

AValiação DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS COM CANDIDOSE BUCAL INDUZIDA POR *Candida albicans*

**Emily Setsuko Halter da Silva Hashimoto, Anna Carolina Borges Pereira da Costa,
Vanessa Maria de Campos Rasteiro, Juliana Campos Junqueira, Antonio Olavo
Cardoso Jorge.**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP / Departamento de Biocências e Diagnóstico Bucal, Av. José Longo, 777 – Jardim São Dimas, São José dos Campos - SP
emily_hashimoto@hotmail.com – FAPESP.

Resumo – O objetivo do trabalho foi avaliar a ação da Terapia Fotodinâmica (TFD) mediada por eritrosina e LED verde no tratamento de lesões de candidose previamente induzidas no dorso da língua dos camundongos imunossuprimidos. Foram utilizados 40 camundongos machos imunossuprimidos por injeções de prednisolona que foram inoculados com swab embebido na suspensão contendo 10^8 células/mL de *Candida albicans* (ATCC 18804). Após a última administração de prednisolona, os animais foram submetidos a tratamentos controles e a TFD mediada por eritrosina (400 μ M) e LED de emissão de luz verde (532 \pm 10 nm). Após os tratamentos, foram recuperadas leveduras do dorso da língua dos camundongos para contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mL que foram submetidas a Análise de Variância e Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os animais tratados com TFD apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos, com redução do número de células de 0,73 \log_{10} . Os resultados demonstraram que a TFD foi efetiva na redução de células de *C. albicans* em candidose bucal induzida em camundongos imunossuprimidos.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, *Candida albicans*, candidose experimental.

Área do Conhecimento: Odontologia.

Introdução

Em pacientes imunodeprimidos, como os indivíduos com AIDS, a candidose bucal é a manifestação fúngica mais comum constituindo um indicador da progressão da infecção por HIV, revelando falha imunológica dos pacientes, em que episódios recorrentes e exposição prévia aos antifúngicos convencionais são as principais causas de falha terapêutica para o tratamento da candidose bucal em pacientes com AIDS, além de efeitos colaterais indesejados (GAITÁN-CEPEDA et al., 2005; WILHEIM et al., 2009).

Uma ferramenta importante para a avaliação de novos tratamentos antifúngicos é a utilização de modelo animal para indução de candidose experimental, sendo que o camundongo é o mais indicado, pois apresenta como vantagens o sistema imunológico mais próximo ao do ser humano e a ausência de leveduras do gênero *Candida* como parte da microbiota residente (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001); (NAGLIK et al., 2008).

Com a utilização destes modelos, é possível testar novos tratamentos, como a Terapia Fotodinâmica (TFD), que consiste na administração de um fotossensibilizador não tóxico associado com a radiação de uma luz de comprimento adequado capaz de produzir radicais

livres as quais provocam danos ao DNA e membrana citoplasmática dos microrganismos, permitindo o extravasamento dos constituintes celulares e inativação de sistemas de transporte de membrana e enzimas. A TFD não apresenta efeitos mutagênicos (HAMBLIN; HASAN, 2004; MAISCH, 2007; PERUSSI, 2007; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Os princípios básicos da TFD baseiam-se no fato de que o uso isolado do corante ou da fonte de luz não deve apresentar efeito antimicrobiano (PLEATZER et al., 2009).

Tem sido realizados trabalhos de TFD com o corante eritrosina que apresenta como principais vantagens em relação aos demais corantes, já ser utilizado em Odontologia e falta de toxicidade para o hospedeiro (ALLAKER; DOUGLAS, 2009;).

O Diodo Emissor de Luz (LED) tem sido apontado como fonte de luz promissora em relação à luz laser, pois apresenta como vantagens menor custo, maior flexibilidade no tempo de irradiação, facilidade de operação e aparelhos com formatos menores e mais leves. O LED é utilizado para polimerização de materiais restauradores e, comprovadamente, não é nocivo para os tecidos bucais (KONOPKA, GOSLINSKI, 2007;). Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação da Terapia Fotodinâmica mediada por eritrosina e LED verde no tratamento de lesões de candidose

previamente induzidas no dorso da língua dos camundongos imunossuprimidos.

Metodologia

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP.

Foi utilizado o fotossensibilizador eritrosina (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) na concentração de 400 μ M, cuja solução foi preparada pela dissolução do pó em solução fisiológica tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e esterilizada por filtração em membrana com poros de diâmetro de 0,22 μ m (MFS, Dublin, EUA). Após a filtração, a solução do corante foi mantida no escuro.

Como fonte de luz foi utilizado um Diodo Emissor de Luz (LED) verde (MMOptics, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de 532 ± 10 nm, potência de 90 mW, fluência de 42,63 J.cm⁻² (energia de 16,2 J e tempo de 180 s) e taxa de fluência de 237 mW.cm⁻².

Foram utilizados 40 camundongos (*Mus musculus*, albinos, Swiss) machos e adultos, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

Antes do experimento foi verificada a existência de colonização por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal dos animais, e, com o resultado negativo, os mesmos foram utilizados no experimento. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10), sendo: a) sensibilização com eritrosina e irradiação por LED (F+L+); b) sensibilização com eritrosina (F+L-); c) irradiação por LED (F-L+); e) grupo controle, sem sensibilização com eritrosina ou irradiação por LED (F-L-).

Para a indução de candidose bucal foi seguida a metodologia descrita por Takakura et al. (2003) e Mima et al. (2010). Resumidamente, os animais foram imunossuprimidos com duas injeções subcutâneas de prednisolona (Depo - Medrol, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, Brasil) na dose de 100 mg/kg de massa corporal um dia antes e três dias após a infecção com *Candida*. Na água de beber foi administrado cloridrato de tetraciclina (Terramicina, Pfizer) na concentração de 0,83 mg/ml iniciando um dia antes da infecção e mantido até o final do experimento, para interferir na microbiota bacteriana bucal e favorecer o crescimento de leveduras (SOYSA et al., 2008). Os animais foram sedados via intramuscular com injeções de cloridrato de clorpromazina (Amplictil, Sanofi Aventis, Suzano, São Paulo) na dose de 10 mg/kg de massa corpórea no volume de 50 μ l, em cada pata. A inoculação foi feita no 2º dia do experimento com swab (Absorve, Cral, São Paulo, SP) encharcado

na suspensão de *C. albicans* (ATCC 18804) padronizada em 10⁸ células/ml passado por 1 min sobre o dorso da língua, um dia após a primeira administração de prednisolona.

Após 24 horas da última administração de prednisolona, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (Anazedan, Vetbrands, Jacareí, SP) e cetamina (Dopalen, Vetbrands, Jacareí, SP) na proporção de 0,8 ml /0,5 ml, respectivamente, na dose de 1,6 ml /100g de massa corpórea, para aplicação da TFD.

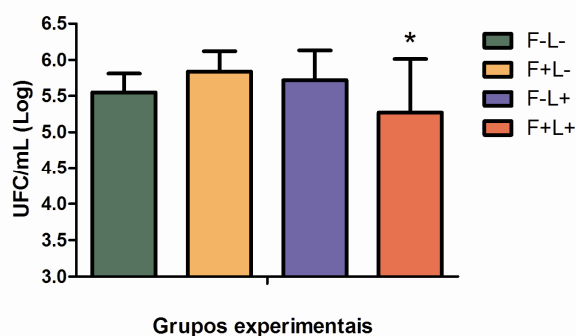
A solução de eritrosina foi pipetada no dorso da língua no volume de 50 μ L. Decorrido 1 min (período pré-irradiação) foi realizada a aplicação com o LED (F+L+= 10). Além disso, foi avaliado o efeito isolado da solução do fotossensibilizador eritrosina (F+L-= 10) e o efeito isolado da fonte de luz utilizando-se PBS (F-L+= 10). O grupo controle recebeu apenas PBS na ausência de luz (F-L-= 10).

Após anestesia e anteriormente a realização de cada tratamento experimental e logo após os tratamentos, foram coletadas amostras do dorso da língua dos animais com swab, os quais foram imediatamente colocados em tubos de ensaio contendo 0,99 mL de PBS, e agitado durante 1 min, considerando-se a diluição como sendo 10⁻². Foram realizadas diluições seriadas. A seguir, 0,1 ml de cada diluição foi semeada em duplicata na superfície de placas de ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) com cloranfenicol (Vixmicina, São Paulo, Brasil) e incubadas a 37°C por 48 horas. Foram contadas colônias típicas de *Candida* para a determinação de UFC/ml.

Os dados foram transformados de logaritmo, o qual foi realizada Análise de Variância e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados

A Figura 01 mostra a média do número de células viáveis de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal dos animais após os tratamentos, mostrando que a TFD apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos controles (F-L-, F+L- e F-L+), apresentando média de redução após o tratamento de 0,73 log₁₀.



* Diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey $p \leq 0,05$).

Fig. 01: Média do número de células viáveis de *C. albicans* recuperadas da superfície da língua dos camundongos após os tratamentos experimentais: F-L-, PBS; F+L-, fotossensibilização com eritrosina; F-L+, irradiação com LED; F+L+, fotossensibilização com eritrosina e irradiação com LED.

Discussão

Os resultados demonstraram que houve efeito antifúngico da TFD mediada por eritrosina e LED verde *in vivo*. Os tratamentos controles realizados com eritrosina (F+L) ou LED (F-L+) não reduziram o número de células de *C. albicans*, o qual foi demonstrado por alguns autores atividade inócua do aparelho LED de emissão de luz vermelha ou azul contra *C. albicans in vitro* ou *in vivo* (MIMA et al., 2010); (SOARES et al., 2009); (PELOI et al., 2008). Enquanto que para o corante eritrosina não foram encontrados trabalhos na literatura de TFD contra leveduras do gênero *Candida*. Portanto, este trabalho trata-se do primeiro estudo de TFD mediada por eritrosina e LED verde contra *C. albicans*.

O tratamento com TFD reduziu 0,73 \log_{10} de células de *C. albicans* para a concentração de 400 μM de eritrosina, enquanto que Teichert et al. (2002) avaliaram a TFD mediada por azul de metileno nas concentrações de 1203,5 μM e 1337,2 μM e irradiação por laser de diodo (664 nm) com redução de 2,5 \log_{10} e 2,74 \log_{10} , respectivamente, para o tratamento de candidose bucal induzida por *C. albicans* em camundongos com doença imunodeficiente combinada severa, porém neste trabalho a média do número de células para o grupo controle (F-L-) foi de 2,34 \log_{10} e para o presente trabalho foi de 5,55 \log_{10} , demonstrando que a colonização dos camundongos do presente trabalho foi maior do que o trabalho acima, sendo que uma maior concentração de células pode interferir na ação da TFD (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

Mima et al. (2010) utilizaram a mesma metodologia para indução de candidose bucal que o presente trabalho, os animais foram tratados com o fotossensibilizador fotogem nas concentrações de 400, 500 e 1000 mg/L e irradiados por LED azul com redução de células de *C. albicans* de 1,04, 1,39 e 1,41 \log_{10} , respectivamente, e LED vermelho com redução de 1,05, 1,59 e 1,40 \log_{10} , respectivamente. Embora a redução alcançada por este tratamento tenha sido maior que a do presente trabalho, a concentração utilizada foi até três vezes maior que a utilizada para a eritrosina e o tempo de irradiação foi de 20 min e a fluência de 305 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, enquanto que para o presente trabalho o tempo de irradiação foi de 3 min e a fluência de 42,63 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Junqueira et al. (2009) induziram candidose bucal em ratos que foram tratados com TFD mediada por azul de metileno e laser de AsGaAl (660 nm), embora não tenham observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos F+L+, F+L-, F-L+ e F-L- na recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal após os tratamentos, os autores observaram que animais tratados pela TFD, após e 1 e 5 dias, não exibiram lesões clínicas de candidose, enquanto que os demais grupos apresentaram lesões característica de infecção por *Candida*. Os autores sugerem que a TFD possa ser útil para o tratamento da candidose bucal através de novos estudos para o estabelecimento de protocolos de tratamento.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que a Terapia Fotodinâmica mediada pelo corante eritrosina e irradiado pelo LED de emissão de luz verde foi eficiente na redução de células de *C. albicans* em candidose bucal induzida em camundongos imunossuprimidos.

Referências

- ALLAKER R.P.; Douglas C.W.I. Novel antimicrobial therapies for dental plaque-related diseases. **Int. J. Antimicrob. Agents.** V.33, p.8-13, 2009.
- DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Effect of cell – photosensitizer blinding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial. Agents Chemoter.** V.49. n.6, p.2329-2335, 2005.
- GAITÁN-CEPEDA, L.A.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.; CEBALLOS-SALOBREÑA, A. Oral candidosis as a clinical marker of immune failure in patients with HIV/AIDS on HAART. **AIDS Patient. Care STDs.** V.19, n.2, p.70-77, 2005.

- HAMBLIN, M.R.; HASAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. Photobiol. Sci.** V.3, p.436-450, 2004.
- JUNQUEIRA, J.C. et al. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. **Lasers Med. Sci.** V.24, n.6, p.65-70, 2009.
- KONOPKA, K.; GOLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J. Dent. Res.** V.86, p.694-707, 2007.
- MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers Med. Sci.** V.22, p.83-91, 2007.
- MIMA, E.G.O. et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** V.109, n.3, p.392-401, 2010.
- NAGLIK, J.R.; FIDEL Jr, PL.; ODDS, F.C. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Yeast Res.** V.283, p.129-139, 2008.
- PELOI, L.S. et al. Photodynamic effect of light emitting-diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J. Biosci.** V.33, n.2, p.231-237, 2008.
- PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Quím Nova.** V.304, p.988-994, 2007.
- PLEATZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med. Sci.** V.24, p.259-268, 2009.
- SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin. Microbiol. Rev.** V.14, n.2, p.398-429, 2001.
- SOARES, B.M. et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. **Photochem. Photobiol. B. Biol.** V.94, p.65-70, 2009.
- SOYSA, N.S.; SAMARANAYAKE, L.P.; ELLEPOLA, A.N.B. Antimicrobial as a contributory factor in oral candidosis- a brief overview. **Oral Dis.** V.14, n.2, p.138-143, 2008.
- TAKAKURA, N. et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. **Microbiol. Immunol.** V.47, n.5, p.321-326, 2003.
- TEICHERT, M.C. et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue- mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** V.93, n.2, p.155-160, 2002.
- WILHEIM, A.B. et al. The resistance to fluconazol in patients with esophageal candidiasis. **Arq. Gastroenterol.** V.46, n.1, p.32-37, 2009.