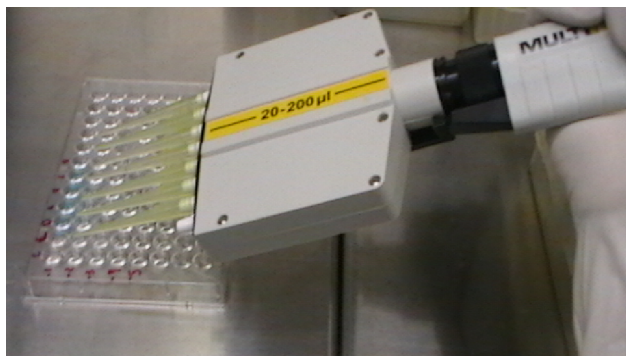


Figura 11: Diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-5}

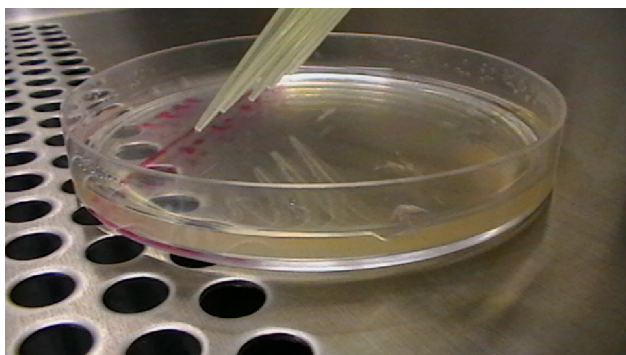


Figura 12: Plaqueamento das amostras após diluição seriada

4.1.2. HB:La⁺³ associada a LED de $\lambda=460\text{nm} \pm 20\text{nm}$ e $\lambda=645\text{nm} \pm 10\text{nm}$ em *P. aeruginosa* MR

Com a finalidade de reproduzir uma situação considerada mais crítica, todos os ensaios seguintes foram realizados apenas com a cepa MR.

Bactéria: *P. aeruginosa* multirresistente (PaMR).

Fotossensibilizador (Fs): HB:La⁺³.

Fonte de luz: LED de $\lambda=460\text{nm} \pm 20\text{nm}$ (Eccofibras/ São Carlos - Brazil) e LED de $\lambda=645\text{nm} \pm 10\text{nm}$ (Protótipo LED MMOptics, São Carlos, Brazil), ambos com potência de 225mW, potência efetiva de 60mW e $I=200 \text{ mW/cm}^2$.

Tempo de pré-irradiação (TPI): 30s.

O tempo de pré-irradiação foi de 30s, considerando que a cepa estudada possa possuir o mecanismo de bombas de efluxo citado anteriormente, e bombeie o Fs para fora da célula com um tempo de pré-irradiação mais longo.

O Fs utilizado foi obtido com a colaboração da Prof^a. Lília Coronato Courrol, da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP - SP. A solução inicial de 1mM em etanol foi diluída em PBS para se chegar à concentração de 10 μ M.

As amostras permaneceram em contato com a HB:La⁺³ por até 8min30s sem iluminação para verificar a toxicidade inerente ao Fs e também foram irradiadas com taxa de fluência de 96J/cm² na ausência da HB:La⁺³ para análise do efeito da irradiação sobre a viabilidade do microrganismo.

As irradiações tanto com LED azul (Figura 13-a) quanto com LED vermelho (Figura 13-b) foram realizadas em placas de 96 poços, após o tempo de pré-irradiação (TPI) de 30s, um grupo de cada vez, por 12J/cm², 24J/cm², 48J/cm², 72J/cm² e 96J/cm².

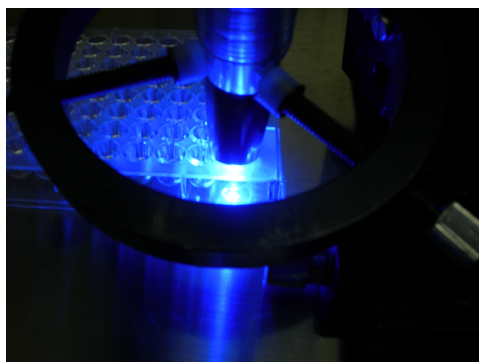


Figura 13-a - Irradiação com LED de 460 \pm 20nm

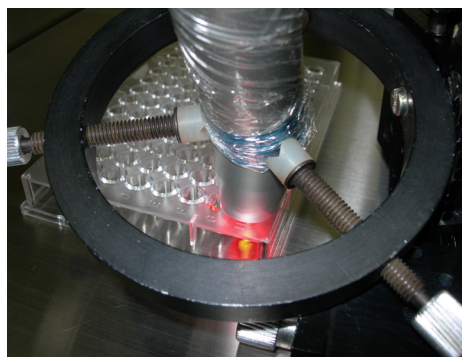


Figura 13-b: Irradiação com LED de 645 \pm 10nm

Os grupos foram divididos conforme mostra o quadro 4:

Quadro 4: Divisão dos grupos do experimento HB:La⁺³ associada a LED de $\lambda=460\text{nm}\pm 20\text{nm}$ e de $\lambda=645\text{nm}\pm 10\text{nm}$ em *P. aeruginosa* MR

PaMR+	Somente PaMR;
PaMR+HB+	PaMR + HB:La ⁺³ (8min30s) sem iluminação;
PaMR+HB-A+	PaMR + LED azul (8min/ 96J/cm ²);
PaMR+ HB-V+	PaMR + LED vermelho (8min/96J/cm ²);
PDT A1	PaMR + HB:La ⁺³ + LED azul (1min/12J/cm ²);
PDT A2	PaMR + HB:La ⁺³ + LED azul (2min/24J/cm ²);
PDT A4	PaMR + HB:La ⁺³ + LED azul (4min/48J/cm ²);
PDT A6	PaMR + HB:La ⁺³ + LED azul (6min/72J/cm ²);
PDT A8	PaMR + HB:La ⁺³ + LED azul (8min/96J/cm ²);
PDT V1	PaMR + HB:La ⁺³ + LED vermelho (1min/12J/cm ²);
PDT V2	PaMR + HB:La ⁺³ + LED vermelho (2min/24J/cm ²);
PDT V4	PaMR + HB:La ⁺³ + LED vermelho (4min/48J/cm ²);
PDT V6	PaMR + HB:La ⁺³ + LED vermelho (6min/72J/cm ²);
PDT V8	PaMR + HB:La ⁺³ + LED vermelho (8min/96J/cm ²).

As amostras foram processadas imediatamente após o tratamento e todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata.

Após cada tratamento, foi realizada a diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-5} e 10 μ L de cada diluição foram retirados e semeados em placa contendo TSA e levados à estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 12h para posterior contagem de UFC/mL.

Os resultados microbiológicos foram analisados estatisticamente com teste ANOVA e diferenças entre resultados foram analisados com teste Tukey ($p<0,05$).

4.1.3. AM associado a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em cepas de *P. aeruginosa* MR

Bactéria: *P. aeruginosa* MR (PaMR).

Fotossensibilizador: AM (150 μ M) associado a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp).

Fonte de luz: laser de $\lambda = 660\text{nm}$, com potência de 40mW , e $I = 133\text{mW/cm}^2$.

Tempo de pré-irradiação (TPI): 5min.

Dez- μL de Verapamil (10mg/mL) foi adicionado a $980\mu\text{L}$ da cultura bacteriana e permaneceu em contato com a mesma por 30min. Após esse tempo, foi adicionado $10\mu\text{L}$ de AM à cultura bacteriana, e após cinco minutos foi realizada a irradiação das amostras em placas de 96 poços, um grupo de cada vez, por 16J/cm^2 , 32J/cm^2 , 48J/cm^2 e 64J/cm^2 .

Os grupos foram então divididos conforme mostra o quadro 5:

Quadro 5: Divisão dos grupos do experimento com AM associado a Verapamil (Vp) em *P. aeruginosa* MR

PaMR+	Somente PaMR;
PaMR+ AMVp+	PaMR com AM/Vp sem irradiação (13min);
PaMR+AMVp-L+	PaMR + laser ($8\text{min}/64\text{J/cm}^2$);
PDT Vp 2	PaMR + AM/Vp + laser ($2\text{min}/16\text{J/cm}^2$);
PDT Vp 4	PaMR + AM/Vp + laser ($4\text{min}/32\text{J/cm}^2$);
PDT Vp 6	PaMR + AM/Vp + laser ($6\text{min}/48\text{J/cm}^2$);
PDT Vp 8	PaMR + AM/Vp + laser ($8\text{min}/64\text{J/cm}^2$).

Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata e o processamento das amostras foi realizado como no ensaio anterior.

Os resultados microbiológicos foram analisados estatisticamente com teste ANOVA e diferenças entre resultados foram analisados com teste Tukey ($p < 0,05$).

4.1.4. HB:La⁺³ associada a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em cepas de *P. aeruginosa* MR

Bactéria: *P. aeruginosa* MR (PaMR).

Fotossensibilizador: HB:La⁺³ ($10\mu\text{M}$) associada a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) (Anexo1).

Fonte de luz: LED de $\lambda = 645 \pm 10\text{nm}$, potência de 225mW , potência efetiva de 60mW , $I = 200\text{mW/cm}^2$.

Tempo de pré-irradiação (TPI): 5min.

Dez- μL de Verapamil (10mg/mL) foi adicionado a $980\mu\text{L}$ da cultura bacteriana e permaneceu em contato com a mesma por 30min. Após esse tempo,

foi adicionado 10 μ L de HB:La⁺³ à cultura bacteriana, e após cinco minutos foi realizada a irradiação em placas de 96 poços, um grupo de cada vez, por 24J/cm², 48J/cm², 72J/cm² e 96J/cm².

Os grupos foram então divididos conforme mostra o quadro 6:

Quadro 6: Divisão dos grupos do experimento com HB:La⁺³ associada a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em *P. aeruginosa* MR

PaMR+	Somente PaMR;
PaMR+ HBVp+	PaMR com HB:La ⁺³ /Vp sem irradiação (13min);
PaMR+HBVp-V+	PaMR + LED vermelho (8min/96J/cm ²);
PDT VpV2	PaMR + HB:La ⁺³ /Vp + LED vermelho (2min/24J/cm ²);
PDT VpV4	PaMR + HB:La ⁺³ /Vp +LED vermelho (4min/48J/cm ²);
PDT VpV6	PaMR + HB:La ⁺³ /Vp +LED vermelho (6min/72J/cm ²);
PDT VpV8	PaMR + HB:La ⁺³ /Vp + LED vermelho (8min/96J/cm ²).

Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata.

Após cada tratamento, foi realizada a diluição seriada de 10⁻¹ a 10⁻⁵ e 10 μ L de cada diluição foram retirados e semeados em placa contendo TSA e levados à estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 12h para posterior contagem de UFC/mL.

Os resultados microbiológicos foram analisados estatisticamente com teste ANOVA e diferenças entre resultados foram analisados com teste Tukey (p<0,05).

4.2. Estudo *in vivo*

4.2.1. Modelo de queimadura de 3º. grau

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (Anexo 2).

Neste ensaio foram utilizados três camundongos Balb C, fêmeas adultas jovens, com idade aproximada de 3-4 semanas e massa corpórea semelhante de aproximadamente 25 gramas provenientes do biotério do IPEN.

Os animais foram mantidos em mini-isoladores individuais com a mesma temperatura ambiente e receberam ração granulada comercial e água antes e

durante todo o período experimental. Os animais foram anestesiados com quetamina (90mg/kg) e xilasina (10mg/kg), administrados intraperitonealmente, e sedados com tartarato de butorfanol (2mg/Kg) antes da queimadura. Todos os animais tiveram o dorso tricotomizado antes do procedimento e as queimaduras foram induzidas utilizando um dispositivo de aço com 6cm² de área pré-aquecido em água a 95°C, por 10min, que entrou em contato com a pele do animal sempre com a mesma pressão, por 10s (Figura 14). A área do dispositivo corresponde de 22 a 24% da superfície corpórea do animal segundo a fórmula de Mee: $A=kW^{2/3}$ (A= área de superfície em cm², W= massa corpórea em gramas, k= coeficiente do animal) (BERKOW, 1924). O recipiente contendo água foi monitorado por um termômetro, mantendo assim a temperatura estável.

Para a confirmação de queimaduras de 3º grau, foram realizadas análises histológicas com amostras de pele de três animais. Este trabalho contou com a colaboração da Prof^ª. Cristiane Padron França, da Universidade Nove de Julho - UNINOVE/SP.



Figura 14 - Dispositivo para confecção da queimadura em contato com a pele do animal.

A figura 15 ilustra o aspecto da lesão imediatamente após a queimadura.

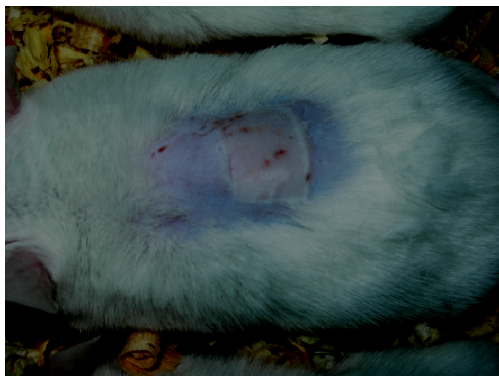


Figura 15 - Aspecto da lesão imediatamente após a queimadura.

4.2.2. Indução da infecção

Para que fosse possível a reprodução de uma situação clinicamente mais crítica, a infecção foi induzida pela cepa de *P. aeruginosa* MR. O inóculo foi preparado a partir da amostra mantida em estoque a -70°C , com concentração bacteriana inicial de 3×10^9 UFC/mL, calibrada em espectrofotômetro com transmitância de 16% em $\lambda=620\text{nm}$.

Para a confecção do inóculo, a amostra foi trazida à temperatura ambiente, semeada em TSA, e levada à estufa a 37°C por 24h para o crescimento bacteriano.

Para a indução da infecção, $100\mu\text{L}$ do inóculo bacteriano na concentração acima foi injetado subcutaneamente nos animais submetidos à queimadura de 3º grau, imediatamente após a queimadura (Figura 16).

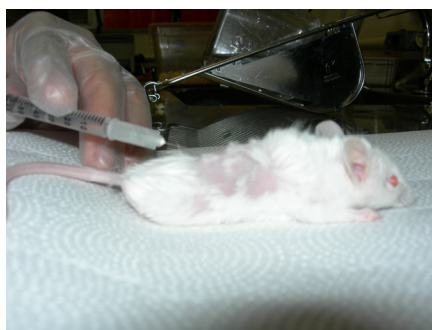


Figura 16 - Inoculação de *P. aeruginosa* MR após a queimadura de 3º grau.

Quinze animais foram divididos em três grupos de cinco animais conforme quadro 7:

Quadro 7: Divisão dos grupos do experimento de indução da infecção.

Q+	animais submetidos apenas à queimadura;
Q-I+	animais submetidos apenas ao inóculo bacteriano;
Q+I+	animais submetidos à queimadura de 3º grau e ao inóculo bacteriano.

Todos os animais foram observados por um período de sete dias.

4.2.3. Teste de letalidade para HB:La⁺³

HB:La⁺³ foi diluída em solução salina fosfatada (PBS) até a concentração de 10 μ M. As fontes de luz utilizadas foram LED de $\lambda=460\text{nm}\pm 20\text{nm}$ (Eccofibras/São Carlos - Brazil) e LED de $\lambda=645\text{nm}\pm 10\text{nm}$ (Protótipo LED MMOptics, São Carlos, Brazil), ambos com potência de 225 mW e I=200mW/cm².

Neste ensaio foram utilizados 20 animais que foram divididos em quatro grupos de cinco como descrito a seguir.

A fim de verificar se HB:La⁺³ poderia ser letal aos animais nas condições propostas pelo experimento, os animais foram submetidos à queimadura de 3º grau e 100 μ L de HB:La⁺³ foram inoculados subcutaneamente no local da queimadura (Figura 17), seguidos de iluminação direta por 2 minutos com LED azul (24J/cm²) (Figura 18) e com LED vermelho (24J/cm²) (Figura 19).

A fonte de luz foi colocada verticalmente em contato com a pele do animal e esta foi protegida um a um com filme plástico.

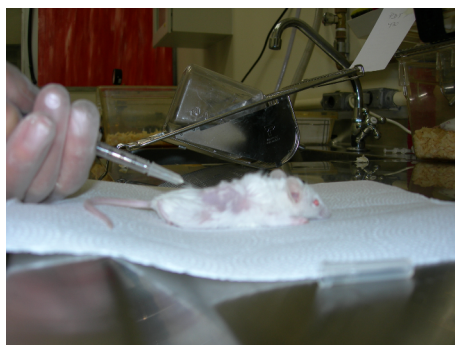


Figura 17 - Inoculação subcutânea da HB:La⁺³ na área da queimadura de 3º grau.

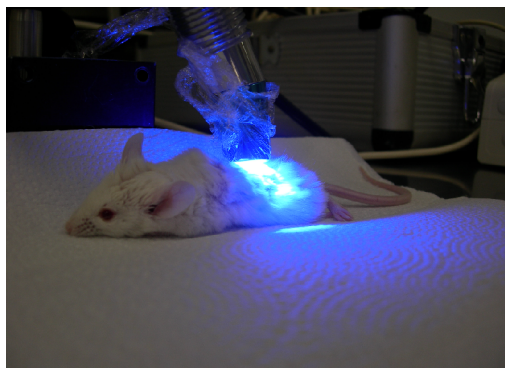


Figura 18 - Irradiação da lesão com LED de $\lambda=470\pm 20\text{nm}$

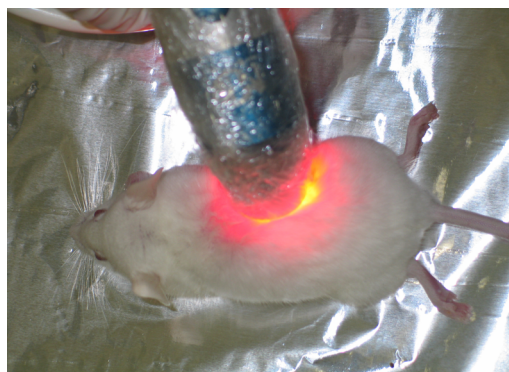


Figura 19 - Irradiação da lesão com LED de $\lambda=645\pm 10\text{nm}$

Os grupos foram divididos conforme quadro 8:

Quadro 8: Divisão dos grupos para teste de letalidade para HB:La⁺³

Q+I+	Queimaduras infectadas;
Q+I-HB+	Queimaduras sem infecção com HB:La ⁺³ ;
Q+I-HB+A+	Queimaduras sem infecção com HB:La ⁺³ irradiada com LED azul (2min/24J/cm ²);
Q+I-HB+V+	Queimaduras sem infecção com HB:La ⁺³ irradiada com LED vermelho (2min/24J/cm ²).

Todos os animais foram observados por sete dias.

4.2.4. Terapia fotodinâmica em única sessão em queimadura infectada e contagem bacteriana local

A queimadura de 3º. grau e inoculação bacteriana foram realizadas de acordo com os ensaios anteriores. A PDT foi realizada 30 minutos após a inoculação bacteriana. Cem- μ L de HB:La⁺³ (10 μ M) foram inoculados subcutaneamente no local da queimadura. Após o tempo de pré-irradiação de cinco minutos, os animais dos grupos PDT foram irradiados por dois minutos (24J/cm²) com LED azul e em outro grupo com LED vermelho como descrito anteriormente.

Quinze animais foram divididos em três grupos de cinco conforme quadro 9:

Quadro 9: Divisão dos grupos para determinação do número de UFC/g após PDT em sessão única em queimadura infectada com *P. aeruginosa* MR

Controle	Sem tratamento;
PDT azul	HB:La ⁺³ e irradiação com LED azul (2min/24J/cm ²);
PDT vermelho	HB:La ⁺³ e irradiação com LED vermelho (2min/24J/cm ²).

A fim de determinar o número de UFC/g de *P. aeruginosa* MR localmente, foi realizada contagem das células viáveis de *P. aeruginosa* MR no local da queimadura em todos os grupos. Os camundongos foram eutanasiados imediatamente após o tratamento e amostras de pele foram cuidadosamente retiradas usando uma tesoura cirúrgica estéril. A profundidade da biópsia da pele se estendeu até o panículo carnoso do dorso do animal, de forma que todos os componentes da derme e epiderme foram removidos. Imediatamente após a excisão, o tecido foi pesado, triturado e homogeneizado em 1 mL de PBS, e as alíquotas passaram por diluição seriada de 10⁻¹ a 10⁻⁵. Dez- μ L foram semeados horizontalmente em placas contendo TSA (Jett *et al.*, 1997) e levadas à estufa a 37°C por 12h para o crescimento bacteriano.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o teste ANOVA e diferenças entre resultados foram testadas com teste Tukey. Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Todos os experimentos descritos foram realizados em triplicata.

4.2.5. Terapia fotodinâmica em única sessão em queimadura infectada e contagem bacteriana na circulação sanguínea

Todos os procedimentos do ensaio anterior foram seguidos, com a diferença de que os animais foram mantidos vivos até o final do experimento e coletas sanguíneas foram realizadas nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após a inoculação bacteriana a fim de determinar o número de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea em todos os grupos.

A finalidade deste ensaio foi verificar se a PDT realizada localmente pode evitar a entrada de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea em animais submetidos a queimaduras de 3º. grau e infectados com esta bactéria.

Neste ensaio foram utilizados trinta animais que foram divididos em seis grupos de cinco animais conforme quadro 10:

Quadro 10: Divisão dos grupos para determinação do número de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea após PDT em uma sessão.

C	Sem tratamento;
HB:La ⁺³	HB:La ⁺³ sem irradiação;
LED azul	Somente irradiação com LED azul (2min/24J/cm ²);
LED vermelho	Somente irradiação com LED vermelho (2min/24J/cm ²);
PDT azul	HB:La ⁺³ e irradiação com LED azul (2min/24J/cm ²);
PDT vermelho	HB:La ⁺³ e irradiação com LED vermelho (2min/24J/cm ²).

Amostras de sangue foram coletadas do plexo venoso orbital com pipeta Pasteur heparinizada (KUMA *et al.*, 2002) nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após a infecção em todos os grupos.

Com a finalidade de mensurar a quantidade de *P. aeruginosa*/mL de sangue nos tempos acima, 200µL de sangue foram coletados e colocados em 1,8 mL de caldo triptona de soja (TSB) acrescidos de anticoagulante poliatenol sulfonato de sódio (SPS). Após diluição seriada de 10⁻¹ a 10⁻⁴, 10µL foram semeados em placas de Petri, com TSA, e levados à estufa a 37°C por 12h para o crescimento bacteriano.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística ANOVA one-way e diferenças

entre os significados foram analisados por teste Tukey. Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4.2.6. Análise do tempo de sobrevivência após uma sessão de PDT

Todos os animais do estudo anterior foram monitorados quanto ao tempo de sobrevivência após a PDT.

4.2.7 Terapia fotodinâmica em duas sessões em queimadura infectada e contagem bacteriana na circulação sanguínea

Os mesmos procedimentos do ensaio anterior foram seguidos, porém foram realizadas duas sessões de PDT, a primeira 15 minutos após a inoculação bacteriana e a segunda, 30 minutos após a mesma, com os mesmos parâmetros já utilizados.

A finalidade deste ensaio foi verificar se mais de uma sessão poderia interferir no resultado final da PDT.

Quinze animais foram divididos em três grupos de cinco animais conforme o quadro 11:

Quadro 11: Divisão dos grupos para determinação do número de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea após PDT em duas sessões.

C	Sem tratamento;
PDT A	HB:La ⁺³ e irradiação com LED azul;
PDT V	HB:La ⁺³ e irradiação com LED vermelho.

4.2.8 Análise do tempo de sobrevivência após duas sessões de PDT

Todos os animais do estudo anterior foram novamente monitorados quanto ao tempo de sobrevivência após a PDT.

5. Resultados

5.1. Estudo *in vitro*

5.1.1. Azul de metileno (AM) associado a laser de $\lambda=660\text{nm}$ em duas cepas distintas de *P. aeruginosa*.

Os grupos controle e os grupos expostos somente ao AM ou somente à luz não apresentaram redução bacteriana. Foi possível observar a redução de um log em *P. aeruginosa* ATCC 27853 após um minuto de irradiação ($8\text{J}/\text{cm}^2$), e esses valores permaneceram os mesmos até oito minutos de irradiação ($64\text{J}/\text{cm}^2$). Em *P. aeruginosa* MR a redução de um log ocorreu apenas após quatro minutos de irradiação ($32\text{J}/\text{cm}^2$), e esse valor também permaneceu o mesmo até oito minutos de irradiação ($64\text{J}/\text{cm}^2$) (Figura 20). Apesar de se observar uma diferença entre os grupos entre um e quatro minutos de irradiação, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p<0,05$).

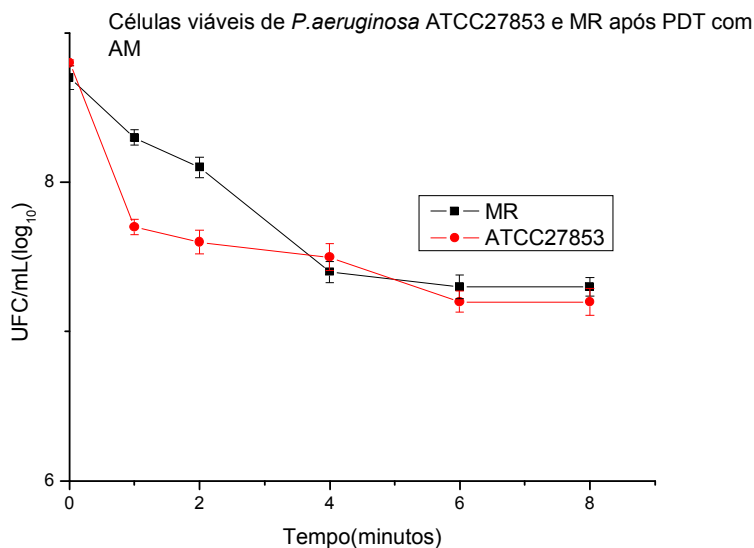


Figura 20 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *P. aeruginosa* MR após PDT com AM. ATCC 27853: *P. aeruginosa* ATCC 27853 após PDT com AM e laser de $\lambda=660\text{nm}$; MR: *P. aeruginosa* MR após PDT com AM e laser de $\lambda=660\text{nm}$.

5.1.2. HB:La⁺³ associada à LED de $\lambda=460\pm 20\text{nm}$ e LED de $\lambda=645\pm 10\text{nm}$ em cepas de *P. aeruginosa* MR

Houve redução bacteriana de cinco logs em relação ao grupo controle, tanto com LED azul quanto com LED vermelho após dois minutos de irradiação ($24\text{J}/\text{cm}^2$), sendo que esta redução se manteve em cinco logs até oito minutos de irradiação ($96\text{J}/\text{cm}^2$) (Figura 21).

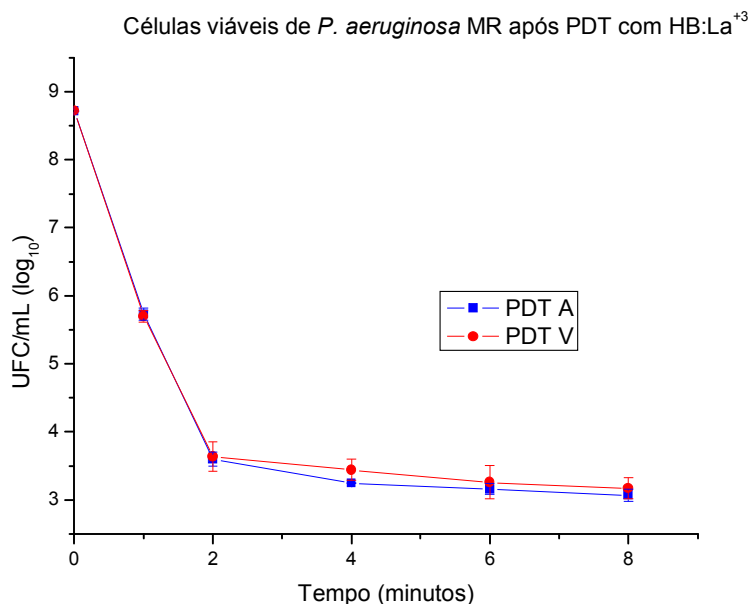


Figura 21 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR, após PDT com HB:La⁺³. PDT A: PDT com LED azul; PDT V: PDT com LED vermelho.

A figura 22 ilustra os resultados da PDT *in vitro* com AM e HB:La⁺³ em cepas de *P. aeruginosa* MR. Foi possível observar diferença estatisticamente significativa quando HB:La⁺³ foi comparada com AM. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos PDT A e PDT V foram comparados entre si ($p < 0,05$).

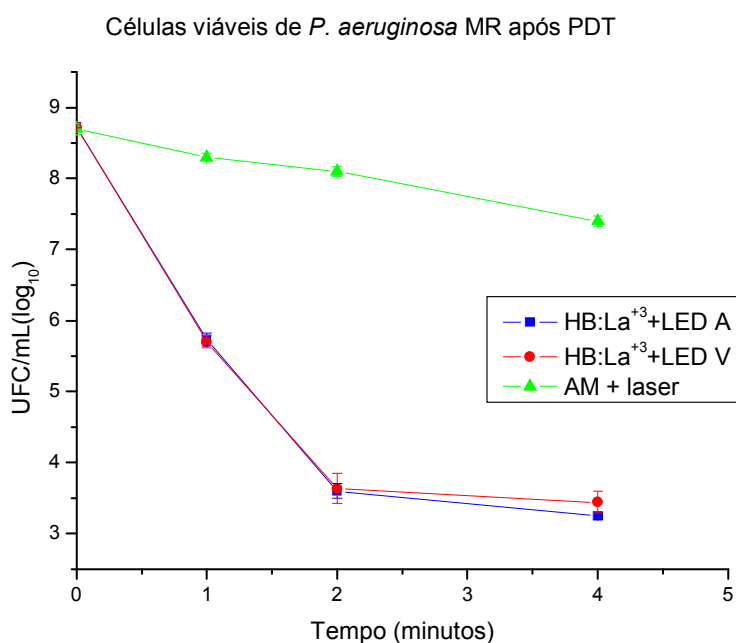


Figura 22 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR após PDT com HB:La⁺³ e AM. HB:La⁺³ + LED A: PDT com HB:La⁺³ irradiada com LED azul; HB:La⁺³ + LED V: PDT com HB:La⁺³ irradiada com LED vermelho; AM + laser: PDT com AM irradiado com laser.

5.1.3. AM associado a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em cepas de *P. aeruginosa* MR

A figura 23 ilustra a redução de *P. aeruginosa* MR após PDT com AM associado a Verapamil. Houve redução de um log no grupo azul de metileno associado a Verapamil (AMVp) após dois minutos de irradiação ($16\text{J}/\text{cm}^2$), e de 2 logs após 8 minutos de irradiação ($64\text{J}/\text{cm}^2$). O grupo sem o Verapamil (AM) apresentou redução de um log apenas após 4 minutos de irradiação ($32\text{J}/\text{cm}^2$), e estes valores permaneceram até 8 minutos de irradiação ($64\text{J}/\text{cm}^2$).

A redução de *P. aeruginosa* MR do grupo com Verapamil foi maior comparado ao grupo sem o Verapamil, havendo diferença estatística entre eles ($p < 0,05$).

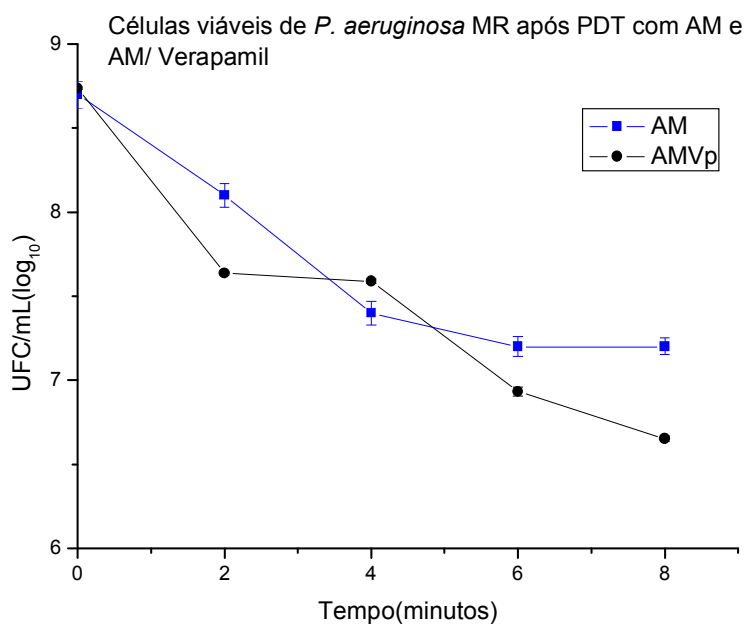


Figura 23 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR após PDT com AM e AM associado a Verapamil. AM: PDT com AM. AMVp: PDT com AM associado a Verapamil.

5.1.4. HB:La⁺³ associada a inibidor de bombas de efluxo (Verapamil-Vp) em cepas de *P. aeruginosa* MR

A figura 24 ilustra a redução de *P. aeruginosa* MR após PDT com HB:La⁺³ associada a Verapamil. Após dois minutos (24J/cm²) de irradiação com LED vermelho houve redução de cinco logs tanto para o grupo HB:La⁺³ como para o grupo HB:La⁺³ Verapamil. Estes valores permaneceram estáveis até oito minutos de irradiação (96J/cm²), não havendo diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$).

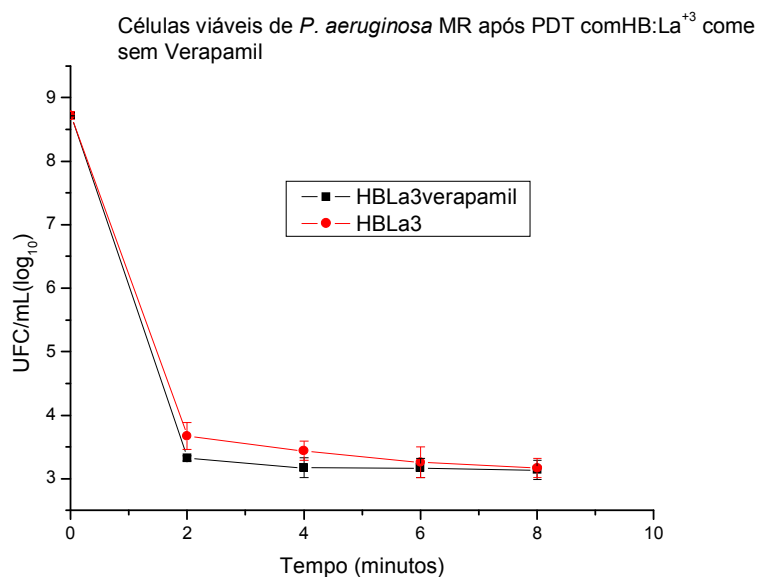


Figura 24 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR após PDT com HB:La⁺³ e HB:La⁺³/Verapamil. HB:La⁺³: PDT com HB:La⁺³; HB:La⁺³ Verapamil: PDT com HB:La⁺³ associada a Verapamil.

5.2. Estudo *in vivo*

5.2.1. Modelo de queimadura de 3º. grau

A análise histológica das amostras de pele dos animais submetidos ao modelo de queimadura descrito anteriormente mostrou destruição da epiderme e derme, com perda de definição de fibras colágenas e áreas de hialinização, confirmando a ocorrência de queimaduras de 3º. grau.

Para facilidade de comparação, a figura 25 mostra um tecido normal com epiderme e derme íntegras, e fibras colágenas bem definidas.

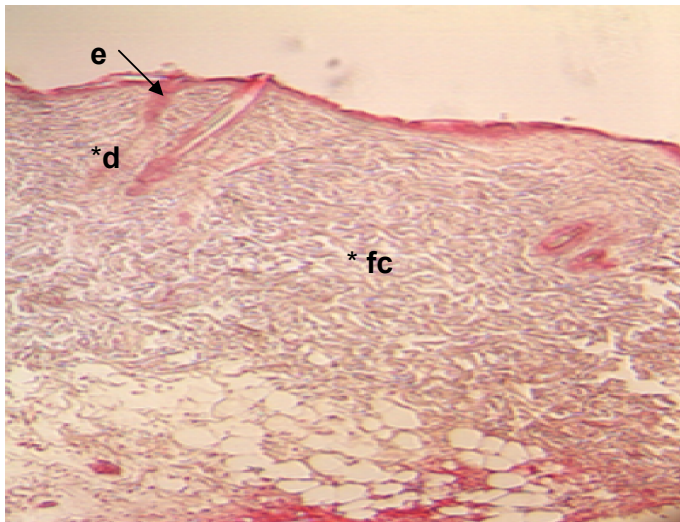


Figura 25 – Pele de camundongo com aspectos histológicos de normalidade. Epiderme (e) e derme (d) íntegras, com fibras colágenas (fc) bem definidas.

A figura 26 ilustra uma queimadura de 2º. grau, encontrada nas bordas da lesão.

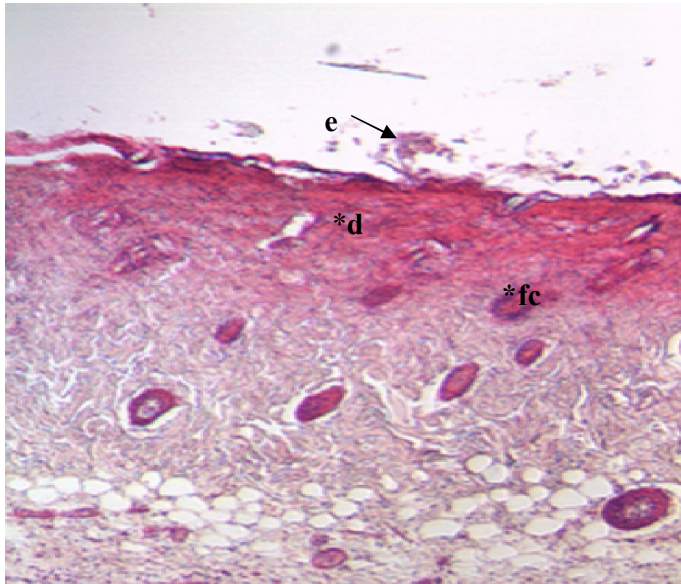


Figura 26 – Aspectos histológicos de uma queimadura de 2º. grau em pele de camundongos com destruição total de epiderme (e) e parte da derme (d) e perda de definição das fibras colágenas (fc).

A figura 27 ilustra a queimadura de 3^o. grau encontrada no centro da lesão, onde é possível observar a destruição total da epiderme (e) e derme (d) e presença de áreas de hialinização (h).

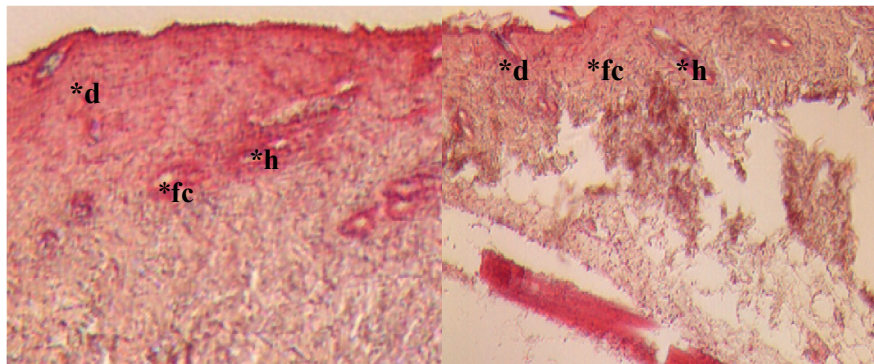


Figura 27 – Queimadura de 3^o. grau com destruição total de epiderme (e) e derme (d) e a presença de áreas de hialinização (h).

5.2.2. Indução da infecção

Neste ensaio foi possível observar que os animais submetidos apenas à queimadura, assim como os animais submetidos apenas ao inóculo bacteriano, sobreviveram por sete dias, enquanto os animais submetidos à queimadura e ao inóculo bacteriano morreram em 24 horas (Figura 28).

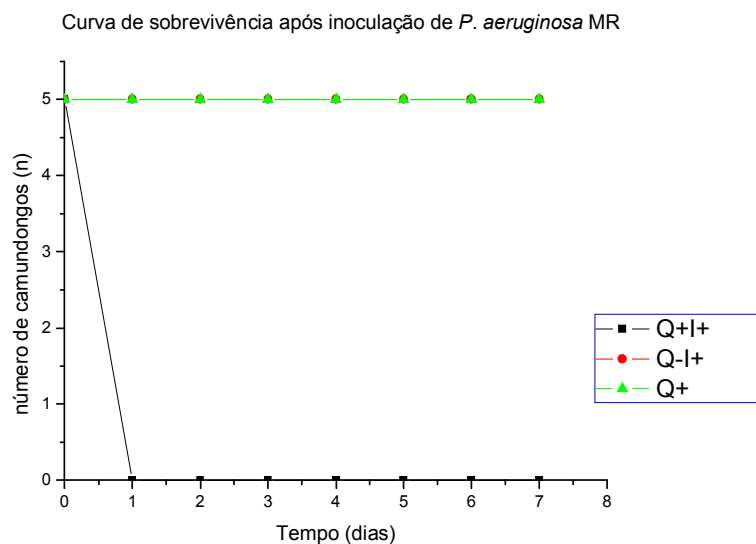


Figura 28 - Curva de sobrevivência de camundongos após inoculação de *P. aeruginosa* MR. Q+: camundongos submetidos somente à queimadura; Q-I+: camundongos submetidos apenas ao inóculo bacteriano; Q+I+: camundongos submetidos à queimadura e ao inóculo bacteriano.

5.2.3. Teste de letalidade para HB:La⁺³

O teste de letalidade para HB:La⁺³ mostrou que somente os animais submetidos à queimadura de 3º. grau e infectados com *P. aeruginosa* MR morreram em 24 horas. Os animais submetidos à queimadura e que receberam somente HB:La⁺³, ou HB:La⁺³ mais irradiação, tanto com LED azul como com LED vermelho mas que não foram infectados, sobreviveram até o 7º. dia (Figura 29).

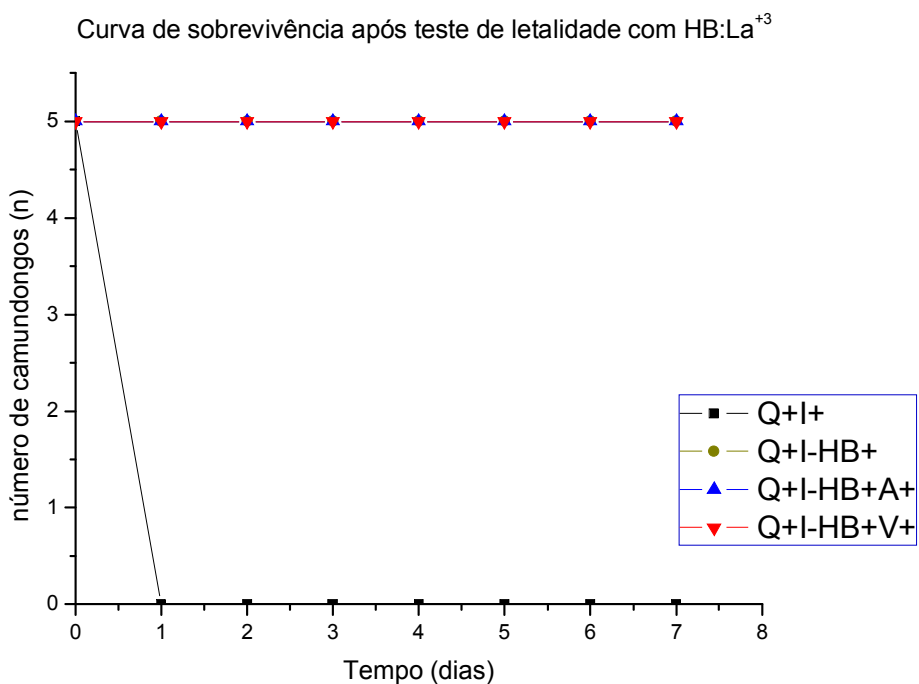


Figura 29 - Curva de sobrevivência de camundongos após o teste de letalidade para HB:La⁺³. Q+I+: queimaduras infectadas; Q+I-HB+: queimaduras sem infecção com HB:La⁺³ inoculada sob a queimadura; Q+I-HB+A+: queimaduras sem infecção com HB:La⁺³ inoculada e irradiada com LED azul; Q+I-HB+V+: queimaduras sem infecção com HB:La⁺³ inoculada e irradiada com LED vermelho.

5.2.4. Terapia fotodinâmica em única sessão em queimadura infectada e contagem bacteriana local

A figura 30 ilustra a redução de *P. aeruginosa* MR em pele de camundongos submetidos à queimadura de 3º. grau e infectados com *P. aeruginosa* MR. Não houve redução de *P. aeruginosa* MR no grupo controle. Os grupos PDT A e PDT V apresentaram redução bacteriana de dois logs em relação ao controle. Houve diferenças estatisticamente significantes quando os grupos PDT A e PDT V foram comparados ao controle, porém sem diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$).

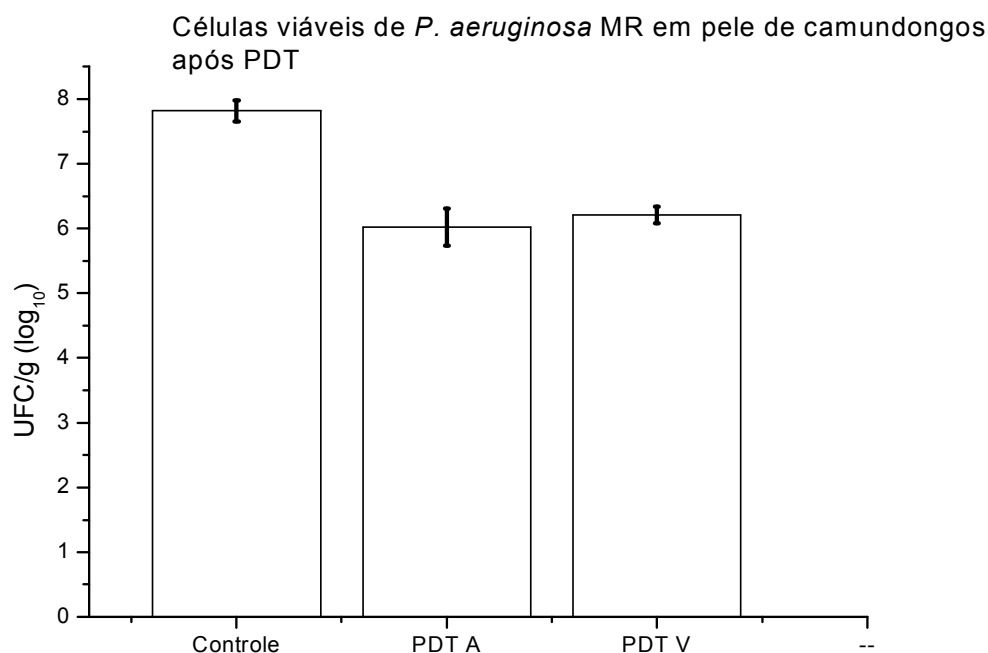


Figura 30 - Valores médios \pm DP do número de UFC/g de *P. aeruginosa* MR em camundongos com queimaduras infectadas após PDT em uma sessão. Controle: camundongos com queimaduras infectadas que não receberam nenhum tratamento; PDT A: camundongos com queimaduras infectadas que receberam HB:La⁺³ e foram irradiadas com LED azul; PDT V: camundongos com queimaduras infectadas que receberam HB:La⁺³ e foram irradiadas com LED vermelho.

5.2.5. Terapia fotodinâmica em única sessão em queimadura infectada e contagem bacteriana na circulação sanguínea

A tabela 1 ilustra os valores médios de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após PDT em sessão única. É possível observar que após sete horas da inoculação bacteriana, o grupo controle, assim como os grupos somente Fs ou somente irradiados apresentaram quatro logs de carga bacteriana na circulação sanguínea, enquanto os grupos submetidos à PDT, tanto com LED azul quanto com LED vermelho não apresentaram crescimento bacteriano neste tempo. Os grupos controle, somente HB:La⁺³, e somente irradiados apresentaram comportamentos similares entre si e estes foram mantidos até as 22 horas após a infecção.

Os grupos PDT azul e PDT vermelho apresentaram bactérias na circulação sanguínea somente após 10 horas da inoculação bacteriana, porém os níveis bacterianos apresentados foram dois logs mais baixos comparados ao grupo controle.

Após 15 horas, os níveis bacterianos no grupo controle subiram para cinco logs, enquanto os grupos PDT azul e PDT vermelho continuaram apresentando dois logs.

Após 18 horas, os níveis bacterianos dos grupos PDT azul e PDT vermelho subiram para três logs, enquanto o grupo controle permaneceu em cinco logs.

Às 22 horas da inoculação bacteriana, o grupo controle apresentou cinco logs de carga bacteriana, enquanto os grupos PDT, tanto azul como vermelho apresentaram apenas três logs.

Não houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos controle, HB:La⁺³, LED A e LED V foram comparados entre si, assim como também não houve diferença quando os grupos PDT A e PDT V foram comparados entre si, porém houve diferença significativa quando os grupos PDT A e PDT V foram comparados ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após PDT em sessão única. C: camundongos com feridas infectadas que não receberam nenhum tratamento; HB:La⁺³: camundongos com feridas infectadas que receberam HB:La⁺³ mas não foram irradiadas; LED A: camundongos com feridas infectadas somente irradiadas com LED azul; LED V: camundongos com feridas infectadas somente irradiadas com LED vermelho; PDT A: camundongos com feridas infectadas que receberam HB:La⁺³ e foram irradiadas com LED azul; PDT V: camundongos com feridas infectadas que receberam HB:La⁺³ e foram irradiadas com LED vermelho.

	7 h	10 h	15 h	18 h	22 h
C	4,38 \pm 0,05	4,84 \pm 0,01	5,08 \pm 0,02	5,18 \pm 0,01	5,58 \pm 0,02
HB:La ⁺³	4,37 \pm 1,12	4,84 \pm 0,01	5,06 \pm 0,03	5,18 \pm 0,01	5,60 \pm 0,01
LED A	4,36 \pm 0,03	4,85 \pm 0,04	5,07 \pm 0,08	5,16 \pm 0,09	5,59 \pm 0,02
LED V	4,34 \pm 0,06	4,84 \pm 0,04	5,09 \pm 0,04	5,19 \pm 0,06	5,63 \pm 0,02
PDT A	0	2,01 \pm 0,35	2,71 \pm 0,23	3,35 \pm 0,28	3,66 \pm 0,40
PDT V	0	2,19 \pm 0,46	2,91 \pm 0,32	3,33 \pm 0,07	3,79 \pm 0,75

A figura 31 ilustra os valores médios de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após PDT em sessão única nos grupos controle, PDT A e PDT V.

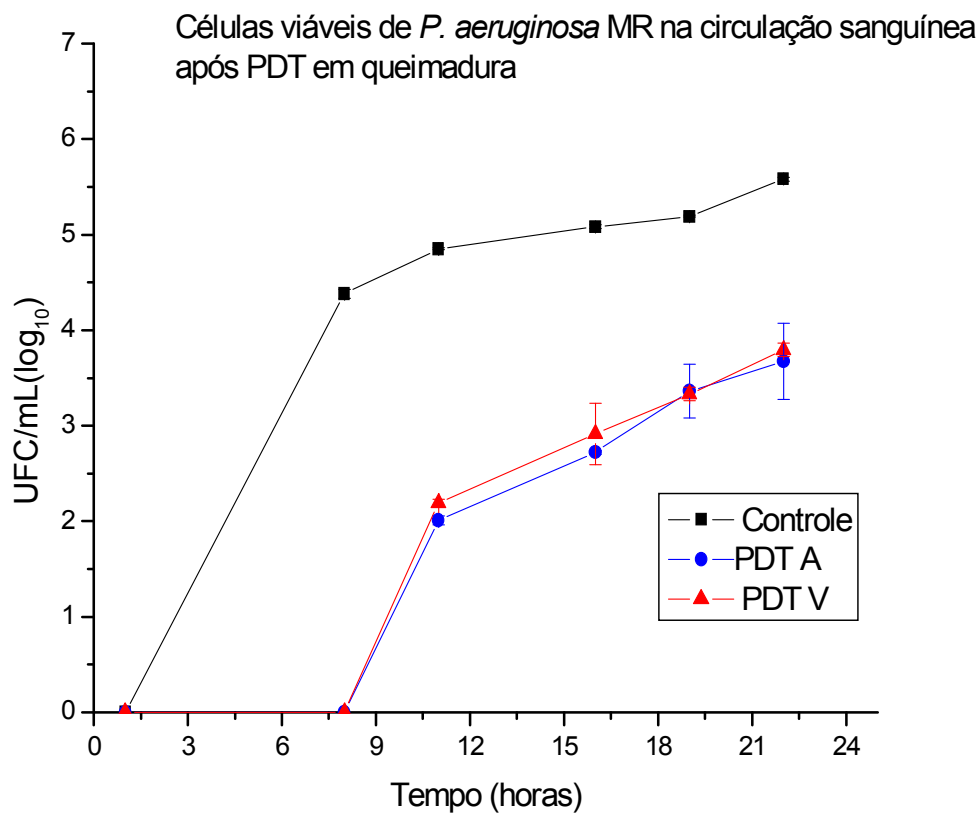


Figura 31 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após PDT em sessão única. Controle: camundongos com queimaduras infectadas que não receberam nenhum tratamento; PDT A: camundongos com feridas infectadas que receberam HB:La⁺³ e foram irradiadas com LED azul; PDT V: camundongos com feridas infectadas que receberam HB:La⁺³ e foram irradiadas com LED vermelho.

5.2.6. Análise do tempo de sobrevivência após PDT em uma sessão

A figura 32 ilustra a curva de sobrevivência dos camundongos tratados e não tratados com PDT em uma sessão. Os camundongos com queimaduras infectadas que não receberam nenhum tratamento foram a óbito em até 23 horas após a infecção; os camundongos que não foram infectados sobreviveram até 48 horas; os camundongos submetidos à PDT com LED azul foram a óbito entre 33 e 48 horas após a PDT; os camundongos submetidos à PDT com LED vermelho foram a óbito entre 25 e 48 horas após a infecção.

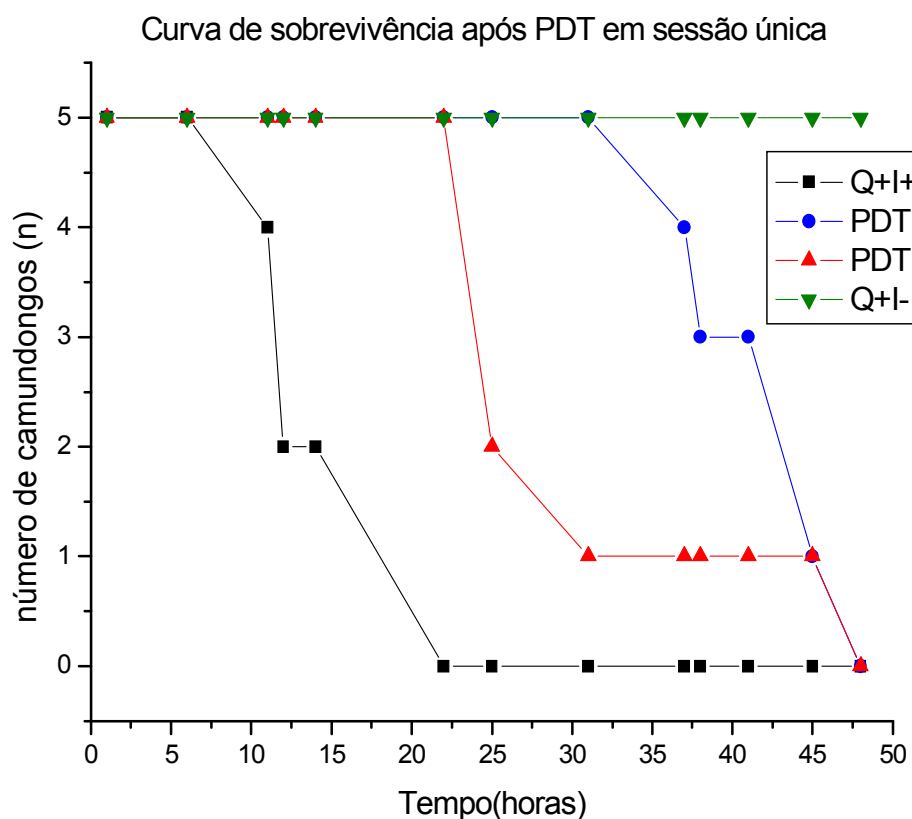


Figura 32 - Curva de sobrevivência de camundongos após PDT em sessão única. Q+I+: camundongos com queimaduras infectadas que não receberam nenhum tratamento; Q+I-: camundongos com queimaduras que não foram infectados; PDT A: camundongos submetidos à PDT com LED azul; PDT V: camundongos submetidos à PDT com LED vermelho.

A tabela 2 ilustra os tempos de sobrevivência dos animais de todos os grupos:

Tabela 2 – Tempos de sobrevivência dos camundongos após PDT em sessão única. Q+I+: camundongos com queimaduras infectadas que não receberam nenhum tratamento; Q+I-: camundongos com queimaduras que não foram infectados; PDT A: camundongos submetidos à PDT com LED azul; PDT V: camundongos submetidos à PDT com LED vermelho.

Tempo (horas)	Número de camundongos (n)			
	Q+I+	PDT A	PDT V	Q+I-
1	5	5	5	5
6	5	5	5	5
11	4	5	5	5
12	2	5	5	5
14	2	5	5	5
22	2	5	5	5
25	0	5	2	5
31	0	5	1	5
37	0	4	1	5
38	0	3	1	5
41	0	3	1	5
45	0	1	1	5
48	0	0	0	5

5.2.7. Terapia fotodinâmica em duas sessões em queimadura infectada e contagem bacteriana na circulação sanguínea

A tabela 3 ilustra os valores médios de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após duas sessões de PDT. No grupo controle, após 7 horas, foi recuperado 6 logs de bactérias na circulação sanguínea, enquanto os grupos PDT A e PDT V não apresentaram bactérias na circulação sanguínea neste tempo.

Às 10 horas os grupos PDT A e PDT V apresentaram 5 logs de bactérias na circulação sanguínea, enquanto o grupo controle apresentou 7 logs.

Às 15 horas, a carga bacteriana do grupo controle subiu para 8 logs, enquanto os grupos PDT A e PDT V continuaram apresentando 5 logs.

Às 18 horas, o grupo controle apresentou 8 logs enquanto os grupos PDT A e PDT V apresentaram 5 logs.

Às 22 horas não foi possível efetuar a coleta sanguínea do grupo controle, pois nenhum animal desse grupo sobreviveu após 20 horas da inoculação bacteriana. Os animais dos grupos PDT A e PDT V apresentaram 6 logs neste tempo.

Não houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos PDT A e PDT V foram comparados entre si, porém houve diferença significativa quando os grupos PDT A e PDT V foram comparados ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após duas sessões de PDT. C: camundongos com feridas infectadas que não receberam nenhum tratamento; PDT A: camundongos submetidos à PDT com LED azul; PDT V: camundongos submetidos à PDT com LED vermelho.

	7 h	10 h	15 h	18 h	22 h
C	6,80 \pm 0,02	7,66 \pm 0,14	8,76 \pm 0,10	8,96 \pm 0,08	morte
PDT A	0	5,72 \pm 0,28	5,47 \pm 0,18	5,89 \pm 0,45	6,24 \pm 0,09
PDT V	0	5,95 \pm 0,25	5,57 \pm 0,21	5,90 \pm 0,40	6,49 \pm 0,19

A figura 33 ilustra os valores médios de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após duas sessões de PDT nos grupos controle, PDT com LED azul e PDT com LED vermelho.

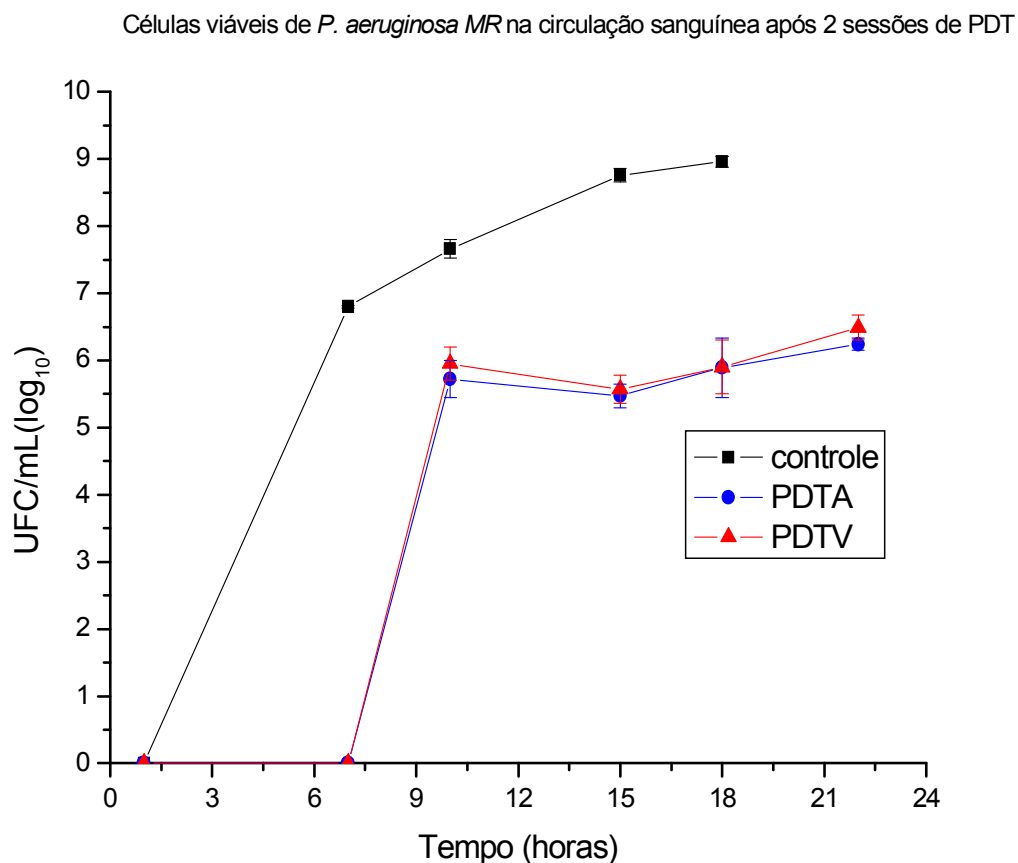


Figura 33 - Valores médios \pm DP de UFC/mL de *P. aeruginosa* MR na circulação sanguínea nos tempos de 7h, 10h, 15h, 18h e 22h após duas sessões de PDT. Controle: camundongos com queimaduras infectadas que não receberam nenhum tratamento; PDT A: camundongos submetidos à duas sessões de PDT com LED azul; PDT V: camundongos submetidos à duas sessões de PDT com LED vermelho.

5.2.8. Análise do tempo de sobrevivência após duas sessões de PDT

A figura 34 ilustra o tempo de sobrevivência dos camundongos após duas sessões de PDT. Os camundongos do grupo controle foram a óbito entre 7 e 19 horas após a inoculação bacteriana; os camundongos do grupo PDT com LED azul foram a óbito entre 30 e 45 horas após a inoculação bacteriana e os camundongos do grupo PDT com LED vermelho foram a óbito entre 30 e 37 horas após a inoculação bacteriana.

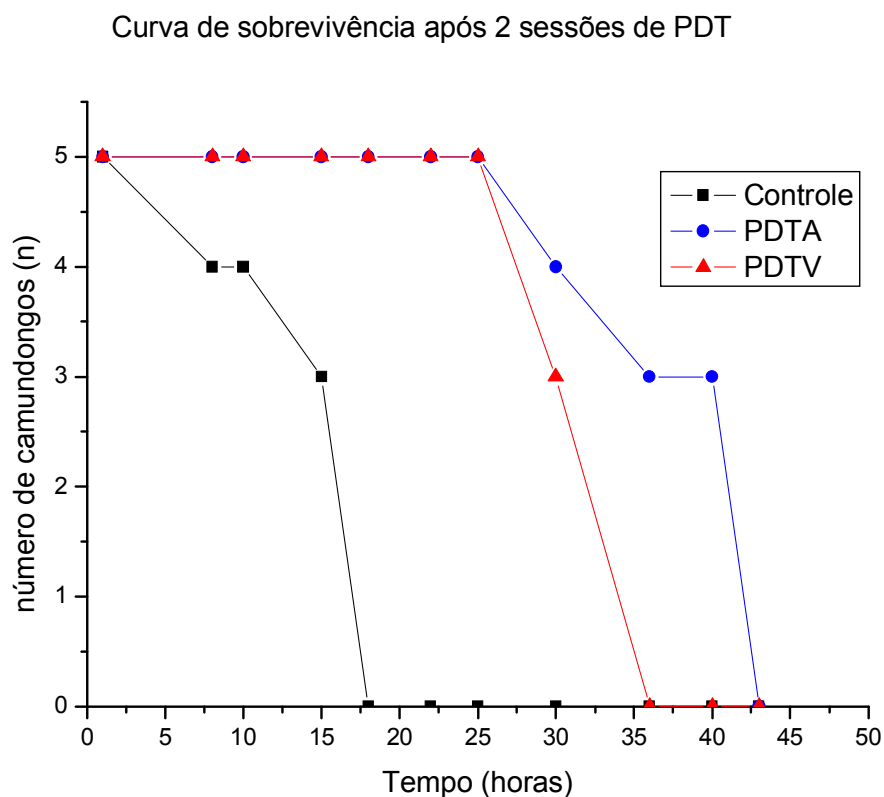


Figura 34 - Curva de sobrevivência de camundongos após duas sessões de PDT. Controle: camundongos com queimaduras infectadas que não receberam nenhum tratamento; PDT A: camundongos com queimaduras infectadas, mas que receberam HB:La⁺³ e foram irradiados com LED azul em duas sessões; PDT V: camundongos com queimaduras infectadas mas que receberam HB:La⁺³ e foram irradiados com LED vermelho em duas sessões.

A tabela 4 ilustra o tempo de sobrevivência dos animais dos grupos controle, PDT com LED azul e PDT com LED vermelho:

Tabela 4– Tempos de sobrevivência dos camundongos após duas sessões de PDT. Q+I+: camundongos com queimaduras infectadas que não receberam nenhum tratamento; PDT A: camundongos submetidos à PDT com LED azul; PDT V: camundongos submetidos à PDT com LED vermelho.

Tempo (horas)	Número de camundongos (n)		
	Controle	PDT A	PDT V
1	5	5	5
6	5	5	5
11	4	5	5
12	4	5	5
14	3	5	5
22	0	5	5
25	0	5	5
31	0	4	3
37	0	3	0
38	0	3	0
41	0	3	0
45	0	0	0

6. Discussão

Estudos *in vitro* com Fs bem estabelecidos como o azul de metileno e azul de toluidina mostraram que *P. aeruginosa* demorou mais tempo para ser eliminada pela terapia fotodinâmica do que outras espécies de bactérias, mesmo considerando outras espécies também Gram-negativas (USACHEVA *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, foi realizada a PDT *in vitro*, utilizando AM e laser de emissão vermelha em duas cepas distintas de *P. aeruginosa*, uma ATCC 27853 e outra selvagem multirresistente (MR). A finalidade deste ensaio foi verificar se poderia ocorrer diferença na susceptibilidade à PDT entre cepas padrão e cepas multirresistentes, e a partir de então utilizar a cepa que pudesse reproduzir a situação mais crítica. A utilização de um tempo de pré-irradiação de 30s nos ensaios preliminares foi com a finalidade de realizar a PDT antes que um possível mecanismo de bombas de efluxo pudesse bombear o Fs para fora das células.

Dentro dos parâmetros utilizados, foi possível observar a redução de um log de *P. aeruginosa* ATCC 27853 após um minuto de irradiação (8 J/cm²) e de *P. aeruginosa* MR com quatro minutos de irradiação (32 J/cm²). A cepa ATCC 27853 se mostrou mais susceptível à PDT quando comparada à cepa MR. Estes resultados concordam com os resultados de Tegos e Hambin, 2006 e George *et al.*, 2009 que sugerem que cepas multi-droga resistentes são mais difíceis de serem eliminadas pela PDT. Estes autores atribuíram a diferença ao fato de que Fs fenotiazínicos como o AM e TBO se ligam a essas bombas, fazendo com que uma menor quantidade de Fs seja acumulado no interior da célula bacteriana. Já os resultados de Tseng *et al.*, 2009, não indicaram diferenças na susceptibilidade à PDT entre cepas multi-droga resistentes e susceptíveis.

No ensaio com o Verapamil associado ao AM foi possível observar uma maior redução de *P. aeruginosa* MR comparado à PDT apenas com o AM. É possível que a cepa MR utilizada neste estudo também possua o mecanismo de bombas de efluxo e que o AM esteja exercendo o papel de substrato destas, impedindo a captação de Fs pela célula bacteriana. O ensaio com o Verapamil associado à HB:La⁺³ não mostrou diferença significativa comparado à PDT apenas com HB:La⁺³. Este comportamento pode ser devido ao fato de que

HB:La⁺³ não seja reconhecida pelo mecanismo dessas bombas de efluxo e, portanto consiga penetrar mais facilmente no interior da célula.

Segundo Usacheva *et al.*, 2008, existem receptores de proteínas presentes na membrana externa da célula bacteriana e a diferença no efeito fotodinâmico de cada Fs pode estar relacionado com o sítio de ligação nas estruturas bacterianas. Como essas estruturas podem variar de cepa para cepa, esta pode ser a razão pela qual são encontrados resultados diferentes de acordo com a cepa estudada.

Em nosso estudo, em todos os ensaios com *P. aeruginosa* MR, foi possível observar que esta cepa produz uma quantidade maior de muco comparada à cepa ATCC 27853. Pode ser que esse fator também dificulte a difusão do Fs, já que estudo de Donnelly *et al.*, em 2007 mostrou que a presença de muco pode diminuir a susceptibilidade de *P. aeruginosa* à PDT.

Nossos resultados *in vitro* mostraram redução de *P. aeruginosa* MR de 5 logs com a utilização de HB:La⁺³. O seu papel como substrato de bombas de efluxo não foi observado já que a associação com Verapamil não mostrou nenhuma diferença significativa.

No melhor de nosso conhecimento, é a primeira vez que HB:La⁺³ é utilizada *in vivo*. Não houve efeito letal sobre os camundongos dentro da metodologia utilizada, uma vez que os animais que receberam apenas HB:La⁺³ ou HB:La⁺³ irradiada sobreviveram, e somente aqueles animais que foram infectados morreram em 24 horas, indicando que a morte foi decorrente do progresso da infecção.

A proposta de nosso estudo *in vivo* foi observar se a terapia fotodinâmica realizada localmente poderia diminuir os níveis bacterianos no local da queimadura e dessa forma evitar a disseminação bacteriana para a circulação sanguínea.

Hamblin *et al.*, 2003, mostraram através de um modelo de monitoramento óptico, a eliminação *in situ* de *P. aeruginosa* em feridas cirúrgicas infectadas com uma cepa ATCC 19669, porém modificada com um gene bioluminescente a fim de permitir a visualização em tempo real da infecção. O modelo de infecção apresentado foi obtido através de uma ferida cirúrgica com inoculação de 5×10^6 UFC/mL de *P. aeruginosa* sobre a ferida infectada.

Em nosso estudo, o modelo de infecção apresentado foi uma queimadura de 3º. grau e somente foi possível induzir infecção letal nos animais com 3×10^9

UFC/mL de *P. aeruginosa* MR inoculada subcutaneamente no local da queimadura. Esse fato pode ser atribuído ao padrão de queimadura de 3^o. grau apresentado em pele de camundongos, que difere bastante de uma queimadura em pele humana onde há a presença de bolhas e exsudato. Vale salientar também que o padrão da lesão de uma queimadura em camundongos é diferente de uma ferida cirúrgica, de forma tal que, para a indução da infecção neste modelo proposto, foi necessária a inoculação bacteriana subcutaneamente.

O propósito deste modelo foi reproduzir uma situação mais próxima da que ocorre clinicamente, já que queimaduras de 3^o. grau proporcionam um ambiente ideal para o crescimento bacteriano e o desenvolvimento de uma infecção, tanto local quanto sistêmica.

Em nosso estudo, após a PDT, houve redução bacteriana de dois logs no local da queimadura e os animais submetidos à PDT demoraram mais tempo para apresentar bacteremia. Os animais dos grupos submetidos à PDT apresentaram níveis bacterianos mais baixos no local da queimadura comparados ao grupo controle. A análise dos níveis bacterianos na circulação sanguínea mostrou que a PDT em sessão única realizada localmente pode retardar a bacteremia, e manter os níveis bacterianos dois logs mais baixos comparados ao grupo controle. A PDT realizada em duas sessões conseguiu manter os níveis bacterianos três logs mais baixo em relação ao controle, porém, o tempo de sobrevivência dos animais submetidos à PDT tanto em sessão única como em duas sessões foi de 24 horas mais do que o grupo controle.

A demora para a ocorrência de bacteremia assim como níveis bacterianos mais baixos podem ter um significado clínico importante, pois nesse tempo, outras terapias poderiam ser instauradas com o objetivo de evitar o óbito do paciente.

Como demonstrado em estudos anteriores (MINNOCK *et al.*, 1996; USAVHEVA *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2005; RESZKA *et al.*, 2006), a PDT pode atuar em alguns fatores de virulência responsáveis pela destruição da integridade do tecido do hospedeiro e degradação do sistema imune do mesmo. A demora para a ocorrência de bacteremia, assim como o tempo de sobrevivência maior nos grupos submetidos à PDT pode estar associado à inativação destes fatores de virulência, além do fato de os grupos PDT terem apresentado valores bacterianos sanguíneos menores comparados ao grupo controle. Pode ser que a inativação de fatores de virulência responsáveis pela

degradação do sistema imune do hospedeiro esteja contribuindo para uma melhor resposta do animal frente à infecção e por isso foi possível retardar a bacteremia, manter níveis bacterianos mais baixos e aumentar o tempo de sobrevivência do animal.

A PDT realizada em duas sessões apresentou resultado semelhante comparado com a PDT em sessão única. Somente foi possível detectar bactérias na circulação sanguínea dos animais do grupo PDT, 10 horas após a inoculação bacteriana, enquanto o grupo controle já apresentava bacteremia às sete horas pós-inoculação bacteriana. A diferença entre a PDT realizada em sessão única e a PDT em duas sessões foi que, nesta última, a diferença no número de células viáveis entre o grupo controle e PDT foi de três logs a partir das 15 horas pós-inoculação bacteriana, e os animais do grupo controle morreram antes das 22 horas, não sendo possível efetuar a última coleta desse grupo. O padrão de infecção apresentado neste último ensaio se mostrou mais agressivo, porém as diferenças entre os grupos controle e PDT permaneceram semelhantes tanto na PDT em sessão única como na PDT realizada em duas sessões.

Em estudos *in vivo*, é possível que fatores como presença de sangue ou plasma, interação entre Fs e bactéria dentro do tecido, localização da bactéria dentro do tecido, comportamento do Fs dentro do tecido, entre outros possam influenciar os parâmetros iniciais da PDT. Porém, a redução bacteriana local pode ter contribuído para uma demora maior na invasão e proliferação bacteriana, aumentando dessa forma a sobrevivência dos animais.

Desenvolver uma maneira de inativar a bactéria na circulação sanguínea através da PDT, uma vez ocorrida a bacteremia, seria um desafio para trabalhos futuros, onde a PDT poderia atuar primeiramente como tratamento local e, paralelamente como tratamento sistêmico, evitando o comprometimento de órgãos importantes. Para tanto, maiores estudos ainda se fazem necessários quanto aos momentos de intervenção, doses requeridas e comportamentos tanto do Fs quanto da bactéria *in vivo*. Monitorar a difusão tanto do Fs como da bactéria *in vivo*, seria um início para o desenvolvimento de métodos para alcançar tal objetivo.

Outro assunto a ser explorado seria elucidar como o mecanismo de bombas de efluxo se comporta *in vivo*, e porque certas substâncias conseguem se passar despercebidas por tais mecanismos.

7. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que:

In vitro:

- PaMR demorou mais tempo para ser eliminada do que a cepa ATCC 27853 utilizando AM associado a laser;
- A redução de PaMR *in vitro* com HB:La⁺³ associada tanto a LED azul como vermelho foi igual, porém foi maior comparada à AM associado a laser;
- A utilização do inibidor de bombas de efluxo melhorou a efetividade da PDT quando associado à AM, porém não aumentou a redução de PaMR quando associado à HB:La⁺³;

In vivo:

- O modelo de queimadura proposto induziu a uma queimadura de 3º. grau segundo análise histológica das amostras de pele;
- Foi possível induzir infecção local e sistêmica pela inoculação de PaMR subcutaneamente no local da queimadura;
- HB:La⁺³ dentro dos parâmetros utilizados não é letal à camundongos;
- A PDT é capaz de reduzir PaMR localmente, retardar a entrada de PaMR na circulação sanguínea, manter a carga de PaMR na circulação sanguínea menor em relação ao controle e aumentar a sobrevida dos animais;
- Não houve diferença entre a PDT realizada em uma ou duas sessões.

ANEXO 1

Cloridrato de verapamila (Verapamil®)

Verapamil® é o nome comercial do cloridrato de verapamila, um medicamento utilizado para o tratamento de hipertensão arterial, arritmias cardíacas, angina e profilaxia da enxaqueca. Estudos demonstraram seu papel como bloqueador de canais de cálcio (AKIYAMA *et al.*, 1984; PIRKER *et al.*, 1985; PIRKER *et al.*, 1988; KO *et al.*, 2010) da célula, facilitando a entrada de substâncias no interior da mesma. Sua utilização dentro da terapia fotodinâmica é no sentido de aumentar a difusão e captação do Fs no interior da célula bacteriana, dificultando a ação das bombas de efluxo.

As bombas de efluxo, como descrito anteriormente, são mecanismos de resistência desenvolvidos por algumas espécies microbianas que dificultam a captação dos Fs no interior das células, comprometendo os efeitos da PDT. A utilização de um agente inibidor da ação dessas bombas, como o Verapamil, melhora a captação do Fs pela célula bacteriana e conseqüentemente a efetividade da PDT (TEGOS e HAMBLIN, 2006).

Cloridrato de verapamila, ou simplesmente Verapamil, tem sido utilizado como inibidor de bombas de efluxo MDRs. Segundo estudo de GEORGE *et al.*, 2009, o Verapamil aumentou a captação do fotossensibilizador Rosa Bengala tanto por bactérias Gram-positivas quanto por bactérias Gram-negativas.

Em estudo com cepas de *P. aeruginosa* e outro agente inibidor como a fenilalanina-arginina- β -naftalamida (PA β N), foi demonstrado que este melhorou o resultado da terapia fotodinâmica, havendo a redução de 1 log a mais no grupo onde foi utilizado o inibidor. Em cepas de *P. aeruginosa* utilizada no estudo, mesmo com o uso do agente inibidor, a redução bacteriana apesar de significativa (5 logs), não chegou a zero. No mesmo estudo, em cepas de *Staphylococcus aureus* quando foi utilizado o agente inibidor, houve redução bacteriana de 7 logs, chegando à eliminação total desta bactéria. Os autores atribuíram essa diferença ao fato de que as bombas de efluxo presentes nas duas bactérias podem ter comportamentos diferentes tanto em relação ao Fs, quanto em relação ao agente inibidor (TEGOS *et al.*, 2008).

ANEXO 2



Parecer - Projeto Nº 4/CEPA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **ANÁLISE DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM QUEIMADURAS DE PELE INFECTADAS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA. ESTUDO IN VIVO** da responsabilidade do pesquisador **MARTHA SIMÕES RIBEIRO** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEPA.

São Paulo, 19 de maio de 2006

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEPA-IPEN

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

- SPIE Photonics West /BIOS 2010, San Francisco, CA, USA. Prevention of bloodstream infections by photodynamic inactivation of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in burn wounds. Proc. of SPIE, v.7552-17, 2010.
- IPA World Congress Meeting 2009, Seattle, WA, USA. Photodynamic inactivation of antibiotic resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. Proc. of SPIE v. 7380, 73803F-1, doi: 10.1117/12.823028, 2009.
- IPA World Congress Meeting 2009, Seattle, WA, USA. Effectiveness in total reduction of *Candida albicans* promoted by PDT with hypocrellin B:Lanthanum. Proc. of SPIE, v. 7380, 738060-1, doi: 10.1117/12.823013, 2009.

Capítulo de livro

- Terapia Fotodinâmica. Mecanismos e Aplicações. In: Fundamentos de Odontologia. Lasers em Odontologia, v.1, p.36-42, 2010.

Resumos publicados em anais de congressos

- 10th Meeting of ISLD & 15th Annual Congress of DGL, Berlin, 2006. Lethal photosensitization following blue light emitting diode and acid rhodamine B. In vitro study on *Streptococcus mutans*. Laser Zahnheilkunde, v. 2/06: 85-173, p. 111-112, 2006.
- 10th Meeting of ISLD & 15th Annual Congress of DGL, Berlin, 2006. Photosensitization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with malachite green and methylene blue: Microbiological analysis. Laser Zahnheilkunde, v. 2/06: 85-173, 2006.

- Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Águas de Lindóia, 2006. Redução bacteriana com diodo emissor de luz azul de 470 nm. Estudo in vitro sobre Streptococcus mutans. Brazilian Oral Research, v. 20, 2006.

Artigo completo publicado em periódico

- Bactericidal effect of malachite green and red laser on Actinobacillus actinomycetemcomitans. Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology, v. 86, n. 1, p. 70-76, 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol.** v.74, p.656-669, 2001.
2. AKIYAMA, S.; GOTTESMAN, M. M.; HANOVER, J. A.; FITZGERALD, D. J. P.; WILLINGHAM, M. C.; PASTAN, I. Verapamil enhances the toxicity of conjugates of epidermal growth factor with Pseudomonas exotoxin and antitransferrin receptor with Pseudomonas exotoxin. **J. Cell. Physiol.**, v. 120, p. 271-279, 1984.
3. ALI, S.M. e OLIVO, M. Efficacy of hypocrellin pharmacokinetics in phototherapy. **International J Oncol**, v. 21, p. 1229-1237, 2002.
4. ALLEN, L.; DOCKRELL, D.H.; PATTERY, T.; LEE, D.G.; CORNELIS, P.; HELLEWEL, L. Pyocyanin production by Pseudomonas aeruginosa induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil mediated host defenses in vivo. **J Immunol** , v. 174, p. 3643–9, 2005.
5. ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Intracellular signalling mechanisms in photodynamic therapy. **Biocem Biophys Acta**, v. 1704, p. 59-86, 2004.
6. ASHKENAZI, H.; NITZAN, Y.; GAL, D. Photodynamic effects of antioxidant substituted porphyrin photosensitizers on gram-positive and negative bacterial. **Photochem Photobiol**, v. 77, p. 186-191, 2003.
7. BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, v. 17, p. 173-86, 2002.
8. BERKOW, S.G. A method for estimating the extensiveness of lesions (burns and scalds) based on surface area proportions. **Arch Surg**, v. 8, p. 138–148, 1924.
9. CHABRIER-ROSELLÓ, Y.; GIESSELMAN, B.R.; DE JESUS-ANDINO, F.J.; FOSTER, T.H.; MITRA, S.; HAIDARIS, C.G. Inhibition of electron transport chain assembly and function promotes photodynamic killing of Candida. **J Photochem Photobiol B**, v. 99 (3), p.117-25, 2010.
10. CHALOUPIKA, R.; SUREAL, F.; KOCISOVA, E.; PETRICH, J. Hypocrellin A photosensitization involves an intracellular pH decrease in 3T3 cells. **Photochem Photobiol**, v. 68/1, p. 44-50, 1998.
11. CHURCH, D.; ELSAYED, S.; REID, O.; WINSTON, B.; LINDSAY, R. Burn Wound Infections. **Clinical Microbiol Reviews**, 403-434, 2006.

12. CONNOR-BALLARD, P. A. Understanding and Managing Burn Pain: Part 1. **American Journal of Nursing**, v. 109(4), p. 48–56, 2009.
13. CRAFORD, M.; HOLONYAK, N.; FREDERICK, K. In pursuit of the ultimate lamp. **Sci Am**, v. 2, p. 284-62, 2001.
14. CUNHA, B.A. Nosocomial pneumonia. Diagnostic and therapeutic considerations. **Med Clin North Am**, v. 85, p. 79-114, 2001.
15. DANIEL, M.D.; HILL, J.S. A history of photodynamic therapy. *Aust NZ J Surg*, v. 61, p. 340, 1991.
16. DE ROSA, M. C.; CRUTHCLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews** 223-234 (2002), 351, 371.
17. DIWU, Z.; LOWN, J. Photosensitization by anticancer agents 12. Perylene quinonoid pigments, a novel type of singlet oxygen sensitizer. **J Photochem Photobiol A**, v. 64, p. 273-87,1992.
18. DONELLY, R.F.; McCARRON, P.A.; CORONA, M.C.; ELBORN, J.S.; TUNNEY, M.M. Delivery of photosensitizers and light trough mucus: Investigations into the potential use of photodynamic therapy for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis pulmonary infection. **J Control Release**, v. 117, p. 217-226, 2007.
19. DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, W. B.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Review: Photodynamic Therapy. **J National Cancer Institute**, v. 90, p.12, 1998.
20. DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v.58, p. 895-900, 1993.
21. EDELSON, M.F. Light-activated drugs. **Sci Am**, v. 259, p. 68-75, 1988.
22. EDWARD-JONES, V. and GREENWOOD, J. E. What's new in burn microbiology? **Burns**, v. 29, p.15-24, 2003.
23. FITZWATER, J.; PURDUE, G.F.; HUNT, J.L.; O'KEEFE, G.E. The risk factors and time course of sepsis and organ dysfunction after burn trauma. **J Trauma**, v. 54(5), p. 956-66, 2003.
24. GARCEZ, A. S.; NUÑEZ, S.C.; HAMBLIN, M.R.; RIBEIRO, M.S. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **J Endod**, v. 34(2), p.138-42, 2008.
25. GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M.S.; TEGOS, G.P.; NÚÑEZ, S.C.; JORGE, A.O.; HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal eliminate infection. **Lasers Surg Med**, v.39 (1), p. 59-66,2007.

26. GEORGE, S.; HAMBLIN, M.R.; KISHEN, A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. **Photochem Photobiol Sci**, v.8, p. 788 - 795, DOI: 10.1039/b809624d, 2009.
27. HALDER, M.; CHOWDHURY, P.K.; GORDON, M.S. PETRICH, J.W.; DAS, K.; PARK, J.; ALEXEEV, Y. Hypericin and its perylene quinone analogs: probing structure, dynamics and interactins with the environment. **Adv Photochem**, v. 28, p. 1-26, 2005.
28. HAMBLIN, M. R.; O'DONNELL, D. A.; ZAHRA, T.; CONTAG, C.H.; MCMANUS, A.T.; HASAN, T. Targeted photodynamic therapy for infected wounds in mice. **Procc SPIE**, v. 4612, p. 48-57, 2002.
29. HAMBLIN, M. R.; ZAHRA, T.; CONTAG, C.H.; MCMANUS, A.T.; HASAN, T. Optical monitoring and treatment of potentially lethal wounds in vivo. **J Infect Dis**, v. 187, p. 1717-25, 2003.
30. HETTIARATCHY, S.; DZIEWULSKI, P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. **BMJ**. v.328, p.1427-9, 2004.
31. HULTÉN, L.M.; HOLMSTROM, M.; SOUSSI, B. Harmful singlet oxygen can be helpful. **Free Rad Biol Med**, v. 27 (11/12), p. 1203-1207, 1999. MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol, A: Biology**, v. 57, p. 1-13, 2000.
32. ITO, T. Photodynamic agents as tools for cell biology. **Photochem Photobiol Rev**, v. 7, p. 141-186, 1983.
33. JETT, D.B.; HATTER, K.L.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Bio Techniques**, v. 23, p. 648-650, 1997.
34. JOSEFSEN, L.B. e BOYLE, L.W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. **Metal-Based Drugs**, Article ID 276109, doi:10.1155/2008/276109, 2008.
35. KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 3-7, 2004.
36. KO, E.A.; PARK, W.S.; SON, Y.K.; KO, J.H.; CHOI, T.H.; JUNG, I.D.; PARK, Y.M.; HONG, D.A.H.; KIM, N.; HAN, J. Calcium channel inhibitor, verapamil, inhibits the voltage-dependent K⁺ channels in rabbit coronary smooth muscle cells. **Biol Pharm Bull**, v, 33(1), p. 47-52, 2010.
37. KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B: Biology**, v. 66, p.89-106, 2002.
38. KUMA, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. **Basic Pathology**, 7th Ed, Philadelphia, WB Saunders Co, 2002.

39. LAURO, F. M.; PRETTO, P.; COVOLO, L.; JORI, G.; BERTOLONI, G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. **Photochem Photobiol Sci**, v.1, p. 468-470, 2002.
40. LEÃO, C.E.G. Queimaduras. In: Fonseca FP, Rocha PRS. **Cirurgia ambulatorial**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.122-8, 1999.
41. LEE, R.G.; VECCHIOTTI, M.A.; HEAPHY, J.; PANNEERSELVAM, A.; SCHLUCHTER, M.D.; OLEINICK, N.L.; LAVERTU, P.; ALAGRAMAM, K.N.; ARNOLD, J.E.; SPRECHER, R.C. Photodynamic therapy of cottontail rabbit papillomavirus-induced papillomas in a severe combined immunodeficient mouse xenograft system. **The Laryngoscope**, v.12(3), p.618-624.
42. LUKSIENE, Z. and ZUKAUSKAS, A. Prospects of photosensitization in control of pathogenic and harmful micro-organisms. **J Appl Microbiol**, v. 107(5), p.1415-24, 2009.
43. MA, J.; ZHAO, J.; JIANG, L. The aluminium (III) complex of hypocrellin B as a PDT photosensitizer. **New J Chem**, v. 25, p. 847-52, 2001.
44. MAISCH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Mini Rev Med Chem**, v. 9(8), p. 974-83, 2009.
45. MEI, G.D.; LUO, H.C. A report on four cases of photodermatitis caused by the eating of *Shiraia bambusicola*. **Chin J Dermatol**, v. 6, p. 434-36, 1958.
46. MICEK, S. T.; LLOYD, A. E.; RITCHIE, D. J.; REICHLEY, R. M.; FRASER, V.J.; KOLLEF, M. H. *Pseudomonas aeruginosa* blood stream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, v.4, p. 1306-11, 2005.
47. MULLER, M.; LI, Z.; PETER, K.; MAITZ, M. *Pseudomonas* pyocyanin inhibits wound repair by inducing premature cellular senescence: Role for p38 mitogen-activated protein kinase. **Burns**, v. 35, p. 500-508, 2009.
48. MINNOCK, A.; VERNON, D. I.; SCHOFIELD, J.; GRIFFITHS, J.; PARISH, J. H.; BROWN, S. B. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **J Photochem Photobiol B: Biology**, v. 32, p. 159-164, 1996.
49. MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol, A: Biology**, v. 57, p. 1-13, 2000.
50. NICAS, T.I.; IGLEWSKI, B.H. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Can J Microbiol**, v.31, p. 387-92, 1985.

51. NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, p. 1831-1836, 1989.
52. OLGIBY, P. Singlet oxygen – introduction. **Photochem Photobiol**, v.82, p. 1133-1135, 2006.
53. OSCHNER, M. Photophysical and photobiological processes en the photodynamic therapy of tumours. **J Photochem Photobiol, B: Biology**, v. 39, p. 1-18, 1997.
54. PRATES, R. A.; YAMADA, A. M. JR; SUZUKI, L. C.; EIKO HASHIMOTO, M. C.; CAI, S.; GOUW-SOARES, S.; GOMES, L.; RIBEIRO, M. S. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Photochem Photobiol B**, v. 86(1), p. 70-6, 2007.
55. PERLIN, M.; MAO, J. C. H.; OTIS, E. R.; SHIPKOWITZ, N.L.; DUFF, R.G. Photodynamic inactivation of influenza and herpes viruses by hematoporphyrin. **Antiviral Res** 7, 43-51(1987).
56. PIRKER, R.; FITZGERALD, D. J. P.; HAMILTON, T. C.; OZOLS, R. F.; WILLINGHAM, M. C.; PASTAN, I. Anti-transferrin receptor antibody linked to *Pseudomonas* exotoxin as a model immunotoxin in human ovarian carcinoma cell lines. **Cancer Res.**, v. 45, p. 751-757, 1985.
57. PRUITT JR., B.A.; MCMANNUS, A. T.; KIM, S.H.; GOODWIN, C.W. Burn wound infections: current status. **World J Surg**, v.22, p.135-145, 1998.
58. RAINEY, P.B.; TRAVISANO M. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. **Nature**, v. 394, p. 69-72, 1998.
59. RESZKA, K .J.; DENNING, G. M.; BRITIGAN, B. E. Photosensitized oxidation and inactivation of pyocyanin, a virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Photochem Photobiol** , v. 82, p. 466-473, 2006.
60. SALTON, M.R.J.; KIM, K-S. In: **Medical Microbiology**, 4th Edition, 1996.
61. SHARMA, M.; BANSAL, H.; GUPTA, P. K. Photodynamic inactivation of antibiotic resistance strain of *Pseudomonas aeruginosa* by porphyrins induced by aminolaevulinic acid. **Ind J Med Res**, v. 116, p. 99-105, 2002.
62. SHARMA, M.; BANSAL, H.; GUPTA, P. K. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue. **Curr Microbiol**, v. 50, p. 277-80, 2005.
63. SHERIDAN, R. Evaluation and management of the thermally injured patient. In: **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6th ed. New York: McGraw-Hill; p.1220-9, 2003.

64. SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L.; KINSELLA, T. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz J Med Biol Res**, v. 33/8, p. 869-880, 2000.
65. SIMPLÍCIO, F. I.; MAOINCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25/5, p. 801-807, 2002.
66. SONCIN, M.; FABRIS, C.; BUSETTI, A.; DEI, D.; NISTRI, D.; RONCUCCI, G.; JORI, G. Approaches to selectivity in the Zn (II)-phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. **Photochem Photobiol Sci**, v. 1, p. 815-819, 2002.
67. SPIERS, A. J.; KAHN, S. G.; BOHANNON, J.; TRAVISANO, M.; RAINEY, P. B. Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. Genetic and phenotypic bases of wrinkly spreader fitness. **Genetics**, v. 161, p. 33-46, 2002.
68. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54/17, p. 4151-4202, 1998.
69. SUÁREZ, C.; PEÑA, C.; TUBAU, F.; GAVALDÀ, L.; MANZUR, A.; DOMINGUEZ, M. A.; PUJOL, M.; GUDIOL, F.; ARIZA, J. Clinical impact of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. **J Infect**, v. 4, p. 285-90, 2009.
70. TAVARES, W.; MARINHO, L.A.C. In: **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 2a. ed, 2007.
71. TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 50-1, p. 196-203, 2006.
72. TEGOS, G.P.; MASAGO, K.; AZIZ, F.; HIGGINBOTHAM, A.; STERMITZ, F.R.; HAMBLIN, M.R. Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps Potentiate Antimicrobial Photoinactivation. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 52-9, p. 3202-3209, 2008.
73. TOFFOLI, D. J.; PRATES, R. A.; RIBEIRO, M. S.; HASHIMOTO, M. C. E.; COURROL, L. C. Effectiveness in total reduction of *Candida albicans* promoted by PDT with hypocrellin B:Lanthanum. **Procc SPIE**, v. 7380, p. 60, 2009.
74. TOFFOLI, D. J.; GOMES, L.; VIEIRA JR., N. D.; COURROL, L. C. Photodynamic potentiality of hypocrellin B and its lanthanide complexes. **J. Opt. A: Pure Appl. Opt.**, v.10, p.104026, 2008.
75. TSENG, S. P.; TENG, L. J.; CHEN, C. T.; LO, T. H.; HUNG, W. C. CHEN, H. J.; HSUEH, P. R.; TSAI, J. C. Toluidine blue O photodynamic inactivation on

multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Lasers Surg Med**, v. 41, p. 391-397, 2009.

76. 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**, v. 29, p. 165-73, 2001.

77. USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. **Lasers Surg Med**, v. 33, p. 311-319, 2003.

78. 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: Biol**, v. 71, p.87-98, 2003.

79. USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; USACHEV, Y. M.; SIEVERT, C. E.; BIEL, M. A. Interaction of the photobactericides methylene blue and toluidine blue with a fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells. **Lasers Surg Med**, v. 61, p. 40-55, 2008.

80. VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B. H. Cell-to-Cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Emerg Infect Dis**, v.4, 1998.

81. VENEZIO, F. R.; VINCENZO, C. D.; RANDALL, S.; REICHMAN, M.; ORIGINANO, T.; THOMPSON, K.; REICHMAN, O. H. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **J Infect Dis**, v. 151, n.1, 1985.

82. VOSTRUGINA, K.; GUDAVICIENE, D.; VITKAUSKIENE, A. Bacteremia in patients with severe burn trauma. **Med (Kaunas)**, v. 42(7), 2006.

83. WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; LAYCOCK, S. L.; WAREING, D. R.; WRIGHT, P. A. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Fems Microbiol Lett**, v. 160, p. 177-181, 1998.

84. WAINWRIGHT, M. ; PHOENIX, D. A.; MARLAND, J.; WAREING, D. R. A.; BOLTON, F. J. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **Fems Immunol Med Mcorbiol**, v. 19, p. 75-80, 1997.

85. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) – **J Antimicrob Chemother**, v. 42, p. 13-28, 1998.

86. WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chem Soc Rev**, v. 25, p. 351-359, 1996.

87. WAKAYAMA, Y.; TAKAGI, M.; YANO, K. Photosensitized inactivation of *E. coli* cells in toluidine blue-light system. **Photochem Photobiol**, v. 32, p. 601-605, 1980.

88. WAN, X. Y.; CHEN, Y. T. Hypocrellin A, a new drug for photochemotherapy. **Kexue Tongbao (English edition)**, v. 26, p. 1040-1042, 1981.
89. WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol** 25, 77-81(1992).
90. WILSON, M. ; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power light. **J Oral Pathol Med**, v. 22, p. 347-357, 1993.
91. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G.J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photossensitizer. **J Appl Bacteriol**, v. 78, p. 569-574, 1995.
92. ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W. M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 144, p. 274-278, 2001.
93. ZHOU, J.; LIU, J.; XIA, S.; WANG, X.; ZHANG, B. Effect of chelation to lanthanum ions on the photodynamic properties of hypocrellin A. **J Phys Chem B**, v. 109, p. 19529-35, 2005.
94. ZOLFAGHARI, P. S.; PACKER, S.; SINGER, M.; NAIR, S. P.; BENNETT, J.; STREET, C.; WILSON, M. *In vivo* killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. **BMC Microbiology**, v. 9:27 doi:10.1186/1471-2180-9-27, 2009.

