

JOÃO ALVES DOS REIS JÚNIOR

**Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) Associada
ou não a Fototerapia LASER em Osteomielite Induzida por
Staphylococcus aureus: Estudo Microbiológico e
Histológico**



PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Área de Concentração: Laser em Odontologia

Salvador

2014

JOÃO ALVES DOS REIS JÚNIOR

Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) Associada ou não a Fototerapia LASER em Osteomielite Induzida por *Staphylococcus aureus*: Estudo Microbiológico e Histológico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia UFPB-UFBA, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Laser em Odontologia

Linha de pesquisa: Laser em processos infecciosos

Orientadores: Prof. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, PhD

Prof. Dr. Paulo Fernando Almeida

SALVADOR

2014

JOÃO ALVES DOS REIS JÚNIOR

**Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) Associada ou não a Fototerapia LASER
em Osteomielite Induzida por *Staphylococcus aureus*: Estudo Microbiológico e
Histológico**

Salvador, 12 de Fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Antônio Luiz B. Pinheiro, PhD – Orientador – UFBA

Prof. Doutor Jean Nunes dos Santos - UFBA

Prof. Doutor Paulo Fernando de Almeida - UFBA

Prof. Doutor Aldo Brugnera Júnior– Membro UNICASTELO

Prof^a. Doutor Fátima Antonia Aparecida Zanin– Membro UNICASTELO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu pai, **João Alves dos Reis** (*in memoriam*), verdadeira fonte de inspiração para esta pesquisa e pelo seu exemplo de bondade e garra pela vida.

A minha mãe, **Suze Alves Neves dos Reis**, e a minha irmã **Larissa Neves dos Reis**, pelo carinho e incentivo constante, por muitas vezes terem renunciado em prol de meus estudos, e por acreditarem, incondicionalmente, na minha formação pessoal e profissional.

Ao meu orientador, **Antônio Pinheiro**, pelos ensinamentos e confiança desde a graduação, instigando sempre a pesquisa através de seu exemplo e por vibrar com o crescimento e as conquistas do grupo.

À **Marta Cecília**, minha noiva e companheira de todas as horas, pelo amor, carinho e cuidado para comigo. Sendo sempre minha fonte de tranquilidade nos momentos difíceis e a luz das minhas alegrias.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me abençoar e acompanhar todos os dias da minha vida, estando sempre presente nos momentos de angústia e conquistas.

Aos meus tios, **Damiana Soraya e Cauby Andrade**, por me receber como filho, pelos ensinamentos constantes e pelo exemplo de vida.

A minha afilhada, **Catharina Andrade**, pela alegria e inocência sempre tornando meus dias mais fáceis.

Ao **Prof. Paulo Almeida**, que gentilmente orientou a etapa microbiológica deste trabalho e abriu as portas do laboratório (LABEM) com toda atenção e dedicação da sua equipe.

Ao **Prof. Jean Nunes**, pelo carinho e disponibilidade em ajudar na execução deste trabalho, sempre atencioso e verdadeiro.

A colega, **Patrícia Assis**, verdadeiro anjo que Deus colocou no meu caminho, sempre disponível e presente me auxiliando na realização desta pesquisa.

Aos meus colegas de Doutorado, **Cristiane Becher, Guilherme Pinheiro, Isabele de Castro, Fabiola Carvalho e Joubert Aciole**, que compartilharam comigo todos os desafios e alegrias vividos durante o curso, levo vocês para sempre em meu coração.

A amiga, **Gardênia Paraguassú**, pela vibração sempre constante e por ensinar que apesar de altos e baixos a amizade verdadeira se perpetua.

Aos **estagiários do Centro de Biofotônica da FOUFBA**, em especial, **Renan Trindade e Bruna Barreto**, pela valiosa colaboração e apoio, imprescindíveis à realização das atividades.

A todos os **professores do Programa Integrado de Pós-Graduação UFPB-UFBA**, que colaboraram para formação acadêmica e profissional.

Aos **funcionários da FOUFBA**, que de maneira direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

Ao **CAPES** pela colaboração científica e financeira, apoiando às atividades acadêmicas e o desenvolvimento de profissionais cada vez mais capacitados.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Meu MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.2 Osteomielite	20
2.3 Terapia Fotodinâmica (TFD) / (TFDa)	23
2.3.1 Fontes de Luz na Terapia Fotodinâmica	24
2.3.2 Fotossensibilizador	25
2.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)	29
2.5 Fototerapia Laser	34
3 PROPOSIÇÃO	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4 MATERIAS E MÉTODOS	37
4.1 Delineamento da Pesquisa	37
4.2 Configuração da Amostra	37
4.3 Distribuição dos grupos	38
4.4 Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
4.5 Determinação da Curva de Crescimento do <i>S. aureus</i>	42
4.6 Determinação da Concentração do Fotossensibilizador e Densidade de Energia Eficaz para a TFDa	44
4.7 Confecção do Defeito Ósseo	47
4.8 Indução da Osteomielite	49
4.9 Tratamentos	49
4.9.1 Solução Salina	50
4.9.2 Laser vermelho	50
4.9.3 Fotossensibilizador	50
4.9.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)	51
4.9.5 Fototerapia Laser	52
4.10 Preparo das Amostras para Estudo Histológico	52
4.11 Critérios para Análise Microscópica	53
4.12 Coleta da Amostra para Estudo Microbiológico	54
4.13 Análise estatística	56

5 RESULTADOS	57
5.1 Análise Microbiológica	57
5.1.1 Estudo <i>in vitro</i>	57
5.1.2 Estudo <i>In vivo</i>	59
5.2 Macroscopia e Análise Histológica	60
5.2.1 Grupo Controle Indução Osteomielite	60
5.2.2 Grupo Controle	61
5.2.3 Grupo Salina	62
5.2.4 Grupo Salina + Fototerapia	63
5.2.5 Grupo Laser vermelho	64
5.2.6 Grupo Laser vermelho + Fototerapia	65
5.2.7 Grupo Fotossensibilizador	66
5.2.8 Grupo Fotossensibilizador + Fototerapia	67
5.2.9 Grupo TDFa	68
5.2.10 Grupo TFDa + Fototerapia	69
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	
ANEXO	

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01	Distribuição dos grupos para estudo histológico (REIS JUNIOR, 2014)	38
Quadro 02	Distribuição dos Grupos para Estudo Microbiológico <i>in vivo</i> (REIS JUNIOR, 2014)	38
Quadro 03	Procedimentos de cada grupo do Estudo Histológico (REIS JUNIOR, 2014)	39
Quadro 04	Procedimentos de cada Grupo do Estudo Microbiológico <i>in vivo</i> (REIS JUNIOR, 2014)	41
Tabela 01	Resultado da contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> nos diferentes tempos para determinação da curva de crescimento (REIS JUNIOR, 2014)	44
Tabela 02	Critérios utilizados para análise semi-quantitativa de microscopia óptica (REIS JUNIOR, 2014)	54
Tabela 03	Médias e desvios-padrão da contagem bacteriana <i>in vitro</i> (IC 95%) (REIS JUNIOR, 2014)	58
Tabela 04	Médias e desvios-padrão de contagem bacteriana <i>in vivo</i> (IC 95%) (REIS JUNIOR, 2014)	59
Tabela 05	Sinopse descritiva da análise histológica, no período de 30 dias (REIS JUNIOR, 2014)	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Região da tíbia tricotomizada (REIS JUNIOR, 2014)	48
Figura 02	Exposição óssea para confecção do defeito ósseo (REIS JUNIOR, 2014)	48
Figura 03	Defeito ósseo com ϕ 2mm de diâmetro (REIS JUNIOR, 2014)	48
Figura 04	Inoculação da bactéria (REIS JUNIOR, 2014)	49
Figura 05	Aspecto clínico após 15 dias da indução da osteomielite (REIS JUNIOR, 2014)	49
Figura 06	Aplicação de 100 μ L do corante ATO sobre a ferida óssea (REIS JUNIOR, 2014)	51
Figura 07	TDFa com Laser de λ 660nm, com potência de 40mW, densidade de energia de 10 J/cm ² , t= 250s (REIS JUNIOR, 2014)	51
Figura 08	Resultados de todos os grupos experimentais <i>in vitro</i> (REIS JUNIOR, 2014)	58
Figura 09	Aspecto clínico após a indução da osteomielite evidenciando a presença de fístula com exsudato purulento e edema (REIS JUNIOR, 2014)	60
Figura 10	Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo ao lado de microabcessos extensos (REIS JUNIOR, 2014)	60
Figura 11	Aspecto clínico da ferida do grupo Controle (REIS JUNIOR, 2014)	61
Figura 12	Fotomicrografia mostrando ferida cirúrgica completamente preenchida por tecido ósseo neoformado e trabéculas ósseas delgadas. (REIS JUNIOR, 2014)	61
Figura 13	Aspecto clínico da ferida após tratamento do grupo Salina evidenciando presença de fístula com exsudato purulento acompanhado de formação de crosta e edema (REIS JUNIOR, 2014)	62
Figura 14	Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo ao lado de microabcessos extensos (REIS JUNIOR, 2014)	62
Figura 15	Aspecto clínico da ferida após tratamento do grupo Salina associado a fototerapia Laser (λ 780nm) evidenciando presença de edema e formação de crosta (REIS JUNIOR, 2014)	63
Figura 16	Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo ao lado de microabcessos extensos. (REIS JUNIOR, 2014)	63
Figura 17	Aspecto clínico da ferida após tratamento do grupo Laser vermelho evidenciando presença de fístula com exsudato	64

	purulento acompanhado de formação de crosta e edema (REIS JUNIOR, 2014)	
Figura 18	Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo acompanhados de abscessos e inflamação crônica, seguido por faixa espessa ou não de tecido ósseo neoformado caracterizado por trabéculas ósseas espessas ou não, com osteócitos no interior, linhas basofílicas irregulares permeadas por marcante inflamação crônica. (REIS JUNIOR, 2014)	64
Figura 19	Aspecto clínico da ferida após tratamento do grupo Laser vermelho associado a fototerapia Laser (λ780nm) evidenciando presença de fístula acompanhada de exsudato purulento e edema (REIS JUNIOR, 2014)	65
Figura 20	Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo com osteomielite secundária acompanhada ou não de abscessos, sempre seguido de neoformação óssea composta por trabéculas ósseas de espessura variável, com osteócitos no interior, linhas basofílicas paralelas ou não à superfície e permeadas por inflamação crônica discreta (REIS JUNIOR, 2014)	65
Figura 21	Aspecto clínico após tratamento do grupo Fotossensibilizador evidenciando presença de edema e formação de crosta (REIS JUNIOR, 2014)	66
Figura 22	Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo acompanhado de abscesso e inflamação crônica marcante (REIS JUNIOR, 2014)	66
Figura 23	Aspecto clínico após tratamento do grupo Fotossensibilizador associado a fototerapia Laser (λ780nm) evidenciando presença de fístula com exsudato purulento acompanhado de edema (REIS JUNIOR, 2014)	67
Figura 24	Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo acompanhado de abscesso e inflamação crônica marcante (REIS JUNIOR, 2014)	67
Figura 25	Aspecto da cicatrização após o tratamento no Grupo TFDa apresentando ferida totalmente fechada e límpida (REIS JUNIOR, 2014)	68
Figura 26	Fotomicrografia mostrando feridas cirúrgicas completamente cobertas por osso neoformado, caracterizado por trabéculas ósseas de espessura variável, interconectantes ou não, que exibiam linhas basofílicas paralelas entre si, osteócitos regulares, e por vezes, osteoblastos em superfície (REIS JUNIOR, 2014)	68

- Figura 27 Aspecto da cicatrização após o tratamento no Grupo TFDa associado a fototerapia ($\lambda 780\text{nm}$) apresentando ferida totalmente fechada e límpida (REIS JUNIOR, 2014) 69
- Figura 28 Fotomicrografia mostrando feridas cirúrgicas completamente substituídas por osso neoformado, caracterizado por trabéculas ósseas de espessura variável e interconectantes (REIS JUNIOR, 2014). 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AsGaAl	Arseneto de Gálio e alumínio
AsGaPI	Arseneto de Gálio Fósforo e índio
ATP	Adenosina-trifosfato
ATO	Azul de Toluidina O
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
Cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
CW	<i>Continuous wave</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
FS	Fotossensibilizador
g	Gramas
g%	Gramas de soluto
h	Horas
HE	Hematoxilina-eosina
InGaAl	Índio Gálio e Alumínio
J/cm ²	Joules por centímetros quadrados
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
mW	Miliwatts
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> = Solução tampão Fosfato salina
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i> = Ágar Trypticase de Soja
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> = Caldo Trypticase de Soja
UFC	Unidade Formadora de colônia
UFC/mL	Unidade Formadora de colônia por mililitro
UI	Unidade internacional
µg/mL	Micro grama por mililitros
λ	Comprimento de onda
µm	Micrometro
Φ	<i>Spot</i>

RESUMO

Osteomielite é um processo inflamatório agudo ou crônico nos espaços medulares ou nas superfícies corticais do osso e pode estar associado com infecções bacterianas ou fúngicas. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) a laser é um tratamento baseado na reação fotoquímica citotóxica que resulta em uma série de reações metabólicas que culminam na morte bacteriana. O objetivo do presente estudo randomizado foi avaliar, *in vitro* e *in vivo*, através de análise microbiológica e histológica, os efeitos da TFDa em defeitos ósseos cirúrgicos em tíbias de ratos infectados por *Staphylococcus aureus* com tempo de observação de 0 e 30 dias após o tratamento. No estudo *in vitro*, um laser de diodo (λ 660 nm; 40 mW; \varnothing = 0,04 cm², 5 ou 10 J/cm²) e concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL do Azul de Toluidina foram testados e o melhor parâmetro escolhido para o estudo *in vivo*. A concentração de 5 µg/mL foi escolhida para realizar a descontaminação da infecção por *Staphylococcus aureus* nos defeitos ósseos. Nos grupos tratados com Fototerapia utilizou-se o laser (λ = 780 nm, P = 70 mW, CW, 16,8 J/cm² por sessão, t= 240s, divididos em quatro pontos NSLO de 4,2 J/cm², 134,4 J/cm² por tratamento). Os protocolos de irradiação foram realizados a cada 48 horas durante 15 dias. Os resultados foram submetidos à análise estatística. Para todos os grupos TFDas do estudo microbiológico *in vitro*, houve redução significativa ($p < 0,001$) na quantidade de bactérias com as diferentes concentrações do fotossensibilizador. No estudo microbiológico *in vivo*, no tempo 0, o grupo TFDa apresentou redução bacteriana de 97,4 % ($p < 0,001$). Já no tempo de observação de 30 dias, observou-se redução bacteriana de mais de 99,9% ($p < 0,001$). No estudo histológico, observou-se que os grupos tratados com TFDa demonstraram presença intensa de osteócitos e ausência de sequestro ósseo e de micro abscessos. A TFDa com azul de toluidina foi eficaz na redução da contagem de *Staphylococcus aureus* possibilitando um reparo ósseo de melhor qualidade.

Palavras-chave: Infecção óssea; Infecção Bacteriana; Terapia fotodinâmica antimicrobiana.

ABSTRACT

Osteomyelitis it is an acute or chronic inflammation in the marrow spaces in the superficial or cortical bone, and can be associated with bacterial or fungal infections. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) is a treatment based on a cytotoxic photochemical reaction that induces a series of metabolic reactions and culminates in the bacterial killing. The aim of the present randomized study was to evaluate, by *in vitro* and *in vivo* microbiological and histological analysis, the effects of PACT on tibial surgical bone defects in rats infected by *Staphylococcus aureus* using bacterial counts at both prior and 30 days after treatment as outcome measure. In the *in vitro* study a diode laser (λ 660 nm; 40mW; \varnothing = 0.04 cm²; 5 or 10 J/cm²) and 5, 10 and 15 μ g/mL toluidine blue were tested and the best parameter chosen for the *in vivo* study. The concentration of 5 μ g/mL was selected to perform the decontamination of infected by *Staphylococcus aureus* tibial bone defects in rats. In the groups treated with phototherapy was used laser (λ =780nm, P=70mW, CW, 16,8 J/cm², t= 240s, divided into four points of 4,2 J/cm² per session, 134,4 J/cm² per treatment). The irradiation protocols were performed every 48 hours during for 15 days. The findings were subjected to statistical analysis. For all PACTs groups microbiological study *in vitro* there were significant reductions ($p < 0.001$) in the amount of bacteria with different concentrations of the photosensitizer. On the microbiological study *in vivo* study, immediate time, the PACT group presented a bacterial reduction of 97.4% ($p < 0.001$). In the observation time of 30 days, there was a bacterial reduction of more than 99.9 % ($p < 0.001$). In the histological study, it was observed that the PACT groups demonstrated presence intense of osteocytes and absence of bone sequestration and micro-abscesses. The PACT using toluidine blue was effective in reducing the number of *Staphylococcus aureus* enabling a better quality bone repair.

Keywords: Bone infection; Bacterial infection; Photodynamic antimicrobial chemotherapy.

1 INTRODUÇÃO

A osteomielite caracteriza-se por uma inflamação de origem infecciosa que invade os espaços medulares do osso, podendo atingir a cortical óssea e o periósteo e resultar em colapso vascular, estase venosa e isquemia (NEVILLE, 2009). Deste modo, o osso torna-se avascular, o que facilita o acúmulo de micro-organismos e a persistência de pus no local, permitindo a ocorrência de fístulas e abscessos mucosos ou cutâneos (PETERSON, 2008).

As bactérias infectam o osso através da corrente sanguínea ou pelo contato direto com o defeito ósseo (PETERSON, 2008). Essa condição afeta de 5% - 50% dos casos de fraturas, sendo menos de 1% em fraturas com fio e 5% dos casos de doenças agudas hematológicas (MUNHOZ LIMA; ZUMIOTTI, 2007).

O principal problema de uma infecção crônica do osso é a persistência prolongada de micro-organismos patogênicos. *Staphylococcus aureus* é o agente mais isolado nessa condição, mas a presença de outros organismos, especialmente bactérias Gram-negativas e bactérias anaeróbias, têm sido cada vez mais relatada (MUNHOZ LIMA; ZUMIOTTI, 2007).

As terapias mais comumente utilizados incluem a utilização de antibióticos, com ou sem o debridamento cirúrgico do osso necrótico, a fim de possibilitar a revascularização do osso (BISLAND et al. 2006). A longo prazo, a utilização de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana, o que leva à necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento da osteomielite (GOTO et al. 2011).

Deste modo, a ação antimicrobiana de alguns lasers tem sido investigada por usar uma abordagem conhecida como fotossensibilização letal (FSL) ou terapia

fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Nesta terapia, a luz emitida por um laser de baixa potência ativa um fotossensibilizador (FS) e leva à liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). O aumento dos níveis de EROs pode causar morte celular por esgotar as moléculas de ATP e de peroxidação lipídica (WAINWRIGHT et al. 1998).

Uma das vantagens da TFDa, consiste no fato de a aplicação tópica do FS na área infectada possibilitar o contato direto dessa substância com o microrganismo, sem afetar a pele e a membrana mucosa do hospedeiro (TEICHERT et al. 2002). Todavia, vale ressaltar a importância de se trabalhar com o FS em concentrações mais baixas e eficazes, no intuito de reduzir a toxicidade através da seleção de níveis terapêuticos adequados, com mínima morbidez para o indivíduo, visto que sua concentração habitual geralmente é alta para levar à saturação dos sítios de ligação do FS.

A fototerapia laser nos comprimentos de onda no infravermelho próximo está sendo utilizadas, em várias condições e em vários tipos de defeitos ósseos. Recentemente, diversos estudos têm obtido resultados positivos com o seu uso (GERBI et al. 2008; PINHEIRO et al. 2009, 2010, 2012).

Estudos prévios (BISLAND et al. 2006; TARDIVO; BATISTA, 2009; GOTO et al. 2011) avaliaram, *in vitro* e *in vivo*, os efeitos da TFDa na osteomielite e apresentaram resultados promissores. Entretanto, nenhum protocolo bem definido tem sido estabelecido na literatura e nem a sua associação com a fototerapia Laser. O objetivo do presente estudo foi avaliar, através de análises microbiológicas e histológicas, os efeitos da TFDa associada ou não a fototerapia Laser em osteomielite induzida por *Staphylococcus aureus* em tíbias de ratos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são cocos Gram e catalase positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversos arranjos, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), devido a sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares (CASSETARI et al. 2005).

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, visto que essa bactéria é significativamente capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira. Esse microrganismo pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, sendo o próprio homem seu principal reservatório, albergando-o em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005). Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de ambientes hospitalares (CARVALHO et al. 2005).

O *S. aureus* encontrado nas fossas nasais ou na pele de neonatos, crianças e adultos pode, a partir desses sítios, alcançar outras regiões da pele e das mucosas. Caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *S. aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local (ROBERT; CHAMBERS, 2005).

As doenças provocadas pelo *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, exclusivamente, ser devidas às toxinas que produz (SCHECHTER; MARANGONI, 1998). Por sua vez, a bacteremia pode levar à formação de abscessos metastáticos, particularmente em pele, tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins e cérebro, além de causar infecções em sítios anatômicos distantes, como endocardites, piodartrites e osteomielites (CASSETARI et al. 2005).

O *S. aureus* também é a bactéria mais comum em infecções ósseas, artrites sépticas e infecções de próteses ósseas. Essas infecções se caracterizam pela dificuldade de tratamento, que pode incluir intervenções cirúrgicas e longos períodos de antibioticoterapia. A relação do *S. aureus* com infecções ósseas está no fato de essa bactéria ser capaz de expressar numerosas proteínas de superfície denominadas adesinas, que permitem a adesão aos componentes da matriz óssea (fibronectina), laminina, colágeno, entre outros. Algumas cepas de *S. aureus* podem sobreviver intracelularmente em osteoblastos, às vezes metabolicamente inativas, tornando-se tolerantes a ação dos antibióticos. Além disso, o *S. aureus* pode formar biofilmes na superfície de materiais estranhos ao organismo, como cateteres endovenosos e próteses, que funcionam como locais protegidos contra a ação de antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro (DAVIS, 2005).

Ao final da década de 1930 foram encontradas as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes. A resistência do *S. aureus* aos antibióticos desenvolve-se por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes. Geralmente, a resistência que ocorre por mutação gera uma alteração no sítio de ação do antibiótico,

enquanto a resistência por aquisição de genes de resistência frequentemente envolve a inativação ou a destruição da droga, sendo transmitida por plasmídeos e transposons (LIMA et al. 2005). Estudos genéticos demonstram que a atual prevalência de SAMR (*S. aureus* resistente à meticilina) resultou principalmente da disseminação de alguns clones, com a descrição de apenas cinco clones no mundo. Atualmente, para a investigação de surtos, podem-se utilizar as caracterizações fenotípica e genotípica para avaliação da disseminação dessas cepas (BERNARD et al. 2004).

2.2 Osteomielite

A osteomielite, usualmente uma infecção bacteriana, pode ser um processo inflamatório agudo ou crônico nos espaços medulares ou nas superfícies corticais do osso que se estende além do sítio inicial de envolvimento (NEVILLE, 2009).

A osteomielite aguda ocorre quando um processo inflamatório agudo se estende através dos espaços medulares do osso e o tempo é insuficiente para o corpo reagir em presença do infiltrado inflamatório. Evolui ao longo de dias a algumas semanas e pode ser curada apenas com antibióticoterapia. A osteomielite crônica, por outro lado, é uma infecção persistente e recorrente, que evolui ao longo de meses a anos, sendo caracterizada pelo baixo grau de inflamação, presença de sequestros ósseos, aposição óssea e trato fistuloso (NORDEM, 1999). O espaço morto atua como reservatório para as bactérias, o que dificulta a ação de antibióticos nesta região. Este processo resulta em uma infecção latente, difícil de

ser resolvida, a menos que o problema seja tratado agressivamente (NEVILLE, 2009).

As osteomielites crônicas representam um grande problema de saúde, decorrente da importante morbidade, embora associada à baixa mortalidade. Esta infecção ocorre em aproximadamente 5%-50% das fraturas expostas, menos de 1% das fraturas fechadas com osteossíte e em 5% dos casos de doença hematogênica aguda (MUNHOZ LIMA; ZUMIOTTI, 2007).

Segundo Peterson (2005), o processo que leva à osteomielite é iniciado por uma inflamação aguda da cavidade medular dos sistemas de Harvers e se estende para envolver o periósteo da área afetada, resultando em colapso vascular, estase venosa e isquemia. Com isso, o osso torna-se avascular e facilita o acúmulo de micro-organismos, com persistência do pus no local, favorendo o surgimento de fístulas e abscessos mucosos ou cutâneos.

O principal problema da infecção crônica dos ossos é a persistência prolongada de micro-organismos patogênicos (ZULUAGA et al. 2006). Os biofilmes bacterianos também podem se desenvolver ao longo da superfície de dispositivos, tais como aqueles usados para fixação interna de uma fratura, e estão envolvidos na patogênese da osteomielite (FANG; GALIANO, 2009). Embora todos os patógenos possam infectar o osso, no caso das osteomielites, o *Staphylococcus aureus* provoca a grande maioria das infecções. Em menor escala, têm-se as enterobactérias e *P. aeruginosa* coagulase-negativos, além de outros como as espécies de *Enterococcus*, *Streptococcus*, micro-organismos aeróbios, anaeróbios e fungos (ZULUAGA et al. 2006).

Doenças crônicas sistêmicas, situação de imunocomprometimento e doenças associadas com diminuição de vascularização do osso parecem predispor à osteomielite. Em adição, o uso do tabaco, o abuso do álcool e de drogas intravenosas, diabete mellitus, febre exantemática, malária, anemia, má nutrição, doenças malignas e a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) têm sido também associados ao aumento da frequência da osteomielite (PARSONS; STRAUSS, 2004).

O tratamento para a osteomielite inclui uma drenagem adequada, debridamento completo, obliteração do espaço morto, proteção da ferida e cobertura antibiótica direcionada para a cultura de bactérias isoladas (PARSONS; STRAUSS, 2004). Embora a terapia antibiótica constitua um importante componente do tratamento da osteomielite, vale ressaltar que as áreas de sequestros ósseos, que se formam no curso da osteomielite crônica, não são alcançadas de forma adequada pela perfusão de antibióticos sistêmicos em concentrações suficientes. Mesmo nas zonas circundantes do osso vivo, o tecido é ainda comprometido pela hipoperfusão relativa resultante do processo inflamatório, que prejudica o fluxo de sangue dentro dos canais vasculares (FANG; GALIANO, 2009).

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) tem, talvez, a mais longa história de eficácia relatada no tratamento de casos refratários de osteomielite (PARSONS; STRAUSS, 2004). A aceitação de seu uso tem crescido, embora a controvérsia ainda permaneça devido ao fato de ainda não existir estudos clínicos de alta qualidade (FANG; GALIANO, 2009). Os fatores de crescimento, tais como as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), têm sido extensivamente estudados

quanto aos seus efeitos na modulação da osteogênese. Poucos estudos em modelos animais evidenciam o seu potencial como auxiliares terapêuticos na osteomielite, sendo necessário mais estudos para determinar a sua eficácia clínica (CHEN et al. 2006). Recentemente, outras terapias têm sido investigadas no tratamento da osteomielite, a exemplo, da TFDa (TARDIVO; BAPTISTA, 2009; BISLAND et al. 2006; GOTO et al. 2011), apresentando resultados promissores, embora sua base literária seja ainda muito restrita.

2.3 Terapia Fotodinâmica (TFD) / TFDa

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica empregada principalmente para o tratamento do câncer e tem ganhado, cada vez mais, destaque no cenário nacional e internacional por obter avanços no tratamento desta enfermidade (MACHADO, 2000). Esta terapia também possui o potencial de promover a destruição de micro-organismos. Neste caso, ela é denominada como terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), Inativação Fotodinâmica (PDI, do Inglês, *Photodynamic Inactivation*) ou quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT, *photodynamic antimicrobial chemotherapy*), e vem sendo testada contra uma série de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DONNELLY et al. 2008), fungos (CASSIDY et al. 2009) e vírus (GRINHOIC et al. 2008).

A TFD envolve três componentes: a luz, um fotossensibilizador (FS) e o oxigênio. As fontes de luz tradicionalmente utilizadas são as lâmpadas, os Lasers e sistemas à base de diodo emissor de luz (LED) (GRANT et al. 1997; BIEL, 2002). Contudo, para que ocorra a ativação do fotossensibilizador, é necessário que o comprimento de onda da luz seja específico ao corante utilizado (SALVA, 2002).

Trata-se de um tratamento baseado em uma reação fotoquímica citotóxica, na qual, uma luz intensa ativa um fotossensibilizador absorvido pelas células, resultando em uma série de reações metabólicas que culminam em sua morte (MACHADO, 2000).

2.3.1 Fontes de Luz na Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) e a TFDa requerem uma fonte de luz para ativar o fotossensibilizador por meio da exposição à luz visível de baixa potência no comprimento de onda específico. A maioria dos FS são ativados pela luz vermelha entre $\lambda 630$ e $\lambda 700\text{nm}$, que corresponde à profundidade de penetração de luz a partir de 0,5 até 1,5 centímetros (SALVA, 2002).

A emissão das lâmpadas abrangem quase toda a luz visível e início do infravermelho, poupando, quase totalmente, a radiação ultravioleta (UV). Lâmpadas halógenas metálicas são amplamente usadas, pois são mais baratas e possui alta irradiância, que mantém a exposição da luz constante e promove uma TFD não muito longa. (PIACQUADIO et al. 2004).

Ao contrário das lâmpadas, os Lasers fornecem luz em comprimento de onda específico que pode ser compatível com o principal espectro de absorção do agente fotossensibilizante, além de um feixe de luz bastante homogêneo. Os principais Lasers são os de hélio-neônio ($\lambda 633$ nm), arseneto de gálio e alumínio ($\lambda 630-690$, $\lambda 830$ ou $\lambda 906$ nm) e argônio ($\lambda 488-514$ nm) (JUZENIENE et al. 2004; CALZAVARA-PINTON et al. 2007). O seu uso permite a realização da TFD de forma mais rápida, pois emitem alta fluência de luz monocromática que

corresponde ao pico de absorção do agente. Porém, são aparelhos de alto custo, não são portáteis, demandam mais assistência técnica e iluminam apenas pequenas áreas da pele (CALZAVARA-PINTON et al. 2007).

Os diodos emissores de luz (*Light Emitting Diode* ou *LED*) são aparelhos compostos por semi-condutores sólidos ligados entre si e que geram luz. Fornecem uma fonte de luz confiável em faixas estreitas de bandas de luz (entre $\lambda 20$ e $\lambda 50$ nm) e podem promover a iluminação de uma superfície ampla e homogênea. Além disso, possuem menor custo e um baixo componente térmico (KALKA et al. 2000; CALZAVARA-PINTON et al. 2007).

2.3.2 Fotossensibilizador

Os fotossensibilizadores (FS) são substâncias sensíveis à luz e de fundamental importância para a ação da TFD, pois apresentam espectro de absorção ressonante ao espectro visível de uma determinada fonte de luz, o que ocasiona a morte microbiana ou necrose celular. Isto se deve ao fato de o FS excitado reagir com o substrato biológico, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres, além de possuir alta seletividade em se associar às células-alvo (MACHADO, 2000).

Desta forma, cada tipo de FS utilizado na TFD possui um comprimento de onda ideal para a sua excitação. Sabe-se que a radiação de comprimento de onda menor sofre maior espalhamento e a presença de cromóforos endógenos nos tecidos, que absorvem comprimentos de onda menores, principalmente a hemoglobina, faz com que a penetração da luz seja menor. Entretanto, radiações com comprimento de onda muito acima de $\lambda 800$ nm sofrem a absorção pela água,

o que restringe a sua penetração ao limite superior do tecido (SOUKOS et al. 2003).

Os FS podem ser administrados por via tópica, intralesional e sistêmica, antes da subsequente exposição à luz (ORTH et al. 2000). No entanto, os FS devem cumprir determinadas características para serem usados como agente na TFD, de forma a garantir a eficiência no processo fotodinâmico. Dentre as principais características citadas por Bagnato (2008), é possível destacar:

- a) Ser solúvel e permanecer estável em solução aquosa a pH fisiológico para permitir circulação e acúmulo nas células;
- b) Apresentar seletividade quanto à retenção por células malignas após algumas horas da introdução da droga na corrente sanguínea;
- c) Ter habilidade para o transporte passivo ou ativo dentro das células e ter um alvo intracelular bem conhecido;
- d) Possuir alto rendimento quântico (facilidade para absorver ou emitir fótons) nos estados tripleto ou singleto;
- e) Não ser tóxico a níveis terapêuticos, com mínima morbidez para o indivíduo;
- f) Ser metabolizado rapidamente, minimizando possíveis efeitos colaterais;
- g) Apresentar farmacocinética favorável (rápida eliminação do corpo);
- h) Capacidade de penetração na membrana celular;
- i) Facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa reprodutibilidade.

O FS é administrado ao paciente e, após irradiação com luz de um comprimento de onda específico, sofre uma transição de um estado de baixa energia para um estado singleto ativado. Subseqüentemente, o FS pode retornar

ao seu estado fundamental com a emissão de fluorescência ou pode sofrer transição para um estado mais elevado de energia tripleto (OCHSNER, 2001). O estado de tripleto do FS pode reagir com biomoléculas em duas vias diferentes: Tipo I e II (FOOTE, 1991).

A reação tipo I envolve a reação de elétrons, que consiste em reações de transferência entre o estado ativado do FS e uma molécula do substrato orgânico das células, levando à produção de radicais livres. Estas espécies de radicais livres, geralmente são altamente reativas e são prejudiciais para a integridade da membrana celular, causando danos biológicos irreparáveis (TAKASAKI et al. 2009).

Na reação de tipo II, o FS no estado tripleto reage com o oxigênio para produzir um estado eletronicamente ativado e altamente reativo de oxigênio, conhecido como oxigênio singleto (1O_2), que pode interagir com um grande número de substratos biológicos e induzir danos oxidativos na membrana e parede da célula. Micro-organismos que são inativados por oxigênio singleto incluem os vírus, bactérias e fungos. Em sistemas biológicos, o oxigênio singleto possui tempo de vida e raio de ação muito curtos (0,02 mm). Assim, a reação tem lugar dentro de um espaço limitado, levando a uma resposta localizada, o que o torna ideal para ser aplicado em áreas localizadas sem afetar as células ou órgãos distantes. Deste modo, a reação tipo II é aceita como a principal via de dano da célula microbiana (SHARMAN et al, 1999).

Os FS podem ser classificados como: hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos. Essa característica influencia os parâmetros fotofísicos e a eficácia do FS, bem como a determinação da sua via de administração *in vivo*, podendo ser oral,

endovenosa, intraperitoneal ou tópica. Os FS hidrofóbicos possuem alta tendência à agregação em meio aquoso e necessitam de conjugação com outras moléculas como, por exemplo, lipossomos (NYMAN; HYNINEN, 2004). Os FS hidrofílicos, por sua vez, podem acumular-se rapidamente na lesão e serem rapidamente excretados. Essa propriedade pode ser vantajosa para prevenir fotossensibilidade cutânea ao corante (SEGUCHI et al. 2002).

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

O Azul de Toluidina O (ATO) e o azul de metileno (AM) são os fotossensibilizantes fenotiazínicos mais aceitos na prática médica e em estudos observados na literatura (DOBSON; WILSON, 1992). Possuem capacidade fotomicrobica contra diferentes organismos, incluindo vírus, bactérias e fungos, além de apresentarem estrutura química e propriedades físico-químicas semelhantes (LAMBRECHT et al. 1991; MILLSON et al. 1996). Embora suas propriedades sejam parecidas, a eficiência fotodinâmica destes compostos, varia

entre os diversos micro-organismos (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). Usacheva, Teichert e Biel (2001) verificaram que o azul de toluidina requer concentrações 1,5 a sete vezes inferiores às requeridas pelo azul de metileno para erradicar as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, o que minimiza o risco de toxicidade para o organismo.

2.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

A TFDa, assim como a TFD, envolve a produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio, produzindo danos às células dos micro-organismos (WAINWRIGHT et al. 1998). Primeiramente, a demonstração dos efeitos da TFD sobre micro-organismos foi realizada por Raab (1990), que publicou um artigo no qual descrevia os efeitos fotodinâmicos no microrganismo unicelular conhecido como *Paramecium caudatum*, quando este era submetido ao corante acridina, juntamente com a luz, ocasionando a morte desse micro-organismo.

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas reagem diferentemente à TFDa. Em bactérias Gram-positivas, a porção externa da parede celular é relativamente mais porosa, permitindo aos fotossensibilizadores neutros ou aniônicos a vinculação mais eficiente e a difusão para locais sensíveis da célula (MAISCH, 2009). As bactérias Gram-negativas foram inicialmente consideradas resistentes à TFDa, uma vez que fosfolípidos, lipoproteínas e polissacarídeos complexos presentes na membrana externa de bactérias como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K.pneumonia* e *H.influenza* podem inibir a ligação das moléculas de FS aniônicos

(NITZAN et al. 1992; MAISCH, 2009), a menos que estratégias adicionais sejam utilizadas de forma a facilitar o seu transporte através membrana celular (DEMIDOVA; HAMBLIN,2004).

Dentre as estratégias que facilitam o transporte do FS através da membrana de bactérias Gram-negativas destacam-se o uso de um FS não carregado (a exemplo da deuteroporfirina e prochlorphyllide), de FS carregado positivamente ou catiônico (a exemplo de azul de toluidina O, azul de metileno, substitutos de tetra-catiônicos de porfirina, catiônicos ftalocianinas) ou o uso de um FS combinado com peptídeos da membrana (NITZAN; PECHATNIKOV, 2011; O'RIORDAN; AKILOV; HASAN, 2005). O FS catiônico é o ideal contra células bacterianas, pois sua taxa de absorção em tais células é muito maior do que para as células de mamíferos (HALL-STOODLEY et al. 2004).

Carvalho et al. (2006) avaliaram *in vitro* o efeito antibacteriano do Laser diodo (AsGaPI, λ 650 nm, 8 J/cm², 50 mW, ϕ =0.1 cm², Laserline®), associado à substância fotossensível azul de toluidina, sobre as bactérias de úlceras cutâneas infectadas e observaram que houve redução significativa das unidades formadoras de colônias (UFC) quando submetidas à TFDa.

Macedo Sobrinho (2004) avaliou em sua pesquisa os efeitos da TFDa em feridas cutâneas em dorso de ratos infectadas com *Staphylococcus aureus* utilizando Laser diodo (λ 660 nm, 30 J/cm², 50 mw, ϕ = 2 mm, em emissão contínua) associado ao fotossensibilizador Azul de Toluidina O na concentração de 100 µg/mL. Em seus resultados foi observado que 48 h após a TFDa houve uma redução bacteriana de 95,6 %.

Dobson e Wilson (1992) analisaram a redução bacteriana por fotoinativação de biofilme formado pelas espécies *S. sanguis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actynomicetecomitans*. Para isso, foi utilizada uma associação de diversos corantes e Laser de HeNe de 7,3 mW de potência, sobre amostras de biofilme em placa de petri. Os autores observaram que os corantes azul de toluidina e azul de metileno foram eficazes em eliminar as quatro espécies de bactérias e os corantes ftalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirina éster não foram tão efetivos. Segundo os resultados, a técnica da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) pode ser efetiva em eliminar bactérias periodontopatogênicas da placa bacteriana.

Burns et al. (1994) verificaram a fotoinativação de bactérias cariogênicas associando o AIPcS₂ ao Laser diodo de GaAlAs. Foram observadas reduções de aproximadamente 10⁶ UFC para *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *A. viscosus*, não sendo encontrado efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias quando elas foram expostas somente à luz Laser ou ao fotossensibilizador.

Soukos et al. (1996) avaliaram os efeitos da TFDa utilizando o Laser de baixa intensidade vermelho associado ao corante azul de toluidina sobre queratinócitos orais humanos, fibroblastos e cultura de *S. sanguis*. Segundo os resultados, os autores concluíram que o uso de baixas concentrações de corante e do Laser provocou a morte bacteriana, sem comprometer a viabilidade dos queratinócitos e fibroblastos.

Tanaka et al. (2012) avaliaram os efeitos citotóxicos da TFDa sobre os neutrófilos do sangue periférico de murinos utilizando diferentes fotossensibilizadores. Cada fotossensibilizador foi testado em uma concentração

que exerceu um efeito máximo bactericida sobre *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SAMR). Os autores observaram que a maioria dos neutrófilos foram mantidos viáveis (> 80%) após a TFDa usando o azul de toluidina ou o azul de metileno, o que sugere que esta terapia pode preservar estas células, enquanto exerce um efeito terapêutico significativo sobre a infecção microbiana localizada.

Bisland et al. (2006) investigaram a utilização da TFDa como um tratamento alternativo para osteomielite. Foi utilizado uma cepa de *S. aureus* para a indução da osteomielite que ocorreu em 10 dias. Após este período, o tratamento compreendeu na administração intraperitoneal de ácido aminolevulínico (300 mg/kg) e, 4h após a realização deste procedimento, a área infectada foi irradiada com luz Laser ($\lambda 635$, 75 J/cm^2), entregue via transcutânea por meio de uma fibra óptica colocada na tíbia. Os autores observaram que o ácido aminolevulínico foi eficaz na redução de biofilme no osso, confirmando, assim, seu potencial para o tratamento de osteomielite em modelo animal.

Goto et al. (2011) avaliaram o efeito da TFDa em modelo animal de osteomielite utilizando o fotossensibilizador Na-Pheophorbide (Na-Phde). O grupo controle foi tratado com injeção de solução salina tamponada com fosfato, enquanto que no grupo experimental, 48 horas após a infecção inicial com *Staphylococcus aureus* na tíbia dos animais, foi injetada intraperitonealmente uma solução de Na-Phde (560 mmol/L). Sessenta minutos depois da injeção deste fotossensibilizador, a área infectada foi irradiada com luz Laser ($\lambda 670 \text{ nm}$, 125 mW , 10 min , $93,8 \text{ J/mm}^2$). O crescimento bacteriano, os exames histológico e radiológico foram avaliados 14 dias após o tratamento inicial, e os autores observaram que a

TFDa com Na-Phde preveniu significativamente o edema. Além disso, histológica e radiograficamente, foi observado inibição da destruição óssea na região da tíbia.

Tardivo e Baptista (2009) avaliaram o efeito de dois protocolos de TFDa em osteomielite de pés diabéticos de dois pacientes. No primeiro paciente, a fim de combater a infecção nos tecidos ósseos e moles, uma solução de fenotiazina (uma mistura de 1:1 das soluções de azul de toluidina 2% e azul de metileno a 2%) foi introduzida na fístula de forma a alcançar o osso subjacente. Em seguida, duas fontes luminosas foram utilizadas devido às infecções dos tecidos supracitados, as quais deveriam ser tratadas ao mesmo tempo. Cinco minutos após a injeção do FS, a irradiação foi realizada (10 minutos) através da introdução de uma fibra óptica através da fístula, de forma a entregar a luz Laser (HeNe, 632 nm, 5 mW) diretamente no osso, e a irradiação externa do hálux foi realizada com uma fonte de luz policromática não coerente (RL 50, λ 570-750 nm, 100 mW, 60 J/cm², Φ = 50 mm). O protocolo do segundo paciente foi semelhante ao do primeiro, entretanto foi utilizado uma mistura 1:1 de hipérico (10% de propileno glicol e 2% de azul de metileno), sendo a irradiação interna (osso) realizada com luz branca não coerente (TransLux III; Kulzer, São Paulo, Brazil; 7 mW) e a externa com luz policromática não coerente, de acordo com o protocolo do primeiro paciente. De acordo com os autores, ambos os protocolos foram efetivos no manejo da osteomielite em pés diabéticos sendo demonstrado por meio de radiografias áreas evidentes de reparo ósseo.

2.5 Fototerapia Laser

A ação da fototerapia Laser sobre os tecidos do hospedeiro pode ser dividida em: a) efeitos analgésicos com diminuição da concentração de substâncias alógenas presentes em processos inflamatórios, normalização das concentrações iônicas intra e extracelulares, ação na repolarização da membrana, além de aumentar a produção de β -Endorfinas por ação nas fibras neurais espessas, bloqueando as fibras neurais finas, levando à analgesia; b) efeitos antiinflamatórios causando vasodilatação, normalização da parede dos vasos, diminuição do edema e ativação dos mecanismos naturais de defesa; c) efeito biomodulador aumentando a concentração de Adenosina Tri-Fosfato (ATP) nas mitocôndrias, elevando a atividade mitótica e a síntese protéica, facilitando, desse modo, a cicatrização de feridas e o reparo ósseo (PINHEIRO; BRUGNERA; ZANIN, 2010).

Foi demonstrado em vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, que a fototerapia laser no nível celular estimula o fotorreceptor citocromo-C-oxidase, resultando no aumento do metabolismo e produção de energia, consequentemente aumentando o metabolismo oxidativo mitocondrial (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005). Iniciando assim uma cascata de reações celulares que modificam o comportamento biológico, modulando a angiogênese, macrófagos e linfócitos; a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno; diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, dentre outros (LOPES *et al.* 2010; TORRES *et al.* 2008; PINHEIRO *et al.* 2011).

Pinheiro e Gerbi (2006), descrevendo acerca da fotoengenharia do processo de reparo ósseo, confirmaram que a fototerapia laser, com comprimento de onda no espectro infravermelho, mostrou-se estimulante na proliferação osteoblástica, na

deposição de colágeno e na neoformação óssea, desde que aplicados nos momentos iniciais da reparação óssea, com predominância da fase proliferativa celular. As respostas vasculares à fototerapia laser têm sido sugeridas como possíveis mecanismos responsáveis pelos resultados clínicos positivos observados. Os autores acrescentam ainda que o efeito da fototerapia na regeneração óssea depende não apenas da dose total de radiação, mas também do tempo e do modo da irradiação.

A extensão e a velocidade da reparação dependem da localização anatômica, do agente etiológico, das dimensões da lesão, além das características biológicas de cada indivíduo. No entanto, a capacidade reparativa óssea tem limites e também pode falhar, caso certas condições não forem atendidas. Os fatores que impedem o reparo ósseo são, entre outros: falhas de vascularização, instabilidade mecânica, defeitos sobre-estendidos, tecidos competidores com alta atividade de proliferação e presença de fragmentos necróticos (PINHEIRO; GERBI, 2006).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar, microbiológica e histologicamente, o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana a Laser TFDa associada ou não a fototerapia Laser em osteomielite induzida por *Staphylococcus aureus* em tibia de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito bactericida da terapia fotodinâmica antimicrobiana a Laser, utilizando o comprimento de onda de $\lambda 660$ nm associado ao fotossensibilizador Azul de Toluidina O ($5 \mu\text{g/mL}$) sobre *Staphylococcus aureus*.

- Avaliar a qualidade do reparo de defeitos ósseos infectados após tratamento por terapia fotodinâmica antimicrobiana associada ou não a fototerapia Laser ($\lambda 780$ nm), através da análise da inflamação aguda e crônica, osteoblastos, osteócitos, presença de sequestro ósseo, presença de microabscessos e presença de reação periosteal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento da Pesquisa

Esta pesquisa foi desenvolvida dentro do paradigma tradicional, no design estudo experimental, com todos os procedimentos obedecendo às recomendações éticas e legais especificadas para a experimentação animal (LEI 11.794 de 2009).

O protocolo de pesquisa foi submetido à avaliação pela Comissão de ética na experimentação animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia tendo sido aprovado sob o nº 09/2010.

4.2 Configuração da Amostra

Para a realização desta pesquisa, foram utilizados 100 (cem) ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, adultos jovens, machos, com idade aproximada de dois meses, pesando entre 250 e 300 gramas cada um, obtidos do Centro de Criação de animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), e passaram por período de sete dias de ambientação. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com dieta sólida (Labina®, Agribbrands-Purina Ltda., Paulínia, São Paulo, Brasil) e água *ad libidum*.

4.3 Distribuição dos Grupos

Quadro 01: Distribuição dos grupos para estudo histológico (REIS JUNIOR, 2014).

Grupo	Descrição	Nº de animais	Tempo de observação
G-0	Controle Indução Osteomielite	5	15 dias
G-I	Controle	5	30 dias
G-II	Solução Salina	5	30 dias
G-III	Laser vermelho	5	30 dias
G-IV	Fotossensibilizador	5	30 dias
G-V	TFDa	5	30 dias
G-VI	Solução Salina + Fototerapia Laser	5	30 dias
G-VII	Laser vermelho+ Fototerapia Laser	5	30 dias
G-VIII	Fotossensibilizador + Fototerapia Laser	5	30 dias
G-IX	TFDa + Fototerapia Laser	5	30 dias

Quadro 02. Distribuição dos Grupos para Estudo Microbiológico *in vivo* (REIS JUNIOR, 2014).

Grupo	Descrição	Nº de animais	Tempo de observação
GM-0	Controle (Osteomielite)	10	0 e 30 dias
GM-I	Solução Salina	10	0 e 30 dias
GM-II	Laser vermelho	10	0 e 30 dias
GM-III	Fotossensibilizador	10	0 e 30 dias
GM-IV	TFDa	10	0 e 30 dias

Quadro 03: Procedimentos de cada Grupo do Estudo Histológico (REIS JUNIOR, 2014).

Grupos	Procedimento
G-0	Neste grupo, foi realizado o defeito ósseo e inoculado dentro da cavidade medular óssea uma alíquota de 50µL de solução salina com <i>Staphylococcus aureus</i> contendo 10 ¹¹ UFC, em seguida a ferida foi fechada e suturada para a indução da osteomielite. Após 15 dias, período necessário para a indução, os animais foram mortos para a verificação e confirmação da osteomielite.
G-I	Neste grupo, foi realizado o defeito ósseo e colocado solução salina para a verificação do reparo ósseo sem a presença de infecção. A morte dos animais deste grupo ocorreu após 30 dias da realização do defeito ósseo.
G-II	Neste grupo, após indução da osteomielite, a ferida foi reaberta, irrigada solução fisiológica estéril, debridada e novamente fechada. A morte dos animais ocorreu 30 dias após este procedimento..
G-III	Neste grupo, após indução da osteomielite, a ferida foi reaberta, irrigada solução fisiológica estéril, debridada, irradiada uma única vez com Laser de diodo vermelho λ660 nm (Arseneto Gálio Fósforo e Índio), 10 J/cm ² com potência de 40 mW, em emissão contínua, Φ = 0,04 cm ² , t=250s e novamente fechada. A morte dos animais ocorreu 30 dias após este procedimento.
G-IV	Neste grupo, após indução da osteomielite, a ferida foi aberta, irrigada solução fisiológica estéril, debridada, aplicado 100 µL de Azul de Toluidina O na concentração de 5 µg/ml por 5 minutos, irrigada com solução fisiológica estéril e novamente fechada. A morte dos animais ocorreu 30 dias após este procedimento.
G-V	Neste grupo, após indução da osteomielite, a ferida foi reaberta, irrigada solução fisiológica estéril, debridada, aplicado 100 µL de Azul de Toluidina O na concentração de 5µg/ml. Foi aguardado o tempo de 5 min para que a bactéria absorvesse o fotossensibilizador, e feita a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com Laser de diodo vermelho λ660 nm (Arseneto Gálio Fósforo e Índio), 10 J/cm ² com potência de 40 mW, em emissão contínua, Φ = 0,04 cm ² , t=250s . Feito isso, a ferida foi fechada e a morte dos animais ocorreu 30 dias após este procedimento.
G-VI	Neste grupo, após indução da osteomielite, a ferida foi reaberta, irrigada solução fisiológica estéril, debridada e fechada. A seguir, foi realizada a fototerapia com Laser de diodo infravermelho λ780 nm (Arseneto de Gálio e Alumínio), com potência de 70mW, emissão contínua, Φ = 0,04 cm ² e foram irradiados durante 15 (quinze) dias, a cada 48 horas com uma dose de 16,8 J/cm ² , t=240s, de forma pontual em 4 (quatro) regiões adjacentes a área do defeito ósseo (4 x 4,2 J/cm ²). A morte dos animais ocorreu 30 dias após este procedimento.

G-VII	Neste grupo, após indução da osteomielite, a ferida foi aberta, irrigada solução fisiológica estéril, debridada, irradiada uma única vez com Laser de diodo infravermelho $\lambda 660$ nm (Arseneto Gálio Fósforo e Índio), com potência de 40mW, emissão contínua, spot de saída de 0,04 cm ² e dose de 10 J/cm ² , t=250s e novamente fechada. A seguir, foi realizada a fototerapia com Laser de diodo infravermelho $\lambda 780$ nm (Arseneto de Gálio e Alumínio), com potência de 70 mW, emissão contínua, $\Phi = 0,04$ cm ² durante 15 (quinze) dias, a cada 48 horas com uma dose de 16,8 J/cm ² , t=240s, de forma pontual em 4 (quatro) regiões adjacentes a área do defeito ósseo (4 x 4,2 J/cm ²). A morte dos animais ocorreu 30 dias após este procedimento.
G-VIII	Neste grupo, após indução da osteomielite, a ferida foi reaberta, irrigada solução fisiológica estéril, debridada, aplicado 100 μ L de Azul de Toluidina O na concentração de 5 μ g/ml e novamente fechada. A seguir, foi realizada a fototerapia com Laser de diodo infravermelho $\lambda 780$ nm (Arseneto de Gálio e Alumínio), com potência de 70 mW, emissão contínua, $\Phi = 0,04$ cm ² durante 15 (quinze) dias, a cada 48 horas com uma dose de 16,8 J/cm ² , t=240s de forma pontual em 4 (quatro) regiões adjacentes a área do defeito ósseo (4 x 4,2 J/cm ²). A morte dos animais ocorreu 30 dias após este procedimento.
G-IX	Neste grupo, após indução da osteomielite, a ferida foi reaberta, irrigada solução fisiológica estéril, debridada, aplicado 100 μ L de Azul de Toluidina O na concentração de 5 μ g/ml. Foi aguardado o tempo de 5 min. para que a bactéria absorvesse o fotossensibilizador, e feita a TFDa com Laser de diodo vermelho $\lambda 660$ nm (Arseneto Gálio Fósforo e Índio), com potência de 40 mW, com emissão contínua, spot de saída de 0,4 cm ² e dose 10 J/cm ² , t=250s. Feito isso, a ferida foi fechada e então realizada a fototerapia com Laser de diodo infravermelho $\lambda 780$ nm (Arseneto de Gálio e Alumínio), com potência de 70 mW, emissão contínua, $\Phi = 0,04$ cm ² durante 15 (quinze) dias, a cada 48 horas com uma dose de 16,8 J/cm ² , t=240s, de forma pontual em 4 (quatro) regiões adjacentes a área do defeito ósseo (4 x 4,2 J/cm ²). A morte dos animais ocorreu 30 dias após este procedimento.

Quadro 04: Procedimentos de cada Grupo do Estudo Microbiológico *in vivo* (REIS JUNIOR, 2014).

Grupos	Procedimento
GM-0	Neste grupo, foi realizado o defeito ósseo e inoculado dentro do osso uma alíquota de 50 µL de solução salina com <i>Staphylococcus aureus</i> contendo 10 ¹¹ UFC. Após 15 dias, com a osteomielite já presente, em 05 animais, a ferida foi reaberta e realizada a remoção do fragmento ósseo para análise microbiológica imediata. Nos outros 05 animais, foi aguardado o período de 30 dias para nova análise microbiológica.
GM-I	Neste grupo, foi realizado o defeito ósseo e inoculado dentro do osso uma alíquota de 50 µL de solução salina com <i>Staphylococcus aureus</i> contendo 10 ¹¹ UFC. Após 15 dias, com a osteomielite já presente, em 05 animais, a ferida foi reaberta, debridada e realizada a remoção do fragmento ósseo para análise microbiológica imediata. Nos outros 05 animais, a ferida foi novamente fechada e aguardado o período de 30 dias para nova análise microbiológica.
GM-II	Neste grupo, foi realizado o defeito ósseo e inoculado dentro do osso uma alíquota de 50 µL de solução salina com <i>Staphylococcus aureus</i> contendo 10 ¹¹ UFC. Após 15 dias, com a osteomielite já presente, a ferida foi reaberta, debridada, irradiada uma única vez com Laser de diodo vermelho λ660 nm (Arseneto Gálio Fósforo e Índio), com potência de 40 mW, em emissão contínua, Φ = 0,04 cm ² , t=250s e realizada a remoção do fragmento ósseo para análise microbiológica imediata. Nos outros 05 animais, a ferida foi novamente fechada e aguardado o período de 30 dias para nova análise microbiológica.
GM-III	Neste grupo, foi realizado o defeito ósseo e inoculado dentro do osso uma alíquota de 50 µL de solução salina com <i>Staphylococcus aureus</i> contendo 10 ¹¹ UFC. Após 15 dias, com a osteomielite já presente, a ferida foi aberta, debridada, aplicado 100 µL de Azul de Toluidina O na concentração de 5 µg/ml por 5 minutos, irrigada com solução fisiológica estéril e realizada a remoção do fragmento ósseo para análise microbiológica imediata. Nos outros 05 animais, a ferida foi novamente fechada e aguardado o período de 30 dias para nova análise microbiológica.
GM-IV	Neste grupo, foi realizado o defeito ósseo e inoculado dentro do osso uma alíquota de 50µL de solução salina com <i>Staphylococcus aureus</i> contendo 10 ¹¹ UFC. Após 15 dias, com a osteomielite já presente, a ferida foi aberta, debridada, aplicado 100µL de Azul de Toluidina O na concentração de 5µg/ml por 5 minutos e feita a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com Laser de diodo vermelho λ660nm (Arseneto Gálio Fósforo e Índio), com potência de 40 mW, em emissão contínua, Φ = 0,04 cm ² , dose 10 J/cm ² , t=250s e realizada a remoção do fragmento ósseo para análise microbiológica imediata. Nos outros 05 animais, a ferida foi novamente fechada e aguardado o período de 30 dias para nova análise microbiológica.

4.4 Cepa de *Staphylococcus aureus*

Os ensaios foram realizados utilizando uma cepa de *S. aureus* ATCC 6538, da coleção do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos (LABEM) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia), após devida ativação de uma cultura pura, verificada através da coloração de Gram (forma, tamanho e arranjo) e de testes bioquímicos de catalase e coagulase.

Para a sua utilização, a cultura foi submetida à ativação em meio líquido de TSB (caldo de soja tratada com tripsina) (Biocen do Brasil, Campinas, SP), e a concentração celular foi determinada pela técnica da contagem padrão em placas usando o meio de TSA (Ágar de tripsina e soja) (Biocen do Brasil, Campinas, SP).

4.5 Determinação da Curva de Crescimento do *Staphylococcus aureus*

A curva de crescimento do *Staphylococcus aureus* foi realizada com o objetivo de estabelecer as características de crescimento da cepa a ser utilizada nos ensaios. Para tanto foram realizados os seguintes procedimentos:

1. Ativação da cultura pura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, cepa padrão conservada em ultrafreezer a -70 °C. Realizado o procedimento de descongelamento da cepa, inoculou-se 100 µL da cepa em um tubo de ensaio contendo 10 mL de Caldo Trypticase de Soja (TSB). O tubo de ensaio foi incubado em estufa bacteriológica a 36 °C por 24 horas. Para obter um inóculo padrão, retirou-se uma alíquota de 10 µL da cultura ativada e

inoculou-se em tubo de ensaio contendo 10mL de meio TSB e incubou-se em estufa a 36 °C por 24 horas;

2. Em seguida, a cultura foi submetida a diluições decimais seriadas em solução tampão fosfato salina (PBS) até 10^{-9} , representando uma contagem em torno de 10^2 bactérias. Identificou-se este tubo como tempo 0;
3. O tubo de ensaio foi incubado sob agitação de 150 rpm a 36 °C por 98 horas;
4. Para obtenção da curva de crescimento, a intervalos regulares de 0, 1, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 72 e 98 horas foram retiradas alíquotas de 100 μ L e efetuadas diluições decimais seriadas até 10^{-12} em tubos de microcentrífuga contendo 900 μ L de PBS;
5. A partir das diluições foram retiradas alíquotas de 100 μ L, em duplicata, que foram inoculadas em placas contendo Ágar Trypticase de Soja (TSA), previamente ambientadas em estufa a 36°C e semeadas por disseminação com alça de Drigalski. As bactérias foram incubadas em estufa a 36 °C por 48 horas;
6. E seguida foi realizada a contagem das colônias para o cálculo da UFC (Unidade Formadora de Colônia) em cada período de incubação (Tab. 01). Com os dados obteve-se uma curva de crescimento onde foi observado que a fase de latência do *Staphylococcus aureus* foi ao tempo de 24 horas, com uma contagem de células viáveis de 10^{11} .

Tabela 01: Resultado da contagem de *Staphylococcus aureus* nos diferentes tempos para determinação da curva de crescimento (REIS JUNIOR, 2014).

Tempo de Incubação (h)	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> UFC/mL	Log de <i>Staphylococcus aureus</i> UFC/mL
0	$1,2 \times 10^2$	2,1
1	$2,6 \times 10^2$	2,4
4	$4,4 \times 10^2$	6,2
8	$1,8 \times 10^6$	7,8
16	$7,2 \times 10^8$	8,8
24	$8,8 \times 10^{11}$	11,9
36	$5,2 \times 10^{11}$	11,7
48	$2,8 \times 10^{11}$	11,4
72	$1,0 \times 10^{12}$	11,0
98	$9,0 \times 10^{11}$	10,9

4.6 Determinação da Concentração do Fotossensibilizador e Densidade de Energia Eficaz para a TFDa

Para determinar a densidade de energia mais adequada para aplicação da TFDa sobre a cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, foram testadas as concentrações do Azul de Toluidina (5, 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$) associadas ao Laser ($\lambda 660\text{nm}$, $P = 40\text{mW}$, emissão contínua, $\Phi = 0,04 \text{ cm}^2$, 5 e 10 J/cm^2 , $t = 125\text{s}$ e 250s, respectivamente). Para tanto, foram realizados os seguintes procedimentos:

1. Foram repetidos os dois primeiros procedimentos realizados na determinação da curva de crescimento;
2. O tubo de ensaio contendo o inóculo da bactéria foi incubado a 36 °C por 24 horas sob agitação de 150 rpm, para a obtenção de uma cultura de

aproximadamente 10^{11} UFC de *Staphylococcus aureus*, de acordo com a curva de crescimento;

3. Alíquotas de 25 μ L desta cultura foram colocadas em placas de ELISA. Os testes foram realizados em quintuplicata e divididos em 10 (dez) grupos:
 - 3.1 Controle - 5 (cinco) alíquotas de 25 μ L da cultura adicionadas a 25 μ L de PBS.
 - 3.2 Controle Azul de toluidina (ATO)₁ - 5 (cinco) alíquotas de 25 μ L da cultura adicionadas a 25 μ L de ATO nas concentrações de 10 μ g/mL, para obter-se concentrações finais de 5 μ g/mL.
 - 3.3 Controle Azul de toluidina (ATO)₂ - 5 (cinco) alíquotas de 25 μ L da cultura adicionadas a 25 μ L de ATO nas concentrações de 20 μ g/mL, para obter-se concentrações finais de 10 μ g/mL.
 - 3.4 Controle Azul de toluidina (ATO)₃ - 5 (cinco) alíquotas de 25 μ L da cultura adicionadas a 25 μ L de ATO nas concentrações de 30 μ g/mL, para obter-se concentrações finais de 15 μ g/mL.
 - 3.5 Controle Laser 1 - 5 (cinco) alíquotas de 25 μ L da cultura adicionadas a 25 μ L de PBS e aplicou-se o laser de baixa potência no comprimento de onda de λ 660 nm, com potência de 40 mW, densidade de energia de 5J/cm², de modo de emissão contínua, t= 125s.
 - 3.6 Controle Laser 2 - 5 (cinco) alíquotas de 25 μ L da cultura adicionadas a 25 μ L de PBS e aplicou-se o laser de baixa potência no comprimento de onda de λ 660 nm, com potência de 40 mW, densidade de energia de 10 J/cm², de modo de emissão contínua, t= 250s.
 - 3.7 TFDa A₁L₁ - 5 (cinco) alíquotas de 25 μ L da cultura adicionadas a 25 μ L de ATO nas concentrações de 10 μ g/mL e, após cinco minutos (tempo necessário para que a bactéria absorva o corante), aplicou-se o Laser de baixa potência no comprimento de onda de λ 660 nm, com potência de 40mW, densidade de energia de 5 J/cm², de modo de emissão contínua, t= 125s.
 - 3.8 TFDa A₁L₂ - 5 (cinco) alíquotas de 25 μ L da cultura adicionadas a 25 μ L de ATO nas concentrações de 10 μ g/mL e, após cinco minutos, aplicou-se o Laser de baixa potência no comprimento de onda de

$\lambda 660\text{nm}$, com potência de 40 mW, densidade de energia de 10 J/cm^2 , de modo de emissão contínua, $t= 250\text{s}$.

- 3.9 TFDa A_2L_1 - 5 (cinco) alíquotas de 25 μL da cultura adicionadas a 25 μL de ATO nas concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$ e, após 5 minutos, aplicou-se o laser de baixa potência no comprimento de onda de $\lambda 660 \text{ nm}$, com potência de 40mW, densidade de energia de 5 J/cm^2 , de modo de emissão contínua, $t= 125\text{s}$.
 - 3.10 TFDa A_2L_2 - 5 (cinco) alíquotas de 25 μL da cultura adicionadas a 25 μL de ATO nas concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$ e, após cinco minutos aplicou-se o laser de baixa potência no comprimento de onda de $\lambda 660 \text{ nm}$, com potência de 40 mW, densidade de energia de 10 J/cm^2 , de modo de emissão contínua, $t= 250\text{s}$.
 - 3.11 TFDa A_3L_1 - 5 (cinco) alíquotas de 25 μL da cultura adicionadas a 25 μL de ATO nas concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$ e, após cinco minutos, aplicou-se o laser de baixa potência no comprimento de onda de $\lambda 660 \text{ nm}$, com potência de 40 mW, densidade de energia de 5 J/cm^2 , de modo de emissão contínua, $t= 125\text{s}$.
 - 3.12 TFDa A_3L_2 - 5 (cinco) alíquotas de 25 μL da cultura adicionadas a 25 μL de ATO nas concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$ e, após cinco minutos, aplicou-se o Laser de baixa potência no comprimento de onda de $\lambda 660 \text{ nm}$, com potência de 40 mW, densidade de energia de 10 J/cm^2 , de modo de emissão contínua, $t= 250\text{s}$.
4. Foram retiradas, de todos os grupos, alíquotas de 40 μL para as diluições seriadas até 10^{-10} e semeadas por disseminação com alça de Drigalski em placas contendo meio TSA que foram incubadas a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas;
 5. Em seguida foram realizadas as contagens das colônias (UFC/mL) para apuração dos resultados.

4.7 Confeção do Defeito Ósseo

Os animais foram submetidos à anestesia geral com injeção intraperitoneal de solução de Cloridrato de Quetamina 2% (Vetaset[®], Fort Dodge Laboratories, Overland Park, KA), administrado na posologia de 60 mg/Kg, e Xilazina (Coopazine[®], Cooper, Brasil), administrado na posologia de 30 mg/Kg. Após anestesia geral foi realizada tricotomia manual em toda região tibial e anti-sepsia com solução de Digluconato de Clorexidina a 2%. Posteriormente, foi realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm seguindo o longo eixo da tíbia esquerda para exposição óssea. Em seguida, com o objetivo de padronizar a área a ser operada, todas as cavidades ósseas foram confeccionadas no terço superior da face lateral da tíbia esquerda. Um defeito ósseo de $\phi = 2$ mm foi confeccionado com ajuda de uma broca cirúrgica n^o 8 montada em contra-ângulo e em ângulo reto com a cortical óssea acessada, para perfuração do osso (Figura01 a 03). Todas as perfurações foram realizadas sob refrigeração externa e constante, com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%.



Figura 01: Região da tíbia tricotomizada (REIS JUNIOR, 2014).

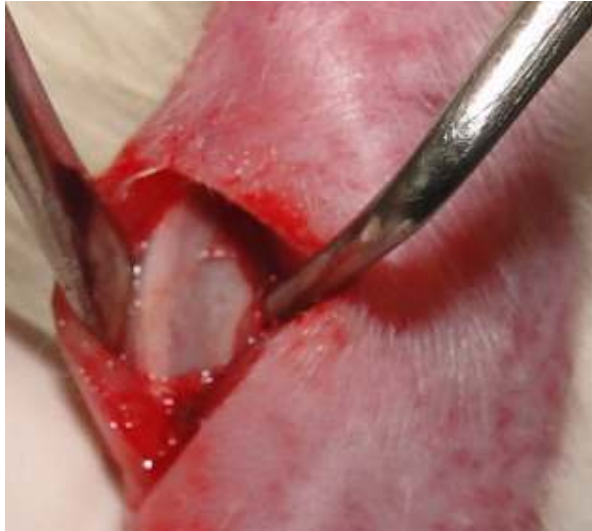


Figura 02: Exposição óssea para confecção do defeito ósseo (REIS JUNIOR, 2014).

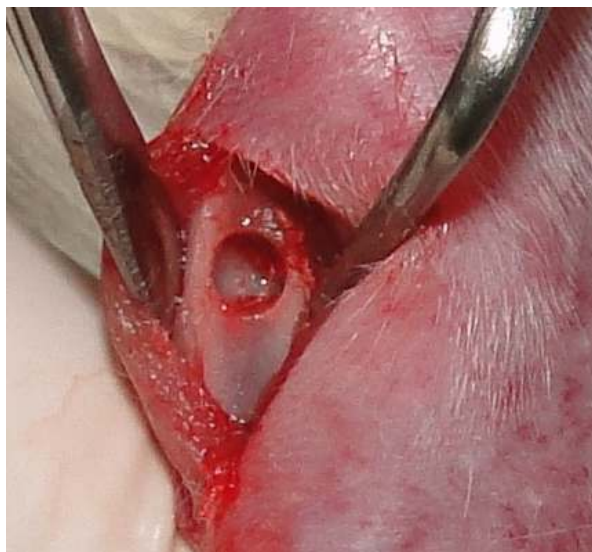


Figura 03: Defeito ósseo com ϕ 2mm de diâmetro (UFPB-UFBA,2014).

4.8 Indução da Osteomielite

A inoculação dos micro-organismos dentro da cavidade medular do osso foi realizada através de uma pipeta automática com uma alíquota de 50 μL de solução salina com *Staphylococcus aureus* contendo 10^{11} UFC (unidades formadoras de colônias). Após este procedimento, a ferida foi fechada, suturada por planos e aguardado um período de 15 dias para a indução da osteomielite (Figuras 04 e 05) (FUKUSHIMA et al. 2005).



Figura 04: Inoculação da bactéria (REIS JUNIOR, 2014).



Figura 05: Aspecto clínico após 15 dias da indução da osteomielite (REIS JUNIOR, 2014).

4.9 Tratamentos

Após 15 dias da indução, já com a osteomielite crônica instalada, o local da ferida foi reaberto para o debridamento da lesão. A partir desta etapa, os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em grupos de acordo com o tratamento estabelecido nos Quadros 01 e 02.

4.9.1 Solução Salina

Trata-se de uma solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0.9 % a 10 °C que foi utilizada para irrigação local durante e após o desbridamento. Este foi realizado com o auxílio de cureta dentinária nº 19 estéril para remoção do tecido ósseo infectado, de textura amolecida, e destacável e fricção com gaze estéril para limpar tecido mole adjacente.

4.9.2 Laser vermelho

Nesta etapa, foi realizado os mesmos procedimentos do tópico anterior e, posteriormente, foi utilizado o aparelho Laser Arseneto Gálio Fósforo e Índio (TWIN FLEX EVOLUTION[®], MMOptics, São Carlos, SP) no comprimento de onda λ 660 mn, com emissão contínua, Φ 0,04 cm², potência de 40 mW e densidade de energia de 10 J/cm², t= 250 s.

4.9.3 Fotossensibilizador

Nesta etapa, foi realizado os mesmos procedimentos do tópico 4.9.1 e, posteriormente, foi utilizado o fotossensibilizador Azul de Toluidina O (ATO), na concentração de 5 µg/ml, que foi preparado em farmácia de manipulação (A Fórmula, Salvador, Bahia), com no máximo 24 horas de antecedência do experimento. O tempo de pré-irradiação, que corresponde ao período necessário para que a bactéria absorva o fotossensibilizador, foi de cinco minutos (MACEDO SOBRINHO, 2004; BARBOSA et al. 2012).

4.9.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

Nesta etapa, foi realizado os mesmos procedimentos do tópico 4.9.1 e, posteriormente, os animais foram tratados através da terapia fotodinâmica antimicrobiana recebendo sobre a lesão 100 μL do corante ATO a uma concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, uma única vez, por cinco minutos e depois da remoção do excesso com uma gaze estéril, foi utilizado o Laser de $\lambda 660\text{ nm}$, com potência de 40 mW, densidade de energia de 10 J/cm^2 , com emissão contínua, em uma única aplicação em contato, de forma perpendicular com a ferida, com a ponteira protegida por papel filme, bem adaptado, para evitar infecção cruzada. Estes foram substituídos a cada nova aplicação (Figs 06 e 07).



Figura 06: Aplicação de 100 μL do corante ATO sobre a ferida óssea (REIS JUNIOR, 2014).



Figura 07: TFDa com laser de $\lambda 660\text{ nm}$, com potência de 40mW, densidade de energia de 10 J/cm^2 , $t = 250\text{ s}$ UFPB-UFBA, 2014).

4.9.5 Fototerapia Laser

Os grupos tratados com fototerapia Laser (G-VI, G-VII, G-VIII e G-IX) foram irradiados com Laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (TWIN FLEX EVOLUTION[®], MMOptics, São Carlos, SP), comprimento de onda de $\lambda 780$ nm, 70 mW, emissão contínua, $\Phi = 0,04$ cm². Foram irradiados por 15 (quinze) dias, a cada 48 horas totalizando 08 aplicações, de forma perpendicular e focada sobre a ferida cirúrgica com uma dose de 16,8 J/cm², t=240s, de forma pontual em quatro pontos (NSLO) adjacentes a área do defeito ósseo (4 x 4,2 J/cm²) totalizando 134,4 J/cm² por tratamento.

De acordo com as regulamentações brasileiras, o Laser foi aplicado em local isolado, com caracteres e simbologia internacional para área em uso ou presença de radiação, observando os procedimentos de segurança recomendados para tratamento com Laser.

4.10 Preparo das Amostras para Estudo Histológico

Terminado o período experimental, os animais foram então submetidos à nova administração de anestésico, em quantidade quatro vezes maior àquela utilizada para anestesia, a fim de que seja constatada a morte do animal através da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea (SOUSA, 2008). Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal acompanhando a cicatriz cutânea existente ao longo da tíbia operada. Após cuidadosa exposição óssea e localização da ferida cirúrgica, foi realizada remoção da peça recortando o osso a aproximadamente 3mm de cada lado da ferida, com auxílio de um disco diamantado e peça reta

(Kavo[®]) acoplada ao micromotor (Kavo[®]), com irrigação constante de soro fisiológico 0,9% (Labormédica[®]) estéril a 10°C.

Os espécimes obtidos foram colocados em frascos previamente preparados e etiquetados, contendo solução de Paraformaldeído tamponado 4%, sendo fixados por aproximadamente três dias e em seguida foram encaminhados para o Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFBA (GERBI, 2006).

Após a período de fixação, as amostras foram descalcificadas em solução de ácido fórmico 5% por um período de setenta e duas horas. Em seguida, as peças foram submetidas ao processamento pela técnica histológica de rotina e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados em micrótomo com espessura de 5µm, semi-seriados de 1/5, e corados pela técnica de Hematoxilina de Harris e Eosina Alcólica (H/E).

4.11 Critérios para Análise Microscópica

A análise dos espécimes através da microscopia de luz foi realizada por meio de avaliação descritiva e semiquantitativa visando observar as características do reparo das feridas cirúrgicas nos diferentes grupos, através da análise da inflamação aguda e crônica, osteoblastos; osteócitos (Tab. 02) e presença ou ausência de sequestro ósseo, microabscessos e reação periosteal.

Tabela 02: Critérios utilizados para análise semi-quantitativa de microscopia óptica (REIS JUNIOR, 2014).

	AUSENTE	DISCRETO	MODERADO	INTENSO
Inflamação Aguda	—	Presença de neutrófilos em até 25 % da área observada	Presença de neutrófilos de 25 % a 50% da área observada	Presença de neutrófilos em mais de 50 % da área observada
Inflamação Crônica	—	Presença de linfócitos em até 25 % da área observada	Presença de linfócitos de 25 % a 50 % da área observada	Presença de linfócitos em mais de 50 % da área observada
Osteoclastos	—	Presença de osteoclastos em até 25 % da área observada	Presença de osteoclastos de 25 % a 50 % da área observada	Presença de osteoclastos em mais de 50 % da área observada
Osteoblastos	—	Presença de osteoblastos em até 25 % da área observada	Presença de osteoblastos de 25 % a 50 % da área observada	Presença de osteoblastos em mais de 50 % da área observada

4.12 Coleta da Amostra para Estudo Microbiológico

Após o período de indução da osteomielite, como elucidado anteriormente, as feridas foram reabertas e após os diversos tratamentos removeu-se a região do defeito ósseo com margem de segurança de 3 mm de cada lado.

Os ossos dos ratos foram encaminhados ao Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos (LABEM), Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia para a realização das análises microbiológicas. A quantificação de células viáveis foi realizada pelo método do plaqueamento em superfície, seguindo os seguintes passos:

- a. Os ossos dos ratos foram pesados em balança semi-analítica com sensibilidade de 0,0001 g. A média da massa dos ossos ficou em torno de 400mg;
- b. Cada fragmento ósseo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 3,6 mL de PBS, de forma a se obter uma diluição final de 10^{-1} . Os tubos foram agitados em vortex por dois minutos;
- c. Em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada, foram iniciadas as diluições seriadas a partir do tubo de ensaio contendo o osso e PBS (diluição 10^{-1}). As diluições foram realizadas retirando 100 μ L da 1ª diluição (10^{-1}) e adicionadas nos cinco primeiros poços da placa de 96 poços contendo PBS. Com o auxílio de uma micropipeta multicanal foram realizadas as diluições seriadas de 10^{-2} até 10^{-12} ;
- d. A partir da diluição 10^{-12} , com auxílio de uma micropipeta foram retirados 100 μ L e inoculados em placa de petri contendo Agar TSA. O mesmo procedimento foi realizado com as demais diluições. As inoculações foram realizadas em quintuplicata;
- e. As placas de petri foram incubadas a 36 °C por 48 horas;
- f. Após o período de incubação foi realizada a leitura das placas no contador de colônias CP-600 Plus (Phoenix).

4.13 Análise estatística

Os dados foram codificados e enviados para análise estatística. Os resultados das contagens bacteriana foram analisados estatisticamente através do ANOVA e teste t de Student, utilizando o MINITAB15® software (Minitab inc. EUA) e nível de significância a 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Microbiológica

5.1.1 Estudo *in vitro*

Os resultados da análise estatística mostraram que todos os grupos TFDA apresentaram contagens bacterianas significativamente inferiores quando comparados com os grupos Controle, Fotossensibilizador e Laser vermelho ($p < 0,001$). A comparação entre os grupos controles e grupos com diferentes concentrações de ATO (5, 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$) mostrou que, mesmo sem a presença da luz, as concentrações de 10 ou 15 $\mu\text{g/ml}$ provocou a morte de bactérias estatisticamente significativa ($p = 0,001$). A concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ foi escolhida para o presente estudo *in vivo*, uma vez que não causou a morte bacteriana significativamente ($p > 0,05$), quando comparada com o grupo controle.

Para escolha da quantidade eficaz de luz para ativar o fotossensibilizador e causar a morte bacteriana, foram utilizadas duas diferentes doses de energia (5 e 10 J/cm^2). A densidade de energia de 10 J/cm^2 foi escolhida por ter demonstrado uma maior eficiência na redução do número de bactérias, quando associada ao fotossensibilizador. Um resumo desses resultados pode ser visto na Tabela 03 e Figura 08.

Tabela 03: Médias e desvios-padrão da contagem bacteriana *in vitro* (IC 95%) * (REIS JUNIOR, 2014)

Grupos	Contagem Bacteriana (UFC x 10 ⁸ /mL)
Controle ^(a)	1224,4 ± 45,7 ^{c,d,e,f,g,h,i,j,k,l}
Fotossensibilizador – 5 µg/mL ^(b)	1184,0 ± 40,5 ^{c,d,e,f,g,h,i,j,k,l}
Fotossensibilizador – 10 µg/mL ^(c)	1081,2 ± 59,1 ^{a,b,e,f,g,h,i,j,k,l}
Fotossensibilizador – 15 µg/mL ^(d)	1042 ± 67,7 ^{a,b,d,e,f,g,h,i,j,k,l}
Laser vermelho – 5 J/cm ² ^(e)	1209 ± 18,2 ^{b,c,d,g,h,i,j,k,l}
Laser vermelho – 10 J/cm ² ^(f)	1216 ± 54,1 ^{b,c,d,g,h,i,j,k,l}
TFDa – (5 µg/mL) x 5 J/cm ² ^(g)	460,4 ± 14,9 ^{a,b,c,d,e,f,h,i,j,k,l}
TFDa – (10 µg/mL) x 5 J/cm ² ^(h)	369,8 ± 38,6 ^{a,b,c,d,e,f,g,i,j,k,l}
TFDa – (15 µg/mL) x 5 J/cm ² ⁽ⁱ⁾	194,2 ± 28,3 ^{a,b,c,d,e,f,g,h,k,l}
TFDa – (5 µg/mL) x 10 J/cm ² ^(j)	220 ± 11,1 ^{a,b,c,d,e,f,g,h,k,l}
TFDa – (10 µg/mL) x 10 J/cm ² ^(k)	115,4 ± 12,2 ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,l}
TFDa – (15 µg/mL) x 10 J/cm ² ^(l)	64,6 ± 6,8 ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k}

* letras indicam diferenças significativas entre os grupos.

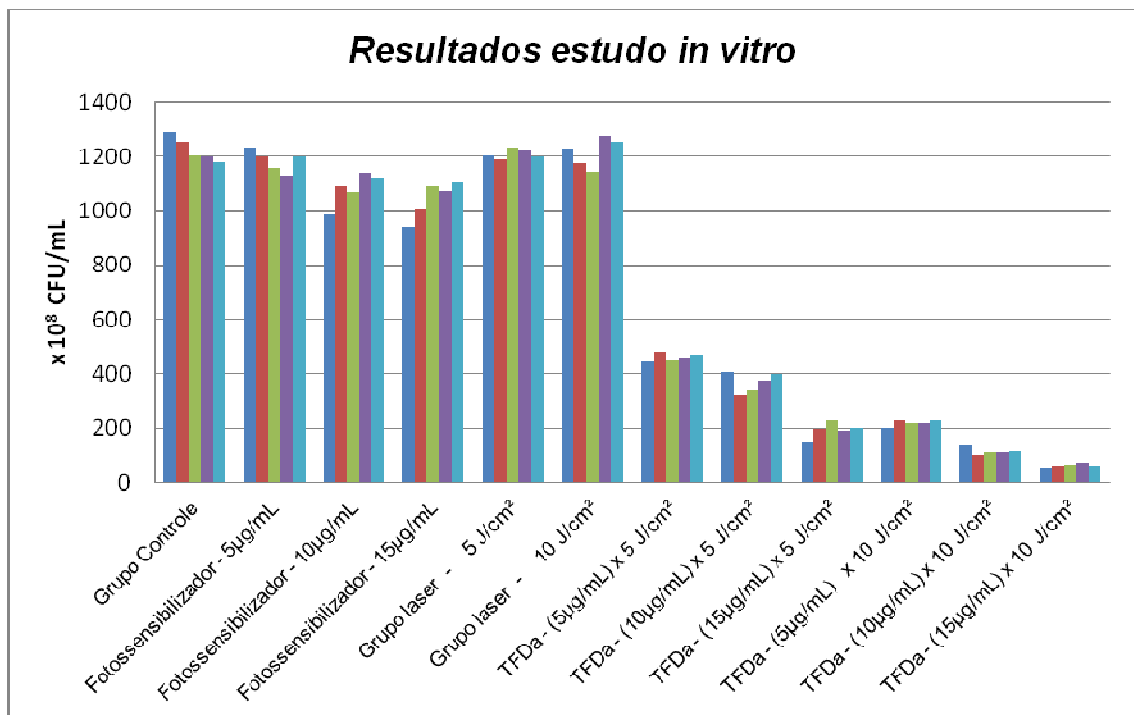


Figura 08: Resultados de todos os grupos experimentais do estudo microbiológico *in vitro* (REIS JUNIOR, 2014).

5.1.2 Estudo *In vivo*

A Tabela 04 mostra os resultados da análise estatística e das contagens bacterianas imediatamente e 30 dias após o tratamento. A análise estatística demonstrou que, imediatamente após o procedimento, o grupo TFDa mostrou uma significativa redução média de 97,4 % na contagem de bactérias em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). É importante notar que os grupos salina, fotossensibilizador e Laser, também mostraram redução estatisticamente significativa da contagem de bactérias em comparação com o grupo de controle, em média, 48,99 % de redução ($p=0,01$). Trinta dias após o tratamento, o grupo TFDa apresentou redução significativa, de 6 casas decimais, da contagem de bactérias em comparação com o seu controle ($p < 0,001$). Comparando todos os períodos experimentais, observou-se que depois de 30 dias, houve redução significativa de micro-organismos, exceto no grupo controle ($p \leq 0,001$).

Tabela 04: Médias e desvios-padrão de contagem bacteriana *in vivo* (IC 95 %)*,** (REIS JUNIOR, 2014).

Grupos	Contagens Bacterianas	
	Imediato (UFC x 10 ⁸ /mL) ¹	30 dias (UFC x 10 ⁴ /mL) ²
Controle ^(a)	3646 ± 859,1 ^{2,b,c,d,e}	26478000 ± 39294 ^{1,b,c,d,e}
Salina ^(b)	2006 ± 531,7 ^{2,a,e}	36253 ± 14887,6 ^{1,a,c,d,e}
Fotossensibilizador ^(c)	1710 ± 485,3 ^{2,a,e}	5949,6 ± 806,1 ^{1,a,b,e}
Laser vermelho ^(d)	1864 ± 173,4 ^{2,a,e}	4719,6 ± 1848,2 ^{1,a,b,e}
TFDa ^(e)	93,6 ± 18,5 ^{2,a,b,c,d}	24,6 ± 9,1 ^{1,a,b,c,d}

* letras indicam diferenças significativas entre os grupos. ** números indicam diferenças significativas entre os tempos.

5.2 Macroscopia e Análise Histológica

Segue abaixo os aspectos clínicos da cicatrização (Figuras 09, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 e 27) e a análise histológica descritiva dos diferentes grupos.

5.2.1 Grupo Controle Indução Osteomielite

Em todos os espécimes desse grupo foi observada formação de sequestro ósseo com osteomielite secundária acompanhada de formação de abscesso (Figura 10) seguidos de faixa de tecido ósseo neoformado e, de modo geral, caracterizado por trabéculas ósseas espessas com osteócitos no interior, linhas basofílicas paralelas entre si, permeados por marcante inflamação. A reabsorção óssea foi frequente na maioria dos espécimes com formação de tecido de granulação. A reação periosteal foi vista em quatro casos.



Figura 09: Aspecto clínico após a indução da osteomielite evidenciando a presença de fístula com exsudato purulento e edema (REIS JUNIOR, 2014).

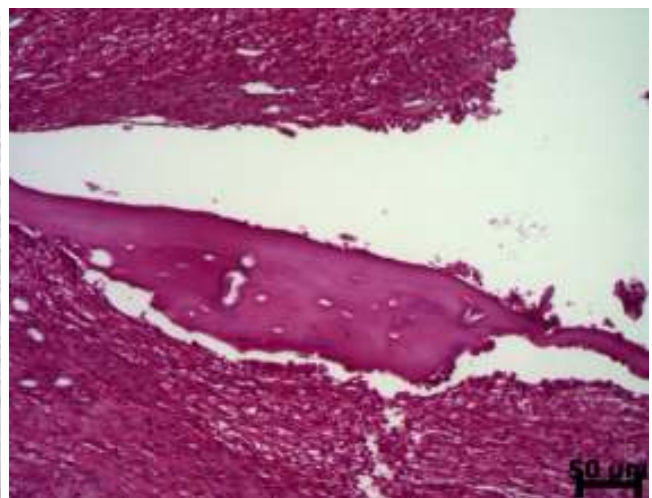


Figura 10: Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo ao lado de microabscessos extensos (REIS JUNIOR, 2014).

5.2.2 Grupo Controle

Os espécimes desse grupo mostraram ferida cirúrgica completamente preenchida por tecido ósseo neoformado, em todos os casos o osso era formado por trabéculas ósseas delgadas (Figura 12), não interconectantes, de modo geral, exibindo osteócitos, muitas vezes irregulares, e linhas basofílicas espessas. É frequente a presença de reabsorção óssea e inflamação crônica discreta.



Figura 11: Aspecto clínico da ferida do grupo Controle (REIS JUNIOR, 2014).

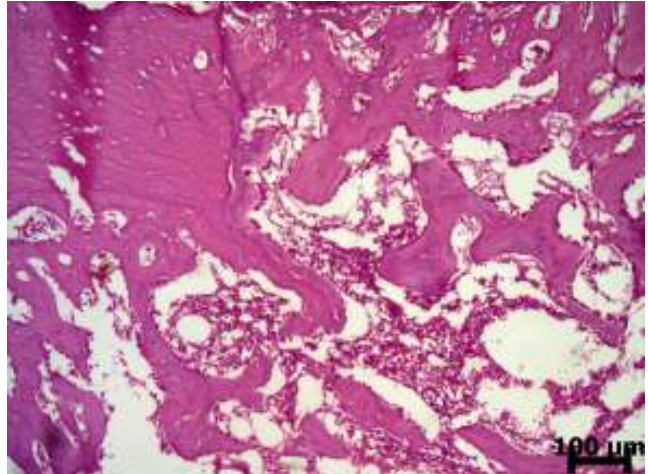


Figura 12: Fotomicrografia mostrando ferida cirúrgica completamente preenchida por tecido ósseo neoformado e trabéculas ósseas delgadas. (REIS JUNIOR. 2014).

5.2.3 Grupo Salina

As seções mostram feridas cirúrgicas completamente substituídas por osso neoformado em dois casos, caracterizado por trabéculas ósseas de espessura variável, interconectantes, exibindo linhas basofílicas paralelas ou não entre si, com osteócitos no interior e poucos os osteoblastos em superfície. De permeio, há poucos espaços medulares e inflamação crônica variando de moderada a intensa. Em três espécimes, houve formação de sequestro ósseo e osteomielite secundária (Figura 14). Nesses três casos, foi comum observar neoformação óssea com os aspectos antes descritos.



Figura 13: Aspecto clínico da ferida após tratamento do grupo Salina evidenciando presença de fístula com exsudato purulento acompanhado de formação de crosta e edema (REIS JUNIOR, 2014).

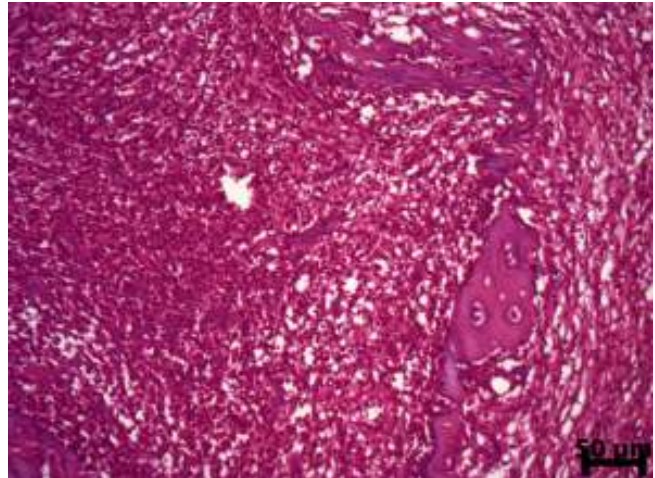


Figura 14: Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo ao lado de microabscessos extensos (REIS JUNIOR, 2014).

5.2.4 Grupo Salina + Fototerapia

As seções mostram feridas cirúrgicas completamente substituídas por osso neoformado caracterizado por trabéculas ósseas espessas interconectantes não que exibiam linhas basofílicas paralelas entre si, osteócitos no interior, por vezes, osteoblastos em superfície. Todos os casos mostraram sequestro ósseo ao lado de microabcessos extensos (Figura 16), exceto em um deles que apresentou inflamação crônica discreta. Em dois casos, foi observada inflamação crônica marcante ao lado de neutrófilos. Reabsorção óssea foi observada nos casos onde o sequestro ósseo estava presente. Reação periosteal foi vista em um caso.



Figura 15: Aspecto clínico da ferida após tratamento do grupo Salina associado a fototerapia Laser ($\lambda 780$ nm) evidenciando presença de edema e formação de crosta (REIS JUNIOR, 2014).

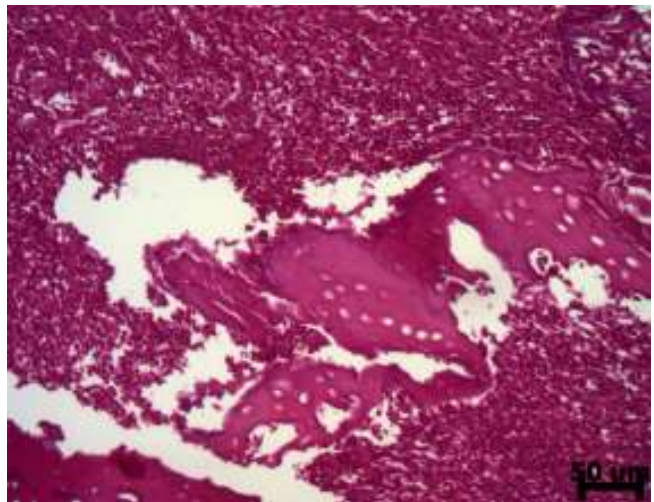


Figura 16: Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo ao lado de microabcessos extensos. (REIS JUNIOR, 2014).

5.2.5 Grupo Laser vermelho

As seções mostram que, em apenas um caso, não houve formação de sequestro ósseo. Estes eram ou não acompanhados de abscessos e inflamação crônica, seguido por faixa espessa ou não de tecido ósseo neoformado caracterizado por trabéculas ósseas espessas ou não, com osteócitos no interior, linhas basofílicas irregulares permeadas por marcante inflamação crônica (Figura 18). O caso que não mostrou sequestro apresentou tecido ósseo neoformado de espessura variável em meio a inflamação crônica marcante com os mesmos aspectos descritos.



Figura 17: Aspecto clínico da ferida após tratamento do grupo Laser vermelho evidenciando presença de fístula com exsudato purulento acompanhado de formação de crosta e edema (REIS JUNIOR, 2014).

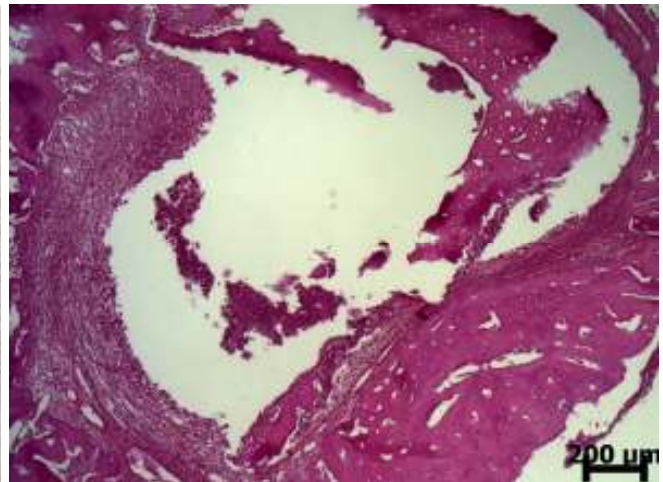


Figura 18: Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo acompanhado de abscessos e inflamação crônica, seguido por faixa espessa ou não de tecido ósseo neoformado caracterizado por trabéculas ósseas espessas ou não, com osteócitos no interior, linhas basofílicas irregulares permeadas por marcante inflamação crônica. (REIS JUNIOR, 2014).

5.2.6 Grupo Laser vermelho + Fototerapia

As secções mostraram, na maioria dos casos, formação de sequestro ósseo com osteomielite secundária acompanhada ou não de abscessos, sempre seguido de neoformação óssea composta por trabéculas ósseas de espessura variável, com osteócitos no interior, linhas basofílicas paralelas ou não à superfície e permeadas por inflamação crônica intensa (Figura 20). Em apenas um caso, não houve formação de sequestro ósseo, mas o mesmo mostrou faixa fibrosa com inflamação crônica marcante, seguido de delgada faixa de neoformação óssea externa exibindo os aspectos antes descritos.



Figura 19: Aspecto clínico da ferida após tratamento do grupo Laser vermelho associado a fototerapia Laser ($\lambda 780$ nm) evidenciando presença de fístula acompanhada de exsudato purulento e edema (REIS JUNIOR, 2014).

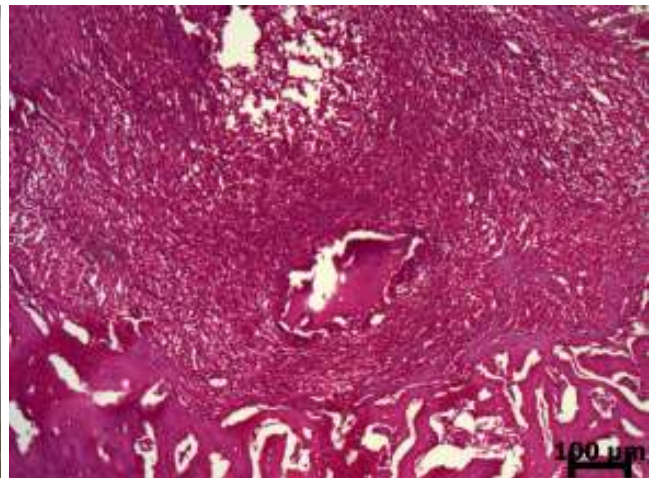


Figura 20: Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo com osteomielite secundária acompanhada ou não de abscessos, sempre seguido de neoformação óssea composta por trabéculas ósseas de espessura variável, com osteócitos no interior, linhas basofílicas paralelas ou não à superfície e permeadas por inflamação crônica discreta (REIS JUNIOR, 2014).

5.2.7 Grupo Fotossensibilizador

As secções mostraram que em três casos houve a formação de sequestro ósseo, todos acompanhados de abscessos e inflamação crônica (Figura 22), seguidos de faixa espessa de tecido ósseo neoformado e, de modo geral, caracterizado por trabéculas ósseas espessas com osteócitos no interior no interior, linhas basofílicas paralelas entre si, permeados por marcante inflamação. Os dois casos que não mostraram formação de sequestro ósseo apresentaram faixa de tecido ósseo neoformado espesso, em meio a marcante inflamação e com os mesmos aspectos descritos anteriormente.



Figura 21: Aspecto clínico após tratamento do grupo Fotossensibilizador evidenciando presença de edema e formação de crosta (REIS JUNIOR, 2014).

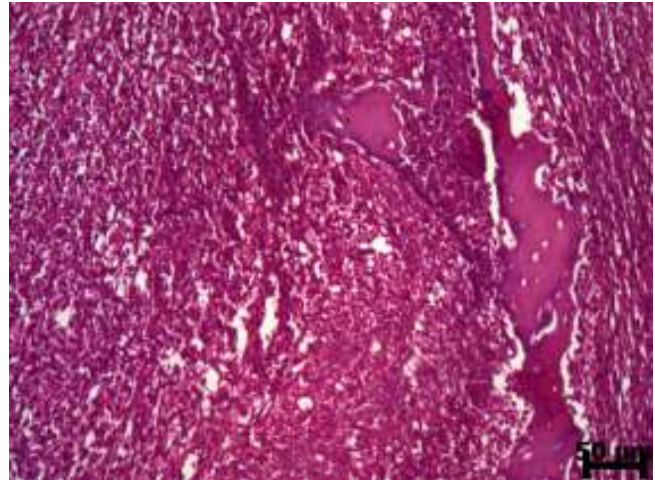


Figura 22: Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo acompanhado de abscesso e inflamação crônica marcante (REIS JUNIOR, 2014).

5.2.8 Grupo Fotossensibilizador + Fototerapia

As secções mostraram dois espécimes sem formação de sequestro, cuja ferida foi substituída por tecido ósseo neoformado espesso, com poucos espaços medulares, exibindo osteócitos no interior, linhas basofílicas paralelas ou não à superfície. Intensa inflamação crônica foi observada. Nos outros três espécimes houve formação de sequestro, sendo um acompanhado de abscessos e outro não, mas com inflamação crônica marcante (Figura 24). Apenas um desses apresentaram neoformação óssea subjacente com os aspectos já descritos.



Figura 23: Aspecto clínico após tratamento do grupo Fotossensibilizador associado a fototerapia Laser ($\lambda 780$ nm) evidenciando presença de fístula com exsudato purulento acompanhado de edema (REIS JUNIOR, 2014).

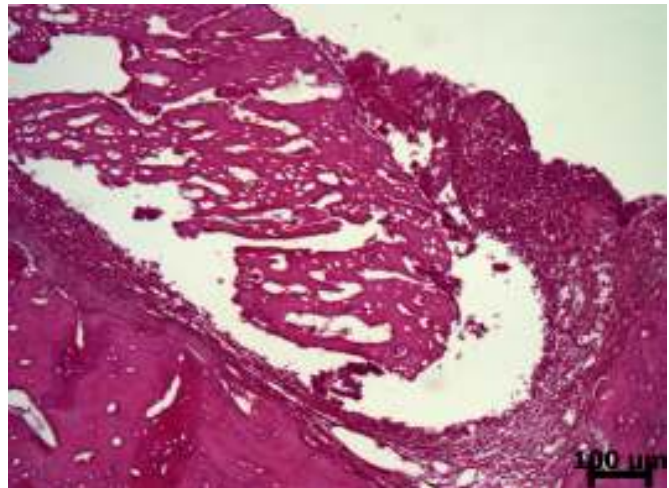


Figura 24: Fotomicrografia mostrando sequestro ósseo acompanhado de abscesso e inflamação crônica marcante (REIS JUNIOR, 2014).

5.2.9 Grupo TDFa

As seções mostraram feridas cirúrgicas completamente cobertas por osso neoformado, caracterizado por trabéculas ósseas de espessura variável, interconectantes ou não, que exibiam linhas basofílicas paralelas entre si, osteócitos regulares, e por vezes, osteoblastos em superfície (Figura 26). De permeio, houve moderada inflamação crônica. Apenas um caso mostrou sequestro ósseo extenso ao lado de microabcesso também extenso, embora subjacente, evidenciou-se neoformação óssea como descrito anteriormente.



Figura 25: Aspecto da cicatrização após o tratamento no Grupo TFDa apresentando ferida totalmente fechada e límpida (REIS JUNIOR, 2014).

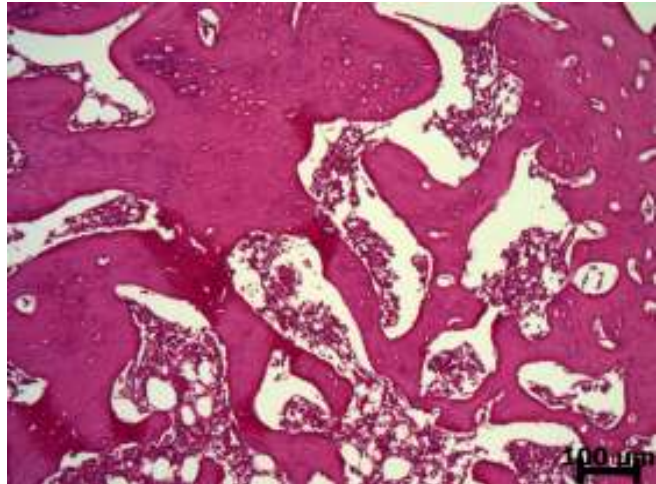


Figura 26: Fotomicrografia mostrando feridas cirúrgicas completamente cobertas por osso neoformado, caracterizado por trabéculas ósseas de espessura variável, interconectantes ou não, que exibiam linhas basofílicas paralelas entre si, osteócitos regulares, e por vezes, osteoblastos em superfície (REIS JUNIOR, 2014).

5.2.10 Grupo TDFa + Fototerapia

As seções mostraram feridas cirúrgicas completamente substituídas por osso neoformado, caracterizado por trabéculas ósseas de espessura variável, interconectantes (Figura 28) ou não, que exibiram linhas basofílicas paralelas entre si, e osteócitos, por vezes, irregulares e osteoblastos na superfície. Todos os casos mostraram inflamação crônica discreta. Exceto um caso que mostrou marcante inflamação mista em torno de trabécula óssea isolada e viável.



Figura 27: Aspecto da cicatrização após o tratamento no Grupo TFDa associado a fototerapia ($\lambda 780$ nm) apresentando ferida totalmente fechada e límpida (REIS JUNIOR, 2014).

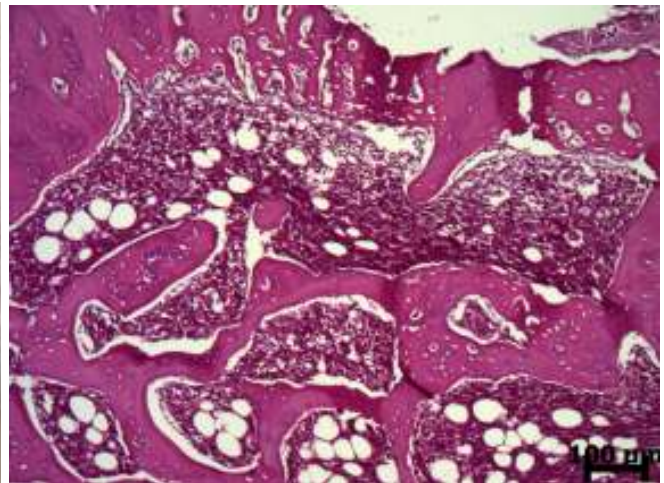


Figura 28: Fotomicrografia mostrando feridas cirúrgicas completamente substituídas por osso neoformado, caracterizado por trabéculas ósseas de espessura variável e interconectantes (REIS JUNIOR, 2014).

6 DISCUSSÃO

Em condições fisiológicas, o tecido ósseo apresenta um grande potencial regenerativo. A reparação tecidual óssea é um processo complexo que envolve respostas locais e sistêmicas. Inúmeros fatores podem alterar substancialmente o processo de osteogênese, dificultando ou mesmo impossibilitando a regeneração do tecido ósseo. Deste modo, a capacidade de regeneração e a completa reparação pode não ocorrer, caso não haja um bom suprimento sanguíneo ou estabilidade mecânica, e exista a presença de micro-organismos patogênicos, como ocorre na osteomielite (GOTO et al. 2011). Com isto, o presente estudo teve como propósito a busca de uma nova modalidade de tratamento para casos de infecções ósseas.

A indução da osteomielite constitui uma técnica conhecida e utilizada para estudos de eficiência dos mais diversos tipos de antibióticos há mais de 30 anos, tendo como escolha a bactéria *Staphylococcus aureus*, devida a sua prevalência em mais 60% dos casos de osteomielite. A relação do *S. aureus* com infecções ósseas se deve ao fato de essa bactéria ser capaz de expressar numerosas proteínas de superfície denominadas adesinas, que permitem a adesão aos componentes da matriz óssea (ZAK et al. 1982; RISSING et al. 1985; NORDEM, 1999; DAVIS, 2005). Para a indução da osteomielite, neste estudo, foi realizada adaptação na técnica de indução de Fukushima et al. 2005, aumentando a carga bacteriana e o defeito ósseo a fim de permitir uma melhor análise histológica posteriormente.

Antibioticoterapia local contribui como uma etapa muito importante do tratamento em casos de osteomielites agudas ou crônicas. É também usada como um dispositivo de prevenção de casos de fraturas expostas. A TFDa utilizada nesta investigação surge como uma alternativa terapêutica, onde a resistência bacteriana ou efeitos colaterais são observados pelo uso da antibioticoterapia convencional. A ausência de efeitos genotóxicos e mutagênicos da TFDa é um fator importante para a segurança de longo prazo durante o tratamento, além de diminuir o risco de difusão de cepas de micro-organismos resistentes a antibióticos (BUCHHOLZ; ENGELBRECHT, 1970; JORI, 2006; DeSILVA; FRITZLER; DESILVA, 2007).

A escolha do protocolo terapêutico ideal ainda consiste em um grande desafio. No presente estudo microbiológico *in vivo* foi utilizado 5 µg/mL de ATO e densidade de energia da luz laser de 10 J/cm² com base no estudo *in vitro* realizado previamente, de modo a garantir o mínimo de toxicidade e maior eficácia terapêutica possível. Além disso, consistiu em uma metodologia que teve como premissa a utilização de uma técnica de aplicação tópica, permitindo melhor aproveitamento da ação antimicrobiana da terapia empregada e evitando possíveis complicações sistêmicas, o que contrasta com alguns estudos geralmente observados na literatura, nos quais fotossensibilizadores são usados sistemicamente, para que seja ativado pela luz Laser, resultando assim em longo período de fotossensibilização da pele após o seu uso (BISLAND et al. 2006; GOTO et al. 2011).

Diversos estudos demonstram que a utilização de ATO é clinicamente eficaz em muitos casos de infecções causadas pelos mais diferentes tipos de micro-organismos incluindo vírus, bactérias e fungos (DÖRTBUDAK et al. 2001; SHIBLI

et al. 2006; HAJIM; SALIH; RASSAM, 2010; VILELA et al. 2011). Nossos resultados estão alinhados com estes achados, pois a associação entre ATO e a luz Laser foi eficaz contra bactérias. Além disso, Usacheva, Teichert e Biel (2001) acrescenta que o azul de toluidina requer concentrações até sete vezes inferiores às requeridas pelo azul de metileno, outro composto fenotiazínico, para erradicar bactérias, justificando assim a escolha deste composto no presente estudo.

A TFDa torna-se vantajosa para a obtenção de efeito antimicrobiano, devido ao fato de o fotossensibilizador não precisar ser mantido em altas concentrações na área infectada por longos períodos de tempo. Isso porque, contrariamente ao que ocorre com o uso de anti-sépticos e antibióticos, o efeito antimicrobiano é obtido em tempos relativamente curtos, tornando improvável o aparecimento de bactérias resistentes (MALIK et al. 1990). Com isto, a multiplicidade de sítios-alvo afetados durante a terapia fotodinâmica faz com que a seleção de linhagens e/ou espécies tolerantes seja extremamente improvável, fato este que constitui uma das principais vantagens da técnica em relação à quimioterapia antimicrobiana convencional.

Os resultados da presente pesquisa estão de acordo com outros estudos que demonstraram efeitos positivos e seguros da TFDa contra *S. aureus*, utilizando ATO e Laser $\lambda 660$ nm ou $\lambda 632.8$ nm (DORTBUDAK et al. 2001; SHIBLI et al. 2006; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; HAJIM; SALIH; RASSAM, 2010; ARCIOLA; MONTANARO; COSTERTON, 2011; VILELA et al. 2011). Uma das vantagens da TFDa se deve ao fato de o FS ser aplicado na área infectada, o que possibilita o contato diretamente dessa substância com o microrganismo. Dessa forma há certa seletividade, pois o fotossensibilizador se liga mais rapidamente aos micro-

organismos e mais lentamente às células do hospedeiro. Assim, se a luz é aplicada de forma relativamente rápida após a administração do fotossensibilizador, o dano colateral para o tecido hospedeiro será minimizado (TEICHERT et al. 2002).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* reportaram resultados positivos com o uso da luz Laser isoladamente sobre *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SAMR). O estudo de Kaya et al. (2011), utilizando-se diferentes densidades de energia, revelou que o uso da luz Laser ($\lambda 808$ nm) causou a morte bacteriana. Outro estudo, realizado por Enwemeka et al. (2009), investigou os efeitos do Laser ($\lambda 470$ nm) sobre SAMR e demonstrou que as densidades de energia de 3, 7 e 35 J/cm² erradicou, respectivamente, 30%, 60 % e 80 % das bactérias, o que sugere que o tratamento a Laser com baixa potência pode ser uma alternativa acessível e prática para o tratamento. Contudo, o presente estudo mostrou que a irradiação isolada com Laser ($\lambda 660$ nm) ajustado a 5 ou 10 J/cm² não foi eficaz em matar as bactérias, tanto no estudo *in vitro* quanto *in vivo*. Isto evidencia que a dose de luz utilizada por si só não foi suficiente para matá-las, conforme também observado por Uusacheva, Teichert e Biel (2001).

Em outro estudo realizado por Barbosa et al. (2012), foi avaliado a eficiência da TFDa sobre formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* utilizando Laser ($\lambda = 660$ nm, 40 mW, 4,2 J/cm² e 8,4 J/cm², CW) associados a derivados de fenotiazina (5 e 10 $\mu\text{g/ml}$, azul de toluidina O ou Azul de metileno) em uma única sessão. Os resultados apresentaram uma diminuição significativa no número de parasitas viáveis em todos os grupos tratados quando comparados com os controles e foi observado ainda que a associação do Laser com o ATO na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ resultou em maior letalidade. Os autores também não

observaram mortalidade nos grupos tratados com laser ou com qualquer um dos compostos separadamente.

No presente estudo, na etapa microbiológica *in vivo*, os grupos tratados com solução salina, Fotossensibilizador e Laser vermelho, isoladamente, mostraram redução significativa das contagens bacterianas quando comparada com os seus controles. Provavelmente, a redução do número de colônias em grupos não tratados com TFDa esteja relacionada com o debridamento cirúrgico realizado, que por si só já constitui um tratamento, visto que este procedimento permite a remoção da área de osso necrótico, infectado e pouco vascularizado, favorecendo o reparo. Estes resultados estão alinhados com os achados de Calhoun; Manning; Shirtliff, (2009), pois para eles, o desbridamento cirúrgico adequado diminui a carga bacteriana, remove tecidos necróticos e dá oportunidade para o sistema imune do hospedeiro e a antibioticoterapia controlar a infecção. Além disso, o grupo tratado com a TFDa mostrou redução ainda mais acentuada do número de colônias.

A partir dos resultados obtido neste estudo, foi possível observar que, após 30 dias de tratamento, foi observada importante redução bacteriana, quando comparado com o tempo zero, em todos os grupos exceto para os grupos controles, nos quais não foram observadas grandes alterações no número de colônias bacterianas. O efeito do sistema imunológico não pode ser ignorado neste caso, visto que no período de 30 dias, pode ter tido atuação do automecanismo de defesa e reparo, inicialmente suplantado pela infecção, mas reativado com o debridamento mecânico realizado.

Em estudo sobre a citotoxicidade da TFDa sobre neutrófilos, Tanaka et al. (2012) concluiu que esta terapia utilizando o ATO pode preservar a viabilidade

destas células ajudando assim no controle do processo infeccioso. É importante notar que, em nossos achados, o grupo tratado com TFDa apresentou, predominantemente, ausência de inflamação aguda, fase típica em que se encontram presentes os neutrófilos. Isto se deve ao fato de que devido a eficiência da terapia empregada na redução bacteriana, o processo inflamatório agudo foi atenuado permitindo assim a continuidade do processo de reparo.

O estudo de Maisch (2007) sugeriu que a utilização de TFDa parece ser uma alternativa prática para o tratamento de osteomielite. No entanto, fatores como a farmacocinética do fotossensibilizador, o uso de um comprimento de onda adequado e protocolos de irradiação utilizados podem afetar o resultado do procedimento. Com isso é lícito apontar que o protocolo utilizado no presente estudo é clinicamente promissor e este é, provavelmente, um dos primeiros relatos sobre a aplicação tópica direta de TFDa com Azul de Toluidina O em osso infectado.

Peplow et al. (2012) em uma revisão sistemática sobre a TFDa em humano e outros animais, concluiu que esta técnica pode melhorar o padrão de cicatrização em vários modelos de feridas, eles acreditam que baixas concentrações do fotossensibilizador, associado ao laser, podem aumentar a proliferação celular devido as baixas concentrações de espécies reativas de oxigênio liberadas, funcionando assim como estimulador de mitoses acelerando a cicatrização. Em nosso estudo, foi verificado que os animais tratados com TFDa apresentaram reparo ósseo e cicatrização da ferida completa, porém não é possível afirmar que estes resultados são oriundos do processo supracitado, pois o melhor padrão do

reparo pode está relacionado à significativa diminuição do processo infeccioso devido a terapia empregada.

A dificuldade de reparação tecidual espontânea, principalmente quando associada a fatores que interferem no processo de reparo justificam a utilização de recursos terapêuticos que possam acelerá-la. A fototerapia Laser constitui um destes recursos, todavia, vale ressaltar que diante de um processo infeccioso, seu uso torna-se mais limitado, necessitando de medidas terapêuticas antimicrobianas adjuvantes, que venham possibilitar uma maior ação da fototerapia no reparo ósseo.

Na literatura, vários estudos têm demonstrado os efeitos positivos da fototerapia Laser sobre o reparo de tecidos ósseos (PINHEIRO, *et al.* 2009, 2011, 2012a,b, 2013). Esta luz, por sua vez, tem sido utilizada para acelerar o reparo tecidual, de maneira que o osso neoformado apresente qualidade superior àquele que não sofreu o mesmo procedimento terapêutico, além de melhorar os resultados clínicos, sem efeitos colaterais sistêmicos negativos. A presente investigação optou pelo emprego da fototerapia Laser ($\lambda 780$ nm) após a TFDa e por um período de 15 dias a cada 48 h. Os resultados obtidos mostraram que a Fototerapia Laser nos grupos Salina, Fotossensibilizador e Laser vermelho não apresentou, de modo geral, melhora nos parâmetros histológicos analisados, evidenciando que para que ocorra os benefícios da fototerapia Laser no processo de reparo ósseo é necessário que se tenha um processo infeccioso controlado. Além disso, a presença de abscesso com exsudato purulento constante nestes grupos pode ter agido como barreira para a transmissão de luz ao osso.

Na quase totalidade dos grupos estudados, foi observada intensa presença de osteócitos. Este achado está alinhado com um estudo prévio (JIA et al. 2010) que relata que a reação inflamatória, em casos de osteomielite, acompanha-se de neoformação óssea constituindo uma forma de reparo. No entanto, caso não seja removida a infecção, esta reação inflamatória pode provocar aumento exagerado de componentes de destruição celular maior que a capacidade de reparação tecidual, dando assim continuidade no processo de destruição do tecido (SHETTY; BERTOLAMI, 1992).

O grupo TFDa associado a fototerapia Laser, apresentou o melhor padrão de reparo ósseo pelos parâmetros analisados, com ausência de inflamação aguda, inflamação crônica discreta, moderada presença de osteoblastos e intensa presença de osteócitos. É importante notar, que apenas nos grupos tratados com a TFDa, observou-se ausência de microabscessos e sequestros ósseos, apontando assim a efetividade antimicrobiana da técnica utilizada. Calhoun; Manring; Shirtliff, (2009), relataram que a presença de abscessos e sequestros ósseos em osteomielite está relacionada a forte processo inflamatório, originado pela infecção, que libera toxinas e enzimas destrutivas reduzindo o pH local e a tensão de oxigênio, causando necrose óssea segmentar.

No grupo controle indução osteomielite observou-se a presença de reação periosteal. Estes achados estão alinhados com o estudo de Rana; Wu; Eisenberg, (2009) que afirmaram que a reação periosteal é a tentativa de formação de um novo osso pelo periósteo em resposta a alguma agressão, e sua presença está associada a uma série de fatores como: traumas, artrites, tumores ósseos e osteomielites. Nos demais grupos não foram observados a presença desta reação,

possivelmente devido ao debridamento realizado que permitiu a diminuição da carga bacteriana e, conseqüentemente, menor agressão óssea.

Ao final do período experimental, foi também observado, macroscopicamente, que os animais tratados com a TFDa associada ou não a fototerapia Laser, apresentaram feridas completamente fechadas, com ausência de fístula e exsudato purulento. Estes aspectos clínicos denotam que a redução bacteriana, no período de 30 dias analisados, permitiu um processo de reparo satisfatório, sendo, no entanto, necessários mais estudos com prazos maiores de observação a fim de acompanhar a evolução deste processo como também os níveis da concentração da bactéria a longo prazo.

O protocolo TFDa adotado no presente trabalho pode ser uma alternativa eficaz para o tratamento de osteomielite, devido à redução bacteriana observada aliada a melhor padrão histológico de reparo ósseo apresentado. Deste modo, a continuidade de estudos dentro dessa linha de pesquisa pode, futuramente, contribuir com grandes avanços no tratamento desta patologia.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, baseado na metodologia utilizada, concluímos que:

- A Terapia fotodinâmica antimicrobiana, com utilização do azul de toluidina O na concentração de 5 µg/mL e associada ao Laser (λ 660 nm), mostrou-se eficiente na redução bacteriana tanto no estudo *in vitro* quanto no *in vivo*.

- Os grupos tratados com a TFDa apresentaram feridas cirúrgicas completamente substituídas por osso neoformado, ausência de sequestros ósseos, ausência de inflamação aguda e discreta inflamação crônica. A fototerapia Laser (λ 780 nm) mostrou-se eficaz quando associada a TFDa aumentando o número de osteoblastos e diminuindo os níveis da inflamação.

- Os grupos submetidos à TFDa e avaliados no período experimental de 30 dias apresentaram contagem bacteriana significativamente menor, quando comparado com o tempo de observação de zero dias, demonstrando possível influência do sistema imunológico do animal auxiliando na redução, ainda maior, da contagem bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ARCIOLA, C.R.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J.W. New trends in diagnosis and control strategies for implant infections. **Int J Artif Organs**, v.34, n.9, p.727-736, 2011.
- BAGNATO, V.S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. São Paulo: Livraria da Física; 2008.
- BARBOSA, A. F., SANGIORGI, B. B., GALDINO, S. L., BARRAL-NETTO, M., PITTA, I. R. AND PINHEIRO, A. L. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. **Lasers Surg Med.**, v.44: p.850–855, 2012.
- BASFORD, J. R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers Surg Med**, New York, v. 9, n.1, p. 1-5, 1989.
- BERNARD, L. et al. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *S. aureus* strains. **J Microbiol Meth**, v. 57, p. 231-9, 2004.
- BIEL, M.A. Photodynamic therapy in head and neck cancer. **Curr Oncol Rep**. v.4, p.87–96, 2002.
- BISLAND, S.K. et al. Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. **Photochem Photobiol Sci**. v.5, n.1, p.31-8, 2006.
- BLAYA, D.S. et al. Histologic Study of the Effect of Laser Therapy on Bone Repair. **J Contemp Dent Pract** v.9, n.6, p.41-48, 2008.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. **J Dent**. V.22, n.5, p.273-8, 1994.

CALHOUN, J.H.; MANRING, M.M.; SHIRTLIFF, M. Osteomyelitis of the Long Bones **Semin Plast Surg**. v.23, n.2, 2009.

CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. 2007;21:293-302.

CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J Pediatr**, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CARVALHO, P. T, MARQUES AP, REIS FA, BELCHIOR AC, SILVA IS, HABITANTE CA, SUSSAI DA. Photodynamic inactivation of in vitro bacterial cultures from pressure ulcers. **Acta Cir Bras**. v.4, p. 32-5, 2006.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.

CASSIDY, C.M.; TUNNEY, M.M.; MCCARRON, P.A.; DONNELLY, R.F. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. **J Photochem Photobiol B**, v.95, p.71–80, 2009.

CHEN, X. et al. Recombinant human osteogenic protein-1 induces bone formation in a chronically infected, internally stabilized segmental defect in the rat femur. **J Bone Joint Surg Am**. v.88, p.1510–1523, 2006.

DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Int Med J**, v. 35, p.79S-96S, 2005.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic inactivation of *Bacillus* Spores, mediated by phenothiazinium dyes. **Appl Environ Microbiol**. v.71, p.6918-25, 2005.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J Immunopathol Pharmacol**. V.17, p.245-254, 2004.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low- power laser. **Arch Oral Biol**. V.37, p.883–7, 1992.

DONNELLY, R.F.; MCCARRON, P.A.; TUNNEY, M.T. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiol Res**. V.163, p.1–12, 2008.

DÖRTBUDAK, O. et al. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. **Clin Oral Impl Res** v.12, p.104–108, 2001.

EPPLEY, B.L.; PIETRZAK, W.S.; BLANTON, M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. **Plast Reconstr Surg**. V.118, p.147e–159e, 2006.

FANG, R.C.; GALIANO, R.D. Adjunctive Therapies in the Treatment of Osteomyelitis. **Semin Plast Surg**. v.23, n.2, p.141–147, 2009.

FOOTE CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochem Photobiol**. v.54, p.659, 1991.

FUKUSHIMA, N.; KAZUHIKO, Y.; SASAHARA, T.; DOBASHI, Y.; MORITOSHI, I. Establishment of rat model of acute staphylococcal osteomyelitis: relationship between inoculation dose and development of osteomyelitis. **Arch Orthop Trauma Surg** 125:169–176. 2005

GERBI, Marleny Elizabeth Márquez de Martínez. Avaliação histológica da eficácia do Laser de λ 830nm no Reparo Ósseo de Feridas Cirúrgicas com implante de Proteínas Morfogenéticas Ósseas (Bmps) e Membrana Biológica. Salvador, 2004. **Tese de Doutorado em Odontologia**. Odontologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2004.

GERBI, M. E. M. M.; MARQUES, A. M. C.; RAMALHO, L. M. P.; et al. Infrared Laser Light Further Improves Bone Healing When Associated with Bone Morphogenic Proteins: An in Vivo Study in a Rodent Model. **Photomed Laser Surg**, v. 26, p. 55-60, 2008a.

GERBI, M. E. M. M.; PINHEIRO, A. L. B.; RAMALHO, L. M. P. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. **Lasers Med Sci**, v. 23, n. 3, p. 313-317, 2008b.

GOTO, B. et al. Therapeutic effect of photodynamic therapy using Naphthophorbide on osteomyelitis models in rats. **Photomed Laser Surg**. v.29, n.3, p.183-9, 2011.

GRANT, W.E. et al. Photodynamic therapy, an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity. **Int J Cancer**. v.71, p.937–42, 1997.

GRINHOIC, M.; SZRAMKA, B.; KURLEND, J. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. **J Photochem Photobiol B**. V.90, p.57-63, 2008.

HAJIM, K.I.; SALIH, D.S.; RASSAM, I.Z. Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Lasers Med Sci** v.25, p. 743–748, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol**. v.2, p.95-108, 2004.

JIA, W.; LUO, S.; ZHANG, C.; WANG, J. In Vitro and In Vivo Efficacies of Teicoplanin-Loaded Calcium Sulfate for Treatment of Chronic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis, v.54, n.1 p. 170–176, **American Society for Microbiology**. Jan. 2010

JUZENIENE, A. et al. Effectiveness of different light Sources for 5 - aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**. v.19, p.139–49, 2004.

KADRY, A.A.; AL-SUWAYEH, S.A.; ABD-ALLAH, A.R.A.; BAYOMI, M.A. Treatment of experimental osteomyelitis by liposomal antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 54, p.1103–1108, 2004.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **J Am Acad Dermatol**. v.42, p.389-413, 2000.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers in Surg And Med**, v. 36, p. 307–14, 2005.

KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of Low-Energy Laser Irradiation on Bone Remodeling During Experimental Tooth Movement in Rats. **Lasers in Surg And Med.**, v.26, p.282-291, 2000.

KAYA, G.S. et al. The Use of 808-nm Light Therapy to Treat Experimental Chronic Osteomyelitis Induced in Rats by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Photomed Laser Surg** v.29, n.6, p. 405–412, 2011.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J Dent Res** v.86, n.8, p.694-707, 2007.

LAMBRECHT, B. et al. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in Combination with visible light. **Vox Sang.** v.60, p.207–13, 1991.

LIMA, D. C. et al. Snake venom: any clue for antibiotics and cam? **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

LIMEIRA JÚNIOR, F.A. Avaliação do reparo ósseo com o uso de osso anorgânico e membrana reabsorvível após irradiação com laser diodo 830nm. Salvador. 2001. 179p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Odontologia – Area de concentração em Estomatologia). Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, 2001.

LOPES, C. B.; PACHECO, M. T. T.; SILVEIRA JUNIOR, L.; *et al.* The effect of the association of near infrared laser therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: A Raman spectroscopic study. **J Biomedical Materials Research A**, v. 4, n. 4, p. 1257-63, 2010.

MACÊDO SOBRINHO, João Batista. Efeitos da Fotossensibilização Letal por Laser Igual a $\lambda 660\text{nm}$ em Feridas Cutâneas infectadas pelo *Staphylococcus aureus*: Estudo microbiológico e histológico. Salvador, 2004. **Tese de Doutorado em Odontologia**. Odontologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2004.

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

MAISCH T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Mini Rev Med Chem**. V.9, n.8, p.947-83, 2009.

MAISCH, T. et al. Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA ex vivo. **Photochem Photobiol Sci** v.6, n.5, p.545-551, 2007.

MALIK, Z. et al. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, v.5, n.3-4, p.281-93, 1990.

MILLSON, C.E. et al. The killing of *Helicobacter pylori* by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J Med Microbiol**. V.44, p.245–52, 1996.

MUNHOZ LIMA, A.L.L.; ZUMIOTTI, A.V. **Osteomielites – Um desafio multiprofissional. Prática Hospitalar**. Ano IX, nº 52, jul-ago/2007.

NEVILLE, B.W. et al. Osteomielite. **Patologia Oral e Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 3, p.123-125.

NITZAN Y, PECHATNIKOV I. Approaches to kill Gram-negative bacteria by photosensitized process. In: Hamblin MR ed, Photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications, **Royal Society of Chemistry**. P.47-67, 2011.

NITZAN, Y. et al. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. **Photochem Photobiol**. V.55, p.89-96, 1992.

NORDEN CW. **Acute and chronic osteomyelitis**. In: Armstrong D, Cohen J, eds. **Infectious Diseases**. London, England: Mosby; 1999:410–431.

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

OCHSNER, M. Photodynamic therapy in squamous cell carcinoma. **J Photochem Photobiol B**. 2001;52:42–8.

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

PARSONS, B.; STRAUSS, E. Surgical management of chronic osteomyelitis. **Am J Surg.** V.188, p.57–66, 2004.

PEPLOW, P.V.; CHUNG, T.; G. BAXTER, G.D.; DPHIL Photodynamic Modulation of Wound Healing: A Review of Human and Animal Studies **Photomed Laser Surg.** v. 30, p.118-148, 2012.

PETERSON, L. J. et al. **Princípios de tratamento e prevenção das infecções odontogênicas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

PIACQUADIO, D.J. et al. Photodynamic therapy with aminolevulinic topical solution and visible blue light in the treatment of multiples actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. **Arch Dermatol.** v.140, p.41-6, 2004.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Low-level laser therapy in the management of the maxillofacial region. **J Clin Laser Med and Surg,** v.16, n. 4, p. 223-226, 1998.

PINHEIRO, A. L. B.; FRAME, J. W. Laser em Odontologia: seu uso atual e perspectivas futuras. **Revista Gaúcha de Odontologia,** v. 40, n. 5, p.327-332, set./out. 1992.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed Laser Surg,** Larchmont, v. 21, n. 2, p. 169-178, 2006.

PINHEIRO, A.L.B. et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with wire osteosynthesis: a comparative laser fluorescence and Raman spectral study on rabbits. **Lasers Med Sci.** v.28, n.3, p.815-22, 2013.

PINHEIRO, A.L.B., CARVALHO, G.M., ALVES, M.S.C.F., LIMA, K.C. Reproducibility of a Laser Diagnodent in assessing dentinal mineral contents. **Cienc Odontol Bras**, v.6, n.3, p.79-85, 2003.

PINHEIRO, A.L.B.; BRUGNERA-JUNIOR, A.; ZANIN, F.A.A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. São Paulo: Santos, 2010.

PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; BARBOSA, A. F. S. *et al.* Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents. **Lasers Med Sci.**, v. 27, n. 5, p. 1013-24, 2012a.

PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; CANGUSSU, M. C. T.; *et al.* Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. **Lasers Med Sci.**, v. 27, n. 5, p. 903-16, 2012b.

PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; ACIOLE, G. T. S.; *et al.* Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. **Journal of Biomedical Material Research part A**, v. 98, n. 2, p. 212-21, 2011.

RAAB, O. Ueber die Wirkung Fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. **Z. Biol.**v., 39, p. 24-546, 1990.

RANA, R.S.; WU, J.S.; EISENBERG, R.L. Periosteal Reaction. **American Journal of Roentgenology**.v.193, n.4 2009.

RISSING, J.P.; BUXTON, T.B.; WEINSTEIN, R.S.; SHOCKL, R.K. Model of Experimental Chronic Osteomyelitis in Rats. **American Society for Microbiology** v. 47, p. 581-586 1985.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of Staphylococcus aureus infections of the skin and soft tissue. **Intern Med J**, v. 35, p. 97S-105S, 2005.

SALVA, K.A. Photodynamic therapy: Unapproved uses, dosages or indications. **Clin Dermatol**. v.20, p.571–81, 2002.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. **Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

SCHINDL, A. et al. Low-intensity laser therapy: a review. **J Investig Med**, v.48, n.5. Sept. 2000.

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

SHARMAN, W.M. et al. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. **Drug Discov Today**.v.4, p.507–17, 1999.

SHETTY, V.; BERTOLAMI, C. The physiology of wound healing. In: PETERSON L.J. et al. **Oral and Maxillo Facial Surgery**. 1ªed. Philadelphia: lippincot Company, 1992. Cap.1, p.3-18.

SHIBLI, J.A. et al. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. **Clin Oral Impl Res** v.17, p. 273–281, 2006.

SOUKOS, N.S. et al. Photodestruction of Human Dental Plaque Bacteria: Enhancement of the Photodynamic Effect by Photomechanical Waves in an Oral Biofilm Model. **Lasers Surg Med.** v.33, p.161-168, 2003.

SOUKOS,N.S. et al. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. **Lasers Surg Med.** v.18, n.3, p.253-259, 1996.

SOUKOS, N.S. et al. Targeted Antimicrobial Photochemotherapy. **Antimicrob Agents Chemother.** v.42, n.10, p.2595–2601, 1998.

STREET,C.N. et al. In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture. **Photochem Photobiol.** V.85, p.137-143, 2009.

TAKASAKI, A.A. et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. **Periodontol.** v.51, p.109–40. 2009.

TANAKA M, KINOSHITA M, YOSHIHARA Y,. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. **Photochem Photobiol.** v.88, n., p. 227-32, 2012.

TARDIVO, J.P.; BAPTISTA, M.S. Treatment of osteomyelitis in the feet of diabetic patients by photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Photomed Laser Surg.** V.27, n.1, p.145-50, 2009.

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

TORRES, C. S.; SANTOS, J. N.; MONTEIRO, J. S. C.; *et al.* Does the Use of Laser Photobiomodulation, Bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration Improve the Outcome of Autologous Bone Grafts? An in Vivo Study in a Rodent Model. **Photomed Laser Surg**, v. 26, n. 4, p. 371-377, 2008.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia. *Staphylococcus aureus***. São Paulo: Atheneu, 2005.

TUNÉR, J.; HODE, L. **Laser Therapy in Dentistry and Medicine**. [s.l.]: Prima Books, 1996. 233p.

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, n. 2, p. 165-173, 2001.

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, n.2, p.165-173, 2001.

VILELA, S.F.G. *et al.* Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An in vitro study. **Arch Oral Biol** v.57, n.6, p.704-710, 2011.

VON TAPPEINER, H.; JESIONEK, A. Über die Wirkung der photodynamischen fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. **Dtsch Arch Klin Med.** v.80, p.427-487, 1904.

WAINWRIGHT M, *et al.* Photoinactivation of viruses. **Photochemical and Photobiology Sciences**. V.3, p.406- 411, 2004.

WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother.** 1998 Jul;42(1):13-28.

WALSH, L.J. The current status of low-level laser therapy in Dentistry. Part 2. Hard tissue applications. **Aust Dent J, St Leonards**, v.42, n.5, p.302-6, 1997.

WEBER, J. B. B. et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 24, n. 1, p. 38-44, 2006.

WHELAN, H.T. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery.** v.19, n.6, p.305–314, 2001

ZAK, O.; ZAK, F.; RICH, R. Experimental staphylococcal osteomyelitis in rats: therapy with rifampin and cloxacillin alone or in combination. In: Perti P, Grassi G, eds. *Current Chemotherapy and Immunotherapy*. Washington, DC: **American Society for Microbiology**; p. 973, 1982,

ZOLFAGHARI, O.S. et al. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. **BMC Microbiol.** V.4, p.9:27, 2009.

ZULUAGA, A.F. et al. **Etiologic Diagnosis of Chronic Osteomyelitis: A Prospective Study.** **Arch Intern Med**, v.166, n.9, 2006.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética na Experimentação Animal

UFBA - Faculdade de Odontologia - Av. Aratijo Pinho, 62 - Canela
CEP: 40.140-110 - Salvador - BA - Tel: (71) 3283-8966
Home-page: www.ufba.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa nº. 09/10 "FOTOSENSIBILIZAÇÃO LETAL À LASER EM OSTEOMIELITE CRÔNICA INDUZIDA POR *Staphylococcus aureus*: ESTUDO HISTOLÓGICO EM RATOS" de autoria de ANTONIO LUIZ BARBOSA PINHEIRO, foi analisado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal e considerado **APROVADO** em reunião ordinária realizada nesta data.

Salvador, 07 de dezembro de 2010

Prof. Maria José P. Ramalho
Vice-Presidente da CEEA