

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE BIOFILMES DE *Candida albicans*

Pereira C.A., Costa A.C.B.P., Freire F., Beraldo P.T.A., Junqueira J.C., Jorge A.O.C.

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP - Laboratório de Microbiologia e Imunologia
Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas - São José dos Campos, SP - Brasil
Cep: 12245-000 - Telefone: (12) 3947-9033/ e-mail: cricabio@gmail.com

Resumo- O biofilme é constituído por uma comunidade diversificada de microrganismos aderida sobre superfícies sólidas. Na cavidade bucal, a presença de biofilme constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de cárie dentária e doença periodontal, o que torna necessário a avaliação da eficácia de novas alternativas, como a terapia fotodinâmica (TFD), para promover a sua eliminação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da TFD no desenvolvimento de biofilmes formados *in vitro* por *C. albicans*. Os biofilmes foram formados em discos de resina acrílica esterilizados, colocados em placas de 24 poços, com 2 mL de caldo BHI sacarosado, incubadas a 37°C por cinco dias. Após este período foi avaliada a ação do fotossensibilizador azul de metileno (AM) e aplicação do laser AsGaAl, isoladamente e em conjunto, seguido da semeadura de alíquotas em diluição a base de 10 em ágar Sabouraud dextrose, e incubação a 37°C/48h. As UFC/mL foram transformadas em Log, e os resultados analisados estatisticamente. O AM juntamente com o laser AsGaAl promoveu redução de 1,04 Log em relação ao grupo controle, com estatística significativa ($p < 0,05$), demonstrando a ação antifúngica da TFD em biofilmes de *C. albicans*.

Palavras-chave: Biofilme, *Candida albicans* e Terapia fotodinâmica.

Área do Conhecimento: Microbiologia

Introdução

Biofilmes são formados por comunidades heterogêneas de microrganismos, que se acumulam em superfícies, organizadas tridimensionalmente, e embebidas em uma matriz extracelular de polímeros (MARSH, 2004). Os biofilmes apresentam característica de desenvolvimento e traços fenotípicos únicos, quando comparados com as mesmas células crescidas em culturas planctônicas, os que os tornam mais resistentes a agentes antimicrobianos e fatores imunes do hospedeiro (DAVEY E O'TOOLE, 2000).

Candida albicans é um microrganismo comensal, isolado com frequência da cavidade bucal de indivíduos saudáveis. As diferentes formas de candidose bucal, superficial ou sistêmica, são frequentemente associadas a biofilmes formados por *C. albicans*. (RAMAGE et al., 2005). Essas leveduras têm sido isoladas de biofilmes dentários (NIKAWA et al., 2003), o que demonstrando que os mesmos podem estar correlacionados no desenvolvimento de cáries e na patogênese de doenças periodontais (JÄRVENSIVU et al. 2004).

Os antimicrobianos auxiliam a remoção química do biofilme, porém o uso prolongado de tais agentes pode levar a seleção de espécies resistentes (MORAN et al., 1992). Além disso, os microrganismos inseridos em biofilmes podem ser 10 a 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos quando comparados aos seus

similares planctônicos (ZANIN et al., 2006). Existem relatos de biofilmes formados por *C. albicans* que são resistentes a uma variedade de antifúngicos, incluindo anfotericina B e fluconazol (CHANDRA et al., 2001).

Frente às limitações dos métodos mecânicos de remoção, e do decréscimo da susceptibilidade de microrganismos em biofilmes aos antimicrobianos convencionais, a avaliação da eficácia de novas alternativas como a Terapia Fotodinâmica (TFD), torna-se de interesse científico. A TFD é baseada nos chamados fotossensibilizadores que são ativados por baixas doses de luz visível, com comprimento de onda apropriado, gerando espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto, e superóxidos. Estes produtos são citotóxicos para a célula alvo, causando desordens na parede celular e danos no DNA (MACHADO, 2000; ROMANOVA et al., 2003), levando a morte do microrganismo. Adicionalmente, a TFD apresenta efeitos colaterais mínimos, ausência de reações sistêmicas, baixo custo e não leva a seleção de cepas resistentes (GARCEZ et al., 2003). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da TFD em biofilmes formados, *in vitro*, sobre resina acrílica por cepa padrão de *C. albicans*.

Metodologia

Para obtenção da suspensão fúngica cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 18804), foram

semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA), e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período, colônias fúngicas foram suspensas em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,9%), e ajustada em espectrofotômetro (B 582, Micronal, São Paulo, Brasil), até obtenção de uma suspensão padronizada contendo 10 células/mL. Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda foram 0,284 e 530 nm, respectivamente.

Os corpos-de-prova constituídos de discos de resina acrílica incolor (Clássico, São Paulo, Brasil), foram esterilizados radiação gama (cobalto 60) com dosagem de 20 kGy por 6 horas (Embrarad, São Paulo, Brasil). Posteriormente, foram colocados, com o auxílio de pinça estéril, na primeira fileira de placas de 24 poços (Costar Corning, New York, EUA) com 2 mL do caldo de infusão de cérebro coração- BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, USA), acrescido de 5% de sacarose (p/v). Cada poço da placa contendo um corpo-de-prova e o caldo BHI foi inoculado com 100 µL da suspensão fúngica. As placas foram mantidas incubadas em estufa a 37°C por cinco dias para formação dos biofilmes.

Após o período de incubação, os corpos-de-prova foram transferidos para os poços da segunda fileira contendo 2 mL de solução fisiológica esterilizada, e as placas foram agitadas por 5 minutos em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Este processo de lavagem foi realizado duas vezes, a fim de remover as células que não ficaram aderidas aos corpos-de-prova.

No processo de TFD foi utilizado um laser de baixa potência de Arseneto de Gálio Alumínio-AsGaAl- (Photon lase III, DMC Equipamentos, São Carlos, Brasil), seguindo o protocolo apresentado no quadro 1.

Quadro 1: Protocolo utilizado para irradiação com laser AsGaAl.

Comprimento de onda	660 nm
Densidade de energia	10,42 J/cm ²
Energia	9,8 J
Potência	100 mW
Área irradiada	0,94 cm ²
Tempo	98 s

O pó de azul de metileno (Munchen, Germany), utilizado como fotossensibilizador, foi dissolvido em solução salina esterilizada a uma concentração de 0,1 mg/mL, seguido de filtração em membrana de acetato de celulose estéril, com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore).

Os corpos-de-prova foram distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais, conforme quadro 2.

Quadro 2 – Distribuição dos grupos de acordo com a fotossensibilização por azul de metileno (AM) e aplicação do laser AsGaAl.

Grupos (n=10)	Fotossensibilizador AM	Laser AsGaAl
L+F+	Sim	Sim
L+F-	Não	Sim
L-F+	Sim	Não
L-F-	Não	Não

Após a lavagem os corpos-de-prova dos grupos L+F+ e L-F+ foram transferidos para os poços da quarta fileira da placa de cultura de células, onde receberam 100 µL do fotossensibilizador AM. As placas foram agitadas por 5 minutos em agitador orbital. Em seguida, os corpos de prova dos grupos L+F+ e L+F- foram irradiados, com as placas abertas, por um laser de baixa potência de AsGaAl por 98 segundos. O grupo controle foi o L-F- que não recebeu o fotossensibilizador e não foi irradiado pelo laser.

Em seguida, cada corpo-de-prova foi colocado em um tubo falcon contendo 10 mL de solução fisiológica esterilizada, e homogeneizado por 30 segundos, utilizando homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200 – Bandelin Eletronic) com potência de 50 W. A partir da solução obtida, considerada 10⁻¹, foram realizadas diluições decimais (10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴), da suspensão do biofilme de cada corpo-de-prova, das quais alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas.

Todo o experimento de TFD foi realizado no escuro e em câmara de fluxo laminar.

Decorrido o tempo de incubação, as placas contendo de 30 a 300 colônias foram contadas e o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) transformado em logaritmo (Log).

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente pela análise de variância ANOVA e teste TUKEY, considerando-se diferença estatística quando p ≤ 0,05, utilizando-se o software Minitab (Inc. PA, USA).

Resultados

A figura 1 representa graficamente os resultados de UFC/mL (Log) dos dez ensaios realizados nos grupos L+F-, L-F+, L-F- e L+F+.

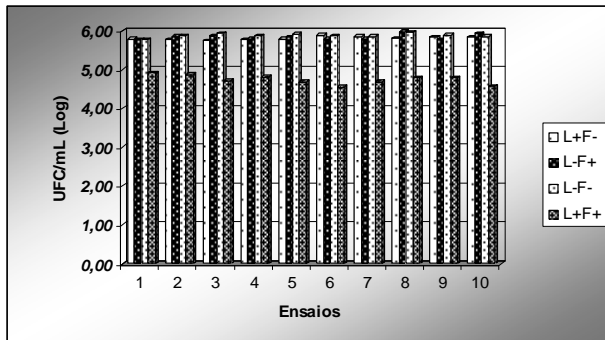


Figura 1 – Números UFC/mL (Log) dos dez ensaios realizados, obtidos nos grupos : L+F-, L-F+, L-F- e L+F+.

Os dados estatísticos das médias de UFC/mL (Log) dos grupos estão representados na tabela 1. Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) apenas do grupo L+F+ em relação aos demais.

Tabela 1 – Dados estatísticos das médias de UFC/mL (Log) dos grupos: L+F-, L-F+, L-F- e L+F+.

Dados Estatísticos	Grupos			
	L+F-	L-F+	L-F-	L+F+
Média	5,81	5,84	5,88	4,74
DP	0,05	0,08	0,05	0,12
Mediana	5,80	5,82	5,87	4,75
Mínimo	5,74	5,76	5,77	4,56
Máximo	5,89	5,95	5,98	4,91
GH	A	A	A	B

DP: Desvio padrão. GH: grupos homogêneos, letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de Tukey, $p < 0,05$)

Discussão

Os microrganismos organizados em biofilmes apresentam características de resistência, principalmente devido a penetração insuficiente de antimicrobianos, velocidade de crescimento e alteração do estágio metabólico que garante a sobrevivência de tais células em ambientes hostis (STEWART et al., 2001).

A TFD é um método eficaz de redução microbiana em infecções localizadas, de pouca profundidade e de microbiota conhecida. O uso da TFD é bastante indicado em diversas áreas da odontologia, como tratamento complementar de lesões e infecções bucais (GARCEZ et al., 2003).

No presente estudo, a fotoativação do AM a uma concentração de 0,1 mg/mL com o laser de AsGaAl de 660 nm, grupo L+F+, em biofilmes de *C. albicans* formados em resina acrílica apresentou uma média de 4,74 UFC/mL (Log). Em relação ao grupo controle, L-F-, onde não foi

utilizado o fotossensibilizador e sem aplicação do laser, houve uma redução de 1,04 Log, o que demonstra que a TFD apresentou efeito fungicida. Porém essa redução não foi tão expressiva quando comparada com relatos da literatura de experimentos de TFD em culturas planctônicas de *C. albicans* (SOUZA et al., 2006, GIROLDI et al., 2007).

A resistência a TFD de biofilmes formados por *C. albicans* têm sido relatada. No estudo de Muller et al. (2007), o processo de TFD com laser diodo e AM apresentou efeito mínimo na viabilidade de vários tipos de microrganismos, dentre eles *C. albicans*, organizados em biofilmes cariogênicos formados em dentes bovinos. Outro estudo, realizado por Donnelly et al. (2007), onde os autores demonstrou que para conseguir redução semelhante de *C. albicans* em biofilmes, em relação aos similares planctônicos deste microrganismo, foi utilizada uma concentração maior de fotossensibilizador e doses mais altas do laser.

Por outro lado, no recente estudo de Sennhenn-Kirchner et al. (2008), os biofilmes formados por duas cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal, crescidos por 5 dias em superfícies de vidro e titânio, apresentaram redução significativa com a aplicação de um laser diodo.

A concentração, tempo de incubação e o tipo do fotossensibilizador, além do estágio fisiológico dos microrganismos, o período de exposição e energia do laser, podem influenciar os resultados da técnica de TFD (WILSON E MIA, 1993).

O AM é um corante catiônico, com capacidade de absorção de luz a 665 nm, o que o torna efetivo no processo de TFD (TARDIVO et al., 2005). Sem a irradiação de luz, este fotossensibilizador demonstrou atividade antifúngica natural (WAINWRIGHT E CROSSLEY, 2002, CALZAVARA-PINTON et al., 2005). Porém os resultados do presente estudo divergem de tal característica, pois somente a aplicação do AM sem a irradiação do laser, grupo L-F+, não promoveu redução de *C. albicans* organizadas em biofilmes. Em relação aos efeitos do laser na ausência do AM, grupo L+F-, não foi observada redução significativa no número de UFC/mL (Log).

Conclusão

De acordo com os parâmetros utilizados neste estudo, a fotoativação do AM a uma concentração de 0,1 mg/mL com o laser de AsGaAl de 660 nm, demonstrou atividade antifúngica sobre os biofilmes de *C. albicans* formados em resina acrílica.

Referências

- CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin; **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** V.78, p.1–6, 2005.
- CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; LEIDICH, S.D.; FADDOUL, F.F.; HOYER, L.L.; DOUGLAS, L.J.; et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in-vitro. **J. Dent. Res.** V.80, p.903–908, 2001.
- DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** V.64, p.847–867, 2000.
- DONNELLY, R.F.; MCCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M.; DAVID-WOLFSON, A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** V.86, p.59–69, 2007.
- GARCEZ, A.S.; SOUZA, F.R.; NÚÑEZ, S.C.; KATHER, J.M.; RIBEIRO, M.S. Terapia fotodinâmica em odontologia – Laser de baixa potência para redução microbiana. **Rev. Ass. Paul. Cirurg. Dent.** V.57, p.223-226, 2003.
- GIROLDO, L. M. ; FELIPE, M. P. ; OLIVEIRA, M. A. ; MUNIN, E. ; ALVES, L. P. ; COSTA, M. S. . Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers Med. Sci.** V.22, 2007.
- JÄRVENSIVU, A.; HIETANEN, J.; RAUTEMMA, R.; SORSA, T.; RICHARDSON, M. *Candida* yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. **Periodon. Oral Microbiol.** V.10, p.106-112, 2004.
- MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím Nova.** V.23, p. 237-243, 2000.
- MARSH, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res.** V.38, p.204-211, 2004.
- MORAN, J.; ADDY, M.; ROBERTS, S. A comparison of natural product, triclosan and chlorhexidine mouthrinses on 4-day plaque regrowth. **J. Clin. Periodontol.** V.19, p. 578-582, 1992.
- MULLER, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMIDLIN, P.R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. **Eur. J. Oral Sci.** V.115, p.77-80, 2007.
- NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; MAKIHIRA, S.; NISHIMURA, M.; EGUSA, H.; FURUKAWA, M.; et al. *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses.** V.46, p.471-478, 2003.
- RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot. Cell.** V.4, p.633–638, 2005.
- ROMANOVA, N.A.; BROVKO, L.Y.; MOORE, L.; POMETUN, E.; SAVITSKY, A.P.; UGAROVA, N.N.; et al. Griffiths, Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. **Appl. Environ. Microbiol.** V.69, p. 6393–6398, 2003.
- SENNHENN-KIRCHNER, S.; SCHWARZ, P.; SCHLIEPHAKE, H.; KONIETSCHKE, F.; BRUNNER, E.; BORG-VON, M.Z. Decontamination efficacy of erbium:yttrium–aluminium–garnet and diode laser light on oral *Candida albicans* isolates of a 5-day in vitro biofilm model. **Lasers Med. Sci.** V.6, 2008.
- SOUZA, S.C.; JUNQUEIRA, J.C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C.Y.; MUNIN, E.; JORGE, A.O.C. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** V.83:p.34-38, 2006.
- STEWART, P.S.; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet.** V.358, p.135-138, 2001.
- TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.D.; OLIVEIRA, C.S.; GABRIELLI, D.S.; JUNQUEIRA, H.C.; TADA, D.B.; ET AL.. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications; **Photodiagnosis Photodyn. Ther.** V.2, p.1-17, 2005
- WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K.B. Methylene blue – a therapeutic dye for all seasons. **J. Chemother.** V.14, p. 431–443, 2002.
- WILSON, M.; MIA, N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light; **J. Oral Pathol. Med.** V.22, p.354–357, 1993.
- ZANIN, I.C.; LOBO, M.M.; RODRIGUES, L.K.; PIMENTA, L.A.; HOFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B.. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with light-emitting diode. **Eur. J. Oral Sci.** V.114, p.64–69, 2006.