

ESTUDO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (PACT) EM CANDIDA ALBICANS.

Gabrielle Klug Bacelli¹, Monalisa Poliana Felipe², Maricília Silva³

^{1,2}Faculdade Ciências da Saúde (FCS) – Engenharia Biomédica, ^{1,2,3}Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos – SP – Brasil, 12.244-000, Fone: 3947-1168.
gabiengbio@yahoo.com.br, engmonalisa@hotmail.com, mscosta@univap.br

Resumo: As espécies de *Candida* constituem parte da flora normal da pele, boca e trato gastrointestinal, sendo a mais freqüente causa de infecções fúngicas. Os principais fatores predisponentes são a imunossupressão. Este trabalho teve como objetivo o estudo da terapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) utilizando o Azul de Metileno como agente fotossensibilizante sobre culturas de *Candida albicans*. A (PACT) promoveu uma queda no crescimento da *Candida albicans*, a inibição foi melhor observada na concentração de AM 0,05 mg/ml. Os resultados demonstram que os efeitos inibitórios dependem da adequada Densidade de energia, concentração de células e da concentração do AM.

Palavras - chave: *Candida Albicans*, terapia fotodinâmica, azul de metileno.

Introdução:

Os fungos são organismos eucarióticos, apresentando DNA delimitado por dupla membrana.

Todas as espécies de fungos possuem parede celular rígida, a qual determina sua forma. As paredes são compostas em grande parte por carboidratos, lipídeos, glicoproteínas e grandes cadeias de polissacarídeos. De acordo com a sua morfologia, os fungos podem ser classificados como leveduras ou como fungos filamentosos (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

As espécies do gênero *Candida* são leveduras que se apresentam como blastomicetos arredondados ou ovalados, apresentando brotamento ou se alongando formando pseudo-hifas. Em caso de invasão tecidual a *C. albicans* pode formar tubos germinativos, que se transformam em brotamentos micelânicos septados. As leveduras são, predominantemente, organismos unicelulares.

As leveduras de *C. albicans* causam infecções que acometem principalmente a pele, unhas, mucosas, trato intestinal, urinário, entre outros. A transmissão se dá por via endógena, podendo haver transmissão por contato inter-humano e fômites (roupas e toalhas). Os principais fatores predisponentes são a imunossupressão, o uso prolongado de corticosteróides, gravidez, diabetes, queimaduras graves, maceração das dobras da pele e umidade constante (OLIVEIRA et al. 2001).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste na administração local ou sistêmica de uma substância fotossensível, podendo ser uma droga ou um pigmento, cuja característica é absorver a luz com elevada eficiência, em determinada região do espectro visível. Quando fotoativadas, estas moléculas são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas (MACHADO, 2000).

Esta técnica, assim como a TFD, envolve a produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio, produzindo danos às células dos microorganismos.

A TFD pode induzir morte celular, tanto por meio de necrose como de apoptose (OLEINICK; EVANS, 1998).

A palavra "laser" é o acrônimo de "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation", ou seja, "amplificação da luz por emissão estimulada de radiação" (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2003; SERWAY, 1996).

É uma luz monocromática, produzindo linhas espectrais muito estreitas. Altamente direcional, coerente, podendo ser focalizada em uma região muito pequena com grande precisão, concentrando grande quantidade da energia luminosa (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2003).

O efeito fotoquímico está associado a moléculas (cromóforos) que ao serem estimuladas absorvem energia e passam para um estado excitado. Estes cromóforos estão presentes nos tecidos biológicos, ou podem ser alguma substância fotossensível (ALMEIDA et al., 2004).

Os lasers de baixa potência, ou biomoduladores são utilizados para a excitação das funções celulares. Estes lasers, por produzirem baixos níveis de energia, provocam apenas efeitos fotoquímicos. Seu principal efeito é o aumento do metabolismo celular (LOPES; BRUGNERA, 1998). Age, principalmente, sobre a mitocôndria e a membrana plasmática, através de fotorreceptores que absorvem fótons e desencadeiam reações químicas, como a síntese de ATP e a transcrição e a replicação do DNA (KARU, 1987).

O azul de metileno (AM) é um corante catiônico da classe das fenotiazinas. É solúvel tanto em água como em álcool.

Recentemente, foi demonstrado o uso do azul de metileno como agente fotossensibilizante sobre a *Candida albicans* (SOUZA et al., 2006)

Objetivo:

O objetivo deste estudo foi estudar o efeito da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (PACT) sobre a *Candida albicans* utilizando o azul de metileno como agente fotossensibilizante.

Materiais e Métodos:

Os experimentos foram realizados dentro da cabine de segurança biológica devidamente limpa com álcool 70% e esterilizada com lâmpada germicida (UV), por 15 minutos.

Neste trabalho foi utilizada a cepa *Candida albicans* ATCC 10231 de origem FIOCRUZ, gentilmente cedida pelo laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde da UNIVAP. As culturas de *Candida albicans* foram semeadas em Agar Sabouraud dextrose e incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C. Após 48 horas de incubação, uma colônia foi cuidadosamente removida e ressuspensa em solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) em concentrações de 10^5 , 10^6 e 10^7 células/ml. Suspensões de *Candida* foram aplicadas em uma placa de microtitulação (96-well) em um volume final de 0,2ml e incubadas no escuro por 5 minutos, na presença de diferentes concentrações de AM. Como grupo controle foram utilizadas suspensões de *C. albicans* incubadas por 5 min em solução fisiológica.

As irradiações foram feitas em placas de microtitulação estéreis, sendo utilizada como fonte luminosa o laser diodo (684nm), com área irradiada de $0,38\text{cm}^2$

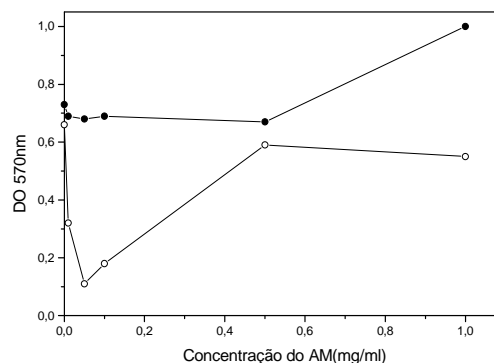
densidade energia de $28\text{J}/\text{cm}^2$, potência de 0,035W e tempo de irradiação de 5min e 21segundos, em diferentes concentrações de células.

Alíquotas de 0,050ml foram retiradas antes e após a irradiação. As alíquotas foram diluídas em 5mL de solução fisiológica estéril. Alíquotas de 25µl foram aplicadas em placas de microtitulação (24-well) em um volume final de 2ml de Caldo (SABOURAUD). As placas permaneceram durante 24h a 37°C e a D.O. foi determinada em um leitor de Elisa em 570nm.

Resultados:

O efeito do azul de metileno (AM), como agente fotossensibilizante foi avaliado sobre a levedura *Candida albicans* em diferentes concentrações de células e em diferentes concentrações de AM. Inicialmente, foi estudado o efeito da PACT sobre a cultura de *C. albicans* em diferentes concentrações do agente fotossensibilizante. Foi observado que o aumento das concentrações de AM entre 0,01 e 0,1mg/ml foi capaz de diminuir o crescimento das células após a irradiação com laser diodo (684nm) e com densidade de energia de $28\text{J}/\text{cm}^2$ (figura 1).

Entretanto, na presença de AM em concentrações superiores a 0,5mg/ml foi observada uma diminuição progressiva do



efeito do AM em diminuir o crescimento da cultura de células.

Figura 1. Efeito do Azul de Metileno antes (●) e após a irradiação com laser diodo (○). Suspensões de *Candida albicans* (10^5 células/ml) foram irradiadas com laser diodo (684nm) com uma densidade de energia de $28\text{J}/\text{cm}^2$.

Após a determinação das melhores concentrações de AM para inibição do crescimento da cultura de *C. albicans*, foi observado o efeito da PACT, utilizando o AM em diferentes concentrações de

células. Foi observado que o aumento da concentração de células de 10^5 (figura 1) para 10^6 (figura 2) e 10^7 células/ml (figura 3) promoveu uma expressiva diminuição sobre o efeito fungicida da PACT com AM.

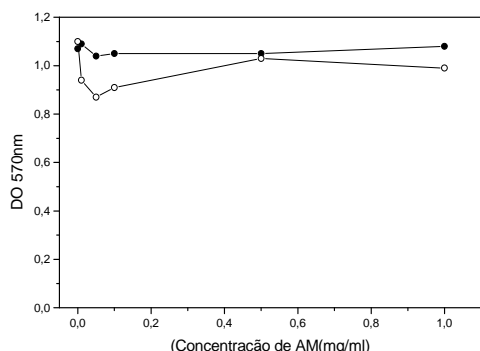


Figura 2 Efeito do Azul de Metileno antes (●) e após a irradiação com laser diodo (○). Suspensões de *Candida albicans* (10^6 células/ml) foram irradiadas com laser diodo (684nm) com uma densidade de energia de $28\text{J}/\text{cm}^2$

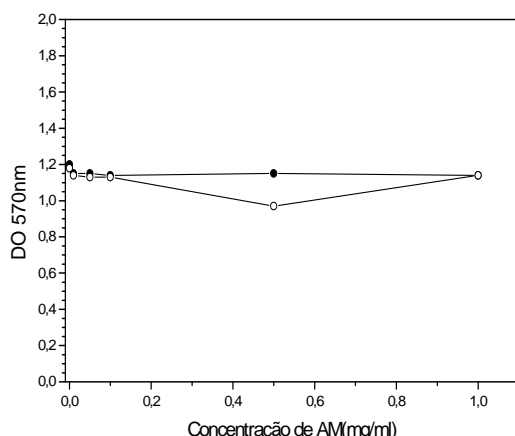


Figura 3 Efeito do Azul de Metileno antes (●) e após a irradiação com laser diodo (○). Suspensões de *Candida albicans* (10^7 células/ml) foram irradiadas com laser diodo (684nm) com uma densidade de energia de $28\text{J}/\text{cm}^2$.

O efeito da densidade de energia (DE) também foi avaliado sobre o crescimento das culturas de *C. albicans* submetidas a PACT com AM. Foi observado que o aumento da DE foi capaz de potencializar o efeito da PACT em reduzir o crescimento celular (figura 4).

Este efeito foi observado, tanto na presença de 0,01 como de 0,05mg/ml de AM. Na ausência do agente

fotossensibilizante a irradiação não foi capaz de modificar o crescimento das células, mesmo em altas dosagens.

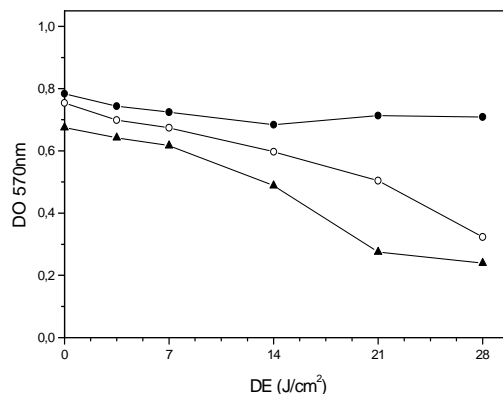


Figura 4. Efeito do Azul de Metileno sobre suspensões de *Candida albicans* (10^5 células/ml). As células foram irradiadas com laser diodo (684nm) em diferentes DE na ausência (●) e na presença de Azul de Metileno 0,01mg/ml (○) e 0,05mg/ml (▲).

Discussão:

A infecção hospitalar atinge o mundo todo e representa uma das principais causas de morte em pacientes hospitalizados. O grupo de patógenos que mais se destaca é o das bactérias que constituem a flora humana. O segundo grupo de importância médica nas infecções hospitalares são os fungos, sendo a *Candida albicans* e o *Aspergillus* os patógenos mais freqüentes. Os fungos são responsáveis por aproximadamente 8% das infecções hospitalares. (ANVISA).

<http://www.anvisa.gov.br>

Em nosso estudo foi demonstrado que as culturas tratadas com azul de metileno, quando irradiadas com laser (GaAIs) o crescimento de *C. albicans* foi inibido quase totalmente, comprovando a eficiência antimicrobiana da TFD utilizando o fotossensibilizante. (SOUZA et al., 2006)

Em nossos estudos células não tratadas com AM irradiadas e não irradiadas, não foi visto nenhuma alteração significativa no aumento da concentração de células.

A TFD induz mudanças na membrana plasmática e organelas celulares produzindo consequências acentuadas. (DOUGHERTY et al., 1998)

Atualmente, o potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) na promoção da erradicação de

microrganismos tem sido progressivamente mais aceita. Foi demonstrado recentemente por Souza e colaboradores (2006) o efeito fototóxico da fenotiazina, azul de metileno, sobre o crescimento da levedura *Candida albicans*, após irradiação com laser diodo GaAlAs (684nm).

Conclusão:

Este trabalho demonstra que a terapia fotodinâmica antimicrobiana, com o AM foi capaz de inibir o crescimento da *Candida albicans*.

Sendo os efeitos inibitórios dependentes da adequada densidade de energia empregada, da concentração de células e da concentração do AM.

Através deste trabalho, será possível o estudo de novos fotossensibilizantes na terapia fotodinâmica para o tratamento de infecções por *Candida albicans*.

Estes resultados mostraram que a eficiência do AM como agente fotossensibilizante depende da concentração de AM utilizada e, ainda, da densidade de energia empregada. A terapia fotodinâmica antimicrobiana, com o AM foi capaz de inibir o crescimento da *Candida albicans*.

Através do experimento realizado variando a DE e utilizando as melhores concentrações de AM, foi observado que o AM tem melhor resultado com DE em 21 J/cm² e 28 J/cm², sendo que na ausência do AM não causou alteração no número de células de *Candida albicans*.

Referências :

ALMEIDA, R. D., MANADAS, B. J., CARVALHO, A. P., DUARTE, C. B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004. p. 59-86.

CONTRAN, R. S. et al. Robbins- Patologia Estrutural e Funcional. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996 1277p.

DOUGHERTY, T.J. An update on the photodynamic therapy applications. *J. Clin. Laser Med. Sug.* 2002. v. 20. p. 3-7.

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *International Journal of Gynecology & Obstetrics.*, v.71, p. S21-S27, 2000.

HALLIDAY, D., RESNICK, R., WALKER, J. Fundamentos de Física. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003. p. 182-183.

HENRY, J.B. Diagnóstico Clínico e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 19. ed São Paulo: Manole, 1999. 1552p.

KARU T. I. Molecular Mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Laser in Life Sciences*. 1988. v.2 p.53-74.

LOPES, L. A., BRUGNERA, A. J., Aplicação Clínica do laser não-cirúrgico. In:

BRUGNERA, A. J., PINHEIRO, A. L. B. Laser na Odontologia Moderna. São Paulo: Pancast. 1998. p. 100-120.

MACDONALD, I. J., DOUGHERTY, T. J., Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Phophyrins and hthalocyanines*, 2001 .v. 5.

MACHADO, A. E. H.. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Química Nova*. 2000. v. 23. n. 2.

OLEINICK, N. L., EVANS, H. H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res*. 1998. v.150. n.5 Suppl. p. 146-56.

OLIVEIRA, R.D.R.; MAFEI, C. M. L.; MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. *Ver. Ass. Med. Brasil.*, v.47, n. 3, p. 231-235, 2001.

SIDRIM, J. J. C., MOREIRA, J. L. B. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.172, 16-28.

SOUZA, S. C. et al. Photosensitization of different *Candida species* by low power laser light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2006. v. 83. p. 34-38.