



Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana em leveduras do gênero *Candida*

Marta Majewski^{1*}; Antonio Olavo Cardoso Jorge²; Juliana Campos Junqueira³

¹ School of Dentistry of São José dos Campos, São Paulo State University (UNESP), Department of Biosciences and Oral Diagnosis, Postgraduate Student, São José dos Campos, SP, Brazil.

^{2,3} School of Dentistry of São José dos Campos, São Paulo State University (UNESP), Department of Biosciences and Oral Diagnosis, São José dos Campos, SP, Brazil.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica utilizando azul de metileno em cepas de *Candida*. Foram estudados: 5 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis*, 4 *C. glabrata*, 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. kefyr*, 1 *C. stellatoidea*, 1 *C. krusei* e 1 *C. lipolytica*. Cada cepa foi submetida a quatro condições experimentais: laser e azul de metileno (L+F+), irradiação com laser (L+F-), tratamento com azul de metileno (L-F+) e tratamento com soro fisiológico como grupo de controle (L-F-). Após o tratamento de cada cepa diluições seriadas e plaqueamento em Sabouraud dextrose agar foram realizadas. Os dados de unidades formadoras de colônias por mililitro (CFU/ml) foram analisados pelos testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que os grupos tratados com laser (L+F+ e L+F-) apresentaram médias de UFC/ml (Log) inferiores aos grupos tratados sem laser (L-F- e L-F+). O grupo com a terapia fotodinâmica (L+F+) apresentou uma média de CFU/ml (Log) semelhante ao grupo (L+F-). Concluiu-se que as cepas de *Candida* analisadas foram sensíveis à irradiação do laser de baixa potência na presença ou ausência do azul de metileno.

Palavras-chave: *Candida* spp. Terapia fotodinâmica. Laser de baixa potência. Azul de metileno.

INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos comensais da cavidade bucal, órgão genital e membranas mucosas de pessoas saudáveis e não causam qualquer prejuízo ao hospedeiro por habitar esses nichos ecológicos (Appleton, 2000; Matsuki *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010). Esses fungos possuem dimorfismo e podem se apresentar morfológicamente tanto como leveduras ou na forma hifal, dependendo das condições de crescimento, o que favorece sua aderência e virulência (Costa *et al.*, 2011).

Essas leveduras consideradas oportunistas tornam-se patogênicas na presença de fatores predisponentes que podem ser locais como o uso de próteses, a utilização do fumo ou álcool e também por fatores sistêmicos quando, desordens hormonais ou imunológicos expõem o indivíduo a essas infecções conhecidas como candidoses (Brito *et al.*, 2010). As candidoses são frequentemente associadas à portadores do vírus HIV, pacientes em tratamento quimioterápico e que utilizam drogas imunossupressoras ou antimicrobianas a longo prazo, ou seja indivíduos imunologicamente deprimidos (Pfaller & Diekema, 2007).

Terapia fotodinâmica ou PDT é designada como uma modalidade alternativa para tratar diversas neoplasias malignas e algumas doenças infecciosas causadas por fungos, vírus e bactérias (Karu, 1987; Usacheva *et al.*, 2001; Gad *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2005). A PDT resulta da associação de uma luz laser, um fotossensibilizador ou corante e o oxigênio, que estimulam uma reação fotofísica intracelular. O mecanismo de ação se dá quando o agente fotossensibilizante absorve os fótons de luz e seus elétrons passam a um estado excitado (Dai *et al.*, 2011). Na presença de um substrato, como o oxigênio em sua forma fundamental, o agente fotossensibilizante ao retornar ao seu estado natural transfere energia ao substrato, formando espécies de radicais altamente reativas, tal como o oxigênio singlete (Bliss *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007).

Corantes fenotiazínicos como o azul de metileno e azul de toluidina possuem efeito antimicrobiano quando associados à luz, com comprimento de onda adequado.

Autor correspondente: Marta Majewski, Department of Biosciences and Oral Diagnosis, School of Dentistry of São José dos Campos, São Paulo State University / UNESP, Francisco José Longo 777, São Dimas, São José dos Campos, CEP: 12245-000, SP, Brazil. E-mail: marta_biologa@ig.com.br

Wilson *et al.* (1993) aplicaram PDT utilizando o azul de metileno em patógenos encontrados na cavidade bucal e observaram que micro-organismos causadores de cárie podem ser erradicados utilizando-se este fotossensibilizador.

Esses corantes são mencionados na literatura por sua baixa toxicidade e eficiência em eliminar micro-organismos quando irradiados com luz, com comprimento de onda adequado à faixa de absorção do fotossensibilizador (Wainwright, 1998; Dai *et al.*, 2011; Denis *et al.*, 2011).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana tem sido utilizada para eliminar micro-organismos patogênicos da cavidade bucal como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras do gênero *Candida*, promovendo potente efeito antifúngico (Giroldo *et al.*, 2009). Chabrier-Roselló *et al.* (2005), analisaram os efeitos da terapia fotodinâmica em infecções mucocutâneas causadas por *C. albicans* e observaram a suscetibilidade desse micro-organismo à PDT.

Na prática odontológica, a procura por terapias alternativas e complementares para tratar infecções fúngicas da cavidade bucal é constante, devido à resistência que alguns micro-organismos apresentam aos medicamentos convencionais utilizados nos tratamentos de lesões localizadas. Entretanto a utilização de corantes na cavidade bucal resulta em manchamento da mucosa e dentina, portanto deve-se levar em consideração a dosagem adequada, para evitar qualquer inconveniente ao paciente (Wainwright, 1998; Wilson & Mia, 1993; Jori *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos encontrados na literatura avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana em cepas padrão do gênero *Candida* (Giroldo *et al.*, 2009; Mima, *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2013). Considerando o aumento das candidoses bucais após o advento da AIDS na década de 1980, surge a necessidade de estudos mais específicos com cepas clínicas desse gênero.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana, utilizando-se o fotossensibilizador azul de metileno, sobre cepas clínicas do gênero *Candida*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 20 cepas clínicas de *Candida*, sendo 5 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis*, 4 *C. glabrata*, 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. kefyr*, 1 *C. krusei*, 1 *C. lipolytica* e 1 *C. stellatoidea*. Cada cepa foi submetida a diferentes condições experimentais: laser e azul de metileno (L+F+, n=6), laser e solução fisiológica (L+F-, n=6), apenas azul de metileno (L-F+, n=6) e apenas solução fisiológica como grupo controle (L-F-, n=6), totalizando 24 experimentos para cada cepa (480 ensaios). As cepas foram obtidas de estudo anterior (Querido *et al.*, 2011) e permaneceram armazenadas sob refrigeração, no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, São Paulo, Brasil. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa sob protocolo 05/2007-PH/CEP.

Foi preparada suspensão de cada cepa de *Candida* contendo 106 células/mL. Cada cepa foi semeada em ágar *Sabouraud* dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubada a 37°C por 48 horas. A seguir, o micro-organismo foi semeado em caldo *Sabouraud* e incubado a 37°C por 16 horas. O crescimento foi centrifugado a 1300 Xg durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O sedimento foi suspenso em 5 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%). Esse procedimento foi repetido e a contagem do número de células da suspensão foi realizada por meio de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,284 (DO).

Para a sensibilização de cada cepa foi utilizado como fotossensibilizador o corante azul de metileno (Labsynth, Diadema, São Paulo) a 0,1%, previamente esterilizado por filtração em membrana (Spritzen-Filter, São Paulo, SP) com poros de diâmetro de 0,22 µm. A fonte de luz usada foi um laser de Arseneto de Gálio Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível) com tempo de exposição de 5 minutos e 0,38 cm² de área irradiada, potência de 35 mW, 10 J de energia e densidade de energia de 26,31 J/cm².

Em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizadas e com tampa, foi adicionado 100 µL de suspensão de *Candida* e 100 µL do fotossensibilizador ou de solução fisiológica (NaCl a 0,85%). A seguir, a placa contendo as amostras foi agitada durante 5 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Após esse período, o conteúdo de cada poço foi irradiado de acordo com os grupos experimentais previamente descritos. A irradiação das amostras foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, em ambiente escuro e utilizando um anteparo negro fosco sobre a placa de diluição, para evitar espalhamento de luz.

Após a irradiação, a partir de cada amostra, foram realizadas diluições seriadas de 10⁻² e 10⁻³ e alíquotas de 100 µL das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar *Sabouraud* dextrose (Difco, Detroit, USA). Após incubação a 37°C por 48 horas, foi realizada a contagem das unidades formadora de colônias (UFC/mL). A análise estatística deste estudo foi feita pelos testes de ANOVA e Tukey (p <0,05), no programa Minitab.

RESULTADOS

As médias de UFC/mL (Log) obtidas nos diferentes grupos experimentais para cada cepa de *C. albicans* e não-*albicans* estão apresentadas na Tabela 1 a 6.

Foi observado que os grupos tratados com laser (L+F+ e L+F-) em todas as cepas apresentaram médias de UFC/mL (Log) inferiores aos grupos sem laser (L-F+ e L-F-), sugerindo que o uso do laser, independente de estar associado ou não a um fotossensibilizador, provocou redução microbiana.

O grupo com terapia fotodinâmica utilizando azul de metileno (L+F+) apresentou média de UFC/ml (Log) semelhante ao grupo (L+F-). Esses dados demonstraram que a

terapia fotodinâmica com azul de metileno nos grupos testados neste trabalho, não apresentou efeito sobre as cepas clínicas de *C. albicans* estudadas, a redução microbiana encontrada no grupo com terapia fotodinâmica foi atribuída ao uso do laser sem corante.

O resultado obtido na cepa 2 de *C. albicans*, para os grupos (L+F-) e (L-F+) foi semelhante ao grupo controle (L-F-), o uso isolado do fotossensibilizador (azul de metileno) não apresentou toxicidade considerável para as cepas clínicas de *Candida*.

Todas as 5 cepas de *C. albicans* que foram analisadas separadamente apresentaram o mesmo padrão de comportamento nos diferentes grupos, a redução UFC/ml (Log) foi considerada estatisticamente insignificante nas condições avaliadas.

As espécies não-*albicans* apresentaram comportamento semelhante ao das espécies de *C. albicans*. *C. kefyr* 1 não apresentou redução nos grupos avaliados, sugerindo resistência à terapia fotodinâmica e ao laser sem fotossensibilizador. Na cepa 2 houve redução estatisticamente insignificante nos grupos com laser (L+F+) e (L+F-), comparado ao grupo controle.

As cepas 1, 2 e 3 de *C. tropicalis*, apresentaram redução no grupo (L+F+) e no grupo (L+F-), entretanto a redução nas cepas 2 e 3 com laser isolado foi superior ao grupo com terapia fotodinâmica. A cepa 4 foi resistente em todos os tratamentos. Foi observado que não houve redução satisfatória nas condições avaliadas para *C. tropicalis*.

As cepas de *C. glabrata* apresentaram maior resistência nas condições experimentais estudadas. A cepa 1 e 4 foram suscetíveis ao tratamento com laser (L+F-), no grupo (L+F+) não houve redução significativa em relação ao grupo controle. As demais cepas 2 e 3, foram resistentes à PDT e ao laser sem fotossensibilizador. O grupo tratado com corante sem laser não causou redução.

C. parapsilosis 1 e 2 foram sensíveis ao grupo tratado com laser, em relação ao grupo (L-F-). A cepa 2 apresentou redução no grupo com terapia fotodinâmica (L+F+) semelhante ao grupo com laser (L+F-). As 2 cepas de *C. parapsilosis* estudadas não demonstraram sensibilidade considerável ao tratamento de PDT e aos demais grupos.

A cepa de *C. stellatoidea* apresentou média UFC/ml (Log) do grupo (L+F+) inferior comparado ao grupo (L-F-). Em todos os outros grupos não foi observado redução significativa, *C. krusei* e *C. lipolytica* apresentaram redução nas médias UFC/ml (Log) no grupo com laser (L+F+) comparado ao grupo (L-F-). Para os demais grupos não houve viabilidade.

Observa-se que todas as cepas de *C. albicans* e não-*albicans* analisadas foram resistentes ao tratamento com terapia fotodinâmica utilizando o azul de metileno como fotossensibilizador. Houve variações na redução das médias UFC/ml (Log) nas cepas da mesma espécie e nas cepas de espécies diferentes. Os dados estatísticos dos resultados demonstraram que não ocorreu efeito fungicida do laser associado ao fotossensibilizador azul de metileno, mas efeito fungistático do laser sem corante para todas as cepas estudadas.

Tabela 1- Valores médios (\pm desvio-padrão) de UFC/mL (log10) de *C. albicans* (n=6) obtidos nos grupos tratados com laser e azul de metileno (L+F+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-F+) e solução fisiológica (L-F-). R% percentual de redução. *Teste de Tukey (p <0,05).

| Cepas | L+F+ | L+F- | L-F+ | L-F- |
|----------------------|------------|------------|------------|------|
| <i>C. albicans</i> 1 | 5.20* | 5.27* | 5.80 | 5.86 |
| DP*/%R | 0.13/11.2% | 0.18/10.0% | 0.12/1.02% | 0.09 |
| <i>C. albicans</i> 2 | 5.58 | 5.64 | 5.64 | 6.04 |
| DP*/%R | 0.08/7.6% | 0.31/6.6% | 0.31/6.6% | 0.18 |
| <i>C. albicans</i> 3 | 5.10* | 4.95* | 5.72 | 5.65 |
| DP*/R | 0.24/9.7% | 0.19/12.3% | 0.05/0.0% | 0.16 |
| <i>C. albicans</i> 4 | 4.95* | 5.57 | 5.73 | 5.64 |
| DP*/R | 0.05/12.2% | 0.22/1.2% | 0.19/0.0% | 0.10 |
| <i>C. albicans</i> 5 | 4.54* | 4.86* | 5.53 | 5.38 |
| DP*/R | 0.20/15.6% | 0.09/9.6% | 0.15/0.0% | 0.12 |

Tabela 2-Valores médios (\pm desvio-padrão) de UFC/mL (log10) de *C. kefyr* (n=6) obtidos nos grupos tratados com laser e azul de metileno (L+F+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-F+) e solução fisiológica (L-F-). R% percentual de redução. *Teste de Tukey (p <0,05).

| Cepas | L+F+ | L+F- | L-F+ | L-F- |
|-------------------|------------|------------|-----------|------|
| <i>C. kefyr</i> 1 | 5.84 | 6.01 | 6.06 | 6.25 |
| DP*/%R | 0.05/6.5% | 0.16/3.8% | 0.15/3.0% | 0.10 |
| <i>C. kefyr</i> 2 | 5.05* | 5.00* | 5.63 | 5.80 |
| DP*/%R | 0.19/12.9% | 0.21/13.7% | 0.18/2.9% | 0.23 |

Tabela 3-Valores médios (\pm desvio-padrão) de UFC/mL (log10) de *C. tropicalis* (n=6) obtidos nos grupos tratados com laser e azul de metileno (L+F+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-F+) e solução fisiológica (L-F-). R% percentual de redução. *Teste de Tukey (p <0,05).

| Cepas | L+F+ | L+F- | L-F+ | L-F- |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|------|
| <i>C. tropicalis</i> 1 | 4.52* | 4.53* | 4.89 | 5.00 |
| DP*/%R | 0.15/9.6% | 0.22/9.4% | 0.29/2.2% | 0.11 |
| <i>C. tropicalis</i> 2 | 5.07* | 4.96* | 5.16 | 5.30 |
| DP*/%R | 0.17/4.3% | 0.18/6.4% | 0.21/2.6% | 0.21 |
| <i>C. tropicalis</i> 3 | 5.18* | 4.96* | 5.22 | 5.32 |
| DP*/%R | 0.22/2.6% | 0.08/6.7% | 0.15/1.8% | 0.27 |
| <i>C. tropicalis</i> 4 | 5.46 | 5.32 | 5.59 | 5.54 |
| DP*/%R | 0.08/1.4% | 0.15/3.9% | 0.14/0.0% | 0.23 |

Tabela 4-Valores médios (\pm desvio-padrão) de UFC/mL (log10) de *C. glabrata* (n=6) obtidos nos grupos tratados com laser e azul de metileno (L+F+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-F+) e solução fisiológica (L-F-). R% percentual de redução. *Teste de Tukey (p <0,05).

| Cepas | L+F+ | L+F- | L-F+ | L-F- |
|----------------------|-----------|------------|-----------|------|
| <i>C. glabrata</i> 1 | 5.68 | 4.72* | 6.00 | 5.82 |
| DP*/%R | 0.34/2.4% | 0.34/18.9% | 0.05/0.0% | 0.18 |
| <i>C. glabrata</i> 2 | 5.92 | 5.94 | 5.99 | 6.05 |
| DP*/%R | 0.06/2.1% | 0.06/1.8% | 0.07/0.9% | 0.14 |
| <i>C. glabrata</i> 3 | 5.96 | 5.96 | 6.19 | 5.98 |
| DP*/%R | 0.12/0.3% | 0.17/0.3% | 0.15/0.0% | 0.14 |
| <i>C. glabrata</i> 4 | 5.66 | 5.14* | 5.85 | 5.77 |
| DP*/%R | 0.07/1.9% | 0.09/10.9% | 0.12/0.0% | 0.13 |

Tabela 5-Valores médios (\pm desvio-padrão) de UFC/mL (log10) de *C. parapsilosis* (n=6) obtidos nos grupos tratados com laser e azul de metileno (L+F+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-F+) e solução fisiológica (L-F-). R% percentual de redução. *Teste de Tukey (p <0,05).

| Cepas | L+F+ | L+F- | L-F+ | L-F- |
|--------------------------|------------|------------|-----------|------|
| <i>C. parapsilosis</i> 1 | 5.75 | 5.09* | 5.89 | 5.94 |
| DP*/R % | 0.14/3,1% | 0.09/14.3% | 0.06/0,8% | 0.09 |
| <i>C. parapsilosis</i> 2 | 5.06* | 5.13* | 5.74 | 5.92 |
| DP*/R % | 0.06/14.5% | 0.10/13.3% | 0.05/3.0% | 0.07 |

Tabela 6-Valores médios (\pm desvio-padrão) de UFC/mL (log10) de *C. stellatoidea*, *C. krusei* e *C. lipolytica* (n=6) obtidos nos grupos tratados com laser e azul de metileno (L+F+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-F+) e solução fisiológica (L-F-). R% percentual de redução. *Teste de Tukey (p <0,05).

| Cepas | L+F+ | L+F- | L-F+ | L-F- |
|------------------------|-----------|------------|-----------|------|
| <i>C. stellatoidea</i> | 5.64 | 5.88 | 5.96 | 5.96 |
| DP*/R % | 0.14/5.3% | 0.22/1.3% | 0.16/0.0% | 0.06 |
| <i>C. krusei</i> | 5.27 | 4.92* | 5.54 | 5.48 |
| DP*/R % | 0.07/3.8% | 0.16/10.2% | 0.21/0.0% | 0.14 |
| <i>C. lipolytica</i> | 5.20 | 4.62* | 5.52 | 5.61 |
| DP*/R % | 0.05/7.3% | 0.05/17.6% | 0.06/1.6% | 0.21 |

DISCUSSÃO

A ocorrência de infecções causadas por fungos na mucosa bucal aumentou consideravelmente nos últimos anos, este fato deve-se ao uso indiscriminado de antibióticos, tratamento quimioterápico para neoplasias, medicamentos imunossupressores que influenciam na microbiota bucal e desordens do sistema imunológico (Hamblin&Hasan, 2004; Donelli *et al.*, 2008; Samaranayake *et al.*, 2013). O uso constante de antifúngicos tópicos e sistêmicos principalmente em pacientes com infecções recidivantes, favorece o aparecimento de cepas resistentes aos fármacos comumente utilizados, para tratar tais infecções. (Bliss *et al.*, 2004; Carrillo-Munõz *et al.*, 2004).

Terapia fotodinâmica antimicrobiana, tem sido utilizada para tratar infecções localizadas, objetivando a destruição dos patógenos oportunistas sem causar efeito colateral ou tóxico para o hospedeiro (Jori *et al.*, 2006; Mima, *et al.*, 2011). Kato *et al.* (2012), avaliaram a redução dos fatores de virulência e patogenicidade de *C. albicans* ATCC (90028) em modelo animal e verificaram que houve viabilidade na aplicação da PDT, reduzindo os fatores patogênicos do micro-organismo. Os autores utilizaram azul de metileno na concentração de 0,5 mM combinado com laser Arseneto de Gálio Alumínio, com comprimento de onda de 660 nm e 9 a 27J/cm².

No presente estudo, foram utilizados parâmetros similares ao trabalho anteriormente citado, entretanto as 20 cepas de *Candida* utilizadas foram clínicas, pertencentes a 8 espécies diferentes, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lipolytica* e *C. stellatoidea*. Observamos que não houve redução estatisticamente significativa nas médias de UFC/mL (Log) em todas as cepas estudadas. O grupo que recebeu o fotossensibilizador isoladamente (L-F+) apresentou resultado semelhante ao grupo controle (L-F-), indicando que a dose do corante testada não apresentou toxicidade para os micro-organismos e os grupos que receberam laser (L+F+ e L+F-) exibiram médias de UFC/mL (Log) inferiores ao grupo controle (L-F-), sugerindo que a redução microbiana observada no grupo (L+F+) foi provocada pelo laser e não pela terapia fotodinâmica.

Redução das médias de UFC/mL (Log) significativa em cepas ATCC foi obtida por Souza *et al.* (2006), que utilizaram a mesma metodologia do presente trabalho. Os autores estudaram os efeitos da fotossensibilização de diferentes espécies de *Candida* pelo azul de metileno associado ao laser de baixa potência (Arseneto de Gálio Alumínio) com comprimento de onda de 685 nm e densidade de energia de 28 J/cm². A terapia fotodinâmica foi eficaz na redução microbiana, apresentando médias de UFC/mL (Log) de 4,68 para *C. albicans* (ATCC 18804), 4,20 para *C. krusei* (ATCC 6258) e 4,72 para *C. tropicalis* (ATCC 13803) em relação aos grupos controle, respectivamente, com médias de 5,69, 5,46 e

5,68. Os grupos tratados com laser isoladamente também exibiram diminuição no número de UFC/mL, entretanto essa diferença foi estatisticamente significativa apenas para *C. tropicalis*. Em nossos resultados, as médias UFC/ml das 3 cepas de *C. tropicalis* também apresentaram redução nos grupos tratados somente com laser (L+F-), na cepa 4 *C. tropicalis* não houve diferença estatística nos grupos avaliados.

Os estudos anteriormente citados (Jori *et al.* 2006; Souza *et al.* 2006; Prates *et al.*, 2007; Peloi *et al.*, 2008) avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica sobre cepas padrão de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. No presente estudo foram analisadas cepas clínicas de diferentes espécies do gênero *Candida*, que provavelmente necessitam de maior tempo de pré-incubação do fotossensibilizador ou maior tempo de exposição ao laser. O tempo de pré-incubação do micro-organismo com o fotossensibilizador utilizado neste estudo foi de 5 min.

Segundo Jori *et al.* (2006), as leveduras necessitam de um período mínimo de 30 min de pré-incubação com o fotossensibilizador, para que o mesmo consiga atingir concentrações endocelulares suficientes para ocorrer a fotoinativação microbiana.

No presente estudo, para a fotossensibilização do azul de metileno foi utilizado laser com densidade de energia de 26,3 J/cm². Peloi *et al.* (2008), utilizando azul de metileno como fotossensibilizador, também verificaram que o aumento da densidade de energia do LED vermelho de 6 para 12 J/cm² resultou em aumento da quantidade de redução de *C. albicans* (ATCC 90028) em aproximadamente 1 log(UFC/ml).

A dificuldade na obtenção de bons resultados com a fotoinativação de leveduras tem sido bastante discutida na literatura. De acordo com Donnelly *et al.* (2008), as leveduras são mais difíceis de serem mortas pela terapia fotodinâmica do que as bactérias porque possuem membrana nuclear, maior tamanho celular e reduzido número de alvos para o oxigênio singlete por unidade de volume celular.

Os resultados do presente estudo não foram satisfatórios quando comparados aos dados da literatura. A análise estatística das médias de UFC/ml (Log) foi realizada para cada cepa isoladamente e os resultados demonstraram que o laser sem corante levou a uma redução no número de UFC/mL (Log) mais significativa que o grupo tratado com terapia fotodinâmica (L+F+), em relação ao grupo controle de todas as cepas avaliadas. O efeito do laser de baixa intensidade sobre leveduras também foi descrito por Maver-Biscanin *et al.* (2005). Esses autores avaliaram o efeito do laser sobre *C. albicans* em dois pacientes com inflamação palatal causada pelo uso de prótese total. Os pacientes foram irradiados com diferentes comprimentos de onda e diferentes tempos (830 nm por 5 min e 685 nm por 10 min). Após a terapia, houve regressão no processo inflamatório e diminuição no número de colônias de *Candida* coletadas do palato.

Os danos fotodinâmicos sobre patógenos bacterianos e fúngicos sem a utilização de fotossensibilizadores são atribuídos à luz ultra-violeta e aos lasers de alta intensidades, entretanto ambos são inviáveis nas terapias de doenças infecciosas por causarem danos às células humanas. Em estudo recente, Bornstein *et al.* (2009) avaliaram os efeitos do laser infra-vermelho (870 e 230 nm), sem associação de fotossensibilizador, sobre *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *Trichophyton rubrum*. Na fotoinativação de *S. aureus* e *E. coli*, o percentual de morte microbiana observado foi, respectivamente, de 19 a 98% e de 8 a 98%, dependendo da densidade de energia utilizada. Para *C. albicans* e *T. rubrum* ocorreu 100% de morte microbiana em todas as densidades de energia testadas. Esses autores relataram que a resposta do micro-organismo ao laser infra-vermelho envolve a geração de espécies reativas de oxigênio, que são derivadas da membrana plasmática e da membrana mitocondrial.

Concluiu-se que as cepas de *Candida* analisadas apresentaram sensibilidade ao laser de baixa potência na presença ou não de azul de metileno.

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro durante a realização da pesquisa.

ABSTRACT

Effects of antimicrobial photodynamic therapy on Candida yeasts

The aim of this study was to evaluate the effects of photodynamic therapy using methylene blue on *Candida* strains. Were studied: 5 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis*, 4 *C. glabrata* 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. kefyr*, 1 *C. stellatoidea*, 1 *C. krusei* and 1 *C. lipolytica*. Each strain was underwent to four experimental conditions: methylene blue laser (L+P+) irradiation with laser (L+P-), treatment with methylene blue (L-P+), and treatment with saline as control group (L-P-). After treatment of each strain and plating serial dilutions on Sabouraud dextrose agar were performed. The data from colony forming units per milliliter (CFU/ml) were analyzed by ANOVA and Tukey test (p <0.05). The results suggest that the groups treated with laser (L+P+ and L+P-) showed average CFU/ml (Log) lower than without laser treatment groups (L-F- e L-F+). The group with photodynamic therapy (L+P+) showed an average CFU/ml (Log) similar to the group (L+P-). It was concluded that the strains of *Candida* analyzed were sensitive to laser irradiation of low power in the presence or absence of methylene blue.

Keywords: *Candida* spp. Photodynamic therapy. Low-power laser. Methylene blue.

REFERÊNCIAS

- Appleton SS. Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics and treatment. *J Calif Dent Assoc.* 2000;28:942-8.
- Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2000-6.
- Brito GN, Inocêncio AC, Querido SM, Jorge AOC, Koga-Ito CY. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV-positive patients and control individuals. *Braz Oral Res.* 2011;25(1):28-33.
- Bornstein E, Hermans W, Gridley S, Manni J. Near-infrared photoinactivation of Bacteria and Fungi at physiologic temperatures. *Photochem Photobiol.* 2009; 85(6):1364-74.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001;9(7):327-35.
- Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Péres-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubs and biofilms to photofrin mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4088-95.
- Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioterap.* 2006;19:130-9.
- Costa CR, Souza LKH, Ataídes FS, Ferri PH, Costa MP, Fernandes OFL, Silva MRR. Molecular analysis and dimorphism of azole susceptible and resistant *C. albicans* isolates. *Rev Soc Bras Trop.* 2011;44(6):740-4.
- Dai T, Arce VJB, Tegos GP, Hamblin MR. Blue day and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(12):5710-7.
- Denis TGS, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, Tegos GP. Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence.* 2011;2:509-20
- Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008;163:1-12.
- Ferreira C, Silva S, Oliveira FF, Pinho E, Henriques M, Lucas C. *Candida albicans* virulence and drug-resistance requires the O-acyltransferase Gup1p. *BMC Microbiol.* 2010;10:238.
- Fuchs BB, Tegos GP, Hamblin MR, Mylonakis E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2929-36.
- Gad F, Zabra T, Francis KP, Hasan T, Hamblin MR. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:451-8.
- Giroldo LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci.* 2009;24(1):109-12
- Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:436-50.
- Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):468-81.
- Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *J Quantun Electron.* 1987;23(10):1703-17.
- Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces *in vivo* pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):445-51.
- Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V. Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. *Photomed Laser Surg.* 2005;23:328-32.
- Matsuki M, Kanatsu H, Watanabe T, Ogasawara A, Mikami T, Matsumoto T. Effects of antifungal drugs on proliferation signals in *Candida albicans*. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(5):919-22.
- Mima EGO, Pavarina AC, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. On dentures: *in vitro* study. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(12):827-33.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133-63.
- Prates RA, Yamada Junior AM, Suzuki LC, Hashimoto MCE, Cai S, Grouw-Soares S, *et al.* Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol Biol.* 2007; 86(1):70-6.
- Peloi LS, Soares RR, Biondo CE, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci.* 2008;33(2):231-7.
- Querido SMR, Brito GN, Santos SSF, Leão MVP, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Opportunistic microorganisms in patients undergoing antibiotic therapy for pulmonary tuberculosis. *Braz J Microbiol.* 2011;42(4):1321-8.
- Samaranayake YH, Cheung BPK, Yau JYY, Yeung SKW, Samaranayake LP. Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial. *Plos One.* 2013;8(5):e-62902.
- Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Fotossensibilização de diferentes *Candida*

species by low power laser light. *J Photochem Photobiol Biol.* 2006;83:34-8.

Usacheva MN, Teichert CM, Biel MA. Comparasion of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microroganisms. *Lasers Surg Med.* 2001;29:165-3.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(5):13-28.

Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(8):354-7.

Wong TW, Wang YY, Sheu HM, Chuang YC. Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(3):895-902.

Recebido em 18 de julho de 2013

Accito em 4 de fevereiro de 2014

