

Estudo da Terapia Fotodinâmica em cultura de *Candida albicans* utilizando Azul de Metileno e Azul de Toluidina.

Gabriela Guimarães Carvalho¹, Monalisa Poliana Felipe² e Maricília Silva Costa³

¹Faculdade Ciências da Saúde (FCS), Curso de Nutrição,² Faculdade Ciência da Saúde 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.

gabriela.carvalho2004@ig.com.br, engmonalisa@hotmail.com, mscosta@univap.br

Resumo: A *Candida albicans* é um fungo que faz parte da microbiota normal, podendo causar infecção fúngica. A Terapia Fotodinâmica (TFD) combina luz, uma droga fotossensibilizante e oxigênio, resultando em espécies reativas, causadoras de danos à célula. Foi estudado o efeito da TFD sobre *C. albicans* variando o pH e concentrações de cálcio. As suspensões de *Candida* foram incubadas na presença e na ausência dos agentes fotossensibilizantes, azul de metileno (AM) e azul de toluidina (AT). A TFD foi capaz de reduzir o crescimento celular com a salina no meio de reação. Com as soluções tampão o efeito da TFD não foi observado. Na presença de AM, com o EGTA, reduziu o efeito da TFD sobre o crescimento celular. Entretanto, utilizando AT, com o EGTA foi capaz de prenciar o efeito da TFD. Utilizando AM, foi observado com o verapamil e com azida sódica, foi capaz de reduzir a inibição do crescimento celular após a TFD. O Ca²⁺ presente no meio de reação tem um efeito inibidor quando é utilizado o AT, enquanto que para o AM, o Ca²⁺ que é fundamental para a morte celular.

Palavras - chave: *Candida albicans*, Azul de Metileno, Terapia Fotodinâmica, Laser.

Introdução:

Os fungos são organismos eucarióticos, assim, possuem DNA delimitado por dupla membrana. Todas as espécies de fungos possuem parede celular rígida, a qual determina sua forma, sendo compostas em grande parte de camadas de 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 de *Candida* constituem parte da flora normal da pele, boca e trato gastrointestinal, e são a causa mais freqüente de infecção fúngica. As leveduras de *C. albicans* causam infecções que acometem principalmente pele, unhas, mucosas, trato intestinal, urinário, entre outros. A transmissão se dá por via endógena, podendo haver transmissão por contato inter-humano e fomites (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).

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.

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).

Na Terapia Fotodinâmica, a interação da luz de comprimento de onda específico, provoca a excitação da molécula podendo vir a ocupar um estado tripleto, e após transferir sua energia para moléculas de oxigênio, podendo gerar o oxigênio singleto. A TFD pode induzir morte celular, tanto por meio de necrose como de apoptose (OLEINICK; EVANS, 1998).

O laser 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 somente 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).

O azul de toluidina (AT) é um corante orgânico redox da classe das fenotiazinas e tem sido pesquisado como mediador de elétrons, devido a sua propriedade eletrocatalítica frente ao NADH, que é o cofator para enzimas dehidrogenases, e também por sua semelhança com as flavinas (CHEN, 1995).

pH é o símbolo para a grandeza físico-química 'potencial hidrogeniônico'. Essa grandeza (potencial hidrogeniônico) é um índice que indica o grau de acidez, neutralidade e alcalinidade de um meio qualquer. O "p" vem do alemão *potenz*, que significa poder de concentração, e o "H" é para o íon de hidrogênio (H^+).

Solução tampão seria aquela que é capaz de atenuar a variação do valor de seu pH, resistindo à adição, dentro de limites, de reagentes ácidos ou alcalinos. Ao mencionarmos os conceitos de "ácido e base", estamos nos referindo a definição de Brønsted-Lowry (1923), a qual diz que "ácido é uma substância que libera prótons (um doador de prótons) e uma base é uma substância que se combina com os prótons (um receptor de prótons)". (THOMAS, 2002).

O ácido etileno glicol tetracético (EGTA) é um quelante relativamente específico para o cálcio. Com o intuito de se obterem meios completamente livres de

íons cálcio, a solução de EGTA tem sido utilizada por vários pesquisadores (HARDIE, 1995; KABAKOV & HILGEMANN, 1995; MATHES & THOMPSON, 1995; RODEBERG & BABCOCK, 1996; CARINI et al, 1997). Essa solução tem sido empregada em baixas concentrações, variando de 100 μ M a 1mM.

O Verapamil é um bloqueador de canais de cálcio, isto é, um antagonista do cálcio. Esta classe de drogas age inibindo seletivamente a entrada de cálcio através da membrana celular ou liberando e ligando cálcio em reservatórios intracelulares.

Azida sódica (NaN_3), é um composto inorgânico que apresenta o grupamento N_3 . Usado também com drogas e elementos químicos para mudanças catabólicas (ruptura de moléculas complexas para moléculas simplificadas).

Objetivo:

Objetivo foi estudar o efeito da TFD sobre *C. albicans* em diferentes valores de pH e concentrações de cálcio, usando como agente fotossensibilizantes o Azul de Metileno (AM) e o Azul de Toluidina (AT).

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, 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 0.9%) com concentrações de 10⁵ células/ml. Suspensões de *Candida* foram aplicadas em uma placa de microtitulação (96-poços) e incubadas no escuro por 5 minutos, na ausência e na presença de concentração de AM (0,01, 0,05 e 0,1mg/ml). Na presença e ausência do EGTA (10mM). Na presença e ausência do cloreto de cálcio (10uM, 100uM e 1mM). Na presença e ausência do verapamil (50uM). Na ausência e presença da azida sódica (1mM), e em pH 6,0, 7,0 e 8,0, em um

volume final de 0,2ml. Como controle foram utilizadas células de *Candida albicans* incubadas por 5 minutos em solução fisiológica.

As irradiações foram feitas em placas de microtitulação estéril (96-poços), sendo utilizada a fonte luminosa o laser diodo com comprimento de onda de 684nm, com área irradiada de 0,38cm², densidade energia de 28J/cm², potência de 0,035W, e tempo de 5min e 21 segundos, quando foi utilizado o AM, como agente fotossensibilizante. Quando foi utilizado o AT, como agente fotossensibilizante foi utilizado laser diodo com comprimento de onda de 660nm, com a mesma área irradiada, densidade de energia, potência de 0,030W e tempo de 6 minutos.

Após os diferentes tratamentos, alíquotas de 0,025ml foram retiradas antes e após a irradiação, colocados em placas de Elisa de 24 poços contendo 2,0ml de Caldo (SABOURAUD). As placas permaneceram durante 24h a 37°C e a D.O. (570nm) foi determinada em leitor de Elisa.

Resultados e discussão:

Em 1994, WILSON, em uma revisão de literatura, ressaltou que a terapia fotodinâmica pode ser influenciada pelo pH.

O presente estudo demonstra que os melhores efeitos acontecem quando se utiliza apenas salina, pois esta pode sofrer alterações de pH, pois não é uma solução tamponada, durante o tratamento, isso pode ser observado com ambos os agentes fotossensibilizantes (azul de metileno e azul de toluidina) como mostram as figuras 1 e 2.

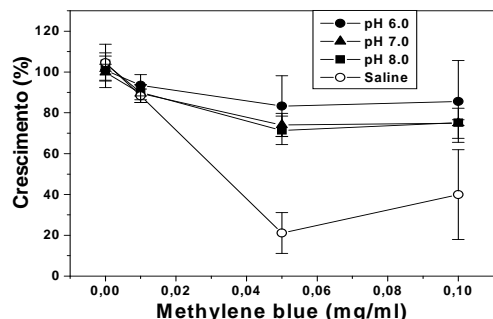


Figura 1. Curva de variação de pH, com Azul de Metileno sobre o crescimento das culturas de *C. albicans*.

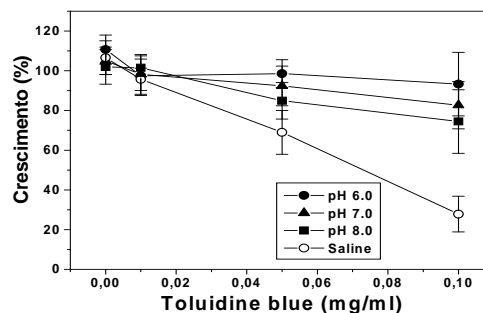


Figura 2. Curva de variação de pH, com Azul de Toluidina, sobre o crescimento das culturas de *C. albicans*.

A utilização da Terapia Fotodinâmica na presença do EGTA e do cloreto de cálcio com o azul de metileno, apresenta um melhor resultado com o cloreto de cálcio, sendo seu efeito diminuído com o EGTA. Porém quando se utiliza a azul de toluidina como agente fotossensibilizante, o efeito é inverso, sendo melhores os resultados na presença do EGTA, e diminuindo com o cloreto de cálcio como é mostrado nas figuras 3 e 4.

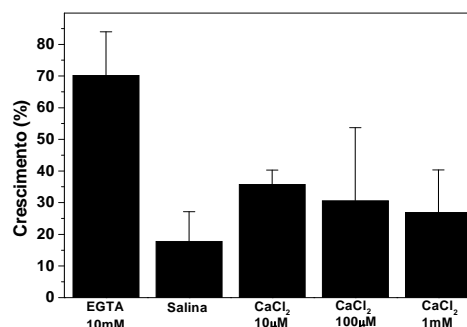


Figura 3. Efeito do EGTA, do Cloreto de Cálcio e Azul de Metileno sobre a cultura de *C. albicans*.

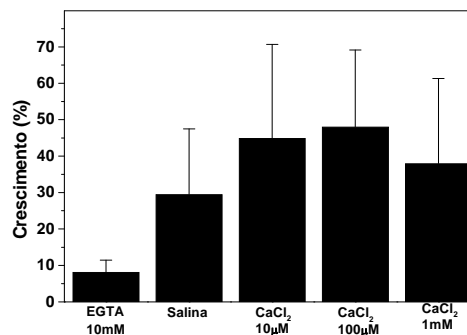


Figura 4. Efeito do EGTA, do Cloreto de Cálcio e Azul de Toluidina sobre a cultura de *C. albicans*.

O presente estudo mostrou que ao se utilizar o Verapamil e a Azida Sódica, juntamente com o azul de metileno na

terapia fotodinâmica em *Candida albicans*, ocorre um aumento do número de células, quando comparado com o controle (sem verapamil e azida sódica), como é mostrado nas figuras 5 e 6.

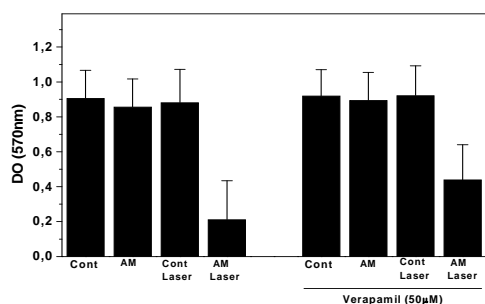


Figura 5. Efeito Verapamil com Azul de Metileno sobre a cultura de *C. albicans*.

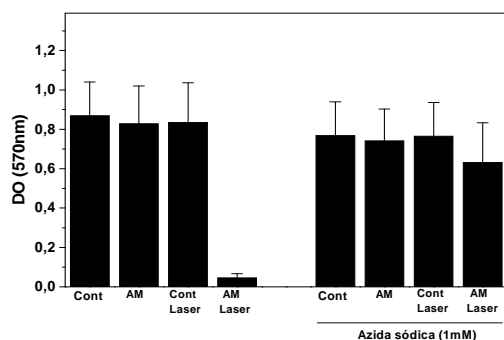


Figura 6. Efeito da Azida Sódica com Azul de Metileno sobre a cultura de *C. albicans*.

Conclusão:

Após análise dos resultados foi verificado que o uso de soluções tamponadas com pH definido, interfere no tratamento com a terapia fotodinâmica independente dos agentes fotossensibilizantes.

O uso do EGTA diminui o efeito da TFP em diminuir o crescimento da *C. albicans*, quando foi utilizado o azul de metileno, como agente fotossensibilizante.

Entretanto quando foi utilizado o azul de toluidina o EGTA potencializou o efeito da PDT. Já os estudos realizados com o Verapamil e a Azida Sódica mostram que a entrada do Ca^{2+} na célula mediada, provavelmente, por canais de Ca^{2+} é essencial para a TFP, bem como a atividade mitocondrial.

Referências Bibliográficas:

THOMAS, M. Delvin. "Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas". Tradução da 4ª edição Americana. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2002.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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

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.

CHEN, H.; Yu, A.; HAN, J.; MI, Y.; Anal. Lett. 1995, 28, 1579