

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

ANTÔNIO FERNANDO HUEB

**EMPREGO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA INATIVAÇÃO
DE *Candida albicans in vitro***

UBERABA – MG

2013

UNIVERSIDADE DE UBERABA
ANTÔNIO FERNANDO HUEB

**EMPREGO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA INATIVAÇÃO
DE *Candida albicans in vitro***

UBERABA – MG
2013

ANTÔNIO FERNANDO HUEB

**EMPREGO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA INATIVAÇÃO
DE *Candida albicans in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em Odontologia da Universidade de Uberaba, área de concentração Biopatologia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

UBERABA – MG

2013

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Hueb, Antônio Fernando.

H87e Emprego da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida albicans* in vitro / Antônio Fernando Hueb – Uberaba, 2013.

35 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino.

1. Fototerapia. 2. *Candida albicans*. 3. Fungos – Culturas e meios de cultura. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. II. Título.

Ata da Sessão Pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Biopatologia, a que se submeteu o aluno Antônio Fernando Hueb – matrícula 6102930, orientado pelo Prof. Tony de Paiva Paulino

Ao dezenove dia do mês de dezembro do ano de dois mil e treze, às 19 horas, na sala 2C06 da Universidade de Uberaba, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo o Colegiado do Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, composta pelos Professores Doutores: Tony de Paiva Paulino - **Presidente**, Geraldo Thedei Júnior, e João Alberto Holanda de Freitas para julgar o trabalho do candidato Antônio Fernando Hueb, apresentado sob o título: **“Emprego da Terapia Fotodinâmica na Inativação de *Candida albicans in vitro*”**. O Presidente declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros da Comissão Julgadora. A seguir a candidata dissertou sobre o seu trabalho e foi arguida pela Comissão Julgadora, tendo a todos respondido às respectivas arguições. Terminada a exposição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

APROVADO

REPROVADO (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora)

Para fazer jus ao título de MESTRE EM ODONTOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOPATOLOGIA, a versão final da dissertação, considerada aprovada devidamente conferida pela Secretaria do Mestrado em Odontologia, deverá ser entregue à Secretaria dentro do prazo de 30 dias, a partir da data da defesa. O aluno Aprovado que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Universidade de Uberaba, conferindo título de validade nacional aos aprovados. Nada mais havendo a tratar, O Senhor Presidente declara a sessão encerrada, cujos trabalhos são objeto desta ata, lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE, com ciência do aluno. Uberaba, ao dezenove dia do mês de dezembro de dois mil e treze.

Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino _____

Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior _____

Prof. Dr. João Alberto Holanda de Freitas _____

Prof. Dr. José Bento Alves _____

Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Flávia Michele da Silva _____

Secretária do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Ciência do Aluno: _____

*Dedico este trabalho à Mara Lúcia, minha
mulher e companheira, que muito me incentivou e
colaborou na execução deste trabalho.*

*Aos meus filhos, Denis, Gustavo e Cristiano,
razão da minha existência.*

Imagination is more important than knowledge
Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino, pela confiança, pelo incentivo e dedicação, pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos e pela impecável condução deste meu trabalho.

Aos professores doutores deste curso de mestrado, Luciano, Denise, Geraldo, Sanívia, Elisângela, o meu muito obrigado pelos ensinamentos e crescimento profissional.

Ao pró-reitor Prof. Dr. José Bento que nos proporcionou esta oportunidade deste curso de mestrado e nos auxiliou sempre que necessitamos de sua ajuda.

Ao aluno da iniciação científica, Renato Ventresqui, pela amizade, conhecimento científico e grande capacidade de trabalho, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vilmar de Paiva Marques e Enfermeira Gláucia de Freitas Marques, amigos e companheiros de jornada, pelo companheirismo e amizade dedicada ao longo dos anos.

À Jerusa de Araújo Costa, sempre solícita e presente durante a árdua caminhada de trabalho.

À Universidade de Uberaba, pelo acolhimento que possibilitou a execução deste trabalho.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo apoio de laboratório, de grande importância para a realização do trabalho.

RESUMO

Espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota comensal da cavidade oral. Entretanto, essas espécies merecem atenção especial devido às patologias que aparecem em pacientes imunossuprimidos, decorrentes do uso indiscriminado de antifúngicos, acarretando um aumento generalizado de cepas resistentes. A terapia fotodinâmica (TFD) está sendo investigada como uma ferramenta alternativa para o combate de microrganismos patogênicos. Esta terapia atua pela combinação de um agente fotossensível e uma fonte de luz visível que levam à produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da terapia fotodinâmica sobre *Candida albicans* em meio planctônico e em biofilme bem como a avaliação metabólica dessas células. Foi preparada uma suspensão de *C. albicans* (CEC 1291) contendo 10^6 UFC/mL. *C. albicans* foi semeada em Agar Sabouraud dextrose (SBA) e incubada a 37°C por 24 horas. Como fonte de luz foi usado um fotopolimerizador de resina odontológica de comprimento de onda 440nm, com potência de 250 mW e com fluência de 50 J/cm^2 . O corante empregado foi o azul de metileno (concentração final de 0,1 mg/mL). Nos estudos realizados em meio planctônico foram avaliadas a viabilidade celular e a cinética de crescimento após o emprego da TFD. Os grupos experimentais foram delineados como segue: células submetidas à irradiação na presença de agente fotossensível (G-TFD), células submetidas somente à irradiação (G-luz), células submetidas somente ao tratamento com o agente fotossensível (G-Droga) e células não tratadas (L-D+). Para todos os experimentos foi estabelecido um inóculo de 10^6 UFC/mL, densidade óptica de 0,680 em 530 nm. As células planctônicas, após os respectivos tratamentos foram, a fim de se determinar a viabilidade celular, diluídas serialmente e posteriormente semeadas em SBA, incubadas por 24 horas a 37°C e contadas as UFC's. Para a avaliação da cinética do crescimento e atividade metabólica foi realizada uma curva de crescimento avaliando-se a densidade celular e o pH por um período de 24 horas e análise calorimétrica. O ensaio de TFD com o azul de metileno inibiu o crescimento de *C. albicans*. O número de UFC foi zero no grupo G-TFD. Já os grupos G-Droga, G-Controle, G-Luz apresentaram um crescimento significativo > 300 UFC. Já a curva de crescimento apresentou resultados positivos após a aplicação da TFD, pois no G-TFD mantiveram-se constante a absorbância e o pH durante as 24 horas indicando inibição do crescimento fúngico pela TFD. Já o grupo G-controle apresentou aumento da densidade celular e diminuição do pH, indicando o crescimento normal da *C. albicans*. A resposta energética detectada pela

calorimetria demonstrou também uma diminuição de energia liberada no grupo G-TFD, diferente do grupo G-Controle. Os resultados apresentaram alta efetividade do azul de metileno aos ensaios realizados, foi possível provar que a *C. albicans* teve sua atividade metabólica inibida. Assim pode-se concluir que a TFD com azul de metileno é eficaz para o tratamento de *C. albicans*.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, *C. albicans*, terapia antifúngica.

ABSTRACT

Candida species are part of the commensal microbiota of the oral cavity. However, these species deserve special attention due to diseases that appear in immunosuppressed patients, resulting from the indiscriminate use of antifungal agents, resulting in an overall increase of resistant strains. Photodynamic therapy (PDT) is being investigated as an alternative tool for combating pathogenic microorganisms. This therapy works by combining a photosensitive agent and a visible light source that lead to the production of reactive oxygen and / or nitrogen. The aim of this study was to evaluate the effect of photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilm and planktonic medium as well as metabolic evaluation of these cells. A suspension was prepared from *C. albicans* (CEC 1291) containing 106 CFU / mL. *C. albicans* was grown on Sabouraud dextrose agar (SDA) and incubated at 37° C for 24 hours. As a light source we used a dental curing resin wavelength 440nm, with power of 250 mW and fluence of 50 J/cm². The dye used was methylene blue (final concentration 0.1 mg / ml). In studies of planktonic medium were assessed cell viability and growth kinetics after the use of PDT. The experimental groups were designed as follows: cells subjected to irradiation in the presence of photosensitive agent (G-PDT), only cells undergoing irradiation (G-light), only cells subjected to treatment with the photosensitive agent (G-Drug) cells and untreated (G-Control). For all experiments established an inoculum of 106 CFU / mL optical density of 0.680 at 530 nm. Planktonic cells after the respective treatments, so as to determine the cell viability were serially diluted and then plated on SDA and incubated for 24 hours at 37 ° C and counted the CFU's. To evaluate the kinetics of growth and metabolic activity was performed by evaluating the growth curve if the cell density and pH for a period of 24 hours and calorimetric analysis. The assay of PDT with methylene blue inhibited the growth of *C. albicans*. The number of CFU was zero in the G- PDT. Have the groups G-Drug G-Control, G-Light showed significant growth > 300 CFU. Already the growth curve showed positive results after application of PDT as the G- PDT remained constant absorbance and pH during the 24 hours indicating fungal growth inhibition by PDT. The G-control showed increased cell density and decreased pH, indicating normal growth of *C. albicans*. The energetic response detected by calorimetry also showed a decrease of energy released in the group G-TFD, different G- Control. The results showed high effectiveness of methylene blue to the tests performed, it was possible to prove that the *C. albicans* was inhibited their metabolic

activity. Thus it can be concluded that PDT with methylene blue is effective for the treatment of *C. albicans*.

Key-words: Photodynamic therapy. *C. albicans*. Antifungic Therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Disposição dos grupos experimentais em placa de 24 poços para realização do trabalho.....	22
Figura 2 - Apresentação esquemática das câmaras. a) Corte transversal com as duas câmaras (a) câmara de amostra (r) câmara referencia, b) Corte lateral da câmara calorimétrica.	23
Figura 3 - Média e Desvio padrão de Log de UFC/mL obtidos das contagem de colônias após a TFD.	25
Figura 4 - Cinética de crescimento dos grupos G-TFD e G-C de <i>C. albicans</i>	26
Figura 5 - Concentração de Glicose ao longo de 24 horas de crescimento de células de <i>C. albicans</i>	27
Figura 6 - Produção de calor em células de <i>C. albicans</i> não tratadas e tratadas com PDT.....	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição dos grupos e parâmetros analisados nos testes de microcalorimetria de condução.	24
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

ASD – Agar Sabouraud Dextrose.

DO – Densidade ótica

EM – Ensaio Microcalorimétricos.

G-C – Grupo Controle.

G-D – Grupo Droga.

G-L – Grupo Luz.

G-TFD – Grupo TFD.

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana.

LED – Diodo Emissor de Luz.

PBS – Phosphate Buffer Saline.

TFD – Terapia Foto Dinâmica.

UFC – Unidade Formadora de Colônia.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Candida albicans</i>	15
1.2	Relevância das infecções por <i>Candida spp</i> no ambiente hospitalar.	16
1.3	Terapia fotodinâmica	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivos Gerais	19
2.2	Objetivos Específicos:	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Obtenção da cepa de <i>Candida albicans</i> CEC 1291	20
3.2	Grupos e delineamento experimental:	20
3.3	Padronização de condições de crescimento de <i>Cândida albicans</i>	20
3.4	Determinação do numero de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	20
3.5	Preparação da solução estoque de Agente Fotossensível utilizado na Terapia Fotodinâmica	21
3.6	Aplicação da Terapia Fotodinâmica	21
3.7	Avaliação das células em meio planctônico pós TFD	22
3.8	Microcalorimetria	23
3.9	Análise estatística	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Estudos em meio planctônico – Avaliação da viabilidade de <i>C. albicans</i> após TFD.....	25
4.2	Avaliação do pH, densidade óptica do meio de cultivo e consumo de glicose durante o crescimento da <i>C. albicans</i>	26
4.3	Análise Calorimétrica	27
5	DISCUSSÃO.....	28
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Candida albicans*

O gênero *Candida spp.* pertence ao reino Fungi, classe dos Deuteromicetos, cuja reprodução acontece através de brotamento. É um fungo leveduriforme, dimórfico, que possui a forma de micélio e hifa, mantendo na maioria das vezes a morfologia de hifas, exibindo a característica de pseudomicélio (Mason *et al.*, 2012). Dentre as espécies de *Candida spp.* existem aproximadamente 150 a 200 espécies conhecidas do gênero (Sanglard e Odds, 2002).

A *C. albicans* é um fungo oportunista que acomete indivíduos imunossuprimidos como os infectados com o HIV, renais crônicos e portadores de doenças do colágeno (Coogan *et al.*, 2006; Antachopoulos, Walsh e Roilides, 2007; Egusa *et al.*, 2008). São frequentes em infecções de pele, cavidade oral, esofágica, trato gastrointestinal e cavidade anal (Calderone e Fonzi, 2001). *C. albicans* pode atingir a corrente sanguínea, por meio da invasão dos tecidos do hospedeiro, ou contaminação por cateter e a infecção pode progredir para o crescimento de massas fúngicas em vários órgãos do corpo (Khan *et al.*, 2010).

As infecções fúngicas representam um grande problema para a saúde pública, à medida que os avanços na medicina prolongam a vida de pacientes imunocomprometidos.

Com o aparecimento da antibioticoterapia, utilização de métodos imunossupressores, surgimento da AIDS, uso prolongado de cateteres e melhorias nos métodos diagnósticos, observamos aumento significativo dos casos de infecções fúngicas.

Crocco (2004) apontou uma diversidade significativa nos mecanismos conferindo resistência de *Candida spp.* aos derivados azólicos. Um dos mecanismos de resistência mais importantes é o aumento da expressão da 14 α -demethylase e, por conseguinte, a dimetilação do precursor lanosterol, bloqueando sua biossíntese, que é um importante componente da parede da célula fúngica (Sheehan, Hitchcock e Sibley, 1999; Sanglard e Odds, 2002).

Dentre os mecanismos que conferem resistência à *Candida spp.* pode-se citar alguns essenciais:

- Alteração do alvo de ação. (Sanglard e Odds, 2002; Kanafani e Perfect, 2008)
- Diminuição da concentração intracelular do fármaco;

- A expressão de bombas de efluxo, resultando no decréscimo da concentração do fármaco no seu local de ação. (Sanglard e colaboradores, 2003; Kanafani, Perfect, 2008);
- Aumento da expressão da enzima lanosterol 14 α -dismetilase (Kanafani e Perfect, 2008; Sanglard e colaboradores, 1995);
- Modificação de outras enzimas envolvidas na biossíntese de esteróis;
- A exposição aos azóis que resulta na depleção do ergosterol da membrana fungica e acúmulo de produtos tóxicos, levando a inibição do crescimento celular;
- Mutações no gene ERG3 impedem a formação destes produtos, o que mantém as membranas funcionalmente ativas e anula a ação dos azóis na via de biossíntese do ergosterol (Kanafani e Perfect, 2008; Sanglard e colaboradores, 2003; Sanglard e Odds, 2002).

Os diferentes mecanismos de resistência descritos podem atuar isoladamente ou em simultâneo nas células fúngicas, desempenhando neste caso em um efeito aditivo.

1.2 Relevância das infecções por Candida spp no ambiente hospitalar.

Em hospitais o gênero *Candida spp.* corresponde a cerca de 80 % das infecções relatadas (Alexander *et al.*, 1990; Colombo e Guimarães, 2003).

Leveduras do gênero *Candida* são de grande importância médica pela frequência que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Esses microrganismos comensais tornam-se patogênicos quando há alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro (Colombo e Guimarães, 2003).

Contaminações por *Candida* induzem a uma vasta gama de infecções superficiais e invasivas acometendo pacientes levando a vários fatores de risco (Colombo e Guimarães, 2003).

Acredita-se que a maioria das infecções hematogênicas seja decorrente de via endógena, através da veiculação desse patógeno pelo trato gastrointestinal (Colombo e Guimarães, 2003).

A maioria das infecções hematogênicas causadas por *Cândida* também podem ser adquiridas por via exógenas, através da manipulação de pacientes com cateteres venosos em

posição central, implante de próteses contaminadas, bem como a administração parenteral de soluções contaminadas, além do que pode ser constatado que dos pacientes com fungemia 100% tinham catéteres intravenosos (Pfaller, 1996; Wenzel, 1995).

1.3 Terapia fotodinâmica

Com o aumento dos níveis de resistência a drogas antifúngicas por *C. albicans*, o potencial efeito antifúngico da terapia fotodinâmica (TFD) tem sido foco de estudos (Junqueira *et al.*, 2010). Esta técnica é utilizada atualmente no tratamento de câncer, apesar de muitos estudos reportarem seu emprego na inativação de microrganismos como bactérias, vírus e fungos (Paulino *et al.*, 2005; Konopka e Goslinski, 2007).

A TFD consiste na combinação entre uma substância química fotossensível (agente sensibilizante) e a fonte de luz na presença de oxigênio, produzindo espécies reativas, como radicais livres, que causam danos às células e sua posterior morte (Lambrechts, Aalders e Van Marle, 2005; Munin *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2008). A TFD foi observada pela primeira vez por Raab em 1903, quando foi observada a morte de microrganismos expostos à luz solar na presença de certos corantes. O que Raab reportou viria a ser uma nova modalidade clínica para o tratamento do câncer e outras moléstias, conhecida como Terapia Fotodinâmica (TFD).

O numero de estudos envolvendo TFD com fungos é menor do que os estudos utilizando bactérias. Nesses estudos os autores relatam a investigação e o entendimento das características moleculares necessárias para que o agente fotossensível seja efetivo em mediar à inativação em várias espécies de microrganismos (Hamblin, 2012).

Há varias fontes de luz que podem ser utilizadas na TFD, dentre elas destaca-se o fotopolimerizador de Resina Odontológica que pode ser usado na terapia fotodinâmica devido ao seu baixo custo de mercado e fácil utilização. Alguns estudos usando este fotopolimerizador apresentaram resultados positivos na inibição de crescimento bacteriano (Paulino e colaboradores, 2005) e fúngico (Ito, 1977; Wilson e Mia, 1993).

A TFD pode ocorrer através de dois mecanismos: Através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou geração do oxigênio singlete (mecanismo tipo II). No mecanismo I o agente fotossensível no estado excitado interage diretamente com o substrato orgânico e moléculas de O₂, produzindo radicais ou íons radicais (Zhu e Finlay, 2008). Esses radicais reagem instantaneamente com o O₂, gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxila os quais podem oxidar uma vasta gama de biomoléculas (Zhu e Finlay, 2008).

No mecanismo tipo II, a reação com os agentes fotossensíveis, ocorre a formação de oxigênio singlete, altamente reativo, através da transferência de energia do fotosensibilizador no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio (Zhu e Finlay, 2008). O oxigênio singlete, quando gerado, pode reagir com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácidos nucléicos. Como os lipídeos insaturados e as proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas, as reações fotoxidativas ocasionam alterações na permeabilidade celular, provocando a morte do tecido alvo via necrose ou apoptose (Zhu e Finlay, 2008).

Os efeitos bioquímicos e funcionais da TFD em fungos incluem a inativação de enzimas, proteínas e a peroxidação lipídica, ocasionando lise da membrana celular, lisossomos e mitocôndria (Bertoloni *et al.*, 1987). Estudos *in vitro* mostraram que *C. albicans* pode ser susceptível a ação de agentes fotossensíveis, como por exemplo, o azul de metileno (Bertoloni *et al.*, 1989).

O Azul de metileno possui varias finalidades na prática clínica devido a sua baixa toxicidade, sendo assim, bastante aceito em procedimentos médicos. Assim, este corante apresenta um potencial fotoativo antimicrobiano, sendo este ideal para tratamento de doenças causadas por fungos leveduriformes e filamentosos (Teichert *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Zeina e colaboradores (2001) e Paardekooper e colaboradores (1995) demonstraram que fungos e bactérias podem ser afetados por agentes fotossensíveis como azul de metileno ou azul de toluidina, quando ativado por luz visível (Ito, 1981; Bertoloni *et al.*, 1993).

Com base no exposto, ante a busca por alternativas que contribuam para com o tratamento de doenças relacionadas infecções por espécies de *Candida* spp. minimizando a troca de cateteres colonizados, trabalhos que busquem um significativo entendimento sobre o uso da TFD (especialmente seus efeitos bioquímicos e fotoquímicos sobre a *C. albicans*) são necessários.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivos Gerais*

Objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações bioenergéticas em *C. albicans* após aplicação da terapia fotodinâmica.

2.2 *Objetivos Específicos:*

- Padronizar o crescimento de *C. albicans* em meio planctônico;
- Avaliar em meio planctônico a capacidade acidogênica da cepa de *C. albicans* após TFD;
- Avaliar o consumo de carboidrato durante o crescimento de *C. albicans* após TFD;
- Utilizar a microcalorimetria de condução para determinação da alteração do metabolismo bioenergético da *C. albicans* após TFD

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Obtenção da cepa de Candida albicans CEC 1291*

A cepa de *Candida albicans* CEC 1291 foi cedida pelo professor Christophe d'Enfert do Unité Biologie et Pathogenicité Fongiques do instituto Pasteur-França. A mesma se encontra no laboratório, congelada em tubos criogênicos em nitrogênio líquido a -120°C.

3.2 *Grupos e delineamento experimental:*

A cepa de *C. albicans* (CEC 1291) foi submetida a diferentes condições experimentais, todas em meio planctônico, conforme disposto no quadro abaixo:

<i>Grupo experimental</i>	<i>Condição experimental</i>	<i>Parâmetros avaliados</i>
Grupo controle (G-C)	Células não tratadas	<ul style="list-style-type: none"> • Acidogenia; • Consumo carboidrato; • Toxicidade das drogas e da luz; • Metabolismo bioenergético
Grupo Terapia Fotodinâmica (G-TFD)	Células tratadas com TFD utilizando Azul de metileno	
Grupo Luz (G-L)	Células tratadas com Luz	
Grupo Droga (G-D)	Células tratadas com Azul de metileno.	

3.3 *Padronização de condições de crescimento de Cândida albicans*

Uma suspensão de *C. albicans* CEC 1291 contendo 10⁶ UFC/ml foi preparada. Para isto, uma cepa de *C. albicans* foi semeada em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco, Detroit, MI, USA) e incubada a 37°C, em aerobiose, por 48 h. Após a Incubação, colônias foram transferidas para um meio líquido de cultivo de Infusão de cérebro e coração (BHI) por 16 h a 37°C em condições aeróbias.

3.4 *Determinação do numero de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)*

Para a determinação do numero de UFC's provenientes dos grupos experimentais, foi utilizada a técnica de semeadura em placa (*Spread plate*).

Após a realização de cada experimento, 50 µL de suspensão de leveduras foram diluídos em PBS (10^{-3}) a fim de se obter contagem de colônias em placa que estejam compreendidas entre 30 e 300 colônias. 50 µL da suspensão de leveduras foram semeados em placa contendo meio de cultivo ASD com o auxílio da alça de Drigalski.

Após o crescimento (24 horas, 37°C, aerobiose) as colônias foram contadas, e os dados expostos em forma de gráfico.

3.5 Preparação da solução estoque de Agente Fotossensível utilizado na Terapia Fotodinâmica

Preparação da solução de Azul de Metileno

Para os experimentos a serem realizados, foi preparada uma solução de Azul de Metileno em uma solução de água esterilizada em um filtro de 0,22 µm, resultando em uma concentração final de 0,1 mg/mL. Esta solução foi armazenada a -20°C até a data do uso.

3.6 Aplicação da Terapia Fotodinâmica

Estudos em meio planctônico – Avaliação da viabilidade de cepas de C. albicans.

Uma suspensão com 10^6 UFC (equivalente à $DO_{530nm} = 0,680$) de *C. albicans* foi distribuída em uma placa de poliestireno (24 poços, 1 mL/ poço) de forma a ficar equidistantes uma amostra da outra, evitando a interferência da luz no momento da irradiação. Desta forma estarão distribuídos na placa os grupos experimentais já descritos como segue (FIGURA 1):

- i) Aos poços da coluna 1 foi adicionado 1 mL de suspensão celular e também a droga em estudo (azul de metileno), constituindo assim o grupo G-D
- ii) Aos poços da coluna 2 foram colocadas apenas as células não tratadas, constituindo o grupo G-C
- iii) Aos poços da coluna 4 foram colocadas as células que serão irradiadas pela luz LED, constituindo o grupo G-L
- iv) Na coluna 6, além das células, foi adicionada a droga em estudo seguida de irradiação com luz LED.

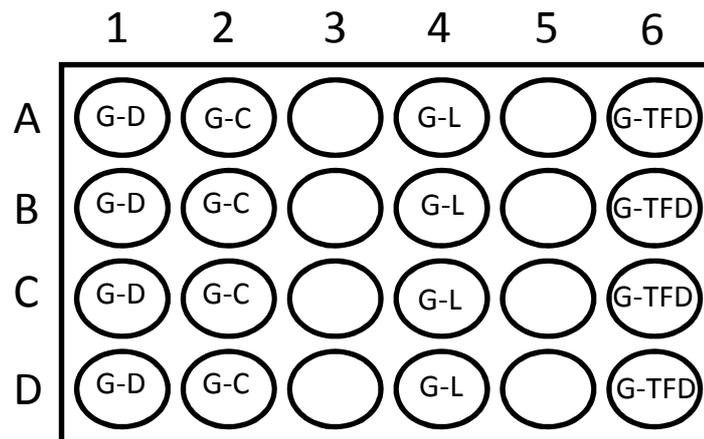


Figura 1 - Disposição dos grupos experimentais em placa de 24 poços para realização do trabalho.

Montada a placa com a respectiva distribuição de células em seus poços, foram iniciados os trabalhos de determinação das concentrações de droga e fluência da luz necessária para se determinar a toxicidade da droga (G-D) e da luz (G-L) sobre a cepa de *C. albicans*.

Após montada a placa de 24 poços com seus respectivos grupos experimentais (Figura 1) a placa foi levada à estufa microbiológica (a 37° C) e incubada durante 30 minutos (azul de metileno 0,1 mg/mL). Em seguida os grupos experimentais foram submetidos a diferentes doses de luz (quando houver) a fim de se determinar a melhor fluência de luz necessária a promover foto danos que comprometam a viabilidade de *C. albicans*.

Após este tempo de irradiação, 50µL da suspensão celular (de todos os grupos descritos) foram plaqueados (*Spread plate*) em meio de cultivo ASD, e em seguida foram incubadas as 37°C por 24 h. Em seguida foi realizada a contagem das colônias e o resultado foi expresso em UFC/mL.

3.7 Avaliação das células em meio planctônico pós TFD

Avaliação do pH, densidade óptica do meio de cultivo e consumo de glicose durante o crescimento da C. albicans

Para a avaliação do crescimento celular a densidade óptica, o pH do meio BHI e a concentração de glicose foram monitorados em função do tempo (a cada 1 hora) coletando-se para análise alíquotas de 3 ml do meio de cultivo previamente homogeneizado.

O pH foi monitorado com um pHmetro de bancada e a densidade óptica foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro (530nm). Para dosagem enzimática de glicose, foi utilizado o kit específico. A glicose foi avaliada quantitativamente no meio de cultivo durante as diferentes fases do crescimento do fungo.

3.8 *Microcalorimetria*

Para a realização dos experimentos de microcalorimetria foi utilizado um Microcalorímetro de Condução (MicroCal, EXON Biotec, Belo Horizonte, Brasil). Todos os grupos experimentais (G-C, G-TFD, G-L e G-D) foram avaliados por microcalorimetria de condução e os experimentos foram realizados em triplicata e os valores expressos como média. As amostras foram depositadas nas câmaras de amostra (A) e de referência (R) (FIGURA 2) do microcalorímetro de forma a obtermos resultados de metabolismo endógeno e metabolismo do carboidrato glicose, como segue a tabela abaixo:

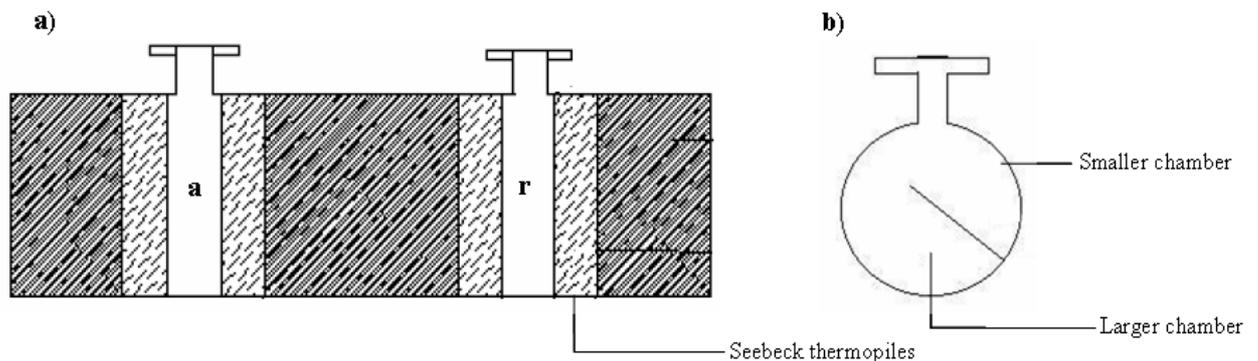


Figura 2 - Apresentação esquemática das câmaras. a) Corte transversal com as duas câmaras (a) câmara de amostra (r) câmara referencia, b) Corte lateral da câmara calorimétrica.

Fonte: Vasconcelos, et.al., 2009.

No experimento foi utilizado um registrador eletrônico com base em um computador do tipo PC-XT, dotado de placa especial OMEGA_WB_AAI_B8 de alta resolução (0,8 uv) que permite a leitura de voltagens nas diversas faixas, cobrindo intervalos de tempo que podem ser estabelecidos de milisegundos a horas. Dessa maneira, um processo qualquer que ocorra na câmara de observação, produzindo ou liberando calor, desencadeia uma resposta que é registrada como potência elétrica em função de tempo, formando uma curva designada termograma. No final do experimento, a interação da área registrada fornece o valor da energia total envolvida no processo (potência x tempo= Energia).

Os resultados dos ensaios foram obtidos comparando-se os grupos experimentais entre si de forma a se obter o efeito da diferença metabólica entre os tratamentos através da energia liberada pela *C. albicans*.

Os Ensaio Microcalorimétricos (EM) avaliando a produção de energia das células tratadas e não tratadas sob diferentes condições foram realizados conforme segue abaixo no Quadro 1:

Quadro 1 - Descrição dos grupos e parâmetros analisados nos testes de microcalorimetria de condução.

Ensaio	Câmara de Referência	Câmara da Amostra
1°	PBS + Glicose 6mM	Células + glicose 6mM
2 °	PBS + Glicose 6mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6mM

3.9 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e suas médias foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Os resultados foram tratados estatisticamente com o teste de t-Student.

4 RESULTADOS

4.1 Estudos em meio planctônico – Avaliação da viabilidade de *C. albicans* após TFD

A TFD induziu uma redução significativa do número de colônias de *C. albicans* com o uso do azul de metileno (0,1 mg/mL) após 50 Joules/cm², como apresentado na (Figura 3), sendo esses resultados considerados como efetivos contra cepas de *C. albicans*.

O grupo G-C e o G-L não apresentaram alterações no log de UFC/mL quando comparado com o grupo G-TFD. Resultados apresentam que o grupo G-D tem um baixo efeito “per se” nas células de *C. albicans*. No grupo G-TFD, houve redução no log de UFC/mL.

Houve diferença estatística entre os grupos analisados. Resultados apresentaram a eficácia do azul de metileno nos testes realizados, propondo a inibição da atividade metabólica das células de *C. albicans*.

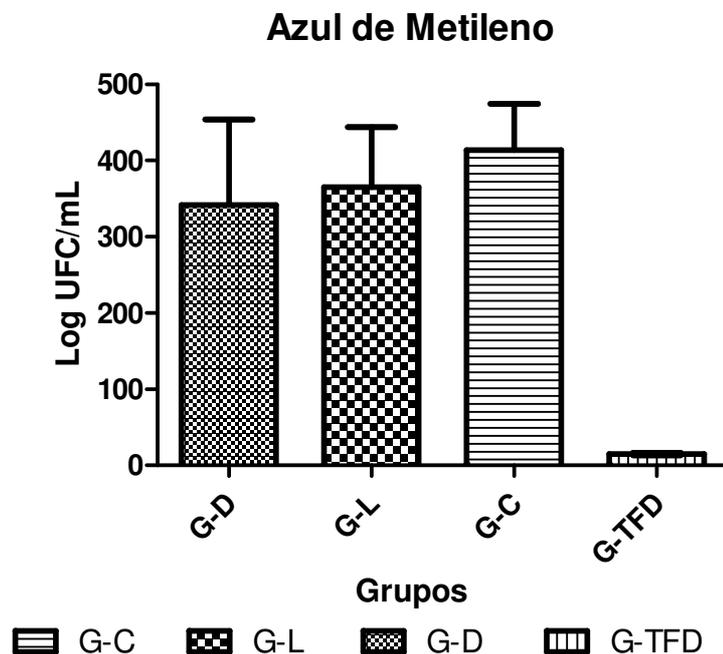


Figura 3 - Média e Desvio padrão de Log de UFC/mL obtidos das contagem de colônias após a TFD.

Há diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre G-TFD e os demais grupos. Entre os grupos G-C, G-L e G-D não houve nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$).

4.2 Avaliação do pH, densidade óptica do meio de cultivo e consumo de glicose durante o crescimento da *C. albicans*

De acordo com a densidade óptica apresentada, foi possível observar uma alteração do crescimento das cepas de *C. albicans*.

Já para os dados de pH não foi possível inferir sobre a viabilidade, visto que a *C. albicans* não apresentou características acidogênicas diferentes entre os grupos G-TFD e G-C.

Os grupos testados foram: G-C e G-TFD. Não foram testados os grupos G-LUZ e G-D visto que de acordo com resultados apresentados anteriormente não mostraram efeitos fungicidas.

O grupo G-C apresentou um crescimento exponencial de células de *C. albicans* ocorrendo comportamento de fase logarítmica com 12 horas.

Pode-se observar que o grupo G-TFD apresentou um crescimento irregular. As células de *C. albicans* apresentaram comportamento de fase logarítmica com 15 horas. Isso se deve ao efeito fungicida causado pela TFD. Este crescimento pode estar associado ao fato de que a TFD não causa morte de 100 % das células, apresentando crescimento com 15 horas, enquanto células não tratadas com TFD apresentam crescimento com 12 horas.

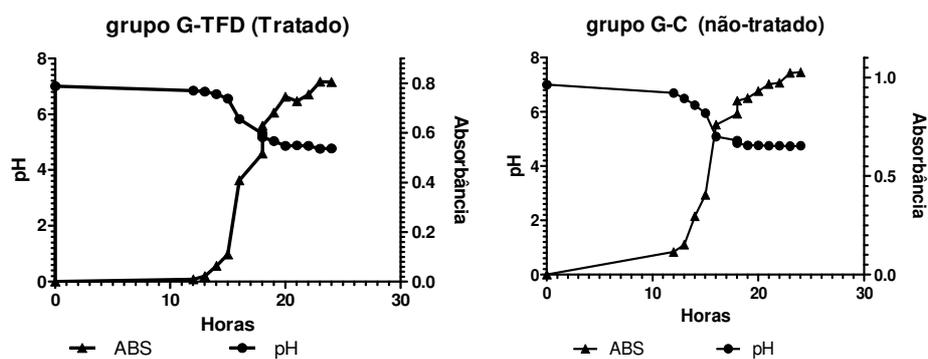


Figura 4 - Cinética de crescimento dos grupos G-TFD e G-C de *C. albicans*.

A concentração de glicose diminui durante o crescimento regular da *C. albicans*, decorrente do consumo pelas células para manter o metabolismo ativo. No início do crescimento, a concentração de glicose (mg/dL) era de 73 mg/dL, já na última hora avaliada do crescimento foi de 5,39 mg/mL, fato esse relacionado à atividade metabólica da célula (FIGURA 3).

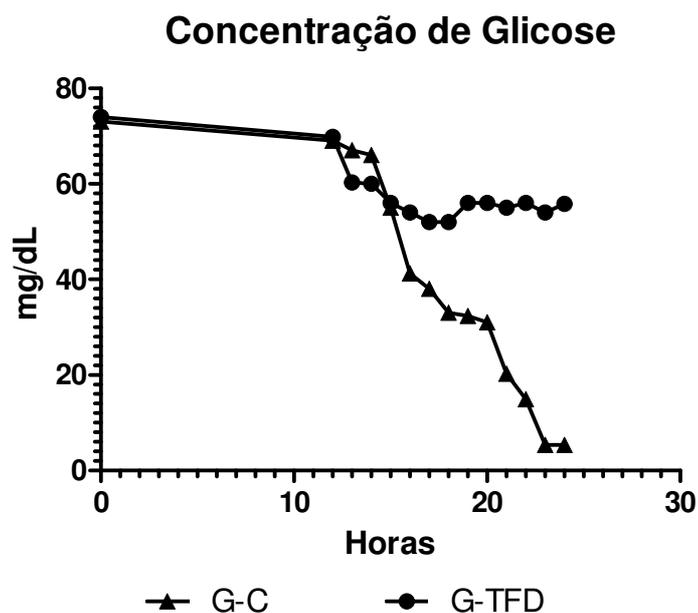


Figura 5 - Concentração de Glicose ao longo de 24 horas de crescimento de células de *C. albicans*.

4.3 Análise Calorimétrica

No estudo calorimétrico foi possível observar que o grupo não tratado, teve uma produção de calor mais elevado do que o grupo tratado. Valores de 184,83 e 54,71 mJ foi observado para as células não tratadas e células tratadas respectivamente, mostrando uma inibição atividade metabólica através da TFD em *C. albicans*, como observado na Figura 4.

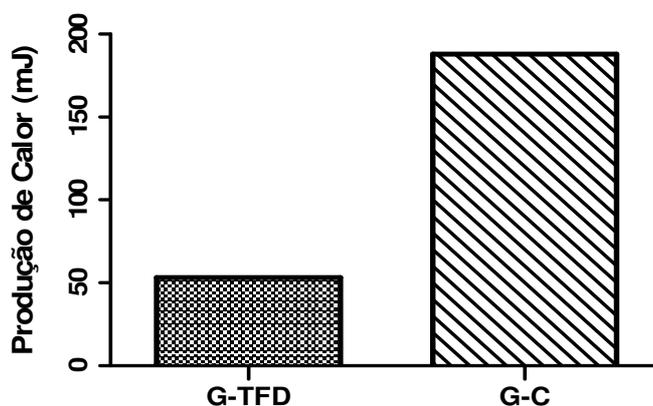


Figura 6 - Produção de calor em células de *C. albicans* não tratadas e tratadas com PDT.

5 DISCUSSÃO

O aumento de infecções fúngicas e de resistência às drogas antifúngicas conduziu à investigação de novas abordagens visando uma nova alternativa para sanar este problema (Dai *et al.*, 2012; . Kato *et al.*, 2013). Com o advento da terapia fotodinâmica esta nova modalidade de tratamento tornou-se opção eficaz contra estes tipos de doenças, decorrentes de microrganismos resistentes (Dai *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, a fotoinativação de *C. albicans* utilizando azul de metileno a uma concentração final de 0,1 mg / mL em meio planctônico seguido da irradiação por LED com fluência de 50 J/cm², mostraram uma redução significativa do log UFC / mL de *C. albicans*. Estes resultados estão de acordo com vários estudos (Peloi *et al.*, 2008 ; Carvalho, Felipe e Costa, 2009; Souza *et al.*, 2010).

Souza *et al.* (2010) estudaram a fotoinativação em *C. albicans* por azul de metileno usando fonte de luz de gálio - alumínio - arseneto (GaAlAs) Laser (Easy Laser, Clean Line , Taubaté , Brasil) , com densidades de energia de 15,8 J / cm² (6 J de energia e de tempo de 171 s) , 26,3 J/cm² (10 J de energia e de tempo de 285 s) e 39,5 J/cm² (15 J de energia e de tempo de 428 s) . Eles encontraram uma redução de log UFC / mL de *C. albicans* tratada por TFD. Foi possível observar que apenas as células que foram irradiadas tiveram uma redução observada, corroborando com o presente trabalho. Wilson e Mia (1993) também observaram uma redução de 77% nas unidades formadoras de colônia após PDT.

Aplicação de irradiação o grupo (G-L) não apresentou nenhuma redução significativa quando comparado com os grupos (G-D e G-C), fato observado por Teichert *et al.* e colaboradores (2002) e Souza e colaboradores (2010) em camundongos tratados com azul de metileno.

Os grupos tratados apenas com azul de metileno não apresentaram redução significativa do log UFC / mL, quando comparados com os grupos G-L e G-C. Este fato foi observado por Teichert *et al.* e colaboradores (2002) que trataram também com azul de metileno, línguas de camundongos infectados por *C. albicans* não apresentando reduções significativas de log UFC / mL de leveduras.

A cinética de crescimento de *C. albicans* apresentou uma atividade antifúngica, indicando a eficácia da TFD. A amostra de *C. albicans* não tratada entrou em fase logarítmica com 12 horas e que pode aqui ser tratado como um metabolismo normal (sem interferência da

TFD). O grupo de *C. albicans* tratadas com TFD entrou na fase logarítmica com 15 horas, devido à ação degenerativa causada pelas espécies reativas produzidas no meio celular.

Este fato foi observado por Kato e colaboradores (2013) que estudou a cinética de *C. albicans* após PDT mediada com azul de metileno, observando uma redução das células expostas a esta terapia.

Como exposto anteriormente, uma curva de crescimento de *C. albicans* após TFD tem cinética diferente de uma cepa não tratada. O consumo de glicose e o pH foram determinados sendo possível observar que para o carboidrato o consumo foi prejudicado pela TFD.

Outra metodologia para analisar o metabolismo da glicose é a calorimetria condução. Neste estudo, a análise calorimétrica apresentou resultados semelhantes aos do consumo da glicose. Análises calorimétricas de *C. albicans* não tratadas por TFD apresentaram uma alta produção de calor, indicando o metabolismo normal. *C. albicans* tratadas pela TFD apresentaram uma baixa produção de calor devido ao efeito inibitório sobre o metabolismo destes microrganismo.

Esta mudança no metabolismo pode ser por meio da inibição de algumas vias metabólicas, inclusive a via glicolítica (fato este que deve ser futuramente elucidado).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de Terapia Fotodinâmica (TFD) mostrou-se eficaz na inativação de *Candida albicans* em meio planctônico, como ficou demonstrado no presente trabalho.

Levando-se em conta:

- A padronização do crescimento da *C. albicans*.
- A determinação da toxicidade do azul de metileno sobre a *C. albicans* cultivada em meio planctônico.
- A determinação da fluência de luz necessária para inativar a *C. albicans* via TFD em meio planctônico.

Foi possível avaliar:

- A capacidade acidogênica da cepa de *C. albicans* após TFD.
- O consumo de carboidratos durante o crescimento de *C. albicans* após TFD.
- Alterações do metabolismo bioenergético da *C. albicans* após TFD, pelo uso de microcalorimetria de condução.

Os resultados obtidos pelo conjunto das análises acima descritas mostram que o TFD representa importante método de tratamento, por inativação celular, de cepas de *C. albicans* em meio planctônico.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. Candida infections of the genitourinary tract. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 253-273, 2010. ISSN 0893-8512.
- ALEXANDER, J. W. et al. The process of microbial translocation. **Annals of surgery**, v. 212, n. 4, p. 496, 1990.
- ANTACHOPOULOS, C.; WALSH, T. J.; ROILIDES, E. Fungal infections in primary immunodeficiencies. **European journal of pediatrics**, v. 166, n. 11, p. 1099-1117, 2007. ISSN 0340-6199.
- BERTOLONI, G. et al. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. **Journal of general microbiology**, v. 135, n. 4, p. 957-966, 1989. ISSN 1350-0872.
- BERTOLONI, G. et al. Biochemical and morphological changes in *Escherichia coli* irradiated by coherent and non-coherent 632.8 nm light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 18, n. 2, p. 191-196, 1993. ISSN 1011-1344.
- BERTOLONI, G. et al. Role of specific cellular targets in the hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of microbial cells. **Photochemistry and photobiology**, v. 46, n. 5, p. 695-698, 1987. ISSN 1751-1097.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001. ISSN 0966-842X.
- CARVALHO, G. G.; FELIPE, M. P.; COSTA, M. S. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. **The Journal of Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 619-623, 2009. ISSN 1225-8873.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- COOGAN, M. M. et al. (B1) *Candida* and mycotic infections. **Advances in dental research**, v. 19, n. 1, p. 130-138, 2006. ISSN 0895-9374.
- DAI, T. et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in microbiology**, v. 3, 2012.
- EGUSA, H. et al. Oral candidosis in HIV-infected patients. **Current HIV research**, v. 6, n. 6, p. 485-499, 2008. ISSN 1570-162X.
- HAMBLIN, M. R. **Photodynamic therapy mediated by fullerenes and their derivatives**. Momentum Press, 2012. ISBN 1606504169.
- ITO, T. Toluidine blue: the mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochemistry and photobiology**, v. 25, n. 1, p. 47-53, 1977. ISSN 1751-1097.
- ITO, T. Photodynamic action of hematoporphyrin on yeast cells—a kinetic approach. **Photochemistry and photobiology**, v. 34, n. 4, p. 521-524, 1981. ISSN 1751-1097.

- JUNQUEIRA, J. C. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: photodynamic antimicrobial effects of malachite green on *Staphylococcus*, enterobacteriaceae, and *Candida*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. S1, p. S-67-S-72, 2010. ISSN 1549-5418.
- KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008. ISSN 1058-4838.
- KATO, I. T. et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 445-451, 2013. ISSN 0066-4804.
- KHAN, M. S. A. et al. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. **Combating Fungal Infections: Problems and Remedy**, p. 21, 2010. ISSN 3642121721.
- KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007. ISSN 0022-0345.
- KONG, W. J. et al. Investigation of the anti-fungal activity of coptisine on *Candida albicans* growth by microcalorimetry combined with principal component analysis. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1072-1080, 2009. ISSN 1365-2672.
- LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, 2005. ISSN 0066-4804.
- MASON, K. L. et al. *Candida albicans* and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy. **Infection and immunity**, v. 80, n. 10, p. 3371-3380, 2012. ISSN 0019-9567.
- MUNIN, E. et al. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, n. 1, p. 16-20, 2007. ISSN 1011-1344.
- PAARDEKOOPER, M. et al. Intracellular damage in yeast cells caused by photodynamic treatment with toluidine blue. **Photochemistry and photobiology**, v. 61, n. 1, p. 84-89, 1995. ISSN 1751-1097.
- PAULINO, T. P. et al. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 3, p. 353-359, 2005. ISSN 0003-9969.
- RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista iberoamericana de micología**, v. 18, n. 4, p. 163-170, 2001. ISSN 1130-1406.
- PELOI, L. S. et al. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of biosciences**, v. 33, n. 2, p. 231-237, 2008. ISSN 0250-5991.
- PRATES, R. A. et al. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. **Laser physics**, v. 19, n. 5, p. 1038-1044, 2009. ISSN 1054-660X.

- PRATES, R. A. et al. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1525-1532, 2011. ISSN 0305-7453.
- PFALLER MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clinical Infectious Diseases* 22 (suppl 2): S89-S94, 1996.
- ROSA, E. A. R. et al. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. **Journal of medical microbiology**, v. 57, n. 10, p. 1277-1281, 2008. ISSN 0022-2615.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002. ISSN 1473-3099.
- SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-590, 2008. ISSN 1601-0825.
- SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999. ISSN 0893-8512.
- SO, C. W. et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by BAM-SiPc. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 215-220, 2010. ISSN 1439-0507.
- SOUZA, R. C. et al. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Lasers in medical science**, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2010. ISSN 0268-8921.
- TEICHERT, M. C. et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 93, n. 2, p. 155-160, 2002. ISSN 1079-2104.
- WENZEL RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clinical Infectious Diseases* 20: 1531-1534, 1995
- WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 22, n. 8, p. 354-357, 1993. ISSN 1600-0714.
- ZEINA, B. et al. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 2, p. 274-278, 2001. ISSN 1365-2133.