

FOTOSENSIBILIZAÇÃO DE QUATRO ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA* POR RADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Sandra Cristina de Souza¹, Egberto Munin¹, Juliana C. Junqueira², Cristiane Y. Koga-Ito², Antônio Olavo Cardoso Jorge².

¹Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), Universidade do vale do Paraíba (UNIVAP), 122444-000, São José dos Campos, SP, Brasil.

²Microbiologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 12245-000, São José dos Campos, SP, Brasil. sandcristina@yahoo.com.br, munin@univap.br, julianacjunqueira@hotmail.com.br,

Palavras-chave: laser, *Candida*, terapia fotodinâmica, Azul de Metileno.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Odontologia

Resumo: O amplo uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos em pacientes imunossuprimidos resultou em um aumento alarmante de microrganismos resistentes a esses medicamentos [1] e estudos promissores têm sido realizados em microbiologia baseados na fotossensibilização de corantes por radiação laser de baixa potência. Em nosso estudo quatro diferentes espécies: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* em suspensão contendo, para cada espécie, 10^6 células viáveis/ml de salina foram irradiadas na presença ou não do azul de metileno (0,1 mg/ml) com dose de energia de 10,6 J/cm² por 300s. Nossos resultados mostraram que todas as espécies tiveram redução de sua viabilidade. Houve redução de até 91,6% quando foram associados laser e corante. Interessantemente, *C. tropicalis* apresentou diferença estatística entre o grupo tratado por laser na ausência do corante e os outros grupos.

Introdução

As espécies do gênero *Candida* estão presentes na maioria das infecções bucais e são patógenos freqüentes em infecções oportunistas de pacientes susceptíveis, incluindo pacientes com leucemia; transplantados; tratados com corticosteróides e HIV-infectados [1,2,3] sendo comum, a presença de candidíase orofaríngea nesses pacientes.

O tratamento convencional contra as mais comuns infecções por *Candida* tem sido realizado por aplicações tópicas de antifúngicos poliênicos como a nistatina e anfotericina. Porém, nos casos em que há imunossupressão esses antifúngicos podem não ser efetivos, sendo necessária a administração de agentes sistêmicos como o ketaconazol, anfotericina B, iatroconazol [4].

No entanto, o amplo uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos em pacientes imunossuprimidos resultou em um aumento alarmante de microrganismos resistentes a esses medicamentos. Essa resistência está associada, principalmente, com imunossupressão severa, reincidência das infecções e tempo de tratamento prolongado [1]. Aproximadamente 81% de todos os pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) são colonizados por cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos [5].

Estudos promissores têm sido realizados em microbiologia baseados na fotossensibilização de corantes por radiação laser de baixa potência [6,7,8], técnica denominada terapia fotodinâmica

(PDT) e o Azul de Metileno tem sido largamente empregado com eficiência, mostrando-se capaz de erradicar *C. albicans* da cavidade bucal de camundongos inoculados por esse microrganismo [1].

Nosso trabalho busca contribuir para o estudo de terapias alternativas no tratamento à infecções por *Candida* avaliando o comportamento de quatro diferentes espécies de *Candida* submetidas à fotossensibilização do Azul de Metileno.

Material e Métodos

Para a sensibilização das diferentes espécies de *Candida* foi utilizado o corante Azul de Metileno como fotossensibilizador em concentração de 0,1 mg/ml, utilizando-se para o preparo dessa solução água destilada. As amostras foram adequadamente irradiadas por um diodo laser InGaAlP modelo PHOTON LASE - DMC equipamentos, atuando na faixa espectral do vermelho com comprimento de onda de 685nm correspondente à faixa de comprimento de alta absorção pelo corante.

As cepas de *Candidas* utilizadas nesse trabalho foram obtidas do banco de amostras do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ UNESP e foi realizada a fotossensibilização de quatro diferentes espécies: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* em suspensão contendo, para cada espécie, 10^6 células viáveis/ml de salina. Utilizamos o meio de

cultura Ágar Sabourand Dextrose em placas de Petri e a contagem das UFCs procedeu-se após um período de 48h em estufa a 37°C.

Para determinarmos o efeito da fotosensibilização sobre as espécies estudadas estabelecemos quatro experimentos: A (L+ C+) em que 0,1 ml de suspensão 10^6 foi adicionado de 0,1ml do fotosensibilizador em poço de fundo plano e irradiado; B (L+ C-) em que 0,1 ml de suspensão 10^6 foi adicionado de 0,1 ml de salina e irradiado; C (L- C+) em que 0,1ml de suspensão 10^6 foi adicionado de 0,1 ml de fotosensibilizador e não irradiado, esse último teve como propósito a avaliação do efeito do fotosensibilizador sobre a suspensão sem a radiação e o experimento D (L- C-) em que 0,1 ml de suspensão 10^6 foi adicionado de 0,1 ml de salina e não irradiado. Durante todo o processo experimental na presença do fotosensibilizador foi mantido o ambiente escuro.

Para a irradiação de cada poço de fundo plano foi utilizado um anteparo negro fosco com orifício de diâmetro coincidente ao da entrada do poço para se evitar espalhamento indesejável da luz laser. A dose de energia adotada foi de 10,6 J/cm², o tempo de irradiação fixado em 300s (5 min) numa área de feixe de 0,38 cm².

Foram realizadas diluições (10^{-3}) em tubos de ensaio contendo soluções salinas de cloreto de

sódio, seguindo-se a semeadura em duplicata em placas.

O cálculo para obtenção do percentual de redução de ufc foi realizado da seguinte forma:

$$XD - XA / XD.100$$

(XD: média do grupo D; XA: média do grupo A.)

A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA 3-way e complementado pelo teste de Tukey com nível de significância de 95% (P<0,05).

Resultado

A eficiência na associação laser/corante na redução da viabilidade é mostrada na Tabela 1. A exposição ao laser InGaAIP por 300s na ausência do fotosensibilizador, interessantemente, mostrou diferença estatisticamente significativa para a espécie *C. tropicalis* em relação ao outros grupos (Tabela 2) e redução de 61% na sua viabilidade. Bem como, a exposição das suspensões de *Candida* ao Azul de Metileno (0,1mg/ml) por 300s na ausência do laser não resultou diferença estatística em qualquer das espécies estudadas.

Em nosso resultado não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparamos espécies e laser, espécies e corante, bem como, quando comparadas espécies/laser/corante (teste ANOVA 3-way, Tukey).

Tabela 1: Viabilidade das quatro diferentes espécies de *Candida* expostas à luz laser na presença do fotosensibilizador azul de metileno (L+ D+) e em sua ausência (L- D-), em valores médios.

espécies	L+ D+	L- D-	Redução à morte ufc/ml	%
<i>C. albicans</i>	55900	488900	433000	88,6
<i>C. dubliniensis</i>	45300	299200	253900	84,8
<i>C.krusei</i>	29150	345900	316750	91,6
<i>C.tropicalis</i>	85050	480400	395350	82,3

Tabela 2: Resultados expressos em valores médios em log de ufc (n=10)±s.d., L+ D+ = suspensão exposta ao laser na presença do corante; L+ D- = suspensão exposta ao laser na ausência do corante; L- D+ = suspensão exposta ao corante na ausência do laser; L- D- = ausência do corante e do laser, evidenciadas as diferenças estatísticas.

espécies	Viabilidade em ufc/ml (log)			
	L+ D+	L+ D-	L- D+	L- D-
<i>C. albicans</i>	4.68±0.29 ^A	5.56±0.09 ^B	5.69±0.10 ^B	5.69±0.08 ^B
<i>C. dubliniensis</i>	4.43±0.58 ^A	5.40±0.11 ^B	5.43±0.12 ^B	5.46±0.10 ^B
<i>C. krusei</i>	4.20±0.56 ^A	5.50±0.11 ^B	5.60±0.19 ^B	5.53±0.06 ^B
<i>C. tropicalis</i>	4.72±0.53 ^A	5.26±0.09 ^C	5.65±0.06 ^B	5.68±0.05 ^B

A, B e C: diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey; p<0,05)

Discussão

Atualmente, os estudos com diferentes espécies de *Candida* são considerados pela sua importância médica em relação ao tratamento das diversas modalidades de doenças infecciosas que podem ocorrer em diferentes sítios do corpo humano bem como, a possível transmissibilidade do fungo [9,10,2]. Entre as espécies de importância médica estão *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* que têm sido isoladas da cavidade oral e *C. albicans* têm se mostrado a espécie mais frequentemente isolada seguida de *C. tropicalis* [11].

Por outro lado, o tratamento para as infecções por *Candida* tem enfrentado o desafio da resistência do microrganismo à droga de escolha que por sua vez, tem seu efeito dependente da espécie infectante, uma vez que a mesma droga pode sensibilizar *C. albicans*, espécie mais susceptível à maioria delas e não ter o mesmo efeito sobre *C. tropicalis* que exibe uma resposta fraca à maioria dos antifúngicos [2]. A espécie *C. krusei*, apesar de apresentar incidência menos comum (1–2 %) têm importante significância clínica devido à resistência ao fluconazol e baixa susceptibilidade a todos os antifúngicos [10].

Muitos estudos têm apontado para a terapia fotodinâmica como alternativa de tratamento em diversas doenças de origem infecciosa ou não. A motivação para tais estudos é o efeito citotóxico provocado pela sensibilização de uma substância alógena ao organismo e que na ausência da luz seja inócua [13,14,15,16,17,18].

Quando utilizado com dose de energia adequada, a luz emitida na região visível do espectro eletromagnético em baixa potência oferece segurança por não provocar danos

térmicos como acontece nos lasers de alta potência [13,16]. No entanto, os trabalhos com terapia fotodinâmica mostram dependência da dose de energia para maior ou menor efeito na morte celular [20]. O azul de metileno é citado como dose-dependente para redução total de microrganismos em língua de camundongo [1]. Nosso estudo, com o intuito de avaliar o efeito da sensibilização do azul de metileno sobre espécies de *Candida in vitro* nos permitiu observar redução de até 91,6% com a dose de energia de 10 J/cm².

WILSON & MIA, 1993 em seu estudo sobre a fotossensibilização de *C. albicans in vitro* relataram citotoxicidade do azul de metileno utilizado em duas concentrações 0,1 e 1 mg/ml e redução de 17% e 35% respectivamente, na presença do laser. No entanto, em nossos resultados, a concentração de 0,1 mg/ml de azul de metileno, na ausência de luz, não demonstrou qualquer efeito citotóxico sobre *C. albicans* de forma semelhante ao que tem sido relatado nos estudos envolvendo bactérias em que é observada a não toxicidade do azul de metileno na ausência de luz [3,13] e ainda, para *C. albicans* obtivemos uma redução de 88.6%. Na presença somente do corante apenas para as espécies *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* foi observada redução de 7% e 5.2%, respectivamente.

Ainda há a necessidade do estabelecimento de protocolos ideais de dosagem de energia para a redução de microrganismos [21] e buscando contribuir para isso, nossos resultados mostraram que todas as espécies estudadas foram sensíveis ao tipo de corante e concentração utilizada quando associados ao laser, bem como, a dosimetria laser adotada foi eficaz.

Referências

1. TEICHERT, M.C.; JONES, J.W.; USACHEVA, M.N.; BIEL, M. A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 93, n.2, February, 2002.
2. SOBEL, J.D.; VAZQUEZ, J. Candidiasis in the Intensive Care Unit. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v.24, n.1, 2003.
3. WILSON, M.; MIA, N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J. Oral Pathol Med**, v.22, p.354-7, May, 1993.
4. FARAH C.S.; ASHMAN, R.B.; CHALLACOMBE, S.J. Oral Candidosis. **Clin. Dermatol.**, v.18, n.5, p.553-62, Sept./Oct., 2000.
5. JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W.; LUCKER, J.; POSTER, S.R.; SCULLY, C.. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy of oral candidiasis. **J. Antimicrob chemoter**, v.35, p.103-114, 1995.
6. WILLIAMS, J.A.; PEARSON, G.J.; COLLES, M.J.; WILSON M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries. Res.**, v.37, p.190-193, 2003.
7. O'NEILL, J.F.; HOPE, C.K.; WILSON M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.31, p.86-90, 2002.
8. 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 in Surgery and Medicine**, v.29, p.165-173, 2001.
9. ZÖLLNER, M.S.A.C.; JORGE, A.O.C. *Candida spp.* Occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mouths and breasts. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n.2, p.151-5, 2003.
10. VAZQUEZ, J.A. Invasive oesophageal candidiasis: current and developing treatment options. **Drugs**, v.63, n.10, p.971-989, 2003.
11. REGO, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE. A.O.C. Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida spp.* in children. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n.4, p.332-6, 2003.
12. SOBEL, J.D.; VAZQUEZ, J. Candidiasis in the intensive care unit. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v.24, n.1, 2003.
13. DOBSON, J.; WILSON M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archs Oral Biol**, v.37, n.11, p.883-887, 1992.
14. SARKAR, S.; WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v.28, p.204-210, 1993.
15. MARCUS, S.L.; SOBEL, R.S.; GOLUB A.L.; CARROL R.L.; LUNDAHL S.; SHULMAN D.G. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): current clinical and development status. **Journal of Clinical Medicine & Surgery**, v.14, n.2, p.59-66, 1996.
16. SMALL, W.; HEREDIA, N.J.; MAITLAND, D.J.; SILVA, L.B.; MATTHEWS, D.L. Dye-enhanced protein solders and patches in laser-assisted tissue welding. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.15, n.5, p.205-208, 1997.
17. CHANG, C.J.; LEE, Y.H.; YANG, J.Y.; WENG, C.J.; WEI, F.C. Pilot *in vitro* toxicity study of 5-ALA and photofrin® in microvascular endothelial cell cultures. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.15, n.2, p.83-87, 1997.
18. NSEYO, U.O.; DEHAVEN, J.; DOUGHERTY, T.J.; POTTER, W.R.;

- MERRILL, D.L.; LUNDAHL, S.L.; LAMM, D.L. Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long term experience. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.16, n.1, p.61-68, 1998.
19. WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol Immunol**, v.8, p.182-187, 1993.
20. WILSON, M.; PRATTEN, J. Lethal photosensitization of *staphylococcus aureus in vitro*: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.16, p.272-276, 1995.
21. CHAN, Y.; LAI, C. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.**, v.18, n.1, p.51-55.