

ACÇÃO DA QUIMIOTERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM COLÓNIAS DE *ACTINOBACILLUS* *ACTINOMYCETEMCOMITANS*. UM ESTUDO *IN VITRO*.

Maria Valéria Abrahão¹, Andreza R. Simioni², Dr. Antônio Cláudio Tedesco², D^{ra}. Cristina Pacheco Soares¹

¹Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D/Lab. de Cultura de Células, UNIVAP R: Shishima Hifumi, 2911-Urbanova – Cep.12240-000 São José dos Campos - SP. Brasil, mariavaleriaabrahao@ig.com.br

²Universidade de São Paulo – FFCLRP -Campus Ribeirão Preto – Departamento de Química

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, Periodontite, GaAIs

Área do Conhecimento: IV – Ciências da Saúde

Resumo- A TFD é uma forma de destruição seletiva de células cancerosas, na qual uma droga fotossensibilizante é administrada de forma local ou sistêmica, sendo predominantemente retida por tecidos pré-malignos e malignos. A ciência de quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (QTFDA) ainda está no início, mas segue princípios semelhantes da Terapia Fotodinâmica. O presente trabalho apresenta uma avaliação da QTFDA *in vitro* com uma bactéria periodontal anaeróbica Gram-negativa, que apresenta eficientes estratégias para sua permanência e sobrevivência na bolsa periodontal. Resistente a muitos antibióticos e sem uma terapia efetiva totalmente. O objetivo foi analisar o efeito da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (QTFDA) usando o fotossensibilizante Cloroalúminio ftalocianina e o laser diodo GaAIs de 685nm (D = 2,6 J/cm², P= 22mW). Os resultados indicam uma eficiência no emprego da terapia podendo ter um resultado mais favorável no controle da viabilidade bacteriana.

Introdução

A Doença Periodontal é uma infecção inflamatória crônica que acomete um grande número de indivíduos jovens. A maioria dos processos são de longa duração com períodos de exacerbação e remissão, independentes da terapia usada, podendo até mascarar a gravidade do caso. As bactérias envolvidas apresentam alto grau de virulência e fatores complexos para a sua transmissibilidade.

O *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A .a.) é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica, predominante nas Periodontites Refratárias, nas de Rápida Progressão, Juvenil e outras. Apresenta resistência a maioria dos antibióticos como eritromicina [1], clindamicina [2], tetraciclina [3] etc. Provavelmente uma das explicações para o mau desempenho dos antibióticos é de não atingir níveis suficientes de concentração do fármaco nos fluidos subgengivais, além dos efeitos colaterais [1,4].

A Terapia Fotodinâmica é uma nova modalidade para o tratamento de câncer, micoses fungóides [5], verrugas, arteriosclerose, psoríase [6], degeneração macular da retina, restenoses [6], SIDA, herpes simplex 1 e 2, varicela zoster e infecções bacterianas [7]. Um novo termo foi proposto por Wainwright [8] quando se trata de

infecções localizadas. Ela tenta contornar os problemas das terapias convencionais, para essas patologias, que são às agressões as células saudáveis, que estão próximas das lesões. Para funcionar o sistema necessita de uma fonte de luz com um comprimento de onda específico, que é o laser; uma substância sensível a ela, que é um corante, que tem a capacidade de absorver a luz visível e, o oxigênio. Em nível molecular, nessa irradiação, ocorre a absorção de fótons pelo sensibilizador, que é convertido para um estado excitado. A seguir, a energia transferida para as moléculas vizinhas pode resultar na formação de oxigênio singleto, que é altamente tóxico para as células assim como as espécies reativas formadas (ânions superóxidos, peróxido de O₂, e radicais hidroxilas). Elas podem oxidar proteínas, ác. nucléicos, carboidratos, ác. graxos polinsaturados e promover a peroxidação de lipídeos principalmente com sítios de elevada densidade eletrônica (caráter eletrofílico do oxigênio singleto) tais como: colesterol, triptofano, guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídios insaturados [9,10].

Os primeiros corantes ou fotossensibilizantes utilizados na TFD (terapia fotodinâmica) eram uma mistura de derivados de hematoporfirinas. Essas

drogas apresentavam algumas desvantagens. Na tentativa de melhorar esses aspectos a 2^o. geração de fotossensibilizadores levou em consideração a toxicidade, a intensidade da absorção na região do vermelho, a hidrofobicidade, a hidrofiliabilidade, a estabilidade e parâmetros fotofísicos. As ftalocianinas são porfirinas sintéticas com sua porção pirrol condensada com um anel benzênico e ligadas por um átomo de Nitrogênio. Tem uma banda intensa de absorção entre 630 a 700nm. A AIPHCl (cloro alumínio ftalocianina) tem um tempo de vida longo no estado excitado singleto (\cong 3-8 ns) e o tempo de vida no estado tripleto é que produz um alto rendimento quântico [11]. Infelizmente ela é insolúvel em água ou em solventes biológicos, então a entrega desse produto na região é feita pelo lipossomo.

Lipossomo é uma pequena vesícula com estrutura de bicamadas concêntricas formadas de fosfolípidos em meio aquoso, semelhante a membrana celular, capaz de levar medicamentos para o interior da célula, protegendo a droga do metabolismo e inativação do plasma, podendo diminuir seus efeitos tóxicos e aumentar sua estabilidade.

O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade bacteriana frente a essa nova droga junto ao sistema de entrega, após irradiação com laser diodo GaAlAs.

Materiais e Métodos

Cepa Bacteriana- a cepa de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo b (ATCC 29522) foi gentilmente cedido pela Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ- através do Dr. Ivano de Filippis.

Como meio de cultura foi utilizado caldo BHI- Infusão de cérebro e coração (Difco 237500) acrescido de 1,8% de Extrato de Levedura (Difco 212750), completado com 1000ml de água ultrapura. Para cultura em ágar usou-se TSA – Ágar Soja Trypticaseína (Difco 236950), acrescido de 2.5% de Extrato de Levedura, completado com 1000ml de água ultrapura.

As bactérias foram inoculadas em 5 ml de BHI enriquecido e cultivadas por 48 a 72 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As culturas foram centrifugadas 5000 rpm por 10 min. A 4° C ressuspensa em tampão fosfato, pH 7,0 (PBS), até a Densidade Óptica 0,09 em comprimento de onda de 570nm (Spectra Count™ Parckard).

Parâmetros- λ 685nm; modo- contínuo; Densidade de Energia- 2,6 J/cm² ; Potência- 22mW Tempo- 1'15''; Área- 1cm².

Fotossensibilizador- AIPHCl (cloro alumínio ftalocianina) lipossomal foi preparada e doada gentilmente pela Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto – Departamento de Química- através do Dr. A . C. Tedesco, na concentração de 5,0 μ M/mL. O lipossomo tinha \cong 50 a 70nm e o preparo utilizou o método de injeção de etanol, descrito por Nunes e cols. O lípido usado foi DL - α - diestearil - fosfatidilcolina (DSPC) da Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA.

Irradiação - O laser utilizado foi um semiconductor com meio ativo de GaAsAl (Thera Lase – DMC, Brasil) λ 685nm para emissão de luz visível na região de vermelho do espectro eletromagnético. A fibra óptica AN 0,39 \pm 0,01 e \varnothing do núcleo 600 \pm 5 μ m. A distância entre a fibra e o experimento foi de 3 cm. Para a irradiação da cultura utilizou-se placas de 96 poços em quadruplicata. A suspensão bacteriana foi incubada com 200 μ l da AIPHCl lipossomal por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O fotossensibilizante foi removido por centrifugação eo pellet formado ressuspenso em 200 μ l de PBS. Para o experimento foram divididos quatro grupos com quatro poços cada.

1° Grupo recebeu o fotossensibilizante.

2° Grupo foi o controle

3° Grupo apenas foi irradiado com o laser vermelho.

4° Grupo participou com a técnica do QTFDA, recebendo o fotossensibilizante e a aplicação do laser vermelho, promovendo assim a TFD.

Após os procedimentos acima citados, retirou-se 100 μ l + 100 μ l de BHI. Desta suspensão, retirou-se 10 μ l que foram semeados na superfície de uma placa de Petri contendo TSA enriquecido, usando uma alça de Drigalsky esterilizada. Incubou-se por 72h. em estufa de CO₂.

Análise dos Resultados - A avaliação do crescimento das colônias foi realizada através da contagem de unidades formadoras de colônias (CFU).

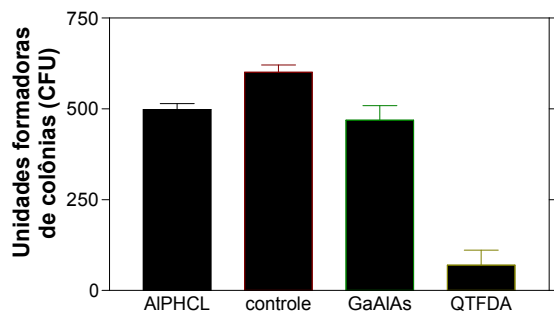
Fig. 1 – Laser para aplicação de quimioterapia fotodinâmica



Resultados

Depois da incubação procedeu-se a contagem de unidades formadoras de colônias

Figura 2 – Valores de ufc / experimentos



Observando a Fig. 2 nota-se que o Grupo 1 foi o que sofreu apenas a aplicação do corante a cloro alumínio ftalocianina lipossomal e que teve uma diminuição dada provavelmente pelo lipossomo. O Grupo 2 foi o controle, o Grupo 3 teve apenas a aplicação do laser vermelho com uma queda no gráfico e o Grupo 4 apresentou eficiência na técnica proposta de QTFDA.

Discussão

Trabalhos com QTFDA (Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana) usando ftalocianina

similar irradiada com GaAs em microorganismos da placa supra gengival apresenta resultados semelhantes [12]. Vários trabalhos [13,14] têm mostrado a mesma similaridades aqui propostas, embora nenhum tenha usado o veículo lipossomal e aí esta a diferença pelo fato de ter encontrado um número mais favorável e efetivo na eliminação da bactéria .

Os dados levantados neste estudo sugere a possibilidade de um novo fotossensibilizador para a técnica da Terapia Fotodinâmica e ainda vem proporcionar mais uma terapia periodontal adjuvante com resultados mais expressivos do que as convencionais e a resistência antibiótica.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ivano de Filippis da FIOCRUZ pela doação da cepa bacteriana.

Referências

- [1] GORDON J.M, WALKER C.B. Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal-disease. **Journal of Periodontology**,v.64(8),p. 760-771, Suppl. S. Aug 1993.
- [2] SLOTS J. ET AL., *In vitro* antimicrobial susceptibility of *actinobacillus actinomycetemcomitans* . **Antimicrob. Agents Chemother.** v.18, p.9-12,1980
- [3] LISGARTEN,M.A. et al.. Effect of tetracycline and /or scaling on human periodontal disease.Clinical, microbiological and histopathological observations. **J. Clin Periodontol** ,v.5, p.246-271, 1978
- [4] COSTERTON J.W, STEWART P.S, GREENBERG E.P.,Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections.**Science**, v.284 (5418), p.1318-1322 ,May 21, 1999.
- [5] WOLF P., et al, **J. Am. Acad. Derm.** v .31,p.678,1994.
- [6] LEVY J.G.;**Trends in Biotechnol.** v.13, p.14, 1995.
- [7] VAN DER MUELEN,F.W.; et al. **J.Photochem. Photobiol** .v.B40, p.204, 1997.

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

[9] STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. **Tetrahedron**, v. 54, p.4151, 1998.

[10] MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e perspectivas . **Quim. Nova** . v.23, p.237, 2000

[11] RUCH A.; et al. Dynamic fluorescence changes during photodynamic therapy in vivo and in vitro of hydrophilic Al (III) phthalocyanine tetrasulphonated and lipophilic Zn (II) phthalocyanine administered in liposomes. **J. Photochem. Photobiol. B, Biology**, v.36, p.127-134, 1996.

[12] WILSON M et al. Bacteria in supragingival samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Appl Bacteriol** , v.78,n.5,p.569-74, May 1995.

[13] WILLSON M.; et al, Sensibilization of periodontopathogenic to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol. Immunol.** v.8, p.182-187, 1993.

[14] BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. **J. Dent.** v.22, p.273-278