

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR CURCUMINA SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Candida* spp. ISOLADAS DE ESTOMATITE PROTÉTICA

Amanda Siqueira Fraga¹; Paulo Henrique Fonseca do Carmo¹, Felipe de Camargo Ribeiro², Karoline Kristina Kemmerich², Juliana Campos Junqueira¹

¹ Universidade Estadual Paulista/UNESP – Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) - Campus de São José dos Campos, Avenida Engenheiro Francisco José Longo, 777, Jardim São Dimas - 12245-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, as.fraga@unesp.br, phf.carmo@unesp.br, juliana.junqueira@unesp.br.

² Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP – Escola Paulista de Medicina - Laboratório Especial de Micologia, R. Leandro Dupret, 188 - Vila Clementino, São Paulo - SP, 04025-010- São Paulo - SP. felipe_c_ribeiro@hotmail.com, kristinakemmerich@hotmail.com

Resumo

A estomatite protética (EP) é uma doença oral que resulta em processo inflamatório crônico da mucosa de suporte da prótese dentária e está frequentemente associada à infecção por *Candida*. O tratamento da EP é dificultado devido ao arsenal antifúngico limitado e a resistência de *Candida* aos fármacos disponíveis. Nesse contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) torna-se uma alternativa para o tratamento da EP. Objetivo: avaliar o efeito da TFD mediada por curcumina (CUR) contra células planctônicas e biofilmes de *Candida* spp. isoladas de EP. Metodologia: amostras de pacientes com EP foram coletadas e semeadas em meios de cultura para leveduras. A seguir, foi feito o isolamento e identificação das espécies por MALDI-TOF. As cepas isoladas foram submetidas à TFD e a atividade sobre células planctônicas foi determinada por meio do ensaio de concentração inibitória mínima. A atividade da TFD contra biofilme foi avaliada por meio da viabilidade celular. Resultados: foram identificadas as espécies *Candida dubliniensis* e *Candida albicans*. A TFD reduziu a CIM de CUR contra células planctônicas de *Candida* spp. e diminuiu a viabilidade celular de biofilmes. Conclusão: a TFD mediada por CUR foi eficaz contra cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* isoladas de pacientes com EP e reduziu a viabilidade de biofilmes de *Candida* spp.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. *Candida*. Estomatite protética.

Área do Conhecimento: Ciências da saúde, Odontologia.

Introdução

A instalação de próteses parciais (PPR) ou totais (PT) em pacientes com edentulismo é necessária para repor os dentes ausentes, recuperando a estética e reestabelecendo as funções do sistema estomatognático, como mastigação e fonética. Por outro lado, a instalação de uma prótese dentária pode acarretar danos à mucosa e aos tecidos de suporte, e resultar em quadros como a candidíase eritematosa crônica, também conhecida como estomatite protética (EP). A EP caracteriza-se por uma lesão geralmente assintomática que acomete aproximadamente 75% dos usuários de prótese. De modo concomitante, pode ocorrer colonização fúngica da superfície das próteses acarretando inflamação crônica da mucosa. (Contaldo et al., 2019; Hellstein et al., 2019).

Nesse processo, *Candida albicans* é o agente de maior relevância na origem, manutenção e agravamento da estomatite protética. Entretanto, espécies de *Candida*, como *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis*, e espécies relacionadas ao gênero *Candida*, como *Pichia kudriavzevii* (anteriormente descrita como *Candida krusei*) e *Nakaseomyces glabratus* (anteriormente descrita como *Candida glabrata*), também podem estar presentes e atuar como agentes de coinfeção (Contaldo et al., 2019, Hellstein et al., 2019, Le Bars et al., 2022).

Além disso, *Candida* spp. e espécies relacionadas à *Candida* exibem mecanismos específicos de resistência à terapia antimicrobiana convencional que geram desafios na prática clínica e reforçam a importância de se estabelecer novas terapias antifúngicas (Kaur et al., 2023, Lee et al., 2021).

Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) tem assumido papel de destaque. A TFD atua por meio de processos fotodinâmicos que ocorrem pela atividade de agentes fotossensibilizadores (FS) não tóxicos que, quando excitados por luz, interagem com o oxigênio molecular, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que atuam sobre os microrganismos, levando-os à morte (Chen et al., 2022, Warriar et al., 2021).

Centenas de substâncias são atualmente conhecidas como FS, incluindo corantes, fármacos, e compostos naturais, como a curcumina (CUR). A CUR é um composto polifenólico extraído do rizoma de *Curcuma longa* Linn, uma planta nativa da Índia e sudeste asiático, que apresenta aplicação potencial em medicamentos devido às suas propriedades terapêuticas, que incluem efeitos antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatórios e antimicrobianos (Santezi et al., 2021). Desse modo, a proposta desse estudo foi avaliar os efeitos da TFD mediada por curcumina sobre *Candida* spp. isoladas de pacientes com estomatite protética.

Metodologia

O protocolo experimental foi aprovado pelo CEPH do ICT/Unesp sob o número 5.827755. Após aprovação, foi realizada a coleta de amostras clínicas das lesões de EP de pacientes. Participaram do estudo 5 voluntários diagnosticados com EP associada à presença de PT ou PPR. As coletas foram realizadas em uma Unidade Básica de Saúde localizada na cidade de São José dos Campos, SP. Os critérios de inclusão foram indivíduos portadores de PT ou PPR, não havendo dependência de idade, condição socioeconômica, etnia ou sexo. Os critérios de exclusão foram pacientes que fizeram uso de antibióticos, antifúngicos ou corticoides nos últimos 60 dias. Os participantes dispostos a participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A coleta das amostras foi realizada com o auxílio de escovas cervicais por meio de fricção da lesão do palato. Além da coleta na região do palato, foram coletadas amostras da prótese dentária. Um *pool* das amostras de palato e prótese de cada paciente foi formado e as amostras coletadas foram armazenadas em tubos cônicos contendo caldo infusão de cérebro e coração estéril e transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT/UNESP em no máximo 3 h após a coleta.

A seguir, a presença de leveduras características de *Candida* nas amostras coletadas foi confirmada por meio da observação de campos microscópicos distintos do esfregaço corado pelo método de Gram (em aumento de 1.000x). As amostras também foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (ASD) e meio seletivo cromogênico Chromagar *Candida* Plus para identificação presuntiva de leveduras do gênero *Candida* e espécies relacionadas. Após a confirmação da presença de células e colônias sugestivas de *Candida* spp., as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C.

As amostras foram descongeladas e semeadas em placas de ASD. As colônias foram isoladas por meio da técnica de esgotamento em estrias, sendo posteriormente utilizadas para identificação por meio da espectrometria de massa, usando o MALDI-TOF Biotyper Microflex LT/SH (Bruker, Massachusetts, EUA). Para tanto, as amostras foram colocadas em uma matriz (lâmina especial) com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Após ionização das partículas, elas foram categorizadas com base em sua relação massa-carga e tempo de chegada aos detectores. Com base nesses parâmetros, espectrogramas de massa foram gerados e comparados com espectros de microrganismos conhecidos em bases de dados nacionais e internacionais.

Em seguida, a susceptibilidade das cepas de *Candida* spp. à CUR (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) foi determinada por meio da concentração inibitória mínima (CIM) segundo o método de microdiluição em caldo de acordo com o manual EUCAST E. DEF. 7.3.2 (Arendrup et al., 2020). Previamente a CUR em pó foi solubilizada em DMSO para a obtenção de uma solução estoque na concentração de 5000 $\mu\text{g/mL}$. Concentrações de CUR variando de 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ diluídas em meio RPMI 1640 foram testadas, os valores foram baseados em estudos prévios sobre TFD e CUR. O inóculo foi preparado a partir de culturas das cepas de *Candida* spp. crescidas em meio ASD por 24 h a 37°C. O inóculo fúngico foi suspenso em água destilada estéril, quantificado em hemocitômetro, ajustado para $2,5 \times 10^5$ células/mL e 100 μL dessa solução foi dispensada nos poços da placa de

microdiluição de 96 poços. Controle de crescimento (inóculo fúngico) e controle de esterilidade (meio RPMI 1640) foram incluídos. Uma placa foi mantida ao abrigo de luz e outra placa foi submetida a TFD utilizando o dispositivo LED Emitter G nos seguintes parâmetros: comprimento de onda de 420-480 nm, potência de 0,47 W, densidade de energia de 49,47 J/cm² por 40 s, totalizando uma densidade de potência de 1,23 W/cm², a irradiação, baseada em trabalhos anteriores feitos em nosso laboratório, foi feita com o LED encostado na parte superior do poço, com uma ponteira que possui uma área de 0,38 cm², igual a área do poço irradiado. Então, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, a absorvância foi determinada em espectrofotômetro (530 nm) e a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico para a CUR quando comparado ao controle de crescimento. (Garcia et al., 2021).

O biofilme das cepas isoladas e identificadas de *Candida* spp. foi formado em fundo de placas de 96 poços. Para isso, as cepas de *Candida* isoladas e identificadas foram cultivadas em ASD por 24 h a 37°C. A seguir, uma alçada das culturas foi removida, semeada em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) crescido de 100 µM de glicose e incubadas a 37°C por 24 h. A suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%). Esse procedimento foi repetido duas vezes. A contagem do número de células em suspensão foi determinada em hemocitômetro. Em seguida, foi adicionada uma alíquota de 200 µL das suspensões de *Candida* isoladas, identificadas e padronizadas em 10⁷ células/mL em cada poço. As placas foram incubadas por 1 h e 30 min em estufa a 37°C sob agitação de 75 rpm para aderência inicial. Após esse período, as placas foram lavadas duas vezes com solução fisiológica e, em seguida, foi adicionado 200 µL de caldo YNB. Então, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h (De Lapena et al., 2022).

Os grupos experimentais para avaliação da atividade da TFD em biofilme de *Candida* das amostras foram divididos em: grupo sem tratamento, sem luz e sem CUR (C-L-), grupo tratado somente com luz (C-L+), grupo tratado somente com CUR (C+L-), e grupo tratado com CUR e luz (C+L+).

Após 24 h de incubação dos biofilmes, CUR a 4 µg/mL (1x CIM), 20 µg/mL (5x CIM), 40 µg/mL (10x CIM) ou meio YNB foi adicionado de acordo com os grupos experimentais. As placas foram envolvidas com papel alumínio para evitar a irradiação de luz do ambiente e levadas para o agitador orbital no tempo de pré-irradiação de 5 min. Posteriormente, as placas foram irradiadas com LED nos mesmos parâmetros descritos acima.

Após a irradiação, diluições seriadas do conteúdo dos poços foram preparadas e 10 µL de cada diluição foi semeado 4 vezes em pontos diferentes de uma placa contendo ASD por meio da técnica da gota. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C para determinação da viabilidade fúngica.

Os resultados obtidos na contagem de células viáveis (UFC/mL) foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Tukey por meio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Para análise estatística, foram utilizados, no mínimo, quatro réplicas técnicas por grupo. Os ensaios foram repetidos, no mínimo, duas vezes. O nível de significância de 5% foi adotado em todas as análises.

Resultados

Entre as amostras clínicas coletadas dos 5 pacientes, apenas 3 (P1, P2 e P3) apresentaram leveduras na análise microscópica e crescimento em meios de cultura, com características sugestivas de *Candida*. A espectrometria de massas (MALDI-TOF) revelou que os isolados das amostras P1 e P3 corresponderam a espécie *C. dubliniensis*; enquanto o da amostra P2 correspondeu à *C. albicans*.

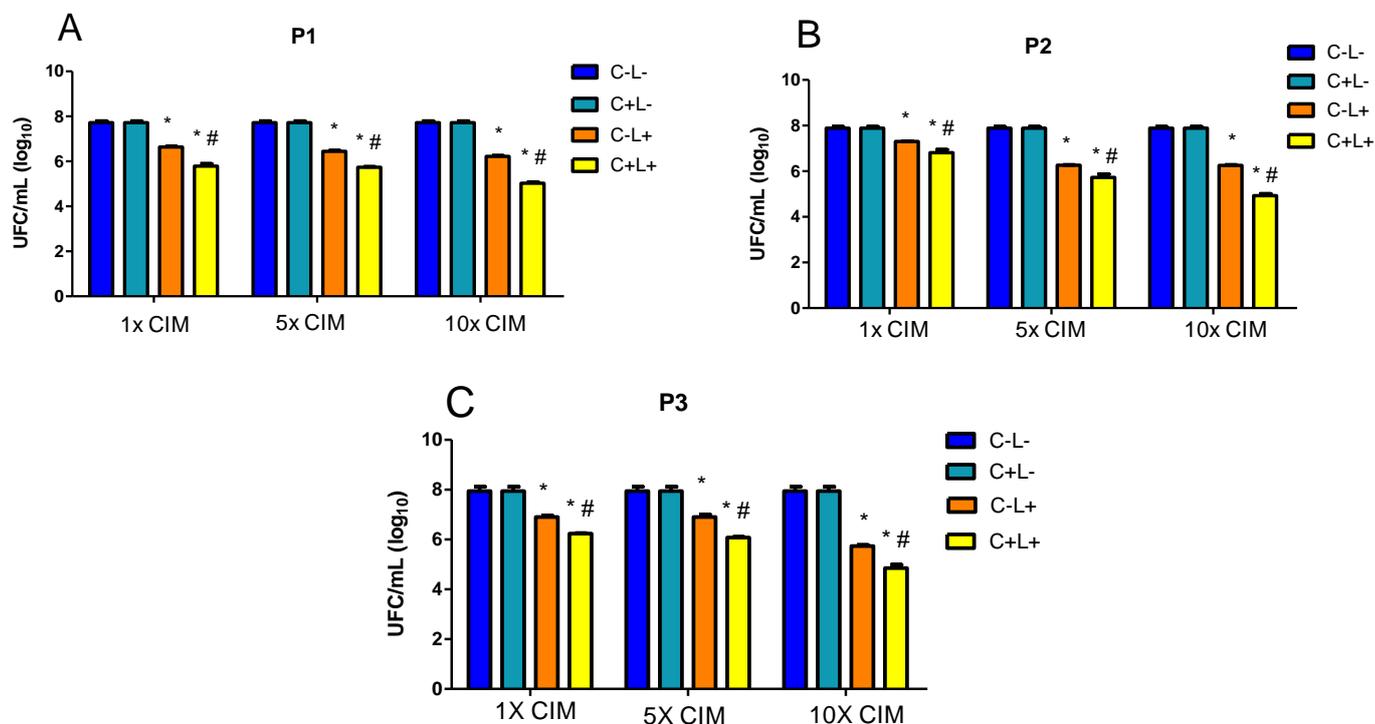
Os valores de CIM de CUR contra as cepas de *Candida* isoladas para a placa não irradiada foram de 64 µg/mL de CUR para as amostras 1, 2 e 3. Na placa irradiada, a CIM foi de 4 µg/mL para CUR para as amostras 1, 2 e 3, demonstrando que o tratamento da placa com a TFDa resultou em uma redução de 16 vezes no valor de CIM para CUR.

A TFD resultou em reduções significativas nos biofilmes das três cepas de *Candida* testadas. Os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média 7,7 log₁₀ UFC/mL para as amostras dos pacientes 1, 2 e 3. Na concentração de 4 µg/mL (1x CIM), a TFD (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 2,0 log₁₀ UFC/mL para P1, 1,0 log₁₀ UFC/mL para P2 e 1,0 log₁₀ UFC/mL para P3 quando comparado ao grupo C-L- (Figura 1A).

Na concentração de 20 µg/mL (5 x CIM), a TFD (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 2,0 log₁₀ UFC/mL para P1, 2,1 log₁₀ UFC/mL para P2 e 1,9 log₁₀ UFC/mL para P3 quando

comparado ao grupo C-L (Figura 1B). Na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ (10x CIM), a TFD (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 2,7 \log_{10} UFC/mL para P1, 2,9 \log_{10} UFC/mL para P2 e 3,1 \log_{10} UFC/mL para P3 quando comparado ao grupo C-L (Figura 1 C).

Figura 1- Viabilidade do biofilme monoespécie de *C. albicans* e *C. dubliniensis* submetido a TFD mediada por CUR. * diferença quando comparado a C-L- e # diferença ao C+L- com a mesma CIM ($p < 0,05$). P: paciente; CIM: concentração inibitória mínima;



Fonte: autor

Discussão

A prevalência de *Candida* encontrada nas amostras vai ao encontro da literatura científica e reforça o papel desse agente na patogênese da EP (Manikandan et al., 2022). Ao avaliar a ocorrência de *Candida* na cavidade bucal de usuários de prótese dentária, Silva et al. (2015) encontraram uma prevalência de 77,27%, percentual próximo ao encontrado nesse estudo.

Entre as amostras positivas para *Candida*, duas foram identificadas como *C. dubliniensis*, enquanto uma foi identificada como *C. albicans*. Diversos estudos têm demonstrado a presença majoritária de *C. albicans* em amostras de EP. Entretanto, espécies como *N. glabratus*, *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* e *C. parapsilosis* também têm sido isoladas, mas em menor prevalência quando comparado a *C. albicans* (Gauch et al., 2017; Manikandan et al., 2022; Qiu et al., 2023). No presente estudo, *C. dubliniensis* foi a espécie mais prevalente, corroborando estudos anteriores em que esse agente foi isolado a partir de amostras de EP (Marcos-Arias et al., 2009; Qiu et al., 2023).

A partir da obtenção das amostras, do isolamento e identificação das cepas de *Candida*, os efeitos da TFD mediada por CUR foi avaliada. A CUR destaca-se por ser um produto natural, de baixo custo e com ação antimicrobiana contra diferentes microrganismos potencialmente patogênicos. A CUR possui comportamento de FS devido à sua capacidade de absorver luz no espectro azul e resultar no aumento da produção de ERO, moléculas com efeitos antimicrobianos (Abdulrahman et al., 2020; Songca et al., 2022).

Estudos anteriores demonstraram que a TFD mediada por CUR resulta em aumento da produção de radicais superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio singleto, coletivamente denominados ERO. Esse aumento pode comprometer a integridade celular devido aos danos causados em diversas macromoléculas e a potencial peroxidação lipídica dos componentes da membrana plasmática fúngica (Chen et al., 2022, Dias et al., 2023). Além disso, Jordão et al. (2020) demonstrou a capacidade de TFD mediada por CUR reduzir a expressão de genes relacionados a adesão, formação de biofilme e atividade antioxidante de *C. albicans*.

Nesse estudo, a irradiação de CUR na luz azul acarretou atividade fungicida contra células planctônicas de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, e redução dos valores de CIM em 16 vezes quando comparado a CUR não irradiada. Além disso, a TFD mediada por CUR exibiu efeitos contra biofilmes de *C. albicans* e *C. dubliniensis* em valores de 4 µg/mL (1x CIM). Entretanto, a atividade antifúngica foi potencializada com o aumento da concentração de CUR usada na TFD. Tais resultados corroboram o observado por Sanitá et al. (2018) e Santos et al. (2022). Em seus estudos, os autores notaram reduções significativas no biofilme de *C. dubliniensis* e *C. albicans* após TFD mediada por CUR, sugerindo que, assim como observado para as células planctônicas, é possível que o aumento da produção de ERO esteja associado a atividade fungicida da TFD mediada por CUR (Dias et al., 2023), o que reitera seu potencial uso no controle de células planctônicas e biofilmes de *C. dubliniensis* e *C. albicans*.

Em conjunto, os resultados sugerem que os parâmetros utilizados para a TFD contra células e biofilmes resultaram em danos importantes aos microrganismos, provavelmente em decorrência do aumento da produção de ERO. A disrupção da membrana citoplasmática em decorrência da maior produção de ERO auxilia na internalização da CUR, o que potencializa sua ação antimicrobiana (Chen et al., 2022, Dias et al., 2023).

Em contrapartida, embora CUR tenha exibido resultados promissores contra culturas planctônicas e biofilmes no presente estudo, é necessário analisar essa atividade *in vivo* para determinar seu potencial para futura utilização e indicação na prática clínica.

Conclusão

A TFD mediada por CUR foi eficaz contra cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* isoladas de pacientes com EP, reduzindo a viabilidade de células planctônicas e biofilmes. Portanto, a CUR representa um fotossensibilizador promissor para TFD direcionada ao tratamento de EP.

Referências

- ABDULRAHMAN, H. *et al.* Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** 2020 Jun;30:101645.
- CHEN, T. *et al.* Photodynamic therapy-a promising treatment of oral mucosal infections. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** 2022 Sep;39:103010.
- CONTALDO, M. *et al.* Association between denture stomatitis, candida species and diabetic status. **J Biol Regul Homeost Agents.** 2019 May-Jun;33(3 Suppl. 1):35-41.
- DE LAPENA, S. *et al.* Enhancing effect of chitosan on methylene blue-mediated photodynamic therapy against *C. albicans*: A study in planktonic growth, biofilms, and persister cells. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** 2022 Jun;38:102837.
- DIAS, LM. *et al.* The Effect of Sub-Lethal Successive Applications of Photodynamic Therapy on *Candida albicans* Biofilm Depends on the Photosensitizer. **J Fungi (Basel).** 2023 Jan 13;9(1):111.
- GAUCH, L.M.R. *et al.* SH. Isolation of *Candida* spp. from denture-related stomatitis in Pará, Brazil. **Braz J Microbiol.** 2018 Jan-Mar;49(1):148-151.

GARCIA, MT. *et al.* Susceptibility of Dental Caries Microcosm Biofilms to Photodynamic Therapy Mediated by Fotoenticine. **Pharmaceutics**. 2021 Nov 10;13(11):1907.

HELLSTEIN, J. W. MAREK CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head Neck Pathol**. 2019 Mar;13(1):25-32.

JORDÃO, C.C. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy reduces gene expression of *Candida albicans* in biofilms. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 2020 Sep;31:101825.

KAUR, J. *et al.* Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. **Curr Opin Microbiol**. 2023 Feb;71:102237.

LE BARS, P. *et al.* Host's Immunity and *Candida* Species Associated with Denture Stomatitis: A Narrative Review. **Microorganisms**. 2022 Jul 16;10(7):1437.

LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chem Rev**. 2021 Mar 24;121(6):3390-3411.

MANIKANDAN, S. *et al.* Prevalence of *Candida* among Denture Wearers and Nondenture Wearers. **J Pharm Bioallied Sci**. 2022 Jul;14(Suppl 1):S702-S705.

MARCOS-ARIAS, C. *et al.* Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. **Arch Oral Biol**. 2009 Feb;54(2):127-31.

QIU, J. *et al.* *Candida*-associated denture stomatitis: clinical, epidemiological, and microbiological features. **Braz J Microbiol**. 2023 Jun;54(2):841-848.

SANITÁ, P.V. *et al.* Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms. **Lasers Med Sci**. 2018 May;33(4):709-717.

SANTOS, R.C.V. Antimicrobial activity of water-soluble tetra-cationic porphyrins on *Pseudomonas aeruginosa*. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 2023 Jun;42:103266.

SANTEZI, C. *et al.* Photodynamic potential of curcumin in bioadhesive formulations: Optical characteristics and antimicrobial effect against biofilms. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 2021 Sep;35:102416.

SILVA, N.P. *et al.* Prevalence of *Candida* in oral cavity of patients wearing dental prosthesis. **Mundo Saúde** 2015;39(3):325-32.

SONGCA, S.P. *et al.* Applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy against Bacterial Biofilms. **Int J Mol Sci**. 2022 Mar 16;23(6):3209..

WARRIER, A. *et al.* Photodynamic therapy to control microbial biofilms. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 2021 Mar;33:102090.