



Juliana Cabrini Carmello

**Efetividade da Terapia
Fotodinâmica mediada pelo
fotossensibilizador
Photodithazine® na inativação de
Candida albicans in vivo.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Sousa Costa
Araraquara

2011

Carmello, Juliana Cabrini
Efetividade da terapia fotodinâmica mediada pelo
fotossensibilizador photodithazine na inativação de Candida albicans
in vivo / Juliana Cabrini Carmello . – Araraquara: [s.n.], 2011.
141 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia
Orientadora : Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina

1. Candida albicans 2. Candidíase bucal 3. Fotoquimioterapia
I. Título

Juliana Cabrini Carmello

**Efetividade da Terapia Fotodinâmica
mediada pelo fotossensibilizador
Photodithazine® na inativação de *Candida
albicans* in vivo**

Comissão Julgadora

Presidente e Orientador - Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador - Prof^a Dr^a Eunice Teresinha Giampaolo

3º Examinador - Prof^a Dr^a Cristina Kurachi

Araraquara, 28 de março de 2011.

Dados Curriculares

Juliana Cabrini Carmello

NASCIMENTO	19/07/1985 – Araraquara, São Paulo
FILIAÇÃO	Jair Cabrini Marli cabrini
2003 a 2006	Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia de Araraquara.
2005 a 2006	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Prótese Parcial Fixa da Faculdade de Odontologia de Araraquara.
2007 a 2009	Estágio de Atualização em Prótese Parcial Fixa da Faculdade de Odontologia de Araraquara.
2009 a 2011	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2009 a 2011	Estágio de docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Dedicatória

Aos meus pais **Jair e Marli**, meu amor incondicional. Agradeço pelo amor, carinho, apoio, por sempre me ajudarem a caminhar. Nos momentos de tristeza e angústia, eram vocês que me animavam e me ajudavam a continuar seguindo em frente. Como agradecer o “colo”, o abraço carinhoso e as doces palavras ditas no momento certo...

“Pai e Mãe: Obrigada por sempre orarem por mim, pedindo para que Deus iluminasse o meu caminho”. Jamais teria chegado até aqui sem o apoio de vocês. O meu amor por vocês é imensurável!!!

Obrigada por tudo!

Ao meu irmão **Jônatas**, pela amizade, companhia, carinho, amor, e pelas gargalhadas até nos momentos de tristeza.

Ao meu amor, **Ulisses**, pelo amor, carinho, companheirismo e por suportar meu mau humor nas épocas dos seminários durante o curso de mestrado. Obrigado por entender cada feriado e final de semana que passamos separados pois eu estava na faculdade..... Nos momentos difíceis sempre tinha a palavra certa para me ajudar a erguer a cabeça e continuar caminhando.

Dedico este trabalho

Agradecimentos especiais

À Deus, por me guiar, iluminar em todos os momentos e por me ajudar a passar por todos os obstáculos e chegar até aqui.

**“Ó SENHOR, TU ÉS O MEU DEUS; EXALTARTE-EI A TI, E LOUVAREI
O TEU NOME, PORQUE FIZESTE MARAVILHAS; OS TEUS
CONSELHOS ANTIGOS SÃO VERDADE E FIRMEZA”.**

ISA, 25:1

À meus pais **Jair e Marli** e à meu irmão **Jônatas**, por sempre apoiarem e entenderem as minhas escolhas estando ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por existirem e me amarem!

Ao meu marido **Ulisses**, mais uma vez o meu muito abrigada.
“Mori, não sei como teria sido esta fase da minha vida sem seu amor, carinho, companheirismo e compreensão”. Te amo muito!!

A minha orientadora Prof^a Dr^a **Ana Cláudia Pavarina**, toda minha admiração e respeito. Agradeço pela paciência, confiança e apoio na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Carlos Alberto de Sousa Costa**, pela disponibilidade e oportunidade concedida, tornando possível a execução de grande parte desse trabalho.

Aos professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, Prof^a Dr^a **Ana Lúcia Machado**, Prof^a Dr^a **Eunice Teresinha Giampaolo** e Prof. Dr.

Carlos Eduardo Vergani , pelo bom convívio, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação profissional.

A minha amiga **Livia Nordi Dovigo**, todo o respeito, carinho e admiração que tenho por você só aumentaram durante esses dois anos de convivência. Agradeço pelo apoio, pela palavra amiga nos momentos difíceis, pelas brincadeiras nos momentos de alegria e principalmente pelos ensinamentos e ajuda na execução deste trabalho. “Livia: não tenho palavras para expressar minha eterna gratidão. Obrigada pelos exemplos de dedicação, persistência, perfeccionismo, que me ajudaram a crescer profissionalmente e pessoalmente... Obrigada por acreditar em mim e pela amizade sincera! Essa jornada teria sido muito mais difícil sem você ao meu lado.

A minha amiga **Laiza Maria Grassi Fais**, pelo excelente convívio, pela sincera amizade, confiança e por estar ao meu lado em todos os momentos. Obrigada pelo estímulo e o incentivo em fazer pós-graduação.

Não teria chegado até aqui sem seu apoio!

À Prof^a Dr^a **Lígia Antunes Pereira Pinelli**, pela amizade, confiança e por ter acreditado em mim. Agradeço pelos ensinamentos que me colocaram na pós-graduação.

À Prof^a Dr^a **Cinara Maria Camparis**, pelo carinho, apoio, dedicação e incentivo para que eu fizesse mestrado. Obrigada por acreditar em mim!

Agradecimentos

Aos colegas de turma, **Giovana, Larissa, Eduardo, Amanda, Delise, Diana, Sabrina, Filipe, Mariana, Marianinha** e aos colegas de pós-graduação **Ana Paula e Cris**, pela amizade, carinho, apoio e por todas as vezes que rimos ou ficamos desesperados durante o curso. Obrigada pelos momentos bons e difíceis que passamos juntos.

As técnicas de laboratório, **Tati, Sônia e Stela** pelo auxílio que foi fundamental na execução desse trabalho.

A **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, por ter contribuído em minha formação profissional desde o início.

Aos **professores do programa de pós-graduação**, pela paciência e dedicação em nos transmitir tanto conhecimento.

Aos **funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e**

Prótese, pelo bom convívio, amizade e carinho.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -**

CAPES, pela bolsa de Mestrado a mim concedida.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste

trabalho.

**"O IMPORTANTE NÃO É A QUANTIDADE DE VITÓRIAS
OBTIDAS, MAS SIM A DETERMINAÇÃO PELO ESFORÇO
EM VENCER, EM SE REALIZAR, EM LUTAR POR ALGO EM
QUE REALMENTE SE ACREDITA!"
(AUTOR DESCONHECIDO)**

SUMÁRIO

Resumo.....	16
Abstract.....	19
1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1 Candidose Oral	27
2.2 PDT in vitro	46
2.3 PDT in vivo.....	67
3 PROPOSIÇÃO	75
4 MATERIAL E MÉTODO.....	77
4.1 Materiais.....	77
4.1.1 Instrumental e Materiais de consumo	77
4.1.2 Equipamentos	79
4.2 Métodos.....	80
4.2.1 Preparo dos materiais e meios de cultura.....	80
4.2.2 Aplicação da Terapia Fotodinâmica	83
4.2.3 <i>Candida albicans</i> e condições de crescimento	86
4.2.4 Animais	87
4.2.5 Indução de candidose em língua de camundongos	88
4.2.6 Imunossupressão dos camundongos	90
4.2.7 Inoculação de <i>C. albicans</i>	92
4.2.8 Realização da PDT	93
4.2.9 Sacrifício dos animais e análise histológica.....	98
4.2.10 Análise de micro-organismos viáveis.....	102
5 RESULTADOS	105
5.1 Avaliação macroscópica da indução de candidose oral nos animais	105
5.2 Avaliação in vivo da efetividade da PDT para os grupos experimentais.....	106
5.3 Avaliação dos grupos controles - Animais expostos somente à luz ou somente ao FS.....	112
5.4 Avaliação da análise histológica realizada nas línguas dos animais.	115
6 DISCUSSÃO	122
7 CONCLUSÃO	130
8 REFERENCIAS	132
APÊNDICE 1	140
APÊNDICE 2.....	142
APÊNDICE 3.....	143

Resumo

Carmello JC. Efetividade da Terapia Fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador Photodithazine[®] na inativação de *C. albicans* in vivo [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica (PDT) mediada pelo fotossensibilizador (FS) Photodithazine[®] (PDZ), associado à luz do tipo LED (660nm). Para tanto, foram utilizados 55 camundongos com aproximadamente 6 semanas de vida, os quais foram submetidos a indução de candidose no dorso da língua. Inicialmente os animais foram imunossuprimidos e no dia seguinte se realizou a inoculação de *C. albicans* na língua dos mesmos por meio de swabs embebidos na suspensão (10^7 Ufc/mL). Para a realização da terapia fotodinâmica o FS foi avaliado nas concentrações de 75, 100, 125 e 150mg/L. Tais grupos experimentais foram denominados de (P+L+ 75mg/L, P+L+ 100mg/L, P+L+ 125mg/L, P+L+ 150mg/L) associados a uma dose de luz de $37,5 \text{ J/cm}^2$. Para a verificação apenas do efeito da PDZ, a mesma foi aplicada na língua dos animais, sem iluminação (grupos denominados de P+L- 75mg/L, P+L- 100mg/L, P+L- 125mg/L, P+L- 150mg/L). O efeito da luz foi avaliado por meio da iluminação das línguas com dose de luz de $37,5 \text{ J/cm}^2$, (grupo denominado de P-L+ $37,5 \text{ J/cm}^2$). Um grupo recebeu apenas inoculação por *Candida* (grupo P-L-, controle positivo), outro grupo não recebeu nenhum tratamento e nem inoculação fúngica (grupo CN – controle negativo). Após os experimentos realizou-se a recuperação de *C. albicans* das línguas dos animais por meio de swabs que foram esfregados sobre as mesmas durante 1 minuto. Esses swabs foram embebidos em tubos de ensaio com 1mL de solução salina, e diluições seriadas foram realizadas e colocadas em placas de petri com SDA. Após 48 horas de incubação a 37° C as células fúngicas

foram quantificadas e o número de Ufc/mL foi determinado e analisado pelo teste ANOVA ($P<.05$). Os camundongos foram sacrificados e tiveram as línguas removidas cirurgicamente para realização da análise histológica. Os resultados demonstraram que a PDT foi efetiva na redução da viabilidade celular da *C. albicans* coletadas das línguas dos animais nas concentrações de 100, 125 e 150mg/L de FS, quando comparados com os animais do grupo controle positivo (P-L-) ($P<0.05$). Entretanto não houve diferença significativa entre os grupos que receberam PDT (P+L+100, P+L+125 e P+L+150mg/L). De acordo com os resultados pode-se concluir que a PDT não causou efeitos adversos nos tecidos das línguas dos animais. Dessa forma, concluiu-se que a PDT foi efetiva na inativação de *C. albicans* sem causar qualquer dano aos tecidos das línguas dos animais.

Palavras-chave: *Candida albicans*; candidíase bucal; fotoquimioterapia.



Abstract

Carmello JC. Effectiveness of photodynamic therapy mediated by Photodithazine[®] for *C. albicans* inactivation in vivo. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Abstract

The aim of this investigation was to evaluate the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) mediated by photosensitizer Photodithazine[®] (PDZ) associated with LED light (660nm) for the photoinactivation of *C. albicans* in a murine model of oral candidosis. Fifty-five 6-week-old female Swiss mice were immunosuppressed and in the next day small cotton pads were soaked in a *C. albicans* cell suspension (10^7 CFU/mL) and swabbed in the oral cavity of mice. PDT was performed and the PS was applied topically on the dorsum of the tongue of mice at concentrations 75, 100, 125 and 150mg/L (P+L+75, P+L+100, P+L+125 and P+L+150mg/L) associated with LED at a fluence of 37,5J/cm². The effect of PS only was tested by application of PDZ for the same period of pre-irradiation time and irradiation at the same concentration as that for the P+L+ group, without the LED illumination (P+L-75, P+L-100, P+L-125 and P+L-150mg/L). To verify the effect of the light only, the group was exposed to the same LED dose mentioned previously (P-L+ 37,5J/cm²), 1 group). The positive control did not receive any PS or light (P-L-). The negative control group (CN) of animals was evaluated and mice did not receive any treatment. After treatment the dorsum of the tongue was swabbed for 1 minute with a cotton pad to recover *C. albicans* cells and the microbiological evaluation was performed. The yeast colony counts were quantified and the number of CFU/mL was determined and analyzed by ANOVA test ($P<.05$). Animals were killed 24 hours after treatment and the tongue of all mice were surgically removed for histological analysis. The results of this investigation demonstrated that PDT was effective in reducing *C. albicans*

recovered from the tongue of mice at concentrations 100, 125 and 150mg/L of PS when compared with the animals from the positive control group (P-L-) ($P < 0.05$). There was no difference between these concentrations. Histological analyze was performed and no adverse effect on the tongue tissue was induced by PDT. In conclusion, PDT was effective for inactivation of *C. albicans* without causing any harming effects on tissues.

Key-words: *Candida albicans*; oral candidiasis; photochemotherapy.



Introdução

1 INTRODUÇÃO

A infecção de tecidos moles da cavidade bucal por *Candida* spp., denominada candidose bucal, é a infecção fúngica mais freqüente entre humanos¹. A *Candida albicans* é considerada a espécie mais prevalente e patogênica²⁹, mas, outras espécies do mesmo gênero também têm sido isoladas e são freqüentemente associadas ao desenvolvimento de infecções, tais como a *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondii* (em ordem decrescente de virulência)⁴². A expressão da virulência de *C. albicans* na cavidade oral está relacionada com alterações no sistema imunológico do indivíduo³¹. Além disso, outros fatores como hipossalivação, diabetes mellitus, uso prolongado de antibióticos ou drogas imunossupressoras e variação de pH também podem predispor o indivíduo a candidose oral⁴¹. A utilização de próteses dentais removíveis tem sido associada à manifestação de uma forma de candidose que afeta normalmente o palato de aproximadamente 65% dos pacientes usuários de próteses¹³, conhecida como estomatite protética. Essa infecção caracteriza-se pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos na mucosa subjacente às próteses removíveis dos pacientes, e, em casos mais avançados, também podem ser observadas áreas eritematosas difusas e hiperplasia papilar do palato⁵⁷.

Para o tratamento da candidose bucal pode ser utilizados terapia antifúngica tópica⁴, medicação antifúngica sistêmica⁹ e procedimentos de higienização e desinfecção das próteses⁵. Os medicamentos de uso tópico, como a nistatina e o miconazol, são normalmente aplicados nos primeiros episódios de candidose de um paciente e se mostram efetivos para aliviar os sinais e sintomas clínicos da infecção associada à *Candida* spp., porém são apenas resultados

transitórios de melhora da infecção. A recorrência da infecção tem se tornado um problema comum, principalmente nos casos de *pacientes que apresentam sistema imunológico comprometido*. O fluconazol, itraconazol e anfotericina B são antifúngicos sistêmicos que vêm sendo amplamente empregados para o tratamento da candidose bucal, especialmente em pacientes imuno-comprometidos, porém a ocorrência de efeitos hepatotóxicos é freqüente com a utilização desses medicamentos assim como o desenvolvimento de resistência microbiana⁴⁴. Outro aspecto relacionado à recorrência da infecção e resistência antifúngica é a habilidade que as espécies de *Candida* apresentam em se organizar em forma de biofilmes sobre superfícies^{13,56}. Os biofilmes consistem em comunidades estruturadas de micro-organismos envoltos por uma matriz polimérica extracelular aderidos a superfícies vivas ou inertes^{13,45}. Todo esse complexo estrutural promove vantagens à sobrevivência do fungo mesmo em condições desfavoráveis e aumenta a resistência aos medicamentos antifúngicos^{13,45}.

Diante das dificuldades relacionadas a resistência fúngica, uma nova modalidade terapêutica vem sendo sugerida como promissora para inativação microbiana, inclusive para o tratamento de candidose oral. Essa nova terapia é conhecida como Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy* ou PDT)^{10,19,58} ou Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês, *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy* ou PACT)⁵⁵. Essa metodologia é baseada na administração de um composto químico, um fotossensibilizador (Fs), que submetido a irradiação com luz visível, na presença de oxigênio, produz danos celulares específicos que inativam os microorganismos. Dois diferentes mecanismos oxidativos parecem ocorrer após a fotoativação do fotossensibilizador. No primeiro, ocorre uma reação fotoquímica, na qual o fotossensibilizador interage com uma biomolécula produzindo radicais livres, já no segundo mecanismo, há produção do oxigênio singlete (1O_2), uma das principais moléculas responsáveis pela inativação celular^{17,38}.

Estudos *in vitro* têm apontado a PDT como uma técnica efetiva em promover a inativação de espécies de *Candida*^{6-7,12,16,22,47,58}. Uma importante vantagem relacionada à utilização da PDT para o tratamento de infecções se deve a possibilidade de inativação de cepas resistentes aos tratamentos convencionais²². Também parece ser improvável que os micro-organismos desenvolvam resistência à PDT, já que esta envolve a formação de radicais livres oxidativos não-específicos. O mecanismo pelo qual a inativação fúngica ocorre ainda não está completamente esclarecido, mesmo assim alguns estudos têm sugerido que o efeito da PDT sobre células fúngicas depende das propriedades do FS utilizado^{14,20,23}. Atualmente, uma nova classe de FS vem sendo empregada em PDT (FSs de segunda geração). Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região vermelha do espectro fotomagnético. O Photodithazine[®] (PDZ) é uma clorina e_6 preparada na Rússia, obtida a partir da cianobactéria *Spirulina platensis*, que é encontrada em grande quantidade o que faz com que tenha baixo custo. Esse FS vem sendo aplicado atualmente com sucesso na PDT contra o câncer, devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete²³. A utilização desse composto em PDT antimicrobiana ainda não foi muito investigada, e a sua efetividade na inviabilização de espécies fúngicas presentes em infecções bucais ainda precisa ser comprovada.

Investigações *in vitro* têm mostrado que as espécies de *Candida* são susceptíveis a terapia fotodinâmica mediada por FS derivados de clorina e_6 ^{39,46,51} assim como a PDZ⁴⁸. Entretanto, o número de trabalhos que avaliaram o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em modelos animais é escasso³. Os modelos animais são indicados para trabalhos em que se deseja obter condições que se aproximem de situações clínicas. A confiabilidade dos resultados se deve ao controle e padronização das amostras que se consegue obter em pesquisas com animais^{2-3,42}.

De acordo com os aspectos citados, a PDT parece ser um método promissor para o tratamento de infecções superficiais. Essa terapia poderia suprir as dificuldades encontradas com os tratamentos convencionais, como a resistência antifúngica. Atualmente, existem novos FS disponíveis que, se efetivos, poderiam auxiliar na difusão da PDT como modalidade terapêutica para o tratamento da candidose bucal. No entanto, são necessários estudos in vivo que simulem condições encontradas clinicamente, para possibilitar a aplicação deste método terapêutico no tratamento de pacientes com candidose.

**Revisão de
Literatura**

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com objetivos didáticos, a revisão de literatura abordará dois aspectos separadamente: o primeiro fará referência aos trabalhos relacionados à candidose oral; o segundo enfocará os estudos referentes à terapia fotodinâmica antimicrobiana *in vitro* e à trabalhos que relataram a efetividade dessa terapia *in vivo*.

2.1 Candidose Oral

O efeito da administração de ketoconazol foi avaliado para o tratamento de candidose oral induzida em dorso da língua de ratos imunocompetentes, por Allen et al.² em 1988. Sessenta animais fêmeas, foram divididos em 4 grupos: G1 composto de animais que não receberam nenhum tratamento e nem inoculação de *C. albicans* (n = 10); G 2 foi tratado apenas com ketoconazol e também não foi inoculado por *candida* (n = 10); G 3 foi infectado mas não recebeu nenhum tratamento(n = 20) e o grupo 4 foi infectado e tratado com ketoconazol (n = 20). Durante 8 semanas os ratos dos grupos 3 e 4 foram inoculados oralmente com uma suspensão de *C. albicans* de 0,1 ml e concentração de 5×10^7 Ufc/ml que foi realizada em 3 dias alternados em todas as semanas. Após as 8 semanas esses animais foram avaliados para evidências clínicas de lesões e os que não apresentaram lesões foram removidos do estudo. Os animais que apresentaram lesões, foram acompanhados durante 20 semanas e observou-se que ainda havia a persistência de alterações no dorso da língua. Os animais foram sacrificados na 27^a semana e examinados para evidências clínicas e histológicas de

infecção. Segundo os autores, a análise histológica demonstrou nenhuma anormalidade nas línguas dos animais do grupo controle. Dos grupos que receberam tratamento, todos os animais mostraram remissão completa da lesão, enquanto que apenas 2 dos 9 animais do grupo não tratado mostraram remissão das lesões. Os autores concluíram que as mudanças epiteliais produzidas pela infecção por *C. albicans* são reversíveis dentro desse período avaliado.

O efeito da administração de fluconazol em pacientes com estomatite protética foi avaliado por Budtz-Jorgensen et al.⁹, em 1988. Pacientes portadores desta infecção foram submetidos à coleta de amostras do palato e da superfície da prótese, para a verificação da presença de fungos. Foram selecionados 38 pacientes, que apresentavam os sinais clínicos de estomatite protética e que possuíam, predominantemente, a *C. albicans* na cavidade bucal. Metade desses indivíduos recebeu a administração de 50 mg de fluconazol por dia, durante 14 dias, via oral. Os demais receberam apenas cápsulas placebo. Foram realizadas avaliações clínicas e micológicas antes, imediatamente após, 2 e 4 semanas após o término do tratamento. Além disso, amostras de sangue e urina foram obtidas para a verificação de possíveis efeitos colaterais do tratamento. Os resultados demonstraram uma redução significativa no eritema imediatamente após o término do tratamento com fluconazol. Após 2 e 4 semanas, observou-se ainda a presença de reação inflamatória. Em alguns casos, a infecção foi re-estabelecida após o período de 2 semanas. Alterações na flora microbiana dos pacientes tratados com o antifúngico foram encontradas, sendo tanto quantitativas, como qualitativas. Na maioria dos casos, a cepa identificada inicialmente foi eliminada e substituída por outros fungos patogênicos. Nesses pacientes, foram encontradas cepas diferentes da espécie originalmente identificada ou outras espécies patogênicas. A análise de urina e sangue, não revelou efeitos tóxicos da administração do fluconazol. Os indivíduos

tratados com o placebo, não mostraram nenhuma alteração na flora bucal e nas condições clínicas. Foi concluído que a utilização do fluconazol foi efetiva para a remissão dos sinais da estomatite protética, no entanto, os índices de recidivas encontrados demonstram resultados considerados apenas temporários.

Jorge et al.²⁵ em 1993, testaram um método de indução de candidose oral, por meio da sialoadenectomia. Foram utilizados, doze ratos wistar femininos com aproximadamente 170 a 200 gramas de massa corpórea. Esses animais foram divididos em dois grupos, no primeiro os animais tiveram suas glândulas salivares removidas, e no grupo 2 os animais receberam apenas inoculação por *Candida* (controle). Após avaliação da xerostomia presente nos animais, realizou-se a inoculação de *C. albicans* por meio do preparo de suspensões celulares que estavam a uma concentração de 10^8 ufc/ml. Realizaram-se três inoculações por semana, e após cinco semanas a infecção foi encontrada em 50% dos animais normais, mas após oito semanas nenhum animal apresentou candidose. Para os animais sialoadenectomizados, após cinco semanas 100% deles apresentavam infecção oral por *C. albicans* e após 18 semanas, 66,6% ainda estavam infectados. Os autores observaram que durante todo o período experimental, os animais que tiveram as suas glândulas salivares removidas, apresentaram maior infecção por *Candida* quando comparados aos animais normais. Concluíram assim que a sialoadenectomia constitui um método confiável para indução de candidose oral em modelo animal experimental.

O estabelecimento de candidose oral em ratos sialoadenectomizados foi avaliado por Jorge et al.²⁶ em 1993. De acordo com os autores, esses animais têm sido utilizados nesse tipo de estudo para uma melhor compreensão sobre a colonização e patogenicidade de *C. albicans* na cavidade oral. Para tanto, 20 ratos Wistar machos foram utilizados e tiveram grande parte de suas glândulas salivares removidas cirurgicamente (parótida, sublingual e submandibular). Para inoculação,

suspensões celulares foram preparadas a partir de isolados clínicos de pacientes com candidose oral crônica. Todos os animais receberam inoculação oral por 32 semanas. Os ratos foram sacrificados 24 horas após a última inoculação. Após 32 semanas, 20% dos animais controle e 70% dos xerostômicos ainda apresentavam infecção por *Candida*. A análise histológica revelou a presença do fungo no epitélio do dorso da língua tanto dos animais controles (40%) quanto dos sialoadenectomizados (100%), com a presença de hifas e pseudohifas na camada de queratina. De acordo com os autores, a remoção cirúrgica das glândulas salivares resultou em xerostomia severa e intensa, predispondo os animais à candidose oral, o que confirmou que os constituintes salivares são importantes na inibição da colonização da cavidade oral por *Candida*, e que esse modelo é promissor para indução dessa infecção em modelos animais.

Em uma revisão de literatura em 1994, Allen³ discutiu sobre indução de candidose oral em animais. De acordo com o autor a candidose oral é a infecção fúngica mais comum que afeta a mucosa oral humana. Em muitos casos, essa infecção pode provocar alteração do paladar, sensação de queimação e até mesmo transformação maligna nos indivíduos. Como esse fungo é considerado um patógeno oportunista, alguns fatores como diabetes melitus, xerostomia, e uso de antibióticos de amplo espectro podem predispor o indivíduo a desenvolver tal infecção. Mas mesmo assim, pouco se sabe sobre como cada um desses fatores permite o desenvolvimento de infecção por *candida*. Do ponto de vista científico começou-se a pensar em modelos animais para indução de candidose, uma vez que os humanos possuem muitas variáveis como hábitos alimentares, sociais, estado imune, higiene oral, uso de drogas e função salivar, que podem interferir e confundir em como uma pessoa pode desenvolver tal infecção. O autor relata ainda que a principal vantagem dos estudos feitos com animais é que se pode controlar seu ambiente e manipular os parâmetros específicos a serem avaliados tais

como dieta, fluxo salivar, uso de antibióticos, microflora oral, presença de diabetes melitus e estado imunológico e dessa maneira dados válidos podem ser obtidos. O autor comenta também que dentre as espécies animais mais utilizadas em experimentos para a indução de candidose oral é necessário levar em consideração o tamanho da cavidade oral do animal, a facilidade de manipulação, o custo e facilidade de manutenção. Por exemplo, os ratos e camundongos são animais baratos, fáceis de manter e de manipular. Os camundongos possuem a cavidade oral muito pequena em relação aos ratos, mas ainda assim possuem outra vantagem que explica seu grande uso em pesquisas que envolvem indução de candidose, que é a de ter um sistema imune de fácil manipulação. Nos estudos de candidose induzida em animais, alguns relatam a contribuição do sistema imune na patogênese da doença; outros examinam fatores sistêmicos envolvidos como diabetes e anemia; há aqueles que falam sobre as alterações que ocorrem na mucosa e aqueles que avaliam a relação entre vários fatores locais e sistêmicos do organismo com a candidose oral. Dessa maneira o autor concluiu que os modelos animais, mais especificamente ratos e camundongos, são os mais satisfatórios na investigação da patogênese, interação com o hospedeiro, e tratamento para infecção de candidose oral.

O objetivo do trabalho de Kulak et al.²⁹ em 1994 foi investigar a remissão de estomatite protética em pacientes usuários de próteses totais por meio de 3 diferentes tratamentos. Foram selecionados 45 pacientes que utilizavam prótese total superior e apresentavam estomatite protética, e não apresentavam nenhuma outra doença sistêmica. Inicialmente realizou-se uma coleta da cavidade oral desses pacientes por meio de swabs que foram cultivados em SDA a 37° C por 48 horas. Os indivíduos que apresentavam 100 Ufc/ml ou mais no plaqueamento realizado e evidências clínicas de estomatite protética foram divididos em 3 grupos : Grupo 1 (G1), foi administrado 50mg de fluconazol diariamente por 2 semanas; G2, aplicou-se solução de

clorixidina 2% na superfície interna das próteses 2 vezes ao dia, juntamente com a administração de fluconazol por 2 semanas; G3, a esses pacientes uma nova prótese foi confeccionada, e nenhum medicamento foi prescrito. Outra coleta da cavidade oral dos pacientes foi realizada por meio de swabs, imediatamente e 2 semanas após o tratamento. De acordo com os resultados observou-se que o tratamento realizado com fluconazol em associação com aplicação de clorexidina 2% sobre a superfície interna da prótese resultou em melhora de reação inflamatória do palato e na diminuição de colonização por *Candida* em comparação aos grupos que apenas receberam tratamento com fluconazol ou apenas confecção de novas próteses. Observou-se ainda que o tratamento realizado para o grupo 2 eliminou quase que totalmente as hifas presentes no palato desses pacientes, entretanto, alguns blastóporos ainda estavam presentes. A confecção de novas próteses não foi efetiva para remissão da infecção. Os autores concluíram que a aplicação tópica de clorexidina em associação à administração de um antifúngico sistêmico é uma alternativa promissora para o tratamento de estomatite protética.

Scully et al.⁴⁴ em 1994 realizaram uma revisão de literatura sobre as espécies candidose oral. Os autores consideram que as espécies de *Candida* são os patógenos mais comuns isolados da cavidade oral, sendo a *C. albicans* a mais prevalente. Outras espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, também estão sendo frequentemente isoladas estando associadas a infecções. Esses microorganismos vivem em comensalismo na cavidade oral e são considerados patógenos oportunistas desenvolvendo a infecção em pacientes imunocomprometidos, que apresentam doenças sistêmicas, que fazem uso de antibioticoterapia de amplo espectro assim como naqueles que utilizam próteses, que possuem hábitos alimentares e/ou higiene oral deficientes, variações de pH entre outros. Investigações têm demonstrado que os pacientes que apresentam síndrome da imunodeficiência humana

(AIDS) também têm sido acometidos por essa infecção e que a mesma tem se desenvolvido de forma severa nesses indivíduos. Adicionalmente, outros trabalhos têm relatado não apenas os sinais clínicos comuns que caracterizam a candidose oral, mas outras variações clínicas como candidose eritematosa ou atrófica. De acordo com os autores essas condições são freqüentes em pacientes que apresentam vírus HIV e naqueles que fazem uso de corticosteróides e antibioticoterapia de amplo espectro. Clinicamente são caracterizadas por áreas eritematosas generalizadas que podem aparecer no dorso da língua (língua despapilada), palato, e mucosa oral. O tratamento para candidose oral tem mostrado resultados efêmeros uma vez que os medicamentos utilizados não têm eliminado completamente o fungo, fazendo com que recidivas da infecção ocorram. Segundo alguns estudos, esse patógeno tem desenvolvido resistência aos antifúngicos utilizados, principalmente às drogas do tipo azol. Dessa maneira, os autores sugerem que com o aumento das infecções orais causadas por *Candida* principalmente em pacientes com HIV, e da resistência que esses patógenos vêm desenvolvendo aos antifúngicos, terapias alternativas devem ser melhor estudadas e futuramente aplicadas para o tratamento de candidose oral.

Sweet et al.⁴⁹ em 1995 avaliaram a capacidade de aderência à células epiteliais bucais de cepas de *Candida albicans* retiradas de indivíduos HIV positivos assintomáticos e sintomáticos. De acordo com os autores, o aumento na prevalência de candidose oral associada com infecção por HIV pode estar relacionado a mudanças no sistema imunológico do hospedeiro, mas também pode estar relacionado à alterações das cepas que estão causando a infecção. Dessa forma, cepas de *C. albicans* foram isoladas de 49 pacientes soro-positivos para o vírus HIV e 49 pacientes saudáveis (grupo controle). Dos pacientes infectados pelo vírus, 41 eram apenas soro-positivo, sem a manifestação da doença, e 8 apresentavam a doença. Os pacientes do grupo controle possuíam várias doenças orais tais como xerostomia, recorrência de ulceração oral

ou líquen plano. Esses pacientes foram selecionados como sendo um grupo com susceptibilidade à candidose oral, porém sem evidências de imunossupressão. Os isolados foram coletados da saliva dos pacientes e cultivados em SDA e armazenados em glicerol 40% a -20° C. Suspensões de *C. albicans* foram preparadas por meio da reativação da levedura em SDA a 37° C por 48 horas. Uma única colônia foi suspensa em 10 mL de PBS, lavada 2 vezes e centrifugada. A concentração celular foi ajustada a 10^7 células/mL. As células epiteliais bucais foram coletadas em laboratório de pacientes saudáveis, sem sinais de qualquer patologia oral. As amostras foram retiradas da mucosa jugal desses pacientes por meio de um swab estéril, no mesmo dia do experimento. As células foram então diluídas em 10 mL de PBS, filtradas, lavadas 3 vezes em PBS e centrifugadas, estando a concentração final equivalente a 10^5 células/mL. Após o preparo das suspensões de *Candida* e de células bucais as mesmas foram submetidas ao teste de aderência. De acordo com os resultados, *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos apresentou maior aderência às células epiteliais bucais quando comparadas aos isolados de pacientes do grupo controle. Os resultados sugerem que a infecção por HIV está associada a seleção de cepas de *C. albicans* e com o aumento na habilidade dessas cepas aderirem à mucosa oral.

A implantação e o desenvolvimento de *C. albicans* e outras espécies de *Candida* na cavidade oral de ratos foi avaliada por Totti et al.⁵³ em 1996. De acordo com os autores, a maior parte das infecções fúngicas que afetam a cavidade oral são causadas por *C. albicans*, porém o número de infecções causadas por outras espécies de *Candida* tem aumentado. Para tanto, 60 ratos femininos Wistar com aproximadamente 120 a 170g de massa corpórea foram utilizados. Desses, 30 foram tidos como controles, e os outros 30 tiveram a maior parte de suas glândulas salivares removidas cirurgicamente. Para inoculação, suspensões celulares com 10^8 blastóporos/ 0,2 ml de salina estéril foram preparadas de *C. albicans*, *C. parapsolis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*,

todas ATCC. Grupos de 6 animais normais e 6 sialoadenectomizados foram inoculados diariamente por 4 dias. As amostras foram coletadas nos dias 1, 2, 3, 5, 8, 15 e 30 após a última inoculação por meio de miniswabs esfregados por todas as partes da língua durante 5 minutos. Esses swabs foram imersos em 0,1ml de solução salina estéril, dos quais diluições seriadas foram realizadas e plaqueadas em SDA em duplicata a 37° C por 48 horas. Em seguida realizou-se a contagem de colônias viáveis. Os resultados mostraram que *C. albicans* foi encontrada recobrando quase toda a cavidade oral de todos os animais e em todos os períodos avaliados. Os animais sialoadenectomizados mostraram maior número de *C. albicans* em relação aos controles. Os valores para *C. parapsolis*, foi semelhante para todos os grupos. Para *C. tropicalis*, os valores foram maiores para os animais não sialoadenectomizados no 8° dia de experimento. Já *C. guilliermondii* e *C. krusei*, foram isoladas em poucos animais apenas no primeiro dia do experimento. Os autores concluíram que todas as espécies de *Candida* isoladas diminuíam em número conforme o decorrer do experimento, e que a sialoadenectomia favoreceu a colonização por *C. albicans*.

A capacidade de aderência de *Candida albicans* às células epiteliais bucais foi avaliada por Schwab et al.⁴³ em 1997. Para isso, 6 isolados clínicos de *Candida albicans* foram obtidos de pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (grupo 1), de pacientes que foram submetidos à transplante de órgãos (grupo 2) e também de pacientes saudáveis (grupo 3). Doze pacientes fizeram parte do grupo 1, 8 do grupo 2 e 17 do grupo 3. Durante o período de coleta das amostras, os pacientes dos grupos 1 e 2 receberam tratamento com fluconazol. Apenas alguns pacientes do grupo 1 foram tratados com antibioticoterapia de amplo espectro, e outros do grupo 2 receberam medicação imunossupressora como ciclosporina, prednisolona ou azatioprina. Os pacientes saudáveis não receberam tratamento. Todas as amostras de leveduras foram armazenadas em -20° C em NaCl após as

coletas, e cultivadas em placas de SDA à 30° C antes do teste de aderência. As células fúngicas foram suspensas em cloreto de sódio a 0,9% contadas em câmara de Neubauer e ajustadas a uma densidade de 10^8 células/mL. As células epiteliais foram coletadas da mucosa jugal de todos os pacientes por meio de swabs estéreis os quais foram embebidos em 6 mL de meio 199. Essa suspensão celular estava a uma concentração de 5×10^5 células/mL. As células epiteliais bucais coletadas dos pacientes foram observadas em microscópio para verificação das leveduras unidas a essas células, antes do teste de adesão. Quando havia presença de leveduras aderidas às células epiteliais, essa suspensão era descartada. Para minimizar possíveis variações, as células foram coletadas de todos os pacientes no mesmo dia e hora, durante 60 minutos. Em seguida, à suspensão celular adicionou-se 100 µL da suspensão de *Candida*, e incubou-se a 37° C. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante ressuspendido em PBS. As células foram preparadas e observadas em microscópio com diferentes contrastes ópticos, o qual permitiu a visualização de toda superfície celular. O valor de leveduras aderidas às células epiteliais foi determinado e o número médio calculado (valor da aderência). De acordo com os autores, a natureza dos receptores celulares do hospedeiro influencia na habilidade de adesão das espécies de *Candida* às células epiteliais. Os resultados demonstraram que os 6 isolados clínicos provenientes de pacientes com AIDS aderiram três vezes mais às células epiteliais bucais quando comparadas aos isolados retirados de pacientes transplantados ou saudáveis. Os autores concluíram que a adesão de *C. albicans* às células epiteliais bucais é um fator importante na patogênese da recorrência de candidose oral em pacientes com AIDS.

Em uma revisão de literatura, White et al.⁵⁶ em 1998, descreveram os fatores clínicos, moleculares e celulares que podem estar relacionados ao desenvolvimento de resistência antifúngica. No estudo, dois tipos de resistência foram definidos: a primária (intrínseca a algumas

espécies, como a *C. glabrata* e *C. krusei*), e a secundária (desenvolvida após a exposição prolongada a algum tipo de medicamento). De acordo com os autores, os mecanismos de resistência demonstrados na literatura variam conforme a medicação avaliada. Os agentes azóis, por exemplo, atuam na inibição da biossíntese do ergosterol, promovendo alterações na função apropriada de enzimas e na integridade da membrana citoplasmática. Dessa forma, micro-organismos resistentes, normalmente apresentam mutações genéticas nas enzimas alvo do medicamento (envolvidas na formação do ergosterol) e mecanismos para diminuir a concentração celular da droga. De modo geral, a natureza fungistática do medicamento, a dosimetria de aplicação (frequência e quantidade de efeito cumulativo), a farmacocinética (absorção, distribuição e metabolismo) e as interações medicamentosas são parâmetros relativos às drogas que podem influenciar o desenvolvimento de resistência antifúngica. Além disso, fatores intrínsecos aos indivíduos também podem interferir na resposta a medicação, como o estado imunológico, o local e severidade da infecção e a presença de fatores agravantes (próteses dentais, catéteres, válvulas cardíacas). Os autores frisaram a importância do desenvolvimento de estratégias que identifiquem de forma segura a presença de micro-organismos resistentes nas infecções, para que terapias apropriadas possam ser aplicadas. Além disso, foi concluído que a busca por tratamentos que não promovam o desenvolvimento de resistência é de fundamental importância, tendo em vista que os medicamentos disponíveis atualmente parecem continuar promovendo novos mecanismos de resistência.

Banting, Hill⁵, em 2001, avaliaram in vivo a desinfecção de próteses totais por imersão em clorexidina ou irradiação em microondas como métodos adjuntos no tratamento de estomatite protética. Trinta e quatro pacientes portadores de próteses totais superiores com esfregaços positivos para pseudohifas de *C. albicans* foram selecionados para um dos seguintes tratamentos: irradiação da prótese em microondas ou

imersão da prótese em solução clorexidina a 0,2% (controle). Todos os pacientes receberam medicação antifúngica tópica (Nistatina 300000 IU 3 vezes ao dia) por 14 dias. As próteses selecionadas para o tratamento com as microondas foram escovadas com sabão anti-séptico e água e então irradiadas por um minuto a 850 W em três dias diferentes (1°, 5° e 10° dia). Para o grupo controle, as próteses foram imersas na solução de clorexidina durante a noite por 14 dias, com renovação da solução a cada 2 dias. Essas próteses também foram escovadas em 3 dias diferentes (1°, 5° e 10° dias), estabelecendo parâmetro para comparação entre os grupos. Os resultados demonstraram que, após 14 dias, 53% das próteses irradiadas por microondas apresentaram pseudohifas de *C. albicans* e que essa porcentagem aumentou para 84% para as próteses imersas em clorexidina. Por outro lado, após esse mesmo período, os esfregaços citológicos referentes à mucosa palatina dos pacientes cujas próteses foram irradiadas apresentaram 1/4 do risco de infecção dos tecidos palatinos em relação aos pacientes que tiveram suas próteses imersas em clorexidina. Três meses após o tratamento, o grupo controle foi considerado 5 vezes mais susceptível a apresentar pseudohifas de *C. albicans* quando em comparação com o grupo que recebeu tratamento com as microondas. Os autores concluíram que a exposição das próteses às microondas foi efetiva para uma adequada desinfecção nas próteses sem ocasionar efeitos deletérios aparentes nas propriedades das mesmas.

Em um trabalho de revisão de literatura, Calderone, Fonzi¹¹, em 2001, descreveram os fatores de virulência da *C. albicans*. De acordo com os autores, a candidose é uma infecção comum da pele, cavidade bucal e esôfago, trato gastrointestinal, vagina e sistema vascular em humanos. Embora a maioria das infecções ocorra em pacientes imunocomprometidos ou debilitados, a *C. albicans* expressa diversos fatores de virulência que contribuem para a patogênese. Esses fatores incluem a presença de biomoléculas de reconhecimento do hospedeiro

(adesinas) e a produção de fosfolipases e proteases aspartil secretadas. Os autores descreveram os eventos iniciais da patogenia da candidose, que se inicia pelo reconhecimento do hospedeiro. A ligação do micro-organismos a proteínas ou competidores do micro-organismos pode dificultar a sua identificação por parte do hospedeiro. Além disso, embora seja bem difundida a idéia de que a invasão tecidual seja facilitada pela transformação do micro-organismos para a forma de hifas, de acordo com os autores, outros mecanismos de penetração tecidual podem ocorrer. Os autores descreveram a invasão tecidual das leveduras por um processo denominado “persoption”, e, também, por meio de fagocitose por parte das células humanas da região da faringe e do esôfago. Além disso, alterações fenotípicas são acompanhadas de alterações na expressão antigênica, morfologia de colônia e afinidade aos tecidos da *C. albicans* e outras espécies de *Candida*. As alterações podem proporcionar às células, flexibilidade, favorecendo a sua adaptação as condições do próprio hospedeiro e do tratamento imposto por algum tipo de terapia.

Em outra revisão de literatura, Samaranayake et al.⁴² em 2001, também falaram sobre candidose oral experimental em modelos animais. Segundo o autor muitos estudos que avaliaram a presença de *Candida* associada ao uso de placas de acrílico para simular o uso de prótese foram bem sucedidos uma vez que as lesões presentes nos animais foram muito semelhantes as presentes em humanos. Outros estudos nos quais se induziu candidose oral em ratos, também se detectou colonização por *Candida* assim como lesões semelhantes em humanos tanto microbiologicamente quanto histologicamente. Em outra investigação, os autores também induziram candidose em ratos e observaram lesões iguais as dos humanos. Os autores consideram o uso de ratos para indução desse tipo de infecção satisfatória, pois esses animais são de fácil manipulação, baixo custo para manutenção, tamanho da cavidade oral suficiente para inoculação e coleta de *Candida*. Além dos ratos, os camundongos também são ideais para esses tipos de

estudo, pois também possuem facilidade de manipulação e de manutenção, baixo custo, e mais um fator que vem a ser o mais importante, que é um sistema imunológico fácil de ser manipulado, o que facilita ainda mais o aparecimento da infecção.

Em 2003, Takakura et al.⁵⁰ avaliaram um método para indução de candidose oral em modelo animal e a efetividade dos antifúngicos Fluconazol e Anfotericina B na inativação de *C. albicans*. Para a indução dessa infecção todos os animais foram imunossuprimidos no primeiro dia do experimento e no terceiro dia após a infecção com Prednisolona 100mg/kg. No segundo dia do experimento os mesmos foram anestesiados e a inoculação foi realizada por meio de mini-swabs embebidos em uma suspensão celular de *C. albicans* ($2,5 \times 10^7$ ufc/ml) os quais foram introduzidos na cavidade oral do animal. Cloridrato de clorpromazina foi administrado para que os animais ficassem sedados até três horas após a inoculação. Os autores avaliaram a infecção macroscopicamente baseados na presença ou não de lesões brancas as quais foram atribuídos escores de 0 a 3 de acordo com a severidade e extensão das mesmas. O Fluconazol foi administrado ao animal sendo misturado na água (50µg/ml). Já Anfotericina B (suspensão oral de 100mg/ml) em um volume de 200µl foi diretamente aplicada por toda a cavidade oral incluindo a língua, mucosa bucal e palato mole. Ambos os antifúngicos foram administrados 3 horas após inoculação até o segundo dia pós-infecção. A eficácia dos medicamentos foi avaliada no segundo e terceiro dia pós-infecção. Com mini-swabs embebidos em 5ml de solução salina, os quais foram esfregados por toda cavidade oral do animal, diluições seriadas foram feitas, plaqueadas e incubadas a 37°C por 20 horas. Os autores constataram que do terceiro ao sétimo dia pós inoculação, os animais possuíam cerca de 10^6 - 10^7 ufcs/mL de *Candida* por toda cavidade oral, além da presença de lesões brancas em várias partes de língua. Os medicamentos utilizados propiciaram uma grande redução da infecção, porém, mostraram resultados temporários já que

não eliminaram completamente esses micro-organismos. Concluíram então que este modelo pode ser usado para indução de candidose oral in vivo, e para testar a eficácia de vários agentes antifúngicos.

A indução de candidose oral em camundongos normais e xerostômicos, foi avaliada por Totti, et al.⁵⁴ em 2004. Os autores consideram que a xerostomia é um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de candidose oral. Dessa maneira, uma suspensão celular com 10^8 Ufc/ml de *C. albicans* foi preparada e inoculada na cavidade oral dos animais por meio de uma seringa. O estudo foi constituído por 3 grupos experimentais: grupo 1, possuía 78 camundongos que tiveram suas glândulas salivares removidas e 78 animais com fluxo salivar normal os quais receberam 1 inoculação por *C. albicans*; grupo 2, com a mesma quantidade de camundongos siloadenectomizados e com fluxo salivar normal, os quais receberam inoculação por *Candida* durante 4 dias, e o grupo 3, possuía 6 animais siloadenectomizados e 6 com fluxo salivar normal, que não receberam inoculação por *Candida*. Nenhum dos animais recebeu água por pelo menos 1 hora após a inoculação. As línguas dos animais normais e siloadenectomizados foram avaliadas nos dias 1, 2, 3, 5 e 8 após a inoculação, e a cada 15 dias até completar 165 dias de experimento. Seis animais foram sacrificados cada vez que as línguas eram avaliadas, e as mesmas foram removidas cirurgicamente. De acordo com as análises histológicas das línguas, pode-se observar o desenvolvimento de candidose tanto nos animais siloadenectomizados que receberam 1 inoculação quanto nos que receberam 4 inoculações. Os autores relataram que a siloadenectomia é promissora para indução de candidose oral e que os animais que receberam 4 inoculações apresentaram lesões mais extensas.

A correlação entre adesão, produção enzimática e susceptibilidade à fluconazol de *C. albicans* obtidas de pacientes usuários de próteses foi avaliada por Lyon et al.³² em 2006. Para isso, 99 pacientes

que utilizavam próteses totais foram selecionados. Desses, 44 apresentavam sinais de *Candida* associada à estomatite protética, os outros 55 pacientes apresentavam a mucosa do palato saudável. As amostras foram coletadas do dorso da língua e da mucosa do palato por meio de swabs estéreis, e cultivadas em SDA a 37° C por 48 horas. Oitenta e três isolados de *Candida* spp. foram obtidos, dos quais 46 eram de pacientes com estomatite protética e 37 de indivíduos com mucosa do palato normal. Os autores observaram que das espécies identificadas 68 eram *C. albicans*, e 15 eram de outras espécies de *Candida*. Apenas 30 cepas obtidas de indivíduos com candidose associada a estomatite, e 30 cepas de indivíduos com mucosa do palato normal foram utilizados no estudo. As cepas foram comparadas com relação a capacidade de aderência às células epiteliais bucais, redução dessa adesão após exposição ao fluconazol, e produção enzimática. De acordo com os resultados, as cepas obtidas de pacientes com estomatite protética apresentam maior aderência produção de enzimas do que aquelas obtidas de pacientes saudáveis. A exposição das cepas ao fluconazol reduziu a aderência das mesmas às células epiteliais bucais. Os autores concluíram assim, que a adesão pode estar relacionada com fatores predisponentes do hospedeiro, que podem determinar ou não se ele irá desenvolver a doença. Eles concluíram ainda, que há correlação entre a adesão, produção de proteinase e fosfolipase e susceptibilidade ao fluconazol.

Nakajima et al.³⁶ em 2007, isolaram, identificaram e determinaram a prevalência de leveduras na cavidade oral de pacientes e avaliaram qual seria a concentração mínima inibitória (MIC) da substância Kolorex que causasse a inativação das espécies de *Candida*. Para isso, 29 indivíduos com e sem lesões orais de candidose foram avaliados. As células fúngicas foram coletadas do dorso da língua de cada paciente saudável. Para os pacientes com lesões de candidose, o material foi coletado direto das lesões. Todos os tubos contendo as

amostras retiradas da língua ou direto de lesões foi incubado 37° C por 4 dias, semeados em SDA e distribuídos em diferentes placas. As leveduras foram identificadas pelo método de formação de tubos germinativos, estudo de micromorfologia, assimilação de níveis de carbono e nitrogênio, fermentação, hidrólise de uréia e redução de trifeniltetrazolio. Cada inóculo foi obtido previamente ao processo de identificação em culturas de SDA. Em seguida, determinou-se a MIC do produto Kolorex na inativação das cepas isoladas. A atividade antifúngica desse composto foi determinada pela técnica de diluição em meio sólido. Diluições seriadas do produto foram preparadas em água destilada estéril em duplicata e semeadas em placas de petri. As placas foram incubadas à 37° C por 24 horas e os resultados foram observados pela possível ocorrência do crescimento de micro-organismos, na diluição correspondente. De acordo com os resultados, espécies do gênero *Candida* foram observadas na saliva de 45,4% dos indivíduos saudáveis avaliados e em 88,2% dos indivíduos com lesões orais. Para o grupo com candidose oral, a proporção de aparecimento das espécies de *Candida* coletadas da língua e diretamente das lesões foi respectivamente: 5,8% e 11,7% de *C. tropicalis*, 5,8 e 5,8% para *C. glabrata*, e 0 e 5,8% para *C. parapsolis*, além disso a espécie *C. albicans* foi a única encontrada em 64,7% e 70,5% respectivamente. Os valores médios de UFC/mL obtidos foram equivalentes a $158,3 \times 10^3$ para o grupo com candidose, e $64,6 \times 10^3$ para o grupo com indivíduos saudáveis. Aproximadamente 95,7% das cepas testadas foram sensíveis ao Kolorex, apresentando MIC de 1:20. Os autores concluíram que o composto testado pode ser utilizado para prevenção e tratamento de candidose oral.

A efetividade do tratamento de pacientes com estomatite protética por meio da irradiação por microondas de suas próteses totais superiores, foi avaliada por Neppelenbroek et al.³⁷ em 2008. Para tanto apenas pacientes que não apresentavam nenhuma história médica de diabetes, anemia, terapia com imunossupressores ou radio e/ou

quimioterapia, foram incluídos. Pacientes que receberam terapia medicamentosa com antibióticos e antifúngicos em até 3 meses antes do início do experimento foram excluídos. Um total de 384 pacientes com idade entre 35 e 80 anos foram examinados. Apenas os que apresentavam evidências clínicas de estomatite protética foram selecionados. Um total de 60 pacientes foram escolhidos para a pesquisa, os quais foram divididos em 4 grupos com 15 pacientes em cada. O grupo controle era constituído de pacientes que apenas eram avaliados e orientados em relação a higienização de suas próteses; grupo Mw, constituído de pacientes que tiveram suas próteses totais superiores submetidas a irradiação por microondas (650 W durante 6 minutos) 3 vezes por semana durante 30 dias; grupo MwMz, pacientes que receberam o tratamento do grupo Mw juntamente com a aplicação tópica de miconazol 3 vezes por semana por 30 dias; e o grupo Mz, no qual os pacientes receberam a mesma terapia antifúngica do grupo MwMz. Análise citológica e culturas micológicas foram realizadas tanto das próteses quanto do palato de todos os pacientes antes do tratamento, no dia 15 e 30 durante o tratamento, e nos dias 60 e 90 após o tratamento. De acordo com os autores, as análises microbiológica e clínica do grupo controle demonstraram uma diminuição não significativa da infecção de *Candida* durante todo o acompanhamento. As análises citológicas e micológicas do palato e das próteses dos grupos Mw e MwMz mostraram ausência de *Candida* nos dias 15 e 30 durante o tratamento. O grupo que recebeu apenas tratamento com miconazol, Mz, demonstrou redução significativa de inflamação no palato. Os autores concluíram que a irradiação por microondas foi efetiva no tratamento de estomatite protética, e que a recorrência de *Candida* foi significativamente reduzida.

A análise da arquitetura, viabilidade e crescimento de biofilmes de *Candida albicans* e *Candida glabrata* foi realizada por Seneviratne et al.⁴⁵ em 2009. Os autores consideram que as espécies de *Candida* são as responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em

humanos. Entretanto, o entendimento do processo de desenvolvimento do biofilme destes fungos é um importante pré-requisito para o descobrimento de novas estratégias para prevenir ou erradicar estas infecções. Dessa maneira, realizou-se uma enumeração das unidades formadoras de colônia, avaliação de XTT, microscopia eletrônica e microscopia confocal. Esta última acoplada ao software COMSTAT, permitiu avaliar o crescimento, arquitetura e viabilidade dos biofilmes referentes a cepas ATCC e isolados clínicos de *C. albicans* e *C. glabrata*. As espécies de *Candida* foram plaqueadas em SDA e incubadas a 37° C por 18 horas e então inoculadas em YNB. A suspensão celular utilizada para o desenvolvimento dos biofilmes, foram colocadas em placas de wells de 96 orifícios. Após o período de adesão (1,5 horas) cada orifício foi lavado com 100µL de PBS para a remoção das células não aderentes. A seguir, 200 µL de YNB foram colocado nos orifícios e incubados a 37° C por 72 horas. As análises realizadas para caracterização das espécies revelaram diferenças substanciais inter e intra-espécies na organização da arquitetura do biofilme de *Candida* e na viabilidade celular, enquanto que a maturidade desse biofilme ocorreu após um período de 48 horas. Houve diferenças de metodologia para o crescimento dos biofilmes, porém os resultados foram semelhantes não mostrando diferenças significativas. As análises realizadas pelo software COMSTAT mostraram estar de acordo com a microscopia eletrônica e com a confocal. Os autores concluíram que o presente estudo promoveu uma descrição detalhada do crescimento, arquitetura e viabilidade celular do biofilme para as duas espécies e que o software utilizado é promissor para o estudo da arquitetura tridimensional dos biofilmes de *Candida*, complementando as análises convencionais.

2.2 PDT in vitro

Bertoloni et al.⁶ em 1989, avaliaram a influência de diversos parâmetros na foto-inativação de *C. albicans* sensibilizadas por um derivado de hematoporfirina. O micro-organismo foi cultivado aerobicamente a 37°C em meios de Sabouraud Broth e Brain Heart Infusion, os quais foram modificados ou não, a fim de se verificar a influência da composição do meio na fotoinativação celular. Após a obtenção de suspensões celulares em solução salina, as amostras foram incubadas no escuro com porfirina nas concentrações de 0,1 a 1000 mg/L por 6 ou 30 minutos. Para irradiação, foram utilizadas quatro lâmpadas de tungstênio de 250 W, numa fluência de 6 mW/cm², e a suspensão celular foi mantida em diversas temperaturas, que variaram entre 2 e 42°C. Em seguida, as amostras foram analisadas em microscopia de luz e eletrônica. A ligação entre a porfirina e a célula foi estimada, e também foram avaliadas as atividades enzimáticas de ATPase e citocromo-c-oxidase, as quais indicam as propriedades funcionais da membrana citoplasmática e da mitocôndria celular, respectivamente. Foi observado que a redução da viabilidade celular foi dependente do tempo de iluminação, e que apenas concentrações acima de 1 mg/L de porfirina foram efetivas para foto-inativação celular. Uma redução significativa da atividade da enzima citocromo-c-oxidase foi verificada após 5 minutos de irradiação, enquanto que a atividade da ATPase apresentou redução após 1 minuto de irradiação e não foi afetada por tempos mais prolongados. Também foi verificado que, quando temperaturas maiores de irradiação foram utilizadas, a inativação celular foi maior e a fluorescência das células foi menor, indicando mobilidade da porfirina ligada à célula. A sobrevivência das amostras cultivadas em Sabouraud foi maior do que a sobrevivência das amostras cultivadas em Brain Heart Infusion. Adicionalmente, a modificação dos meios não alterou a capacidade das células em se ligar à porfirina. A adição de glicose e a ausência de sais e

fosfato aumentaram a sobrevivência do micro-organismo no meio de cultivo, enquanto que a variação de pH não alterou a viabilidade celular. Quando suspensões sensibilizadas pela porfirina foram lavadas três vezes, foram necessários maiores tempos de irradiação para diminuir a viabilidade do micro-organismos, que apresentou maior permeabilidade celular. A microscopia eletrônica demonstrou que as amostras irradiadas por 10 minutos apresentaram células com alterações morfológicas, e que as células irradiadas por tempos maiores apresentaram rompimento da membrana citoplasmática e organelas. Também foi verificado que, quando tempos de 10 e 30 minutos foram utilizados para irradiação das amostras, a fluorescência do DNA diminuiu, indicando dano à membrana nuclear. Os autores concluíram que a fotossensibilização de *C. albicans* pela porfirina causa um dano inicial na membrana citoplasmática, o qual permite a penetração das moléculas do fotossensibilizador para dentro do citoplasma, danificando componentes vitais para célula.

Os pesquisadores Dobson, Wilson²⁰ em 1992, estudaram a ação do laser He-Ne (7.3 mW/632.8 nm/1.3 mm) associado a vários FSs sobre biofilmes de *Streptococcus Sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Os biofilmes foram cultivados em placas de Petri contendo meios de cultura específicos, e várias substâncias corantes foram adicionadas a esses biofilmes, com o intuito de avaliar a capacidade fotossensibilizadora de cada uma delas, seguido da iluminação com a luz de laser. A análise dos resultados foi realizada por meio do aparecimento de zonas de inibição de crescimento. Para o micro-organismos *S. Sanguis* foram utilizados os FSs violeta cristal, azul de metileno, azul de orto-toluidina e azul metálico, todos nas concentrações de 0,01% e 0,1%, enquanto para o fotossensibilizante ftalocianina, a concentração utilizada foi de 0,005%. Todos os biofilmes foram irradiados durante 10 ou 60 segundos com a luz do laser de He-Ne. Outro tipo de experimento foi realizado para os quatro micro-organismos utilizando a concentração de 0.005% dos seguintes

fotossensibilizantes: azul de toluidina, hematoporfirina HCl, azul de metileno, ftalocianina e hematoporfirina éster, porém durante 10 ou 30 segundos de exposição à luz do laser de He-Ne. Pela análise dos resultados foi verificada a redução no número de micro-organismos para as quatro espécies após a utilização de azul de orto-toluidina e azul de metileno, ambos na concentração de 0,005% submetidos à irradiação durante 30 segundos (16,5 J/cm²). Os demais FSs foram efetivos apenas para alguns micro-organismos. Devido a estes resultados, os autores sugerem que uma foto-inativação pode ser efetiva para a eliminação de bactérias periodontopatogênicas da placa dental.

A susceptibilidade de bactérias cariogênicas à PDT foi verificada por Burns et al.¹⁰, em 1993. Para isso, foram realizados dois experimentos distintos, nos quais um aparelho de laser hélio-neônio (He-Ne) foi associado ao FS azul de toluidina. Inicialmente, as bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus* foram individualmente inoculadas em caldo Tryptic Soy e incubadas por 16 horas a 37°C. Em seguida, o FS foi adicionado a estas suspensões celulares, obtendo-se as concentrações finais de 100, 50 e 25 mg/L. Após o período de incubação de 15 minutos, uma alíquota de 1 mL da cada suspensão celular foi transferida para placas de Petri contendo o meio de cultura Tryptic Soy Agar, e diferentes áreas de cada placa foram expostas a luz do laser durante os tempos de 15 a 300 segundos. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C para a análise de zonas de inibição de crescimento microbiológico. O segundo teste foi realizado por meio da transferência de 100 µL de cada suspensão celular de micro-organismos para orifícios de uma placa de microtitulação, juntamente com o mesmo volume do FS em várias concentrações, e em seguida a placa foi exposta ao laser. O controle constituiu-se de amostras adicionais que não foram expostas ao laser, amostras que receberam apenas meio de cultura e foram expostas a luz, e amostras que não receberam nem FS nem luz. Os resultados obtidos

nos dois experimentos demonstraram que a inativação dos micro-organismos ocorreu de forma dose-concentração dependente. No primeiro, foram observadas zonas de inibição nas placas de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *A. viscosus* após 15 segundos de exposição ao laser e o *L. casei* após 45 segundos, quando o azul de toluidina foi utilizado a 100 mg/L. A utilização de concentrações menores do FS necessitou de maiores tempos de iluminação para que fosse conseguida a inativação das quatro bactérias testadas. Da mesma forma, os resultados do segundo experimento demonstraram significativa redução nos valores de ufc/mL de todos os micro-organismos testados após a exposição por 60 segundos ao laser ($33,6 \text{ J/cm}^2$), quando o FS foi utilizado na concentração de 50mg/L. Entretanto, esta concentração do agente mostrou-se tóxica às células microbianas do *S. mutans* e *S. sobrinus*, na ausência de luz. A exposição ao laser sem a presença do FS não afetou significativamente a viabilidade de das bactérias testadas. Com os resultados obtidos, os autores concluíram que a PDT pode ser empregada na odontologia, para a descontaminação de dentina cariada previamente a restauração.

Wilson, Mia⁵⁸ em 1993, avaliaram a inativação de *Candida* spp. após aplicação da PDT. Foram utilizados os FSs ftalocianina dissulfonato de alumínio (FDA) e azul de metileno (MB) associados ao laser de arseneto de gálio e alumínio (Ga-As, 660 nm), cuja potência é de 11mW. Também, foram testados os FSs violeta cristal, azul de toluidina (TB), dihematoporfirina-éster (HpDE) e tionina em associação ao laser de hélio e neônio (He-Ne, 632,8 nm), de potência de 7,3 mW. Inicialmente o micro-organismos avaliado foi uma cepa padrão de *C. albicans*. Alíquotas de 50 µL da suspensão diluída 1:100 foram transferidas para uma placa de 96 orifícios. Uma alíquota de mesmo volume de um dos FSs foi então adicionada a cada orifício, obtendo-se concentrações finais de 100, 500, ou 1000 mg/L. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, os orifícios em duplicatas foram expostos à luz de laser durante 120 segundos. Amostras adicionais somente receberam o FS ou foram

expostas à luz. Para todas as amostras, 50 µL das diluições seriadas foram plaqueadas em duplicatas em Agar Sabouraud Dextrose. Após 3 dias a 37°C, as colônias foram contadas. Após esta etapa inicial, o FSS mais efetivo foi então selecionado na concentração de 100 mg/L para avaliar a inativação de suspensões mais densas (1:10) de cepas de *C. albicans*, *C. steallatoidea*, *C. tropicalis* e *C. Krusei*. Os dados foram analisados pelo teste-t de Student. Foi verificada que a exposição ao He-Ne reduziu os valores de ufc/mL das amostras sensibilizadas por TB, tionina e violeta cristal a 100 e 500 mg/L, sendo que a maior redução foi obtida com o TB a 100 mg/L. A irradiação com o laser Ga-As promoveu redução significativa dos valores de ufc/mL das amostras sensibilizadas por MB e FDA a 100 e 1000 mg/L. A PDT não foi efetiva na inativação de *C. albicans* quando o HpDE foi utilizado. Os agentes TB, MB e FDA se mostraram tóxicos às células de *C. albicans*, na ausência de luz. Além disso, o TB a 100 mg/L associado ao laser He-Ne também foi efetivo na inativação das demais espécies de *Candida*, no entanto, essas se mostraram menos susceptíveis à terapia em relação a *C. albicans*. Os autores concluíram que a PDT foi efetiva na inativação de *Candida* spp. quando uma fonte de luz de laser de baixa potência foi associada a vários FSS.

Com base em dados científicos publicados na literatura, Wainwright⁵⁵ em 1998, apresentou os fotossensibilizadores disponíveis para a realização da PDT antimicrobiana. De acordo com o autor, a grande utilização das porfirinas é decorrente do seu emprego no tratamento fotodinâmico de câncer. Os derivados de hematoporfirina são uma combinação de fotossensibilizadores oligoméricos derivados do sangue, e foram os primeiros agentes a receberem aprovação do FDA (Food and Drug Administration) para aplicação clínica da PDT. As porfirinas aniônicas são efetivas para a foto-inativação de bactérias Gram-positivas. Entretanto, as bactérias Gram-negativas, por apresentarem uma parede celular mais complexa, somente são sensibilizadas quando a

porfirina aniônica é utilizada em associação a um derivado nonapeptídeo de colistina, que promove abertura de canais na membrana bacteriana. As porfirinas também têm se mostradas efetivas para inativação de vírus *in vitro*, causando aparentemente um dano ao envelope viral. Segundo o autor, as pesquisas realizadas até o momento ainda não indicam a PDT como uma forma de tratamento em substituição as drogas antimicrobianas, mas sim como uma forma de se aprimorar o tratamento de infecções locais devido ao menor custo e um menor tempo de tratamento que pode ser obtido.

O objetivo do estudo de Jackson et al.²⁴ em 1999, foi avaliar se suspensões de *C. albicans*, em forma de leveduras e hifas, poderiam ser fotoinativadas. A PDT foi realizada por meio da utilização do azul de toluidina em associação com um laser de hélio-neônio (632,8 nm). Três variáveis foram avaliadas: a concentração do FS (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L), a dose de luz (4,2; 10,5; 21 e 42 J) e o tempo de pré-irradiação. Além disso, duas cepas de *C. albicans* com resistência a fluconazol foram submetidas à incubação durante 5 minutos com 25 mg/L de azul de toluidina, e em seguida foram iluminadas com 21 J de luz. A sobrevivência do fungo foi determinada pelo método da contagem de ufc/mL. Os resultados demonstraram que as duas formas de *C. albicans* foram efetivamente inativadas, no entanto, as hifas necessitaram de 12,5 mg/L de FS para que a redução da viabilidade ocorresse, enquanto que, para as leveduras, foi necessária a utilização de 25 mg/L. Segundo os autores, a maior susceptibilidade da forma de hifas foi em consequência das alterações celulares ocorridas durante a conversão da forma de leveduras para as hifas. A quantidade de redução obtida, para as duas formas, foi dependente da dose de luz aplicada, sendo que a aplicação de 42 J promoveu as maiores taxas de inativação. A aplicação de diferentes tempos de pré-irradiação não afetou a efetividade da PDT para a forma de hifa, mas para a forma de levedura, o período ideal de incubação foi de 5 minutos. Como a conversão da forma de levedura para a forma de hifa

é responsável pelo desenvolvimento de infecções por *C. albicans*, os autores sugeriram que a eliminação das hifas por meio da PDT pode ser uma possível modalidade de tratamento para a candidose. Além disso, as duas cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol avaliadas foram inativadas pela PDT, no entanto, a redução obtida foi menor em relação aos resultados dos experimentos anteriores.

Bonnett, Martínez⁸ em 2001, fizeram uma revisão de literatura sobre fotodegradação dos fotossensibilizadores de primeira e segunda geração utilizados em PDT. Há muitos estudos sobre fotodegradação dos FSs utilizados em PDT, particularmente estudos que medem a perda de absorbância ou a perda de fluorescência. A fotodegradação tem sido observada ocorrer nos FSs, em algumas situações nas quais altas doses de luz são aplicadas, os tecidos são destituídos de oxigênio, e a desfragmentação da luz liberada pode trazer algumas desvantagens. De acordo com os autores, a maioria dos processos de fotodegradação são oxidativos e há evidências de que envolva a produção de oxigênio singlete. Parece que FSs com moléculas aromáticas grandes, tendem a formar agregados sob determinadas condições. A formação de agregados faz com que o FS tenha baixo rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, diminuindo assim sua efetividade na PDT. Entretanto, eles são mais resistentes à fotodegradação e menos fluorescentes. A adição de substâncias surfactantes aos FSs geralmente aumenta a fotodegradação dos mesmos, uma vez que essas substâncias promovem desagregação em meio aquoso. Embora aja vários estudos sobre fotodegradação de FSs, os autores comentam que esses estudos são relativamente complicados, e os resultados publicados freqüentemente inconsistentes.

Chandra et al.¹³ em 2001, verificaram a formação de biofilmes de *C. albicans* e de *Saccharomyces cerevisiae* sobre corpos de prova de metilmetacrilato e de silicone. Para isso, foram utilizadas cepas padrão e isoladas da cavidade bucal de pacientes, as quais foram

inoculadas nesses corpos de prova. Foram utilizadas técnicas para verificação do número de células pela redução de tetrazolium e pelo peso seco dos materiais. Além disso, foi avaliada a atividade metabólica, por meio de corantes fluorescentes e microscopia confocal a laser. Os autores também avaliaram a susceptibilidade dos micro-organismos a diferentes concentrações (0,5 a 256 mg/mL) de fluconazol, anfotericina B, nistatina e clorexidina. Os autores observaram que as leveduras aderidas são transformadas em comunidades celulares bem definidas, inseridas em uma matriz de polissacarídeos. Os biofilmes constituíram um nicho de proteção contra a terapia com antifúngicos, podendo criar uma fonte para infecções refratárias. Além disso, a observação de biofilmes por microscopia de fluorescência e confocal de varredura a laser demonstrou que os biofilmes de *C. albicans* são altamente heterogêneos, sendo compostos de elementos celulares e não celulares. Em ambos os modelos, a resistência antifúngica das células aumentou com o desenvolvimento do biofilme. O biofilme formado sobre o silicone apresentou camadas internas formadas por densos aglomerados de leveduras, das quais partiram prolongamentos miceliais (hifas) que atravessaram um revestimento externo de polissacarídeos. Com a remoção mecânica do biofilme, por meio de enxágüe ou raspagem, ainda permaneceram as células basais leveduriformes aderidas ao material de substrato. Ao contrário da *C. albicans*, *S. cerevisiae* não apresentou capacidade de formar biofilme maduro, embora também tenha aderido às superfícies protéticas. Os resultados obtidos pelos autores permitiram, segundo eles, a identificação de bases para investigações dos mecanismos moleculares da biologia de biofilmes de *C. albicans*, envolvidos na resistência antifúngica e forneceram meios para o desenvolvimento de novas terapias para infecções provocadas por biofilmes.

A fotoinativação de micro-organismos cutâneos foi objeto de estudo de Zeina et al.⁶⁰ em 2001. Suspensões celulares de

Staphylococcus aureus, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* e *C. albicans*, foram pipetadas em placas de Petri para a realização dos experimentos. A fotossensibilização das amostras foi realizada com 1 mL do corante azul de metileno, a 100 mg/L. Um projetor de slides foi utilizado como fonte de luz policromática, e a iluminação das amostras foi realizada sob intensidades de luz que variaram de 1,6 a 42 mW/cm², dependendo da distância entre o aparelho de luz e a amostra iluminada. A aplicação da luz foi realizada durante períodos de 10 a 60 minutos, sendo que a cada 10 minutos transcorridos, uma alíquota de 1 mL foi removida da placa de Petri, diluída e plaqueada em meio de cultura específico. A análise de regressão foi utilizada para o cálculo da quantidade de redução de todas as espécies testadas. Além disso, foram obtidos “valores-D”, correspondentes ao tempo mínimo de exposição necessário para promover uma redução na contagem de colônias viáveis. Foi demonstrado que os valores-D obtidos para cada micro-organismos foram distintos, sendo que a *C. albicans* mostrou o maior valor em comparação com as bactérias (a iluminação por 660 segundos reduziu apenas 0,09 log ufc/mL). Tal fato foi atribuído ao maior tamanho/volume da célula da *C. albicans*, que é cerca de 25-50 vezes maior do que as células das bactérias testadas. Além disso, a presença da membrana nuclear nos seres eucariontes, como os fungos, pode representar uma barreira adicional a penetração do FS, tornando a *C. albicans* mais resistente a PDT em relação às bactérias.

O objetivo do estudo de Strakhovskaya et al.⁴⁸ em 2002, foi avaliar a eficiência do fotossensibilizador photodithazine (PDZ), uma substância derivada de clorina, e estudar o seu efeito na inativação de *Candida guilliermondii* por meio de luz visível. Para tanto uma suspensão celular de *C. guilliermondii* foi obtida em uma concentração de 2×10^7 Ufc/ml e mantida no interior de uma cubeta de aproximadamente 1 cm de diâmetro sob temperatura controlada (22°C) e irradiada com luz visível de

comprimento de onda em torno de 380 nm. A suspensão foi mantida a uma distância de 15 cm da lâmpada. Imediatamente após a iluminação, alíquotas da suspensão foram transferidas para um eletrodo de oxigênio Clark-type o qual esteve sob temperatura controlada (22°C) para que os níveis de consumo de oxigênio fossem medidos. A mesma suspensão foi utilizada para o preparo de diluições seriadas para contagem de células viáveis. De acordo com os autores os resultados mostraram que apenas 37% de *C. guilliermondii* sobreviveu na presença de 2µM de clorina e₆, e que a eficiência de fotossensibilização com a mesma concentração para a PDZ foi 25% maior do que em relação a clorina e₆ (pura). Isso pode estar relacionado a melhor solubilidade de PDZ em água e conseqüentemente ao menor grau de agregação de moléculas de PDZ em solução aquosa. Quando a concentração de PDZ aumentou para 20µM a eficiência da fotossensibilização aumentou mais de 25 vezes. Os autores concluíram então, a substância PDZ é um fotossensibilizador promissor com atividade antifúngica elevada.

Soukos et al.⁴⁶ em 2003, avaliou a fotodestruição de placa bacteriana dental humana em modelo de biofilme oral associado a ondas fotomecânicas. Os autores relatam que a doença periodontal é resultante do acúmulo de biofilme bacteriano subgingival sobre as superfícies dentárias. Há uma reduzida susceptibilidade desses biofilmes aos antimicrobianos por razões que ainda não estão elucidadas. Dessa maneira investigou-se o efeito fotodinâmico de um conjugado entre o fotossensibilizador (Fs) clorina e₆ (ce₆) e uma poly-L-lysine (pL) com 5 resíduos de lisina na placa bacteriana dental humana como é conhecido no biofilme oral das espécies de *Actinomyces naeslundii* após exposição a ondas fotomecânicas geradas por um laser (662 nm) na presença do conjugado. Amostras de placa subgingival de 12 pacientes com periodontite crônica foram obtidas e colocadas em um eppendorf com 5mL de solução Ringer pré-reduzida anaerobicamente e esterilizada. As suspensões foram incubadas no escuro em temperatura ambiente por 5

minutos com 5 μM do conjugado pL-ce₆. Em seguida foram centrifugadas e lavadas uma vez em PBS estéril. A partir disso as amostras foram divididas em 3 grupos: grupo 1 apenas com suspensão celular; grupo 2 adicionou-se 1ml de PBS a suspensão celular e para o grupo 3 adicionou-se 80% de PBS e 20% de EDTA a suspensão. Cada grupo era constituído de 4 amostras. Para a realização da PDT as amostras foram colocadas em placas de Wells de 24 orifícios e então as mesmas foram expostas à luz vermelha (15 J/cm²). Adicionalmente, biofilmes de *A. naeslundii*, formados em esmalte bovino, também foram expostos as ondas fotomecânicas por 15 minutos com 5 μM do conjugado pL-ce₆. A profundidade de penetração do conjugado foi medida por meio de um microscópio confocal. Em ambos os casos, após a iluminação diluições seriadas foram preparadas e alíquotas de 100 μL foram removidas colocadas em placas com Agar sangue. Frações de sobrevivência foram calculadas pela contagem de colônias bacterianas. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, o grupo submetido a PDT demonstrou 90% de morte celular de placa bacteriana dental humana. Os autores concluíram que as ondas fotomecânicas juntamente com a PDT podem ser uma arma com grande potencial para fotodestruição de placa dental no tratamento de doença periodontal destrutiva crônica.

Bliss et al.⁷ em 2004, avaliaram a susceptibilidade de cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* a PDT mediada pelo Photofrin[®]. Neste estudo, suspensões celulares das três espécies avaliadas foram transferidas para cavidades de uma placa de 96 orifícios, incubadas por 30 minutos com o FS, em concentrações variando de 0,01 a 10 mg/L, e iluminadas com uma lâmpada de arco (mercúrio) durante 10 minutos a 15 mW/cm² (9 J/cm²). A sobrevivência dos micro-organismos foi verificada por meio do teste de viabilidade celular (XTT). Adicionalmente, foram realizadas análises em microscopia de fluorescência e confocal, para a verificação da captação do FS pelas células fúngicas. O controle foi constituído de suspensões de *Candida* spp. associadas tanto a solução

salina como ao Photofrin[®] (suspensões não iluminadas). Os experimentos foram realizados em triplicatas e as comparações da efetividade da PDT em relação as diferentes espécies avaliadas foram feitas com Análise de Variância. Os autores demonstraram que, a *C. albicans* foi a espécie mais susceptível a PDT, seguida da *C. krusei* e *C. glabrata*. Após a irradiação, foram obtidas altas porcentagens de redução da viabilidade celular, mais de 50%, com a utilização de apenas 1 mg/L do Photofrin[®] para a *C. albicans* e *C. krusei*, sendo que o FS a 10 mg/L reduziu em cerca de 80 % a viabilidade dessas duas espécies. Para a *C. glabrata*, no entanto, a utilização de 10 mg/L do Photofrin[®] promoveu baixas porcentagens de redução, cerca de 30%. As imagens obtidas nas análises microscópicas demonstraram fluorescência quando o FS foi efetivamente captado para o interior da célula fúngica. A fluorescência foi detectada na presença de 10 mg/L de Photofrin[®] em todas as espécies, porém, para a *C. glabrata*, a quantidade de fluorescência foi mínima. Os autores concluíram que a captação do FS para o interior da célula está diretamente relacionada com a efetividade da PDT, e que a *C. glabrata* apresenta uma menor susceptibilidade à inativação fotodinâmica, em comparação com as outras espécies avaliadas.

Chabrier-Roselló et al.¹² em 2005, avaliaram parâmetros da ação fotodinâmica mediada pelo Photofrin[®] em *C. albicans*. O cultivo de *C. albicans* foi realizado em tubo germinativo e em biofilmes de 24 horas. As amostras foram incubadas com Photofrin[®] 10 mg/L por 1 e 5 minutos e, em seguida, irradiadas com uma lâmpada de mercúrio de 400 a 700 nm, numa fluência de 15 mW/cm² (0,9 J/cm² por minuto de irradiação). Amostras deixadas no escuro (não irradiadas) foram utilizadas como controle. A atividade metabólica do micro-organismos foi avaliada pelo teste XTT. Tubos germinativos de *C. albicans* foram observados em microscopia de fluorescência a fim de se avaliar a captação do Photofrin[®] pela célula. Para avaliar a resposta adaptativa do micro-organismos a injúria oxidativa, tubos germinativos foram submetidos repetidamente a

tratamentos com H₂O₂ (primeiramente numa concentração subletal de 1 mM e posteriormente em concentrações tóxicas variadas entre 50 e 100 mM), PDT (Photofrin numa concentração subtóxica de 0,5 mg/L associada à irradiação de 9 J/cm², seguida por novas irradiações com concentrações do fotossensibilizador entre 1 e 10 mg/L) ou associação de ambos os tratamentos. Adicionalmente, amostras de biofilmes submetidas à PDT (10 mg/L de Photofrin, seguida por 30 minutos de incubação e irradiação de 18 J/cm²) foram comparadas com amostras tratadas com anfotericina B 10 mg/L. Todos os procedimentos foram realizados em duplicatas e repetidos três vezes. A análise estatística foi realizada com o teste t de Student. Os resultados obtidos com as amostras de tubo germinativo demonstraram que a PDT utilizando ambos os tempos de incubação de 1 e 5 minutos com o FS promoveu a completa eliminação da atividade metabólica do micro-organismo. A microscopia de fluorescência revelou captura uniforme de Photofrin[®] pelos organismos após 5 minutos. Foi verificada resistência na resposta adaptativa do micro-organismos tratado repetidamente com H₂O₂. No entanto, não houve resistência quando amostras foram submetidas repetidamente à PDT ou quando essa foi associada ao tratamento com H₂O₂. Com relação às amostras em biofilme, a irradiação das amostras sensibilizadas pelo Photofrin[®] resultou em redução significativa da atividade metabólica de *C. albicans*. Além disso, a diminuição da atividade metabólica do micro-organismos submetido à fototerapia foi significativa em relação às amostras tratadas com anfotericina B. Os autores concluíram que a PDT é uma alternativa segura como modalidade terapêutica para a inativação microbiana, pois o desenvolvimento de resistência aos efeitos fotodinâmicos é improvável.

Demidova, Hamblin¹⁶, em 2005, compararam a efetividade da PDT na inativação de suspensões das bactérias *Escherichia coli* (gram-negativo) e *S. aureus* (gram-positivo), e do fungo *C. albicans*, em concentrações celulares de 10⁹-10⁷, 10⁹-10⁷ e 10⁸-10⁶ respectivamente. A

foto-inativação foi testada com a utilização dos FSs rose bengal, azul de toluidina e conjugado de poli-lisina, em várias concentrações, associados a uma fonte de luz não coerente, composta de pacotes de fibras intercambiáveis. Inicialmente, as suspensões celulares dos três micro-organismos foram obtidas por meio do crescimento *overnight* a 37°C, em meios de cultura específicos, seguido da centrifugação e ressuspensão das células em solução tamponada. As suspensões celulares, foram incubadas em ambiente escuro com os FSs em diferentes concentrações durante 20 minutos, e em seguida, alíquotas de 200µL foram transferidas para uma placa de 96 orifícios, e a iluminação realizada com doses de luz que variaram de 0 a 200 J/cm². As amostras foram iluminadas com e sem a remoção do excesso do agente. Foram obtidas diluições seriadas de cada amostra, seguidas do plaqueamento, incubação *overnight* a 37°C, e obtenção do número de ufc/mL. Além disso, após a incubação, alíquotas adicionais foram utilizadas com o objetivo de verificar se os FSs testados permanecem somente ligados a membrana celular dos micro-organismos ou se a captação para o interior da célula ocorreu. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste t Student. Os resultados demonstraram que a concentração celular das suspensões de micro-organismos afetou a efetividade de todos os FSs testados, ou seja, quanto maior a concentração celular presente na suspensão, uma maior concentração de FS foi requerida. O Conjugado de poli-lisina foi o FS mais efetivo para promover a fotossensibilização das bactérias e do fungo. A susceptibilidade dos três micro-organismos variou em decorrência do micro-organismos avaliado, sendo que a *C. albicans* mostrou-se mais resistente a PDT em comparação com as bactérias. Os autores concluíram que, por possuir um tamanho 10 a 50 vezes maior que a célula bacteriana, a célula fúngica necessita de uma maior quantidade de oxigênio singlete para que sua inativação ocorra. Além disso, a *C. albicans* é um ser eucarionte e a presença da membrana nuclear poderia atuar como uma barreira adicional para a penetração do FS.

Lambrechts et al.³⁰ em 2005, realizaram um estudo para a avaliação dos mecanismos de inativação celular da PDT mediada por uma porfirina catiônica. Foram obtidas suspensões celulares de *C. albicans* nas concentrações de 10^6 e 10^7 células/mL. Em seguida, essas suspensões foram incubadas com a porfirina catiônica TriP [4], na concentração de 25 μ M, durante 1, 15 ou 30 minutos. Alíquotas de 1 mL das suspensões foram transferidas para um placa de orifícios e iluminadas com uma lâmpada halógena de intensidade de 30 mW/cm². Suspensões incubadas durante 30 minutos também foram lavadas duas vezes e em seguida iluminadas, para que fosse possível a distinção entre o efeito da porfirina em solução, do efeito causado pela porfirina que ficou ligada às células. A sobrevivência do fungo foi verificada pelo método da contagem de colônias viáveis, e foi expressa como uma porcentagem relativa ao observado em suspensões controles. Os resultados demonstraram que a sobrevivência do fungo foi reduzida gradativamente com o aumento da dose de luz. A aplicação de 12,6 J/cm² promoveu a completa eliminação do micro-organismos. As análises realizadas para a avaliação do mecanismo de ação da porfirina catiônica foram: análise do espectro de absorção do FS, microscopia de fluorescência, microscopia confocal e técnica de fratura por congelamento associada à microscopia eletrônica. Essas análises demonstraram que, após a incubação das suspensões com o FS, esse foi capaz de se ligar a parede celular da *C. albicans*, previamente a exposição luminosa. Durante a iluminação, ocorreram danos na membrana celular, que se tornou mais permeável a entrada do FS. Após o influxo do FS para o interior da célula, organelas intracelulares também foram atingidas pelos processos fotodinâmicos. O aumento no tempo de incubação não alterou a quantidade de FS que entrou na célula previamente a iluminação, nem tão pouco a efetividade da PDT. Os autores concluíram que a *C. albicans* pôde ser inativada pela porfirina catiônica, e a membrana citoplasmática foi a principal organela atingida no processo de inativação celular.

O objetivo do estudo de Paulino et al.³⁹ em 2005, foi avaliar o efeito da PDT sobre cepas de *S. mutans* e fibroblastos, utilizando diferentes concentrações do FS rose bengal (0-50 µL), associando um fotopolimerizador com diferentes tempos de exposição de luz (0-40 s). Segundo os autores, o fotopolimerizador apresentava as seguintes características: 350-500 mJ/cm² de potência e 400-500 nm de comprimento de onda. Após a realização dos procedimentos relativos ao cultivo para obtenção do crescimento tanto do *S. mutans* como dos fibroblastos, foram, então, verificados os efeitos citotóxicos da PDT sobre estas células na presença e ausência de luz. Os resultados microbiológicos foram obtidos pela contagem das colônias (ufc/mL). A viabilidade celular dos fibroblastos foi avaliada em câmara de Neubauer pelo teste de exclusão *Trypan Blue*. Pelos resultados foi observado que a aplicação isolada da luz não promoveu efeitos tóxicos, mas o FS demonstrou toxicidade para as células testadas em concentrações acima de 2,5 µM. Sob a exposição de luz e concentrações do fotossensibilizante acima de 0,5 µM houve completa eliminação de *S. mutans*, e essa mesma condição experimental não ocasionou qualquer efeito citotóxico sobre os fibroblastos. Dessa forma, os autores afirmaram que a foto-ativação do FS Rose bengal pelo uso de HHP inativou a bactéria selecionada para este estudo sem afetar a viabilidade de fibroblastos.

O estudo de Zanin et al.⁵⁹ em 2005, teve por objetivo avaliar o efeito da associação do azul de orto-toluidina – TBO (100 mg/L) a uma luz LED vermelha (620-660 nm) ou a um laser de He-Ne (632,8 nm) sobre biofilmes de *S. mutans* crescidos em um fermentador de espessura e fluxo contínuos (CFFF). A utilização do CFFF possibilitou a simulação da formação da película adquirida e o crescimento dos biofilmes, a partir de culturas simples de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita (HA), em local constantemente banhado por saliva artificial. Os biofilmes foram crescidos sob suplementação de 2% de sacarose. Na aplicação da PDT, os discos de HA contendo os biofilmes foram removidos do CFFF após 3,

7 e 10 dias, e 25 µL de TBO foi adicionado em cada biofilme e deixado no escuro durante 5 min. Após este período, os biofilmes foram expostos por 5, 15 e 30 minutos ao laser He-Ne ou à luz do LED, sendo a mesma potência de 32 mW utilizada por ambos aparelhos, e a dose de energia para os diferentes tempos de irradiação correspondeu a 49, 147 e 294 J/cm², respectivamente. Os resultados deste estudo demonstraram redução significativa nas contagens das bactérias presentes em biofilmes de *S. mutans* após a realização da PDT. Não foram observadas diferenças significativas no efeito antimicrobiano promovido quando o laser de He-Ne ou a luz LED foram utilizados. Em ambos os casos, o FS utilizado foi o TBO na concentração de 100 mg/L, e, tanto a sensibilização dos biofilmes na ausência da luz, como a irradiação dos biofilmes na ausência do corante, não demonstraram efeito antimicrobiano sobre os biofilmes testados. Além disso, a microscopia confocal demonstrou que a inativação das bactérias promovida pela PDT ocorreu predominantemente nas camadas externas dos biofilmes e que os biofilmes mais velhos foram menos susceptíveis à essa terapia. Outro ponto importante a se ressaltar é que a luz LED vermelha apresentou efeito antimicrobiano semelhante ao obtido pelo laser de He-Ne. Assim, considerando o surgimento crescente de bactérias resistentes aos antibióticos, a PDT surge como uma terapia antimicrobiana alternativa para o tratamento e/ou prevenção de doenças como cárie dental.

Jori et al.²⁷ publicaram em 2006, uma revisão de literatura baseada nos princípios de ação e aplicações da PDT na inativação microbiológica. Segundo os autores, apesar da PDT ser atualmente empregada no tratamento de neoplasias, o primeiro relato da utilização desta terapia foi na área microbiológica, em 1900. No entanto, o potencial da PDT no tratamento de infecções ficou por muitos anos, inexplorado. Atualmente, com a emergência de doenças infecciosas resistentes aos tratamentos convencionais, muitos estudos têm buscado o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para a inativação de micro-

organismos patogênicos. A PDT parece oferecer muitas vantagens para o tratamento de infecções originadas por micro-organismos, tais como um amplo espectro de ação, a inativação de micro-organismos resistentes e o baixo potencial mutagênico nas células expostas. A PDT tem se mostrado capaz de promover atividades citotóxicas contra uma grande variedade de bactérias, fungos e protozoários. No entanto, a foto-inativação de fungos parece ser mais difícil de ser atingida, devido ao maior tamanho celular desses micro-organismos, que exige uma maior quantidade de oxigênio singlete para que a inativação celular ocorra, em comparação com bactérias. Particularmente no caso da candidose, a aplicação tópica de FS associada a luz para a inativação microbiológica parece oferecer um importante avanço para o tratamento de pacientes imunodebilitados, como os HIV positivos. A utilização de porfirinas tem se mostrado efetiva para a fotossensibilização da *C. albicans*, e promove a inativação do fungo após a iluminação com luz visível. A PDT também representa uma modalidade terapêutica potencialmente aplicável para o tratamento de doenças periodontais e cáries. No entanto, são encontrados poucos estudos in vivo que utilizam esse método terapêutico para o tratamento de infecções e assim, a aplicação clínica da PDT antimicrobiana ainda está em desenvolvimento.

O objetivo do estudo de Souza et al.⁴⁷ em 2006, foi avaliar a viabilidade de diferentes espécies de *Candida* após a fotossensibilização com azul de metileno (100mg/L), e iluminação com um laser diodo (685 nm; 28 J/cm²). Suspensões celulares de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, contendo 10⁶ células por mL, foram submetidas as seguintes condições experimentais: aplicação de FS seguida de iluminação com laser, somente aplicação de FS, somente iluminação com laser, e aplicação de nenhum tratamento (controle). Para avaliação da viabilidade celular após a PDT, os autores utilizaram o método da contagem das ufc/mL. Para isso, após a execução dos experimentos, diluições seriadas de cada amostra (10⁻² e 10⁻³), foram plaqueadas em

meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, e as placas foram incubadas por 48 horas. Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e teste de Tukey. Foi demonstrado que a iluminação com laser, na presença de Azul de metileno, reduziu o número de ufc/mL em 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dubliniensis*, 91,6% para a *C. krusei* e 82,3% para a *C. tropicalis*. Também foi observado que a utilização do FS ou da luz, isoladamente, não causaram reduções significativas no número de ufc/mL das amostras, exceto para a *C. tropicalis*. Os autores concluíram que a fotoativação do azul de metileno pela luz vermelha do laser promoveu um efeito fungicida sobre as células de todas as espécies avaliadas.

No estudo conduzido por Tegos et al.⁵¹ em 2006, os autores avaliaram o fotossensibilizador policatiônico conjugado entre os compostos polyethyleneimine (PEI) e clorina (e_6), na inativação antimicrobiana de fungos e bactérias. Os autores consideram que as estruturas moleculares policatiônicas aumentam a penetração do FS em células gram-negativas. Para a realização deste experimento preparou-se conjugados policatiônicos entre clorina (e_6) e 3 formas moleculares de PEI: PEI-ce6 lin, PEI-ce6 LMW e PEI-ce6 HMW. Os conjugados foram caracterizados por cromatografia líquida de alta pressão, e foram testados segundo sua habilidade em inativar micro-organismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (gram-positivas), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa), e *Candida albicans*, após exposição a baixos níveis de luz. Previamente ao experimento, suspensões celulares foram preparadas, lavadas, centrifugadas e ressuspensas em 3,5 mL de PBS. (10^8 células/mL para bactérias e 10^7 células/mL para *C. albicans*). Tais suspensões foram incubadas com 1 ou 10 μ M de FS no escuro por 10 minutos em temperatura ambiente. As células que foram incubadas sem FS para promover os valores de Ufc foram consideradas controles. De acordo com os resultados, a molécula PEI-ce6 HMW foi efetiva na inativação de todos

os micro-organismos avaliados, enquanto que o conjugado PEI-ce6 lin foi efetivo apenas na inativação de bactérias gram-positivas e *C. albicans*. Dessa maneira, concluiu-se que esses conjugados podem ser considerados eficientes FS, podendo ser utilizados em PDT.

A fotodegradação de três diferentes fotossensibilizadores (Fs) derivados de clorina foi avaliada por Ferreira et al.²³ em 2008. Os autores avaliaram a degradação do fotossensibilizador por meio das mudanças do espectro de fluorescência durante a iluminação. A taxa de variação de fluorescência foi normalizada para a absorção da solução e a energia do fóton resultante na determinação do número necessário de fótons a ser absorvido para induzir a degradação do fotossensibilizador. Para tanto três Fs derivados de clorina foram utilizados: Photoditazine[®], Radaclorin[®] e Foscan[®]. Os parâmetros para obtenção dos valores de deterioração das moléculas, valores de fluência dos fótons e propriedades ópticas da solução permitiu determinar a estabilidade do Fs em solução durante a iluminação. Segundo os autores os resultados demonstraram em ordem de susceptibilidade a fotodegradação que Radaclorin[®] < Photoditazine[®] < Foscan[®]. A diferença na fotodegradação para o Foscan pode ser explicada pela alta proporção de agregados em solução que inibe o processo foto-oxidativo e impede a formação do oxigênio singlete. Os autores hipotetizaram que houve uma correlação entre a fotodegradação e a eficácia fotodinâmica dos Fs que é dirigida pela formação de oxigênio singlete responsável pela maioria das reações relevantes na indução fotodinâmica de morte celular. Dessa maneira os autores concluíram que a fotodegradação assim como a eficácia fotodinâmica estão fortemente correlacionada em relação à concentração de oxigênio presente no tecido tecido.

Dovigo et al.²² em 2009, avaliaram a efetividade da PDT na inativação de suspensões celulares e biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, ATCC e resistente a fluconazol, por meio da utilização do FS Photogem[®] e da iluminação com LEDs de comprimento de onda azul (455

nm). A solução estoque de Photogem[®] foi preparada sendo dissolvida em salina estéril e mantida no escuro até o momento de sua utilização. As suspensões celulares de cada cepa de *Candida* foram tratadas com 5 concentrações de Photogem[®] e expostas a 4 tempos de iluminação (14, 24, 34 ou 50 minutos) segundo a dose de luz aplicada. Para avaliação da viabilidade celular após a PDT, os autores utilizaram o método da contagem das ufc/mL. Para isso, após a execução dos experimentos, diluições seriadas de cada amostra (10^{-2} e 10^{-3}), foram plaqueadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, e as placas foram incubadas por 48 horas. Com relação aos biofilmes, os mesmos foram cultivados sobre um filtro de membrana de celulose e tratados com 25mg/L de Photogem[®] e iluminados por 37,5 J/cm². Os autores observaram que os biofilmes tiveram sua estrutura rompida, já as suspensões planctônicas de cepas de *Candida* resistentes a fluconazol foram totalmente inativadas após a PDT. Os resultados revelaram que as cepas resistentes a fluconazol apresentaram menor susceptibilidade à PDT, em comparação com as cepas ATCC, e que os biofilmes foram mais resistentes à terapia em relação às suspensões celulares.

Em um editorial da revista Photodiagnosis and Photodynamic Therapy¹⁴, em 2009, vários autores escreveram um artigo sobre a origem e algumas propriedades dos fotossensibilizadores derivados da clorina e_6 . Dentre essas substâncias estavam Photolon, Radachlorin e Photoditazine. De acordo com o levantamento feito pelos autores, as clorinas contêm magnésio e são chamadas de “chlorophylls”, e são os pigmentos fotossensíveis presentes nos cloroplastos da maioria das plantas, algas e cianobactérias. Assim, as clorinas foram introduzidas em 1980 como fotossensibilizadores potenciais para PDT e desde então seus derivados têm sido desenvolvidos. Segundo os autores, o radachlorin e photodithazine não só aumentaram a eficácia como também diminuíram efeitos adversos quando comparados com os fotossensibilizadores de primeira geração. Sua maior eficiência foi

comprovada inativando células tumorais, absorvendo maiores comprimentos de onda (400 – 670 nm) e sendo eliminados do organismo rapidamente (por volta de 2 dias). Photodithazine é uma mistura de clorina Ce6 (60%), clorina p6, e purpurinas 7 e 18, além disso é solúvel em água, o que lhe confere boa estabilidade quando armazenada. Os autores concluíram que de maneira geral, os fotossensibilizadores acima citados possuem baixa toxicidade, alta seletividade além de alta fototoxicidade sendo muito promissor o seu uso na terapia fotodinâmica.

O efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica utilizando uma clorina e₆ pura como FS e uma luz laser foi avaliado por Park et al.⁴⁰ em 2010. Nesse estudo os autores avaliaram o efeito da PDT na inativação de *Staphilococcus aureos*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonela typhimurium*. Os autores avaliaram a viabilidade bacteriana, quantificação das unidades formadoras de colônia assim como halo de inibição das mesmas. Os resultados demonstraram que a PDT mediada por meio da clorina na foi muito efetiva na inibição do crescimento de *S. aureos* e *P. aeruginosa*, mas foi dependente da dose de luz e da concentração do FS. O número de bactérias viáveis diminuiu significativamente após a aplicação da PDT com a utilização de 10µM de FS e uma dose de luz de 20J/cm². Essa terapia também inibiu parcialmente a formação de colônias para *E. coli* e *S. typhimurium*. Esses resultados mostraram que a PDT mediada pela clorina e₆ pode ser uma alternativa promissora para o tratamento antimicrobiano.

2.3 PDT in vivo

A inativação de *C. albicans* in vivo foi avaliada no estudo conduzido por Teichert et al.⁵² em 2002. Os autores verificaram a susceptibilidade de *C. albicans* presente em línguas de camundongos, por meio da utilização do azul de metileno como FS. Setenta e cinco camundongos com severa imunodeficiência receberam inoculação

durante quatro semanas de uma cepa clínica de *C. albicans* azol-resistente. Previamente a aplicação da PDT, os animais foram anestesiados e foi realizada uma coleta, por meio de *swab*, para a determinação do número de ufc/mL presentes na língua dos animais. Em seguida, os animais foram divididos em grupos de acordo com a concentração de FS aplicado topicamente (250, 275, 300, 350, 400, 450 ou 500 µg/L). Após 10 minutos de incubação, a língua foi exposta à luz de um aparelho de laser diodo (664 nm), durante 684,5 segundos, o que correspondeu a uma dose de 275 J/cm². Ao final da iluminação, foi realizada uma nova coleta da língua e os animais foram sacrificados. Os grupos controle corresponderam a animais não inoculados que foram expostos ao laser e animais inoculados com *C. albicans* que não receberam nenhum tratamento, além de animais inoculados que receberam somente o FS ou somente luz. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os quatro grupos controle. Nos grupos experimentais, foi observada, independente da concentração de FS utilizada, uma diminuição no número de colônias viáveis por mL, após a exposição a luz do laser. Apesar disso, somente as concentrações de 450 e 500 µg/L eliminaram totalmente o micro-organismos da cavidade bucal dos animais após a ativação por luz.

Em um estudo conduzido por Maver-Biscanin et al.³³ em 2004, os autores avaliaram o efeito fungicida da irradiação por laser em pacientes com estomatite protética (EP). Para isso, foram selecionados 70 pacientes com evidências clínicas de EP que utilizavam próteses superiores. Dos 70 indivíduos, 49 eram do sexo feminino, com idade média de 65 anos. Os pacientes foram divididos de acordo com o tratamento que receberam em 4 grupos, sendo o primeiro no qual os indivíduos foram submetidos à irradiação por laser com 685nm de comprimento de onda por 10 minutos (30mW), no segundo, receberam irradiação com 830nm de comprimento de onda por 5 minutos (60mW). Para esses dois tratamentos, o aparelho de laser foi utilizado a uma

fluência de 3.0 J/cm^2 e foi efetuado durante 5 dias consecutivos. Com relação ao terceiro grupo, foi observado efeito placebo, portanto os pacientes não receberam irradiação por laser (grupo controle). Já para o quarto grupo, os indivíduos tiveram o tratamento de mucosa palatina realizado com medicação antifúngica gel oral e uso de solução antiséptica para as próteses. Todos os pacientes foram instruídos a não mudar seus hábitos de higiene oral. O efeito da luz laser no crescimento de *C. albicans* in vivo foi avaliado após o final do tratamento por meio de um esfregaço com swabs realizado na mucosa palatina e na base das próteses. Esse procedimento foi realizado para todos os grupos. Tais swabs foram então cultivados em placas de SDA as quais foram incubados a 37° C por 48 horas em condições aeróbicas. Para a contagem de colônias viáveis, utilizou-se o método semi-quantitativo proposto por Olsen no qual escores de 0 a 4 eram atribuídos dependendo do número de colônias presentes, sendo 0 quando não havia colônias, 1 quando houvesse de 1 a 9 colônias, 2 para 10 a 24 colônias, 3 quando houvesse de 25 a 100 colônias e 4 quando o número de colônias presentes fosse maior do que 100. Segundo os autores, os resultados demonstraram que o efeito fungicida foi observado nos pacientes tratados com laser e nos tratados com antifúngico, enquanto que para a maioria dos pacientes do grupo placebo, não houve regressão da infecção e nem diminuição do fungo na base das próteses. Os autores concluíram que a luz proveniente de um laser de baixa potência pode ser uma alternativa promissora para o tratamento de EP.

Em 2005, Maver-Biscanin et al.³⁴ avaliaram o efeito da terapia com laser de baixa potência no crescimento de *C. albicans* em 2 pacientes com estomatite protética (EP) – Relato de caso clínico. Segundo os autores a estomatite protética é considerada a infecção fúngica que mais acomete os pacientes usuários de próteses, e que essa condição está normalmente associada à presença de *C. albicans*. Para tanto, dois pacientes usuários de próteses superiores, ambos com

inflamação no palato diagnosticada como estomatite protética Tipo II de Newton, foram tratados com laser de baixa potência com diferentes comprimentos de onda (685 e 830nm) por 5 dias consecutivos. Para os dois pacientes, tanto a mucosa palatina quanto a base das próteses foram irradiadas a uma distância entre o aparelho de laser e a área irradiada de 0.5cm. A iluminação foi realizada em diferentes tempos, sendo 5 minutos com 830nm a uma fluência de $3.0\text{J}/\text{cm}^2$ a 60mW, e 10 minutos a 685nm a uma fluência de $3.0\text{J}/\text{cm}^2$ a 30mW. Os pacientes foram instruídos para higienização correta das próteses. O efeito do laser no crescimento fúngico in vivo foi determinado após o final do tratamento por meio da coleta com swabs. Tais swabs foram então cultivados em placas de SDA as quais foram incubados a 37°C por 48 horas em condições aeróbicas. A severidade das lesões foi determinada segundo critérios clínicos. De acordo com os resultados, após a aplicação do laser, observou-se uma redução no número de células viáveis nas placas de petri, e a inflamação no palato diminuiu. Os autores concluíram que a iluminação a laser foi efetiva para o tratamento de estomatite protética.

Um estudo que avaliou a inativação de *C.albicans* in vivo por meio da terapia fotodinâmica (PDT) foi conduzido por Junqueira et al.²⁸ em 2009. A PDT foi realizada com laser de comprimento de onda de 660 nm associado ao azul de metileno como fotossensibilizador (Fs). Setenta e dois ratos foram inoculados com *C. albicans* para induzir candidose no dorso da língua de cada animal. Para a inoculação, a suspensão de *C. albicans* estava a uma concentração de 5×10^8 unidades formadoras de colônias por ml (Ufcs/ml), e a mesma foi realizada por meio de swabs previamente embebidos na suspensão celular os quais foram esfregados em toda cavidade oral do animal. Após 7 dias os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento estabelecido: grupo 1 tratados com laser ($26\text{ J}/\text{cm}^2$) e azul de metileno (0,1 mg/ml); grupo 2 recebeu apenas luz; grupo 3 foi tratado apenas com Fs e grupo 4 (controle) não recebeu nenhum tratamento apenas solução fisiológica (NaCl a 0,85%).

Previamente ao experimento, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular e o fotossensibilizador foi aplicado topicamente sobre o dorso da língua de cada animal com swab estéril. Após 5 minutos de incubação duas áreas da língua foram irradiadas por laser (ponta e base da língua). O tempo decorrido da aplicação de luz foi de 200 segundos. Para verificar o efeito do Fs o mesmo foi aplicado da mesma forma que o grupo no qual se realizou a PDT, porém sem a iluminação. Da mesma maneira, para verificar o efeito da luz, o fotossensibilizador foi substituído por solução salina, e a iluminação também foi feita durante 200 segundos. Segundo os autores, os resultados mostraram que o grupo que recebeu a PDT exibiu menores alterações epiteliais e baixa resposta inflamatória crônica em relação ao grupo controle. Por outro lado, o grupo que recebeu apenas luz exibiu alterações epiteliais mais intensas assim como maior resposta inflamatória crônica quando comparado aos demais grupos. Dessa maneira, os autores concluíram que os ratos tratados com PDT desenvolveram lesões de candidose mais discretas do que aqueles dos demais grupos experimentais.

Em 2010 Mima et al.³⁵ avaliaram a inativação de *C. albicans* em candidose induzida em camundongos por meio da terapia fotodinâmica (PDT) utilizando uma hematoporfirina, Photogem, como fotossensibilizador (FS). A substância fotossensibilizadora foi preparada sendo dissolvida em salina estéril e mantida no escuro imediatamente após o preparo. Para iluminação utilizou-se dois tipos de luz LED, azul e vermelho com comprimentos de onda de 455nm e 630nm respectivamente. Dessa maneira, 71 camundongos fêmeas com aproximadamente 6 semanas de vida foram imunossuprimidos com prednisolona 100mg/Kg, e tetraciclina foi diluída na água dos animais para que os mesmos não desenvolvessem nenhum outro tipo de infecção senão a candidose. Para a inoculação, suspensão de *C. albicans* ATCC ($4,5 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia-Ufc/ml) foi inoculada no interior da cavidade oral do animal por meio de swabs previamente embebidos na

suspensão. No quarto dia pós-inoculação os animais foram divididos em 6 grupos de 5 cada, e 7 para o grupo controle, e a PDT foi realizada no dorso da língua dos camundongos com aplicação tópica do Photogem seguido de iluminação. A substância fotossensibilizadora foi aplicada nas concentrações de 400, 500 ou 1000 mg/L no dorso da língua de cada animal os quais ficaram no escuro por 20 minutos (tempo de pré-irradiação). Decorrido esse período, realizou-se a iluminação por meio da luz LED 455nm ou 630nm (305 J/cm²) durante 30 minutos. Para a avaliação do efeito do FS, o mesmo foi aplicado nas mesmas concentrações, pelo mesmo período de pré-irradiação e irradiação do grupo PDT, porém com ausência de luz (Total de 3 grupos). Ao grupos que receberam apenas luz, azul ou vermelha, os mesmos foram submetidos as doses de luz mencionadas previamente, num total de 2 grupos. O controle positivo não recebeu nenhum tratamento, apenas foi inoculado com *C. albicans* e o grupo controle negativo não recebeu nenhum tratamento e nem inoculação de *candida*. Após cada tratamento, a coleta das leveduras foi realizada por meio de swabs que foram esfregados no dorso da língua dos animais por 1 minuto. Esses swabs foram então embebidos em tubos contendo 1mL de solução salina estéril, os quais foram agitados também por 1 minuto. Três diluições seriadas foram realizadas a partir desses tubos, e alíquotas de 25µl de cada diluição foi colocada em placas de SDA em duplicata. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e o número de células viáveis foi obtido por meio de contagem de colônias. Os animais foram sacrificados e as línguas removidas para avaliação histológica. De acordo com os resultados a PDT reduziu significativamente o número de células de *C. albicans* que estavam sobre a língua do animal em comparação ao grupo controle positivo. Não houve diferença significativa entre as concentrações do FS e a dose de luz utilizada (455 e 630 nm). A avaliação histológica revelou que a PDT não causou alterações adversas no tecido. Os autores concluíram assim, que a PDT promoveu significativa

redução na viabilidade do biofilme de *C. albicans* sem causar dano tecidual a língua dos animais.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da PDT na inativação de *C. albicans* presente em candidose oral experimental induzida no dorso de língua de camundongo em função de:

- Quatro concentrações do agente fotossensibilizador Photodithazine[®] associado a uma dose de luz LED com comprimento de onda vermelho.



**Material e
Métodos**

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Materiais

Para a realização da fase experimental do presente estudo, foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentais e equipamentos:

4.1.1 Instrumental e Materiais de consumo

- 1- Cultura de *Candida albicans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA
Número (ATCC number): 90028
- 2- Parafina histológica (56-58) marca SYNTH
- 3- Xilol PA 1000mL, marca Synth
- 4- Lamínulas para microscopia, 24X60mm, marca PERFECTA
- 5- Água destilada
- 6- Meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB), produzido pela Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Lote nº 100,431
- 7- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, produzido pela Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Lote nº 100,717C
- 8- Lâminas para bisturi, marca FREEBACK
- 9- Ponteiras azuis descartáveis para micropipeta, marca BOECO
- 10- Micotubos plástico graduado com tampa, marca BOECO
- 11- Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm), marca BOECO
- 12- Estantes de arames revestidos para tubos de ensaio 13mm, marca RICILAB

- 13-Xilazina Cloridrato, (Produtos Veterinários J. A. Ltda., Patrocínio Paulista, SP, Brasil)
- 14-Ponteira amarela para micropipeta, marca BOECO
- 15-Cloridrato de Ketamina, (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Embu-Guaçu, SP, Brasil)
- 16-Prednisolona 40mg, marca DEPO-MEDROL (Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, SP, Brasil)
- 17-Tetraciclina, 2g, medicamento para uso veterinário (Farmácia Santa Paula, Araraquara, SP, Brasil)
- 18-Lâmina para microscopia 26X 76mm, lapidada, marca PERFECTA
- 19-Seringa descartável 5mL com agulha 25X7 BD, marca CBS MEDICO
- 20-Formaldeído PA, marca QUEMIS
- 21-Cloridrato de clorpromazina, medicamento para uso veterinário, produzido por Farmácia Santa Paula – Araraquara São Paulo
- 22-Cotonetes, (Cotton-baby, Higie-Plus Cottonbaby Ind. Com. Ltda., São José, SC, Brasil)
- 23-Fotossensibilizador Photodithazine[®], (Rússia – Moscou)
- 24 - Placas de Petri 100 X 15 mm, fabricada por PLEION
- 25 - Tubos de ensaio 100 X 10 mm, fabricados por PYREX
- 26 -Béquer graduado, fabricado pela VIDROLABOR
- 27 -Micropipeta de 0,5-10 μ L, fabricada pela BOECO, Alemanha
- 28 -Micropipeta de 20-200 μ L, fabricada pela BOECO, Alemanha
- 29 -Micropipeta de 100-1000 μ L, fabricada pela Boeco, Alemanha
- 30 -Bico de Bunsen, fabricado por J.PROLAB
- 31 -Alça de Drigalsky, fabricada pela VIDROLABOR
- 32 -Tesoura cirúrgica de ponta fina reta, marca CBS MEDICO
- 33 -Cabo de bisturi reto, marca TRINKS
- 34 -Pinça clínica, marca DUFLEX

4.1.2 Equipamentos

- 35 Balança de precisão, fabricada por GEHAKA – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, São Paulo, Brasil
Modelo: BG 400
Nº 016450
- 36 Centrífuga Eppendorf, fabricada por EPPENDORF AG, Hamburg, Alemanha
Modelo: 5810R
- 37 Contador de colônias CP 600 PLUS, fabricado pela Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil
Modelo: CP-600
Nr-série: 919
- 38 Autoclave vertical, fabricada pela PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil
Modelo : AV 60
Nº 6614
- 39 Estufa para secagem e esterilização, fabricada por MARCONI Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil
Modelo: MA 033
Série: 9819
- 40 Agitador de tubos, fabricado por PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil
Modelo: AP 56
Série: 9803
- 41 Estufa bacteriológica, produzida por MARCONI Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil
Modelo – MA 0324

Série – 9819011

42 - Aparelho de luz LED, 660nm, (LXHL-PR09, Luxeon III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California USA), desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos – USP São Carlos – Brasil.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo dos materiais e meios de cultura

O meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) foi preparado para a reativação da *Candida albicans* utilizada neste estudo. Esse meio de cultura constitui-se de um caldo nutriente que propicia o crescimento de vários tipos de micro-organismos. A manipulação e a esterilização foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. Para o preparo do meio, foi utilizada uma proporção de 30 g de pó do meio de cultura para 1 L de água destilada. O pó proporcionado foi colocado em um béquer, e a água foi adicionada. A seguir, o béquer foi aquecido em banho-maria para a dissolução completa do meio de cultura na água destilada. Após a dissolução, a solução resultante foi distribuída em tubos de ensaio. Uma alíquota de 5 mL do meio de cultura preparado foi pipetada e dispensada em cada um dos tubos de ensaio. Esses tubos foram devidamente identificados, datados, tampados com algodão e colocados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após esse procedimento, os tubos de ensaio tampados foram deixados ao ar livre até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, foram armazenados em geladeira a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

A solução salina utilizada nas diluições seriadas realizadas neste estudo foi preparada pela diluição completa de 8,5 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada. A dissolução do sal na água destilada foi realizada em um béquer, pela manipulação de uma haste de vidro. Após a

dissolução, a solução salina resultante, na concentração de 0,15 mol, foi distribuída em tubos de ensaio. Para a distribuição, pipetou-se 1000 µL de solução salina em tubos de ensaio, que foram utilizados para armazenamento dos swabs passados nas línguas dos animais após o experimento. A partir desses tubos, iniciaram-se as diluições seriadas. Para a realização dessas diluições, 900 µL de solução salina foram pipetados e transferidos para outros tubos de ensaio. A seguir, esses tubos foram tampados com algodão hidrófobo e levados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos de ensaio foram deixados ao ar livre até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, os tubos contendo solução salina foram armazenados em geladeira a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

O meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) contendo 5 µg/mL de cloranfenicol foi utilizado nas semeaduras das placas de Petri. Esse meio de cultura apresenta-se sólido após o preparo, sendo seletivo para a cultura de fungos. Para o preparo do meio de cultura, foi utilizada a proporção recomendada pelo fabricante: 65 g de pó misturada a 0,005 g de cloranfenicol para 1 L de água destilada. O meio de cultura proporcionado foi individualmente colocado em um béquer e misturado com a água destilada. A seguir, o béquer foi levado ao banho-maria até que ocorresse a dissolução completa do meio de cultura. Uma alíquota de 20 mililitros da solução resultante foi pipetada e dispensada em tubos de ensaio, ainda na fase líquida (temperatura superior à temperatura de solidificação). A seguir, os tubos de ensaio foram devidamente identificados, datados, tampados com algodão e levados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os meios de cultura, ainda na fase líquida, foram vertidos em placas de Petri estéreis. Esse procedimento foi realizado com as placas bem próximas ao bico de Bunsen aceso para evitar contaminação das mesmas.

É importante ressaltar que as placas de Petri utilizadas foram compradas já esterilizadas e eram descartáveis, segundo recomendações do fabricante. Dessa maneira, não foi necessária a realização de procedimentos de esterilização para as mesmas. Os filtros utilizados para vedar as placas foram cortados em círculos de acordo com o formato e tamanho das placas de petri. Esses filtros foram embalados em papel alumínio e colocados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização dos filtros, os mesmos foram colocados próximos à chama do bico de Bunsen. Os tubos de ensaio foram individualmente vertidos nas placas de Petri. Cada tubo de ensaio contendo 20 mL do meio foi aberto e o conteúdo do mesmo foi vertido na parte inferior da placa de Petri. Em seguida, os filtros foram colocados individualmente sobre a parte inferior das placas e as mesmas foram então fechadas, datadas e mantidas em temperatura ambiente para esfriar. A seguir, a parte inferior de cada placa de Petri foi externamente dividida em quadrantes. Esses quadrantes foram traçados com caneta para retroprojeter para facilitar posteriormente os procedimentos de semeadura dos micro-organismos (diluição seriada por quadrante). Finalmente, as placas de Petri foram armazenadas em geladeira a 5°C para serem utilizadas nos procedimentos de semeadura dos micro-organismos recuperados da cavidade oral dos animais.

A água de beber dos camundongos utilizados neste estudo foi preparada pela diluição completa de 1g de tetraciclina em 1L e 200 mL de água. Para a realização desse procedimento, uma balança digital de alta precisão foi ligada, um pratinho plástico específico para esse tipo de balança foi colocado sobre a mesma que foi então calibrada em zero. Em seguida, com o auxílio de uma espátula pesou-se 1g de tetraciclina. A quantidade de água necessária para a diluição da substância antibiótica foi medida em uma proveta de 2L. A tetraciclina foi diluída em água com o auxílio de uma haste de vidro. Após a total diluição, a solução final ficou a uma concentração de 0,83mg/mL de tetraciclina. A solução foi então

colocada em recipiente âmbar, o qual foi vedado com parafilm e papel alumínio e armazenada em refrigerador a 5° C até o momento de ser utilizada.

4.2.2 Aplicação da Terapia Fotodinâmica

Preparo do agente fotossensibilizador

Para a realização da PDT no estudo proposto, utilizou-se como agente fotossensibilizador o Photodithazine® (PDZ). Esse composto é produzido a partir de uma clorina e₆, é uma substância extraída da cianobactéria *Spirulina platensis*. Apresenta-se na forma de um líquido verde-escuro, sendo comercializado em frascos âmbar contendo aproximadamente 5 mL da substância. Sua distribuição é realizada somente sob prescrição para instituições especializadas, deve ser armazenado em um local protegido da luz e em temperatura inferior a 5°C. É considerado FS de segunda geração, pois apresenta curtos períodos de fotossensitização, absorve maiores comprimentos de onda, além de produzir altos níveis de oxigênio singlete. Em solução, o PDZ apresenta máxima absorção da banda Q de 660 nm, (Figura 1)

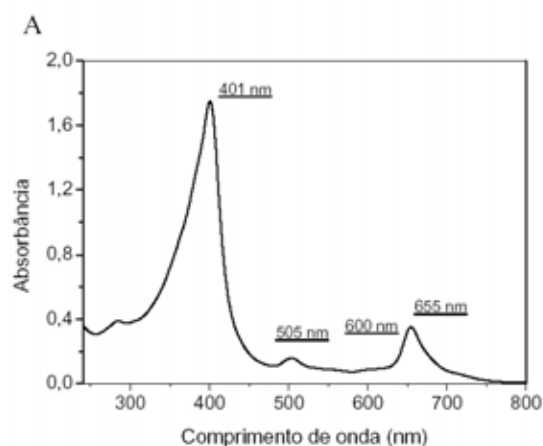


FIGURA 1 - Espectro de absorção óptica do Photodithazine®.

Para a realização do estudo proposto, o material FS foi fornecido pelo Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos – USP (IFSC) a uma concentração de 5.000 mg/L. Sua embalagem foi coberta por papel alumínio para proteção da luz e armazenada à 5° C como descrito anteriormente.

A capacidade de inativar micro-organismos do PDZ foi avaliada por meio da utilização de quatro concentrações dessa substância: 75, 100, 125 e 150mg/L. Para o preparo dessas soluções, cálculos com regra de três simples foram realizados e possibilitaram a obtenção das seguintes proporções: solução estoque a 1,5% para a concentração de 75mg/L, solução estoque a 2% para a concentração de 100mg/L, solução estoque a 2,5% para a concentração de 125mg/L e solução estoque a 3% para a concentração de 150mg/L. As soluções de PDZ foram preparadas por meio da diluição das mesmas em solução salina estéril (Apêndice 1). O preparo das soluções de PDZ foi realizado em microtubos envoltos por papel alumínio os quais foram agitados vigorosamente por 1 minuto para a completa homogeneização. Todo esse procedimento foi realizado previamente ao início de cada experimento a partir da solução de 5000 mg/L. É importante ressaltar que o PDZ é uma substância fotossensível, podendo sofrer degradação de seus componentes quando exposto a luz. Dessa maneira, os procedimentos de preparo da solução estoque, manipulação do agente fotossensibilizador e posteriormente a fotossensibilização dos micro-organismos, foram realizados em ambiente sem luz.

Parâmetros de irradiação

O aparelho de luz utilizado neste estudo é constituído por uma peça de mão de luz LED vermelha idealizada e desenvolvida no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP) de São Carlos.

Essa fonte de luz possui a região de iluminação no final da peça de mão em formato arredondado com aproximadamente 5 mm de diâmetro (Figura 3 e 4). Além disso, a peça de mão possui potência de saída constante de $44,5 \text{ mW/cm}^2$ e a luz emitida se encontra numa faixa do espectro eletromagnético, predominantemente em 660 nm, na qual o FS empregado apresenta capacidade de absorção de luz. A importância em se conhecer o valor da potência de saída do aparelho utilizado se justifica, pois este valor, juntamente com o tempo de iluminação, determina a quantidade de energia aplicada na amostra irradiada. Essa quantidade de energia é denominada fluência ou dose de luz, e é expressa pela energia por área (J/cm^2). A fórmula empregada para o cálculo da dose é a seguinte:

$$\text{Dose de luz (J/cm}^2\text{)} = I (\text{W/cm}^2) \times t (\text{seg.}).$$



FIGURA 3 - *Peça de mão*. Aparelho de luz LED construído para iluminação das línguas dos animais.



FIGURA 4 - *Peça de mão*. Aparelho de luz LED vermelho.

Para a realização do estudo, camundongos portadores de candidose oral experimental induzida no dorso da língua foram submetidos à PDT, mediados pelo fotossensibilizador PDZ, a fim de se avaliar a efetividade do tratamento na inativação de *C. albicans* presente

nas lesões. Quatro concentrações do FS (75, 100, 125 e 150mg/L) foram avaliadas, assim como uma dose de luz (37,5 J/cm²). Como a fonte de luz utilizada possuiu potência constante, e a dose de luz que seria utilizada já estava estabelecida, de acordo com a fórmula descrita anteriormente, calculou-se o tempo de iluminação. Assim o tempo de iluminação utilizado foi de 14 minutos. Os cálculos realizados para a obtenção desse tempo de iluminação estão descritos no Apêndice 2.

4.2.3 *Candida albicans* e condições de crescimento

Uma cepa padrão de *C. albicans* foi selecionada para ser utilizada nesse estudo. A cultura desse micro-organismo foi armazenada em microtubos contendo meio de cultura TSB acrescido de glicerol e congelada à -70° C, até o momento de sua utilização. Previamente a cada experimento, a levedura foi descongelada e inoculada aerobicamente em meio de cultura SDA e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas para sua reativação. Decorrido esse período, uma alçada da cultura de *Candida* foi retirada e inoculada em 5 mL de TSB contido em um tubo de ensaio. Dessa maneira as leveduras cresceram aerobicamente em cultura overnight a 37° C por 24 horas. Após a incubação, o tubo foi centrifugado a 2000 rpm, durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células (sedimentado) foram ressuspensas em 5 ml de água destilada estéril. O tubo foi agitado novamente por 30 segundos e os mesmos passos de centrifugação foram repetidos. As células foram, então, ressuspensas em 2 mL de solução salina estéril até que a concentração celular no interior do tubo de ensaio fosse equivalente a 10⁷ células/mL. Para isso, uma cubeta estéril com 2 mL de solução salina foi posicionada no interior do espectrofotômetro ajustado para 520 nm e 0 de absorbância para fazer o blank (solução controle). Em seguida, alíquotas

de 100 µL da suspensão celular preparada foram transferidas gradativamente para o interior da cubeta, e agitadas com a ponteira. O espectrofotômetro era então fechado para avaliação da concentração celular. Esse procedimento foi repetido até que a concentração celular fosse apontada pelo aparelho a um valor de absorbância de 0.38 nm. Dessa forma, foram obtidas suspensões celulares padronizadas do microorganismo avaliado, em uma mesma concentração celular (10^7 células/mL).

4.2.4 Animais

Previamente ao início dos experimentos, o projeto de pesquisa referente a este estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, que autorizou a execução do estudo (Anexo 1). Foram utilizados 55 camundongos com aproximadamente 6 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da UNESP - Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, e alimentados com ração e água *ad libitum*. Anteriormente ao início de cada experimento, verificou-se a ausência de leveduras de gênero *Candida* na cavidade bucal e língua de todos os animais, por meio da coleta de material da mucosa bucal da cada camundongo com um mini-swab oral previamente esterilizado. Em seguida, o swab foi semeado em placas de Petri contendo meio seletivo para *Candida* spp. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Todos os animais apresentaram ausência de crescimento de fungos nas placas de petri.

4.2.5 Indução de candidose em língua de camundongos

Para indução de candidose, utilizou-se a metodologia proposta por Takakura et al.⁵⁰ em 2003. Nesse estudo, os autores verificaram as condições necessárias para o desenvolvimento de um modelo experimental de candidose bucal em camundongos, no qual foram obtidas lesões brancas macroscópicas típicas ou pseudomembranas no dorso lingual dos animais. De acordo com essa metodologia, para a indução de candidose deve ser utilizado a prednisolona, um glicocorticoide imunossupressor, associada à tetraciclina (antibiótico), seguida de inoculação tópica de *C. albicans*.

A susceptibilidade da cepa de *C. albicans* a PDT in vivo, foi avaliada por meio da exposição das línguas contaminadas dos camundongos às quatro concentrações do agente fotossensibilizador (75, 100, 125 e 150mg/L) e a uma dose de luz (37,5J/cm²) no comprimento de onda vermelho (predominantemente em 660nm) como descrito anteriormente. Assim, quatro condições experimentais foram obtidas, pela associação da dose de luz com as quatro concentrações de PDZ avaliadas, denominadas P+L+. Adicionalmente, o efeito da aplicação isolada de cada concentração de PDZ (P+L-) e da dose de luz (P-L+) também foi avaliado nos animais. Os animais referentes ao grupo controle positivo (P-L-) não tiveram suas línguas fotossensibilizadas e nem iluminadas, apenas receberam inoculação por *C. albicans*. Já os animais do grupo controle negativo (CN), não receberam tratamento algum e nem inoculação pelo fungo, porém realizou-se apenas uma simulação de imunossupressão, inoculação e tratamento. Dessa forma foram obtidos 5 grupos, os quais foram divididos em subgrupos, sendo avaliados 5 espécimes em cada condição experimental. Cada condição experimental pode ser observada no Quadro1.

Quadro1 – Descrição dos grupos de estudo, subgrupos e condições experimentais

Grupos	Subgrupos	Descrição da condição experimental
P+L+	75mg/L	Os animais receberam aplicação de PDZ 75mg/L, foram incubados por 20min, e receberam iluminação com 37,5J/cm ² .
	100mg/L	Os animais receberam aplicação de PDZ 100mg/L, foram incubados por 20min, e receberam iluminação com 37,5J/cm ² .
	125mg/L	Os animais receberam aplicação de PDZ 125mg/L, foram incubados por 20min, e receberam iluminação com 37,5J/cm ² .
	150mg/L	Os animais receberam aplicação de PDZ 150mg/L, foram incubados por 20min, e receberam iluminação com 37,5J/cm ² .
P+L-	P+L-75mg/L	Os animais receberam aplicação de PDZ 75mg/L e foram incubados por 20min.
	P+L-100mg/L	Os animais receberam aplicação de PDZ 100mg/L e foram incubados por 20min.
	P+L-125mg/L	Os animais receberam aplicação de PDZ 125mg/L e foram incubados por 20min.
	P+L-150mg/L	Os animais receberam aplicação de PDZ 150mg/L e foram incubados por 20min.
P-L+	P-L+	Os animais receberam iluminação de 37,5J/cm ² com o comprimento de onda 660 nm..
Controle Positivo	P-L-	Os animais não receberam tratamento, apenas inoculação por <i>C. albicans</i> .
Controle Negativo	CN	Os animais não foram submetidos à indução de candidose, não receberam nenhum tratamento mas foram estressados assim como os animais que receberam tratamento.

A seguir, estão descritas as etapas experimentais que foram necessárias para a indução de candidose oral experimental em modelo animal, as quais foram divididas em três partes: imunossupressão, inoculação e realização da PDT. Para a realização de cada ocasião, foram necessários 8 dias de experimento (Tabela 1). Na sequência, as condições experimentais avaliadas estão descritas em forma de tópicos (P+L+, P+L-, P-L+, P-L- e CN) com a finalidade de simplificar a descrição das etapas.

Tabela 1 - Etapas realizadas em cada dia de experimento

Dias	Protocolo experimental
1 a 8	Antibioticoterapia
1 e 5	Imunossupressão
2	Inoculação por <i>C. albicans</i>
7	Realização da PDT e recuperação de <i>C.albicans</i>
8	Sacrifício dos animais

4.2.6 Imunossupressão dos camundongos

A imunossupressão dos animais foi efetuada por meio de duas injeções subcutâneas de prednisolona na dose de 100mg/kg de massa corporal. Para a realização de tal procedimento, utilizou-se o medicamento imunossupressor, Acetato de metilprednisolona 40mg/ml, do qual 0,1mL foi colocado em uma seringa estéril de capacidade de 1mL.

Para possibilitar a injeção do medicamento nos animais sem a necessidade de sedação dos mesmos, cada animal foi imobilizado por meio da fixação da cauda sobre a bancada com a mão direita do pesquisador, enquanto a seringa era manuseada com a mão esquerda, e a injeção realizada conforme mostrado na Figura 5. A injeção foi realizada na porção posterior da cabeça do animal, próximo à região de pescoço. O procedimento de imunossupressão foi realizado no primeiro dia de experimento, e foi repetido dois dias após inoculação por *C. albicans* (quinto dia de experimento).

Adicionalmente a imunossupressão, no primeiro dia do experimento iniciou-se o tratamento dos animais com tetraciclina, para prevenir o desenvolvimento de infecções bacterianas nos animais imunossuprimidos. Para a realização desse procedimento, tetraciclina foi fornecida aos animais na água de beber na concentração de 0,83 mg/mL, como descrito anteriormente. Os animais receberam o medicamento durante todo o período experimental.



FIGURA 5 - Procedimento de imunossupressão.

4.2.7 Inoculação de *C. albicans*

No segundo dia de experimento, a suspensão padronizada de *C.albicans* foi obtida para a inoculação da mesma nos animais, como já descrito anteriormente. Após o preparo da suspensão celular, com o auxílio de uma seringa estéril de capacidade de 1mL, os animais foram sedados com 0,1mL de cloridrato de clorpromazina 2mg/mL. Para isso, o animal foi imobilizado por umas das mãos do pesquisador, que com a outra mão esticou cuidadosamente as patas do animal, uma por vez, para que a injeção com sedativo fosse aplicada por um segundo pesquisador. Essa injeção foi intramuscular, e aplicou-se 0,05mL de medicamento na região de cada fêmur do animal (Figura 6).



FIGURA 6 - Foto representativa da aplicação do medicamento cloridrato de clorpromazina no fêmur do animal.

Após as injeções, um período de aproximadamente 15 minutos era aguardado até que todos os animais estivessem sedados. A seguir, com o auxílio de uma pinça, a língua do animal foi delicadamente posicionada para fora da cavidade oral, e cotonetes embebidos na suspensão de *C. albicans* preparada foram utilizados como mini-swabs, sendo então friccionados por todo o dorso da língua dos animais sedados

(Figura 7). O tempo para a inoculação dos animais foi padronizado com cronômetro em 30 segundos.



FIGURA 7 - Procedimento de inoculação de *C. albicans* no dorso da língua dos animais.

É importante ressaltar que 48 horas após a realização do procedimento de inoculação de *C. albicans* (5º dia de experimento) os animais receberam mais uma dose de imunossupressor de forma semelhante à descrita no primeiro dia.

4.2.8 Realização da PDT

A PDT foi realizada 48 horas após a segunda imunossupressão (7º dia de experimento). Previamente e realização da PDT, as soluções estoque da substância fotossensibilizadora foram preparadas e mantidas em recipientes âmbar até o momento do uso, como já comentado anteriormente. Durante a realização do experimento os animais foram avaliados de acordo com o grupo a que pertenciam.

◆ **Grupos P+L+**

Para a realização da PDT, os animais foram inicialmente anestesiados. Para isso, com o auxílio de uma seringa de capacidade de 1mL, obteve-se uma mistura de 100mg/kg de massa corpórea de Quetamina, anestésico geral, e 10mg/kg de massa corpórea de Xilazina, relaxante muscular.

Para aplicação desses medicamentos o animal foi imobilizado pelo pesquisador da mesma maneira que para o procedimento de aplicação de sedativo descrito anteriormente. Mais uma vez com o auxílio de outro pesquisador, aplicou-se 0,1mL da mistura feita pelos dois medicamentos por meio de injeção intramuscular em região de fêmur em apenas uma pata do animal (Figura 8). Após anestesia, os animais foram colocados em posição supina, e com o auxílio de uma pinça clínica a língua dos camundongos foi cuidadosamente posicionada para fora da cavidade oral dos mesmos (Figura 9).



FIGURA 8 - Aplicação intramuscular de anestésico geral.



FIGURA 9 - Exposição do dorso da língua do animal previamente à aplicação do FS e realização da PDT.

Em seguida, realizou-se aplicação tópica de 70 μ L de FS na região dorsal da língua. Nesse momento, a língua foi posicionada no

interior da cavidade oral e os animais permaneceram no escuro durante 20 minutos (tempo de pré-irradiação). Decorrido esse tempo, com o auxílio de uma pinça as línguas dos animais foram tracionadas para fora da boca, o aparelho de luz foi posicionado estando em contato com a língua do animal formando um ângulo de 90° entre o aparelho e a língua. A luz foi acionada e as amostras iluminadas por 14 minutos (Figura 10). Após a PDT, realizou-se a recuperação de *C. albicans* da língua dos animais por meio da coleta com mini-swabs estéreis que estavam previamente embebidos em 1mL de solução salina estéril (Figura 11). Para isso, os swabs foram esfregados sobre o dorso das línguas dos animais durante 1 minuto.



FIGURA 10 - Realização da PDT.



FIGURA 11 - Recuperação de *C. albicans* após PDT.

Todo procedimento acima descrito foi realizado para a avaliação das quatro concentrações de PDZ propostas para este estudo (grupos P+L+75, P+L+100, P+L+125 e P+L+150mg/L) em associação com apenas uma dose de luz.

◆ **Grupos P+L-**

Para verificar um possível efeito tóxico da aplicação isolada do FS, sem iluminação posterior, os animais receberam apenas aplicação do PDZ nas mesmas concentrações (75, 100, 125 e 150mg/L) avaliadas para os grupos P+L+. No 7º dia de experimento os animais foram anestesiados e receberam aplicação tópica de FS da mesma maneira que o grupo anterior (P+L+). Entretanto, após os 20 minutos de pré-incubação dos animais no escuro, realizou-se a recuperação de *C. albicans* da língua dos mesmos por meio da coleta com mini-swabs estéreis por 1 minuto.

◆ **Grupo P-L+**

Para verificar um possível efeito tóxico da luz sobre os micro-organismos os animais pertencentes a este grupo receberam apenas iluminação na dose de luz de 37,5J/cm². Da mesma maneira que para os grupos anteriores, os animais foram anestesiados e receberam aplicação da luz durante 14 minutos na região dorsal da língua. Após esse período, realizou-se a recuperação de *C. albicans* da língua dos animais como descrito para o grupo anterior.

◆ **Grupo P-L-**

Os animais pertencentes a este grupo foram considerados controles positivos. Os mesmos foram manipulados para indução de candidose, no entanto, não receberam tratamento. No 7º dia de experimento a recuperação de *C. albicans* da língua foi realizada, da mesma maneira descrita para os grupos anteriores.

◆ **Grupo CN**

Nos animais dessa condição experimental, não foram realizados os procedimentos de indução de candidose. Os animais foram apenas estressados da mesma maneira que todos os outros por meio de uma simulação de imunossupressão, inoculação e tratamento. A simulação de recuperação de *C. albicans* também foi realizada assim como para os demais grupos experimentais. Dessa maneira esses animais foram considerados como controles negativos.

Após a recuperação de *C. albicans*, para todas as condições avaliadas, foram realizadas diluições seriadas a partir das amostras contidas nos tubos de ensaio com o mini-swab e 1ml de solução salina. Inicialmente, esses tubos de ensaio foram vigorosamente agitados durante 1 minuto, para que houvesse total desprendimento do fungo do swab e o mesmo ficasse apenas na solução salina. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi removida de cada amostra e transferida para um tubo de ensaio contendo 900 µL de solução salina estéril. Este tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos e uma nova alíquota de 100 µL foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio com 900 µL de solução salina. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra e, desta forma, as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} foram obtidas (Figura 12).

As três diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram utilizadas para a realização da semeadura nas placas de Petri com o meio de cultura SDA com 5 µg/mL de cloranfenicol. Para este procedimento, os tubos de ensaio contendo as diluições seriadas foram individualmente agitados em agitador de tubos de ensaio. A seguir, alíquotas de 25 µL de cada diluição seriada foram pipetadas em duplicata. Cada alíquota foi transferida para um dos quadrantes de três placas de Petri com o meio de cultura. Adicionalmente, alíquotas de 25 µL foram removidas dos tubos de ensaio que continham o mini-swab e transferidas diretamente para um

quadrante da placa de Petri, sem a realização de diluição (Figura 13). Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. Os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicatas.

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri referentes às amostras das condições experimentais avaliadas foram submetidas à contagem de colônias. Para este procedimento, cada placa de Petri foi posicionada em um contador de colônias digital. A quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias foram calculados.



FIGURA 12 - Diluições seriadas referentes a amostra coletada de apenas um animal.

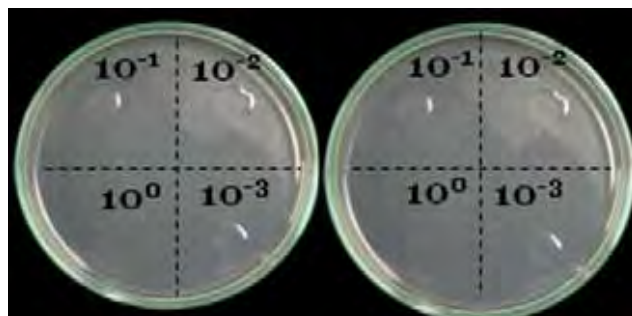


FIGURA 13 - Placas de Petri contendo meio de cultura SDA.

4.2.9 Sacrifício dos animais e análise histológica

No 8º dia de experimento, os camundongos foram sacrificados por uma dose letal de Quetamina (0,2mL) injetada de maneira intramuscular no fêmur de cada animal. Após a morte, a língua dos animais foi removida cirurgicamente. Para a realização desse procedimento, inicialmente, com uma tesoura cirúrgica, cortou-se na região de comissura labial de ambos os lados com o objetivo de aumentar a abertura bucal do animal e facilitar o acesso para a adequada remoção

de língua. Em seguida, com o auxílio de uma pinça a língua foi cuidadosamente tracionada para fora da cavidade oral e a base da mesma foi cortada com a tesoura cirúrgica, até sua remoção total. As línguas para serem consideradas totalmente removidas, deveriam apresentar até a eminência intermolar. Em seguida, as peças foram colocadas em cassetes, os quais foram identificados de acordo com o grupo experimental a que pertenciam. Os cassetes ficaram imersos em um recipiente com formol a 10% (pH 7,4) por 48 horas. Decorrido esse período, os mesmos ficaram sob água corrente por 24 horas. Na sequência, cortes padronizados das línguas foram realizados. Para isso as línguas foram divididas em três partes, como pode ser observado na Figura 14:

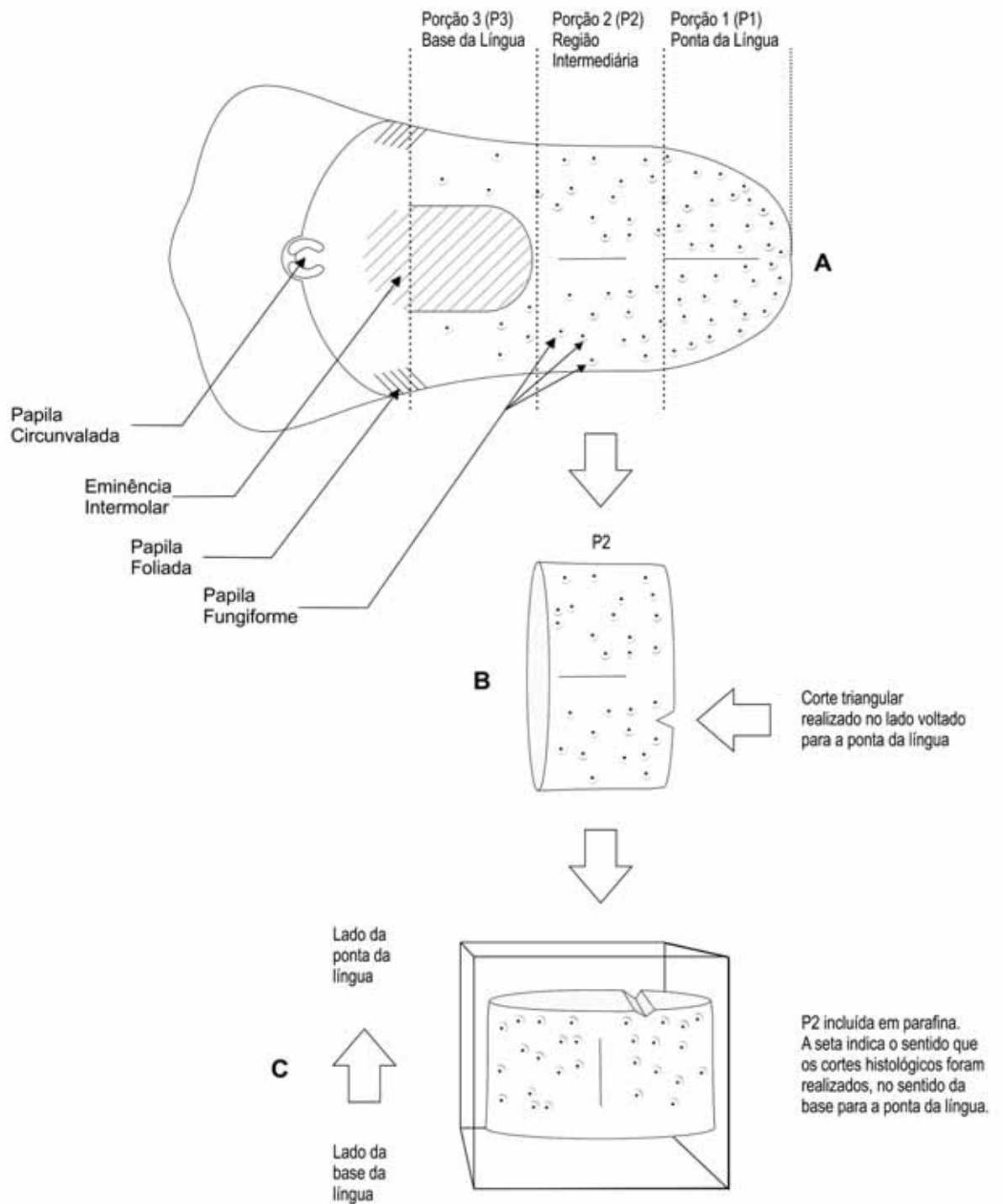


FIGURA 14 - Representação esquemática da divisão da língua dos camundongos em 3 partes (A). Corte triangular realizado na parte intermediária (P2) no lado voltado para a ponta da língua (B). Inclusão da P2 em parafina. A seta indica o sentido que os cortes histológicos foram realizados, no sentido da base para a ponta da língua. - 5 μ m (C).

Imediatamente após realização dos cortes das línguas e previamente à inclusão das peças em parafina, as mesmas foram submetidas ao seguinte processo laboratorial de rotina:

1. Fase de desidratação por trocas consecutivas de alcoóis em concentrações crescentes:
 - álcool 70% por 1 hora;
 - álcool 90% por 1 hora;
 - álcool absoluto, 6 trocas de 1 em 1 hora.
2. Fase de diafanização:
 - álcool xilol por 30 minutos;
 - xilol-puro por 30 minutos;
 - novo xilol piro por mais 30 minutos.
3. Fase de embebição em parafina histológica a 58° C:
 - parafina líquida por 3 horas;
 - nova parafina líquida por mais 3 horas.

As amostras foram incluídas em fôrmas de papel contendo parafina líquida após o processamento laboratorial. Após endurecimento da parafina tais fôrmas foram removidas e, com o auxílio de navalhas descartáveis foram obtidos blocos de parafina que continham as peças incluídas centralmente, como pode ser observado na Figura 14 (Item C). Esses blocos foram fixados em suportes de madeira para serem posicionados em micrótomo rotatório. Dezesesseis cortes histológicos seriados de cada bloco foram obtidos. Esses cortes apresentavam 5 µm de espessura, foram colocados em lâminas de vidro e corados com reagente ácido periódico de Schiff, Hematoxilina e Eosina para posterior avaliação dos eventos histológicos ocorridos em cada um dos grupos através de microscopia de luz, em aumento de 200x e 400x.

4.2.10 Análise de micro-organismos viáveis

Após a incubação das placas de Petri a 37° C por 48 horas, foi realizado o cálculo do número de micro-organismos viáveis, em valores de ufc/mL, obtido nas amostras experimentais e controle. Para o cálculo desses valores, as colônias viáveis presentes nas placas de Petri de cada duplicata foram contadas com o contador de colônias digital. É importante ressaltar que, para cada duplicata, a contagem do número de colônias foi realizada em cada uma das diluições semeadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e também no quadrante onde a alíquota plaqueada foi retirada diretamente da suspensão celular (diluição zero). Para os grupos controle (P-L-, P+ L- e P-L+) foram considerados somente os valores entre 30 e 300 colônias, sendo escolhido o número de colônias referente a uma única diluição que representasse um valor entre a variação considerada. Para os grupos experimentais (P+L+), essa regra não pode ser aplicada, pois muitas vezes o crescimento nas placas não atingiu o valor mínimo de 30 colônias, tendo em vista as taxas de redução obtidas após a aplicação da PDT. Então, quando valores inferiores a 30 foram observados, o número de colônias considerado foi referente à diluição que apresentou algum crescimento. Após a contagem, foi obtida a média entre as duplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foi calculado. Para o cálculo de ufc/mL, utilizou-se a fórmula a seguir:

$$\text{ufc/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times 10^n}{q}$$

q

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição

quando nas sementeiras das placas. No presente estudo, $q = 0,025$ já que foram pipetados 25 μL para cada diluição. Os valores de ufc/mL obtidos foram deixados em notação científica.

Os valores de ufc/mL são extremamente elevados e, por isso, considerados de difícil avaliação. As contagens de microorganismos, em ufc/mL, foram transformadas em logaritmo (\log_{10}) para a análise pretendida neste trabalho. No presente estudo foram realizadas duas análises, sendo uma para os grupos experimentais (subgrupos: P+L+75, P+L+100, P+L+125 e P+L+150) e a outra para os grupos controles (subgrupos: P-L-, P+L-75, P+L-100, P+L-125, P+L-150 e P-L+). Todas as condições experimentais avaliadas foram comparadas com o subgrupo controle positivo (P-L-). Os dados relativos aos grupos experimentais apresentaram desvios de normalidade, bem como heterocedasticidade (Shapiro-Wilks e Levene, $\alpha=0,05$). Dessa forma, utilizou-se estatística não-paramétrica, a qual foi realizada por meio do teste Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%. Já com relação aos grupos controles, os dados apresentaram normalidade e homocedasticidade (Shapiro-Wilks e Levene, $\alpha=0,05$) e puderam ser analisados com inferências estatísticas paramétricas. Utilizou-se a Análise de Variância a um critério (*One-way ANOVA*), com nível de significância de 5%.



Resultados

5 RESULTADOS

O número de colônias obtido em cada duplicata de todos os espécimes utilizados neste estudo está representado no Apêndice 3, no qual as Tabelas 1A e 2A são referentes à todas as condições experimentais avaliadas.

5.1 Avaliação macroscópica da indução de candidose oral nos animais

O modelo animal de indução de candidose oral em língua de camundongo utilizado neste estudo mostrou-se adequadamente reprodutível, a partir da metodologia descrita por Takakura et al.⁵⁰. Lesões típicas de candidose oral, como placas brancas ou pseudomenbranas, foram observadas no dorso da língua de todos os animais infectados por *C. albicans*, 5 dias após a inoculação do micro-organismo (Figura 15). Em média os animais com candidose apresentaram aproximadamente 10^{4-5} ufc/ml de *C. albicans*, de acordo com as contagens realizadas nas placas de petri.



FIGURA 15 - Placas brancas ou pseudomembranas observadas no dorso da língua dos animais imunossuprimidos.

A seguir, para facilitar a compreensão dos resultados, as análises realizadas foram divididas em duas partes: Avaliação in vivo da efetividade da PDT para os grupos experimentais e avaliação dos grupos controles.

5.2 Avaliação in vivo da efetividade da PDT para os grupos experimentais

Para verificação da efetividade da PDT, a avaliação dos grupos experimentais também incluiu o subgrupo controle positivo (P-L-), para efeito de comparação.

A Tabela 2 apresenta as principais estatísticas descritivas dos grupos PDT e do controle positivo.

Tabela 2 - Medidas de tendência central e de variabilidade dos grupos experimentais

Grupos	Média	Mediana	Variância	Desvio Padrão	Coef. Variação (%)	Máx	Min
P-L-	4,9321	4,5105	0,4062	0,6373	12,9215	5,6812	4,3909
P+L+75	4,7142	4,7966	0,2746	0,524	11,1153	5,2833	4,1206
P+L+100	1,0528	0,0000	2,0832	1,4433	137,0968	2,7324	0,0000
P+L+125	2,3397	1,7782	6,2701	2,504	107,0239	5,1644	0,0000
P+L+150	2,2636	2,7782	1,9189	1,3853	61,1963	3,6684	0,0000

Como pode ser observado na tabela acima, os resultados médios dos grupos P-L- e P+L+ 75 parecem ser semelhantes, assim como suas variâncias e coeficientes de variação. Com relação ao grupo P+L+ 100, pôde-se observar que seus valores de média e mediana são discrepantes em relação aos demais grupos. Este grupo apresentou a menor média absoluta, mediana nula e coeficiente de variação muito elevado.

Foi interessante observar que a PDT promoveu completa inativação fúngica em 3, 2 e 1 animais tratados com 100, 125 e 150mg/L de PDZ, respectivamente. Isso pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de Ufc/mL referente a cada amostra de cada grupo experimental tratado com PDT

	Concentrações de PDZ			
	75mg/L	100mg/L	125mg/L	150mg/L
	1.92E+05	3.40E+02	0.00E+00	1.20E+02
	1.70E+04	0.00E+00	0.00E+00	6.20E+02
	6.26E+04	0.00E+00	1.46E+05	0.00E+00
	1.38E+05	5.40E+02	5.70E+04	4.66E+03
	1.32E+04	0.00E+00	6.00E+01	6.00E+02

Foi estimado um modelo linear de forma a identificar os efeitos dos subgrupos para a elaboração de quadro de análise de variância. Inicialmente, verificou-se que sobre o modelo linear proposto, os pressupostos de homogeneidade dos resíduos e normalidade foram satisfeitos pelos testes de Levene e Shapiro-Wilks ($\alpha = 5\%$). Assim, foi possível a utilização de métodos paramétricos de análise. Utilizou-se a análise de variância ANOVA a um critério.

Sob a hipótese nula de igualdade de médias com nível de significância de 5%, elaborou-se o seguinte quadro ANOVA representado pela Tabela a seguir:

Tabela 4 - Sumário da Análise de Variância para o estudo de $\log_{10}(\text{Ufc})$ em função dos grupos experimentais e controle positivo

	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Grupo	4	57,116	14,279	6,5184	0,0016
Resíduo	20	43,8116	2,1906		

De acordo com a tabela acima, os dados indicam que pelo menos um grupo apresenta média diferente dos demais, fato este já esperado em função dos resultados da estatística descritiva (Tabela 2). Em razão disso, um teste “post hoc” foi necessário para se determinar quais grupos possuíam médias diferentes entre si. O resultado pode ser visualizado na Tabela 5, que apresenta o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0.05$).

Tabela 5 - Comparações múltiplas pelo teste de Tukey para os valores médios de $\log_{10}(\text{Ufc})$ - Grupos experimentais e controle positivo

Grupos	Médias	M	N	Erro Padrão
P-L-	4,9321	a	5,0000	0,2850
P+L+ 75	4,7142	a	5,0000	0,2343
P+L+125	2,3397	ab	5,0000	1,1198
P+L+150	2,2636	ab	5,0000	0,6195
P+L+100	1,0528	b	5,0000	0,6455

Segundo a tabela apresentada, os grupos controle positivo P-L- e grupo P+L+ 75 são semelhantes estatisticamente. Estes dois grupos porém, possuem diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo P+L+ 100. Os grupos P+L+ 125 e P+L+ 150 são semelhantes entre si, semelhantes a P+L+100, e semelhantes a P-L- e P+L+ 75. Pôde-se observar também que o grupo controle teve a maior média pontual enquanto que o grupo P+L+ 100 teve a menor média pontual.

Estatísticas não-paramétricas

O teste de Kruskal-Wallis foi realizado posteriormente à análise paramétrica uma vez que os grupos P-L- e P+L+ 75 que são estatisticamente semelhantes foram considerados semelhantes também ao grupo P+L+ 150, e essas semelhanças não foram corretamente observadas no gráfico de média e intervalos de confiança (Gráfico 1):

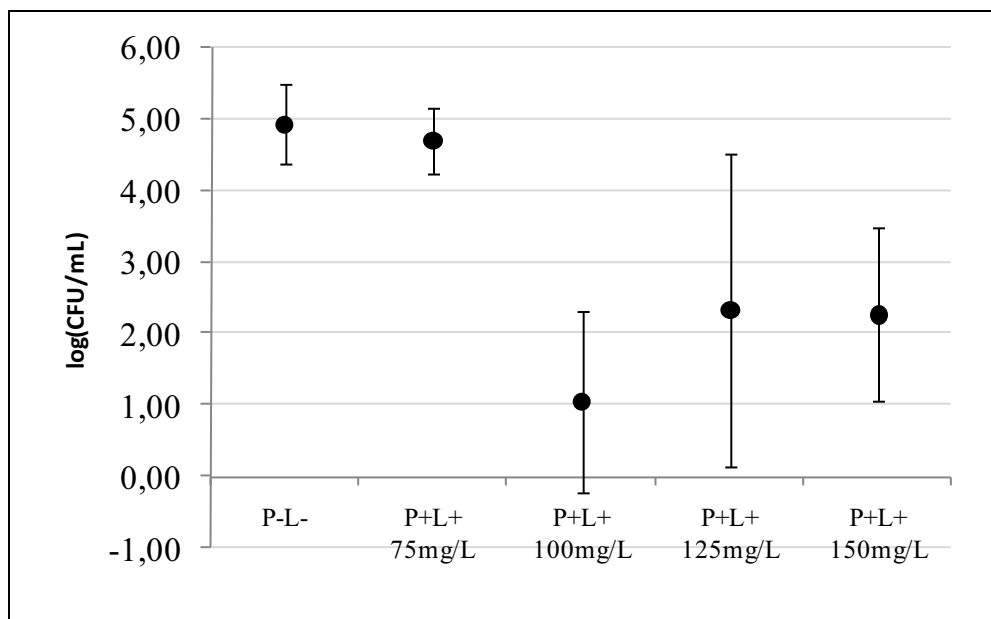


GRÁFICO 1 - Valores médios de *C. albicans* tiradas do dorso da língua de camundongo imunossuprimidos e intervalos de confiança (95%) do grupo controle positivo (P-L-) e dos grupos tratados com PDT.

Após realização do teste não-paramétrico, sob a hipótese nula de igualdade de médias a considerar 5% de significância, rejeita-se a hipótese nula com p – valor = 0,008. A Tabela 6 apresenta as comparações múltiplas.

Tabela 6 - Teste de Comparações Múltiplas - Postos Médios - Grupo Experimental

Grupos	Postos			
	Médios	M	N	Erro Padrão
P-L-	20,0000	a	5,0000	2,3397
P+L+ 75	18,6000	a	5,0000	2,3397
P+L+125	11,0000	b	5,0000	2,3397
P+L+150	9,5000	b	5,0000	2,3397
P+L+100	5,9000	b	5,0000	2,3397

Com base na tabela acima, pôde-se observar que os grupos P-L- e P+L+ 75 são diferentes dos demais grupos. Este resultado deve-se ao fato de que o teste de postos é robusto e apresenta um intervalo de confiança mais conservador que o teste de Tukey apresentado na Tabela 5. Dessa maneira, é natural que distorções aconteçam, principalmente quando se comparam resultados de teste com intervalos de confiança conservadores com testes que possuem intervalos menos conservadores.

Para dirimir as dúvidas, foram gerados 30.000 replicações bootstrap (via computação intensiva) da amostra da média calculada de cada grupo, obtendo-se assim, estimativas do intervalo de confiança de 95% para estas médias. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Intervalo de confiança bootstrap (95%) para os grupos experimentais - 30.000 replicações

Grupos	Lim. Inf.	Média	Lim.
			Sup.
P-L-	4,4605	4,9321	5,4243
P+L+ 75	4,2997	4,7142	5,1286
P+L+100	0,0000	1,0528	2,1457
P+L+125	0,3556	2,3397	4,3237
P+L+150	1,1113	2,2636	3,1725

Após análise dos dados acima citados, pôde-se observar que não houve ponto de intersecção dos grupos P-L- e P+L+ 75 com o grupo PDT 150. De acordo com essa segunda análise, houve diferença estatisticamente significativa dos grupos P+L+ 100, P+L+125 e P+L+150mg/L de PDZ, quando comparados com o grupo controle positivo P-L-. Entretanto, a associação de 100mg/L de PDZ com luz LED vermelha, promoveu elevada redução na viabilidade celular de *C. albicans*, que foi de aproximadamente 4.36 log₁₀. Para os grupos P+L+75, P+L+125 e P+L+ 150mg/L observou-se uma redução de 0.22, 2.72 e 2.43 log₁₀, respectivamente.

5.3 Avaliação dos grupos controles - Animais expostos somente à luz ou somente ao FS.

O objetivo da avaliação dos grupos de animais expostos somente à luz ou ao FS foi para verificar um possível efeito tóxico desses fatores isoladamente. Dessa maneira, a análise desses grupos de dados

também inclui o subgrupo P-L-, possibilitando a comparação dos valores obtidos em cada subgrupo em relação ao controle positivo.

O grupo controle foi formado por 5 subgrupos, representados pela utilização de fotossensibilizador (FS), dose de luz ou nenhum deles como descrito no Quadro 1 (Materiais e métodos). Inicialmente procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo. Na Tabela 8 estão apresentadas as principais medidas tendência central e de variabilidade dos grupos controle. Cada grupo foi formado por 5 unidades amostrais cujas medidas são expressas em \log_{10} (UFC/mL).

Tabela 8 - Medidas de tendência central e de variabilidade dos grupos controle

Grupos	Média	Mediana	Variância	Desvio	Coef. Variação	Máx	Min
				Padrão	(%)		
P-L-	4,9321	4,5105	0,4062	0,6373	12,9215	5,6812	4,3909
P+L- 75	5,4169	5,4014	0,0455	0,2133	3,9379	5,7259	5,1987
P+L- 100	5,0647	5,1875	0,1282	0,3581	7,0701	5,3424	4,4378
P+L- 125	4,6934	4,549	0,1512	0,3888	8,2841	5,2553	4,3579
P+L- 150	4,8428	4,9685	0,2387	0,4886	10,0895	5,2695	4,1271
P-L+	4,8450	4,8299	0,1391	0,373	7,6978	5,3385	4,301

Os resultados acima apresentados demonstram que parece haver semelhança entre as medidas de tendência central (média e mediana) para os seis subgrupos. Para confirmar ou rejeitar a hipótese de que o comportamento nesses subgrupos é semelhante, procedeu-se a análise estatística inferencial.

De forma semelhante ao executado para os grupos experimentais, um modelo linear paramétrico foi utilizado, de modo que ANOVA pode ser realizada. Neste caso os resíduos de modelo linear utilizados apresentaram normalidade e homogeneidade de variâncias

(testes de Levene e Shapiro-Wilks, respectivamente) a considerar um erro de 5%. Dessa maneira o procedimento adotado foi o estudo de diferenças de médias pela Análise de Variância com um fator (*One-Way ANOVA*).

Sob a hipótese nula (H_0) de igualdade de médias com nível de significância de 5%, elaborou-se o seguinte quadro ANOVA representado pela Tabela 9.

Tabela 9 - Sumário da Análise de Variância para o estudo de \log_{10} (Ufc) em função dos grupos controles

	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Grupo	5	1,5916	0,3183	1,7223	0,1678
Residuo	24	4,4356	0,1848		

De acordo com o resultado exposto na Tabela 8, a H_0 não foi rejeitada, ou seja, foi aceita a existência de igualdade de médias a considerar o nível de significância de 5% (p – valor = 0,1464).

Dessa maneira, pode-se dizer que os grupos que utilizaram apenas o FS PDZ (P+L- 75, 100, 125 e 150mg/L) apresentaram médias estatisticamente iguais entre si, e que o uso da PDZ somente, não teve efeito na diminuição da viabilidade celular de *C. albicans* em comparação com o subgrupo P-L-. Semelhantemente, o uso da luz LED vermelha somente, também não causou efeito algum na viabilidade fúngica. Pôde-se verificar então que todos esses grupos apresentaram médias estatisticamente iguais ao grupo controle positivo (P-L-), como pode ser melhor observado no Gráfico 2.

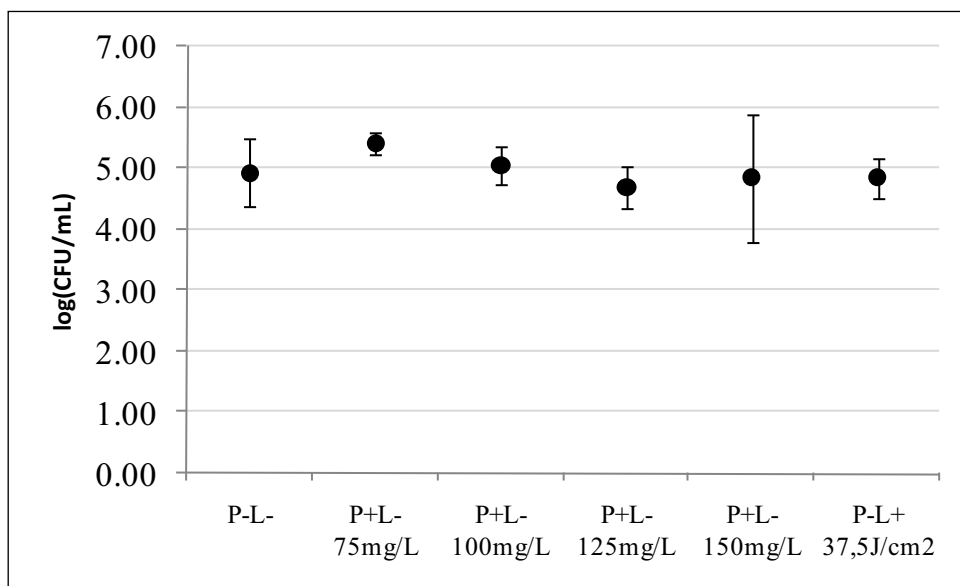


GRÁFICO 2 – Valores médios de \log_{10} (Ufc/mL) com os respectivos intervalos de confiança (95%) do grupo controle positivo (P-L-) e todos os outros grupos controles (P+L- 75mg/L, P+L- 100mg/L, P+L- 125mg/L, P+L- 150mg/L and P-L+).

5.4 Avaliação da análise histológica realizada nas línguas dos animais.

A análise histológica foi realizada nas línguas de todos os animais utilizados no estudo por meio de microscopia de luz com aumento de 200 vezes. Com relação aos grupos experimentais, nos cortes histológicos dos animais tratados com PDT 100mg/L de FS (grupo P+L+ 100), pôde-se observar o epitélio íntegro com discreta acantose e apenas algumas papilas epiteliais. O referido epitélio estava recoberto por uma espessa camada de ceratina livre da presença de fungo. O tecido conjuntivo subjacente ainda demonstrava alguns linfócitos em meio a fibroblastos, capilares sanguíneos e fibras de colágeno. As fibras musculares apresentavam características histológicas de normalidade. Tais características foram observadas em 3 espécimes deste grupo dos 5 avaliados (Figura 16). No 4º espécime, constatou-se discreta presença de

Candida albicans (hifas e blastóporos) em meio à delgada camada de ceratina, a qual recobria homoganeamente o epitélio ligeiramente acantótico. No 5º espécime observou-se intensa presença do micro-organismos (hifas e blastóporos) junto à camada de ceratina que reveste homoganeamente o epitélio acantótico (Figura 17).

Para o grupo P+L+ 125mg/L, foi possível observar por meio da análise histológica que em 3 espécimes avaliados havia presença do fungo (hifas e blastóporos) na camada de ceratina que recobre o epitélio acantótico e que tal epitélio apresentava poucas papilas. O tecido conjuntivo subjacente possuía poucos linfócitos em meio a fibroblastos, fibras colágenas e discretos capilares sanguíneos. Já o tecido muscular exibia características histológicas de normalidade (Figura 18). Nos outros 2 espécimes não se observou presença de micro-organismos na camada de ceratina, estando o tecido conjuntivo subjacente e o tecido muscular com características de normalidade (Figura 19).

Já os cortes histológicos realizados para o grupo P+L+ 150mg/L, em 4 espécimes havia presença de *Candida* as quais estavam em suas duas formas (hifas e blastóporos) em meio a camada de ceratina. Essa ceratina recobria o epitélio que se apresentava com acantose e com poucas papilas. O tecido conjuntivo subjacente demonstrou capilares sanguíneos e linfócitos em meio a fibroblastos e colágeno. Os feixes musculares apresentavam-se sem alterações (Figura 20). Em apenas 1 espécime não se observou contaminação da camada de ceratina. Neste caso, tanto o tecido epitelial, quanto o conjuntivo e o muscular exibiam características de normalidade (Figura 21).

Com relação ao grupo controle positivo, os cortes mostraram o epitélio da língua com discreta acantose e perda de grande número de papilas. A camada de ceratina que reveste esse epitélio apresentava-se com grande quantidade do fungo, *C. albicans*, o qual estava presente tanto na forma de hifas/pseudohifas quanto blastóporos. O tecido conjuntivo subjacente exibia discreta reação inflamatória com predomínio

de linfócitos em meio a fibroblastos, fibras colágenas e pequena quantidade de capilares sanguíneos. As fibras musculares estavam organizadas em feixes sem alterações significativas. De maneira geral, observou-se atrofia lingual (Figura 22). É importante ressaltar que o subgrupo P+L+75mg/L apresentou características histológicas semelhantes ao controle positivo para todos os espécimes avaliados.

De acordo com a análise realizada, os cortes histológicos dos demais grupos controles, que constituem os subgrupos (P+L- 75, P+L-100, P+L-125, P+L-150 e P-L+ 37,5J/cm²) que utilizaram apenas fotossensibilizador ou apenas luz, exibiam discreta acantose e perda de grande número de papilas. A camada de ceratina que reveste esse epitélio apresentava-se com grande quantidade do fungo, *C. albicans*, o qual estava tanto na forma de hifas/pseudohifas quanto blastóporos. O tecido conjuntivo subjacente exibia discreta reação inflamatória com predomínio de linfócitos em meio a fibroblastos, fibras colágenas e pequena quantidade de capilares sanguíneos. As fibras musculares estavam organizadas em feixes sem alterações significativas. De maneira geral, observou-se atrofia lingual. Tais características histológicas foram semelhantes às observadas no grupo controle positivo (Figura 23)

Os cortes histológicos do grupo controle negativo exibiam epitélio íntegro com espessa camada de ceratina e numerosas papilas epiteliais curtas quando comparada ao controle positivo. O tecido conjuntivo subjacente apresentou numerosos fibroblastos em meio às fibras colágenas e capilares sanguíneos. As fibras musculares estavam organizadas em feixes com características histológicas de normalidade (Figura 24).

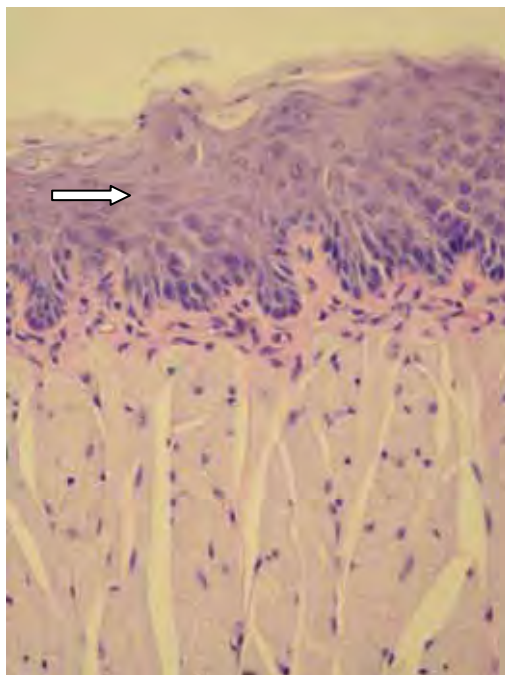


FIGURA 16 - (Grupo P+L+100): Epitélio íntegro com discreta acantose (seta) e recoberto por espessa camada de ceratina. Ausência de hifas/pseudohifas. Tecidos conjuntivo e muscular com características histológicas de normalidade. Observado em 3 espécimes.

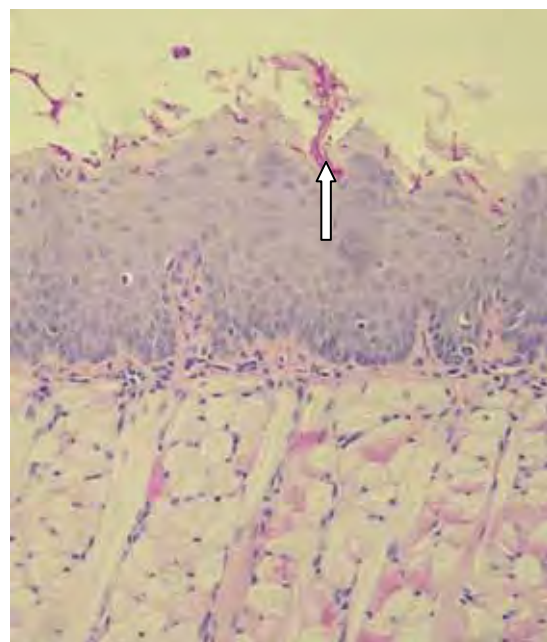


FIGURA 17 - (Grupo P+L+100): Presença de hifas/pseudohifas (seta) em meio à delgada camada de ceratina que recobre o epitélio ligeiramente acantótico. Observado em 2 espécimes.

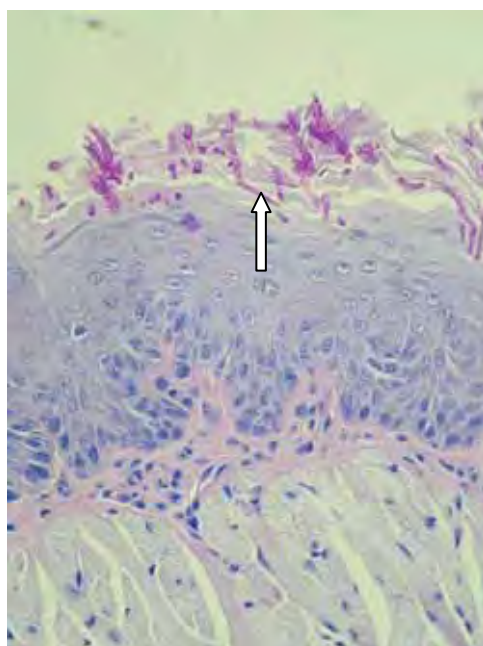


FIGURA 18 - (Grupo P+L+125): Presença de hifas/pseudohifas (seta) em meio à delgada camada de ceratina que recobre o epitélio acantótico. Observado em 3

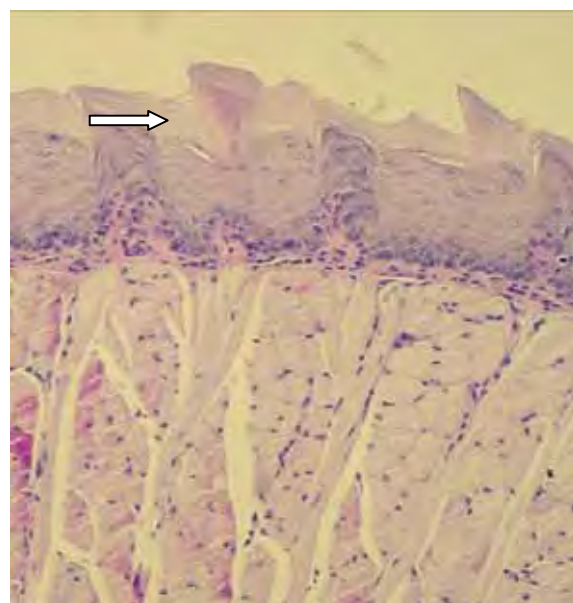


FIGURA 19 - (Grupo P+L+125): Ausência de micro-organismos na camada de ceratina (seta) que apresentava-se sem alterações. Observado em 2 espécimes.

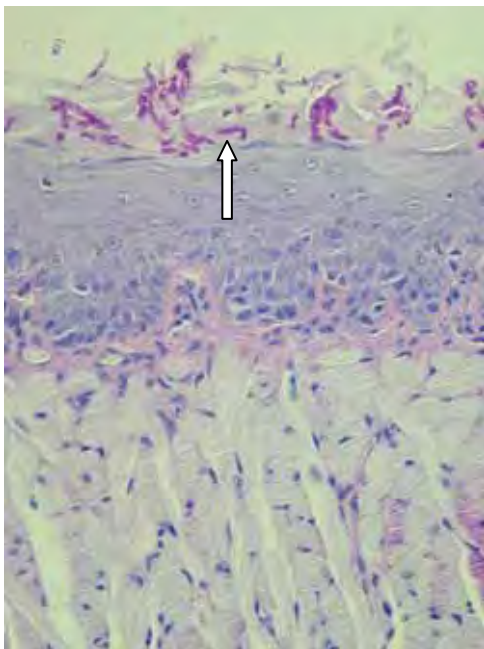


FIGURA 20 - (Grupo P+L+150): Presença de hifas (seta) e blastóporos em meio à camada de ceratina recobrando o epitélio acantótico. Foi observado em 4 espécimes.

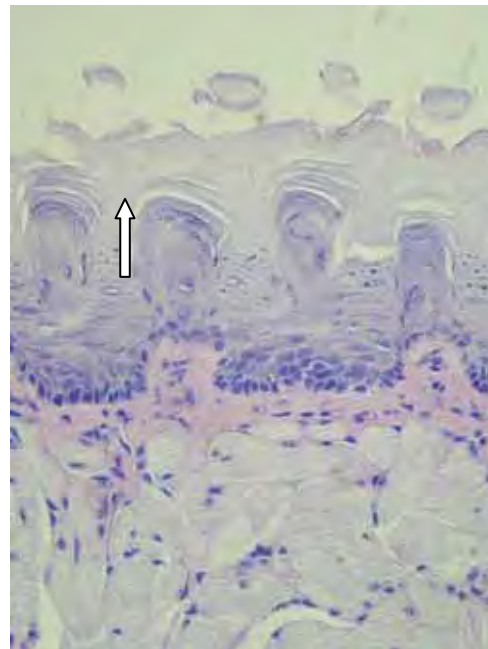


FIGURA 21 - (Grupo P+L+150): Observou-se em 1 espécime desse grupo, ausência de fungo na camada de ceratina (seta). Tecidos epitelial, conjuntivo e muscular sem alterações.

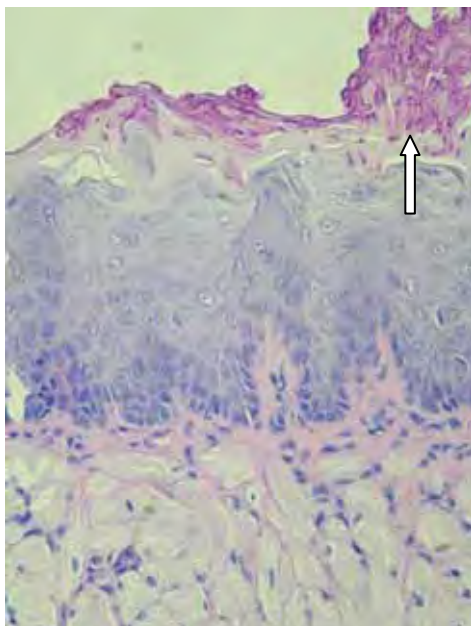


FIGURA 22 - (Grupo P-L- e P+L+75): Epitélio acantótico, com presença de hifas/pseudohifas (seta) e blastóporos. Tecido conjuntivo adjacente com discreta reação inflamatória. Observado nos 5 espécimes de cada grupo.

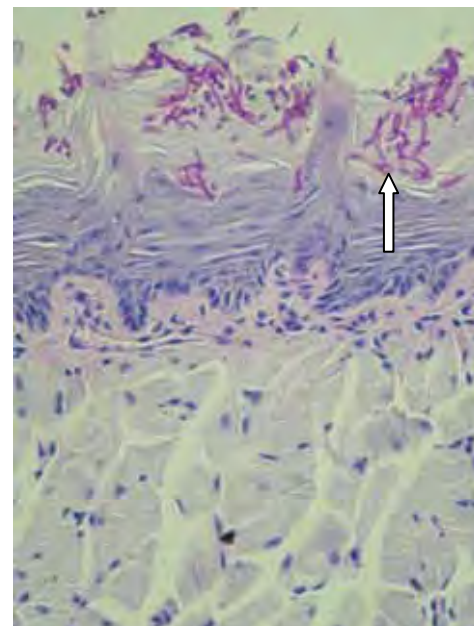


FIGURA 23 - (Grupos P+L- e P-L+): Presença de numerosas hifas/pseudohifas e blastóporos (seta) semelhantemente ao grupo P-L-. Observado em todos os espécimes.

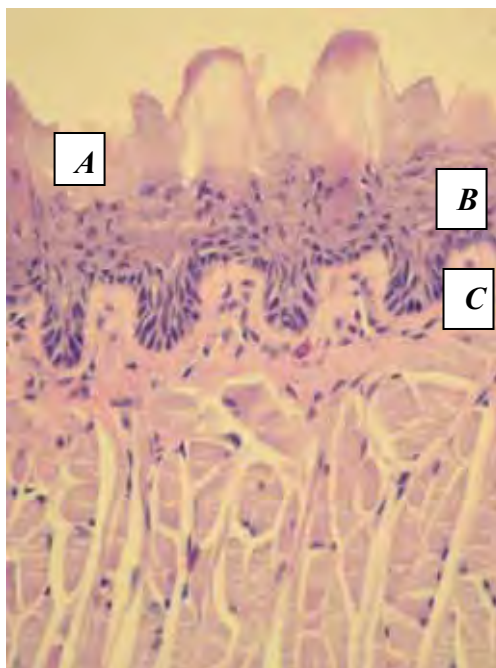


FIGURA 24 - (Grupo CN): Espessa camada de ceratina (A), epitélio íntegro (B), tecido conjuntivo com numerosos fibroblastos em meio à colágeno e capilares (C). Ausência de microorganismos nos 5 espécimes avaliados.



Discussão

6 DISCUSSÃO

A *Candida albicans* é considerada a principal espécie fúngica relacionada ao desenvolvimento da candidose oral, que é uma das infecções mais prevalentes em humanos¹¹. A literatura disponível sugere que este patógeno atua de forma oportunista, dessa forma, algumas alterações locais e sistêmicas tais como hábito de fumar, alterações de pH, uso de próteses removíveis, xerostomia, diabetes melitus, imunossupressão por drogas, e o uso de antibióticos de amplo espectro podem atuar como fatores predisponentes ao desenvolvimento da infecção por *Candida*³⁰. A forma mais comum de candidose oral é conhecida como estomatite protética, uma infecção que se desenvolve após adesão, colonização e proliferação de espécies fúngicas e bacterianas nos tecidos bucais e nas superfícies internas das próteses^{9,37}.

A Terapia Fotodinâmica, PDT, vem sendo apontada como um método alternativo na inativação microbiana, incluindo alguns tipos de vírus, bactérias e fungos^{7,13,40,59-60}. A inativação de espécies de *Candida* por meio da PDT também tem sido relatada por autores que realizaram estudos *in vitro*^{6-7,24,27,58}. Dessa maneira, o processo de inativação fotodinâmica é baseado na administração de um fotossensibilizador (FS). A subsequente irradiação com luz visível, na presença de oxigênio produz danos celulares que inativam os micro-organismos. Alguns estudos têm sugerido que o efeito da PDT sobre células fúngicas depende das propriedades do fotossensibilizador utilizado^{22,55}. Um FS para ser considerado efetivo deve conseguir absorver luz visível, sendo excitado ao seu estado triplo e então transferir energia ao oxigênio molecular. De forma geral, os FSs são aplicados externamente à célula e, por isso, a membrana celular do micro-organismo parece ser o alvo inicial do processo fotodinâmico²¹.

O Photodithazine (PDZ), um derivado de clorina e_6 , é uma nova substância fotossensibilizadora que vem sendo utilizada na terapia fotodinâmica. De acordo com alguns estudos este composto tem mostrado maior eficiência fotodinâmica em relação às porfirinas e hematoporfirinas^{23,40}. O PDZ já mostrou sua eficiência fotodinâmica quando foi associado a uma luz visível para inativação de suspensões celulares de *C. guilliermondii*⁴⁸. O mesmo composto também comprovou sua eficiência em um estudo que avaliou a fotoinativação de placa bacteriana em modelo de biofilme oral. Nesse estudo os autores concluíram que o PDZ pode ser utilizado na terapia fotodinâmica para o tratamento de periodontite crônica, pois reduziu a formação de biofilme em aproximadamente 80%⁴⁶. Entretanto o número de estudos in vivo realizados com o objetivo de confirmar a efetividade da PDT na inativação de *Candida* spp é escasso^{28,35,52}.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade da PDT na inativação de *C. albicans* presentes no dorso da língua de camundongos em um modelo de candidose oral. Os resultados demonstraram que a PDT promoveu uma redução significativa na viabilidade celular de *C. albicans* coletadas da língua dos animais, quando comparadas com os animais do grupo controle positivo (P-L-). Estes resultados estão de acordo com os de Teichert et al.⁵² e Mima et al.³⁵ que também comprovaram a efetividade da PDT na inativação de *Candida* spp. De acordo com a análise estatística realizada, os resultados do presente estudo não demonstraram diferença significativa entre os grupos tratados com PDT que utilizaram 100, 125 e 150mg/L de PDZ. Entretanto, a utilização de 100mg/L resultou na maior redução de células de *C. albicans*, que foi equivalente a 4.36 \log_{10} . É importante ressaltar que a inativação total de *C. albicans* foi verificada em três animais pertencentes a este grupo experimental após a PDT. Alguns estudos têm demonstrado a fotoinativação de *C. albicans* por meio da PDT mediada por azul de metileno⁵² e porfirinas³⁵. Teichert et al.⁵² utilizou elevadas concentrações

de azul de metileno (450 a 500µg/L) para obter a erradicação de *C. albicans*, sendo a maior redução obtida de aproximadamente 3 log₁₀. No estudo conduzido por Mima et al.³⁵, o FS Photogem® foi utilizado nas concentrações de 400, 500 e 1000mg/L e a redução na viabilidade celular encontrada foi de 1.05, 1.59 e 1.40 log₁₀, respectivamente. Além disso, estes estudos utilizaram altas doses de luz para obter fotoinativação fúngica, quando comparados com o presente estudo.

As diferentes concentrações de FS e doses de luz necessárias para fotoinativação em cada estudo mencionado pode ser justificada pela natureza de cada FS utilizado. Os derivados de clorina e₆ são eficientes FSs com alta formação de oxigênio singlete, dessa maneira, baixas concentrações de substância fotossensibilizadora podem ser necessárias para promover efetividade na PDT^{23,48}. Além disso, esse alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, faz com que o tempo de iluminação seja reduzido. No entanto, é importante ressaltar que o uso de PDZ em elevadas concentrações tais como 125, 150mg/L, não aumentou a efetividade da PDT no presente estudo. Esses resultados corroboram àqueles observados por Mima et al.³⁵, que utilizou um FS derivado de porfirina em altas concentrações como mencionado anteriormente. Tem sido sugerido a possibilidade de formação de agregados da substância fotossensibilizadora quando esta é utilizada em altas concentrações e isso pode ser a causa da redução da eficácia terapêutica da droga. A agregação ocasiona alteração no comportamento fotofísico da substância reduzindo o tempo de vida de um fotossensibilizador no seu estado triplete excitado, resultando em um decréscimo na sua eficiência fotodinâmica em produzir espécies reativas de oxigênio^{8,18}. Na presente investigação, o uso de 100mg/L de PDZ foi adequado para promover a inativação de *C. albicans*, já o aumento na concentração do FS pode não ser recomendado, devido à possibilidade de formação de agregados, o que pode fazer com que a efetividade da PDT seja reduzida.

As análises histológicas realizadas demonstraram que a PDT não provocou reações adversas nos tecidos das línguas avaliadas, pois estes exibiam características histológicas de normalidade. Independente do tipo de tratamento realizado, baixa resposta inflamatória foi observada nos tecidos subjacentes ao epitélio lingual de todos os animais que receberam inoculação por *Candida albicans*. Nas análises realizadas para os animais pertencentes ao grupo controle negativo (CN), ou seja, animais que não receberam inoculação por fungo, nenhuma resposta inflamatória nos tecidos linguais foi observada. Dessa maneira, pode-se sugerir que a reação inflamatória verificada nos tecidos dos camundongos que receberam tratamento pode estar associada à infecção por *Candida*, e não à PDT. Estes resultados são semelhantes aos observados no estudo conduzido por Mima et al.³⁵, no qual os autores verificaram baixa resposta inflamatória nos tecidos subjacentes ao epitélio lingual de todos os animais que receberam inoculação por *Candida albicans*, independente de terem sido submetidos à PDT. Todavia, Junqueira et al.²⁸ que avaliaram a efetividade da PDT em ratos com candidose oral induzida, verificaram poucas alterações epiteliais e menor resposta inflamatória nas línguas dos animais dos grupos tratados com PDT, quando comparados àqueles dos grupos que receberam apenas aplicação de luz. Essa divergência relacionada a intensidade da reação inflamatória observada nesses estudos pode ser justificada pela utilização de diferentes fotossensibilizadores, tempos de iluminação assim como diferentes metodologias de indução de candidose oral. É importante ressaltar que as análises dos cortes histológicos realizados para os grupos tratados com PDT demonstraram a presença de pequeno número de hifas na camada de ceratina, em comparação com o grupo controle positivo (P-L-). Adicionalmente, verificou-se a presença de hifas/pseudohifas na camada de ceratina nas línguas dos animais dos grupos P+L-, P-L+ e P-L-. Não foi observado invasão de hifas no epitélio lingual. Os resultados do presente estudo podem ser comparados àqueles

encontrados por Teichert et al.⁵², Junqueira et al.²⁸ e Mima et al.³⁵. Estes autores também verificaram presença de hifas/pseudohifas na camada de ceratina, sem invasão das mesmas nas camadas epiteliais. No entanto, na investigação conduzida por Takakura et al.⁵⁰, a análise realizada demonstrou numerosas hifas no epitélio do dorso das línguas dos animais e destruição das camadas epiteliais.

Para indução de candidose oral em camundongos a metodologia utilizada neste estudo promoveu lesões brancas ou pseudomembranosas no dorso da língua de todos os animais avaliados associadas a valores médios de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de *C. albicans* equivalentes a 10^{4-5} UFC/mL. Esses valores são semelhantes àqueles encontrados por Mima et al.³⁵ (10^{4-5} UFC/mL), que também verificaram a presença de lesões brancas e pseudomembranosas nas línguas dos camundongos. Esses resultados corroboram parcialmente àqueles verificados por Takakura et al.⁵⁰ que embora tenham observado lesões brancas, constataram maiores valores de UFC de *Candida* coletados da cavidade oral dos mesmos (10^{5-6} UFC/mL). A semelhança nos valores de UFC/mL observados entre a presente investigação e o estudo realizado por Mima et al.³⁵ pode ser atribuída às cepas de *C. albicans* utilizadas para a indução da infecção bucal. Nesses estudos, utilizou-se uma cepa de referência (ATCC) para indução de candidose, enquanto que na investigação de Takakura et al.⁵⁰, os autores utilizaram um isolado clínico de um paciente com candidíase cutânea. Tem sido demonstrado que isolados clínicos provenientes de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou de pacientes com estomatite protética apresentam maior adesão às células epiteliais do que os isolados provenientes de indivíduos saudáveis^{32,43,49}.

Diferentes investigações in vivo vêm sendo conduzidas para o desenvolvimento de metodologias de indução de candidose em animais, de forma a se obter infecções reprodutíveis e semelhantes ao observado em humanos^{25-26,52-54}. Teichert et al.⁵² utilizou um protocolo no qual os

camundongos utilizados apresentavam imunodeficiência combinada severa (SCID) para indução de candidose oral, e coletou aproximadamente 2×10^2 CFU/mL de *Candida* spp. da cavidade bucal dos animais infectados. Outro exemplo de técnica foi a indução de *C. albicans* por meio da sialoadenectomia conduzida por Jorge et al.²⁵ Nesse estudo, os ratos utilizados tiveram a maioria de suas glândulas salivares removidas cirurgicamente. Os autores observaram que durante todo o período experimental, os animais sialoadenectomizados apresentaram infecção por *C. albicans* mais intensa quando comparados aos animais normais⁵³⁻⁵⁴, sendo o número médio de *C. albicans* recolhidos da cavidade oral dos animais com xerostomia de aproximadamente $3,73 \times 10^4$ UFC/mL. Recentemente, um estudo clínico realizado com pacientes com candidose oral demonstrou que o número médio de células viáveis de espécies de *Candida* coletadas da mucosa bucal desses indivíduos era em torno de $4,14 \times 10^5$ UFC/mL³⁷. Nakajima et al.³⁶, determinaram a quantidade de *Candida* spp. da cavidade oral de pacientes com lesões orais de candidose. O valor médio em UFC/mL obtido de células fúngicas coletadas da saliva desses indivíduos foi de $158,3 \times 10^3$. Dessa maneira, pode-se sugerir que o método de indução de candidose oral por meio de imunossupressão utilizado no presente estudo parece ser o mais reprodutível da infecção, uma vez que esse método promoveu valores médios de células de *Candida* semelhantes àqueles encontrados em pacientes com essa infecção.

Com base na análise estatística desta investigação foi possível ainda observar que não houve diferença significativa entre o grupo controle positivo (P-L-) com os grupos P+L- (P+L- 75, P+L- 100, P+L- 125 e P+L- 150) e P-L+. A utilização apenas de PDZ e/ou a aplicação de luz LED somente não causou danos às células de *C. albicans*. O efeito fungicida da luz laser na ausência de FS foi demonstrado em estudos conduzidos por Maver-Biscanin et al.³³⁻³⁴. Esses resultados não estão de acordo com os obtidos no presente estudo, no

qual o tipo de luz utilizado não foi tóxico às células fúngicas. As divergências entre os estudos acima mencionados podem ser atribuídas às diferentes doses e intensidades de luz aplicadas nos experimentos. Adicionalmente, o tipo de luz utilizado também foi diferente, uma vez que nesta investigação utilizou-se luz LED, e nas realizadas por Maver-Biscanin et al.³³⁻³⁴, a luz utilizada foi laser. Em outra investigação³⁵ os autores também fizeram uso de luz LED assim como no presente estudo, e verificaram que o uso desse tipo de luz somente ou a aplicação de FS apenas, não causou danos às células de *C. albicans*.

Considerando os resultados do presente estudo juntamente com aqueles obtidos nas investigações anteriormente mencionadas, é possível sugerir que o modelo animal experimental de candidose bucal utilizado foi um método adequado para a reprodução dessa infecção, e que a PDT foi efetiva na redução da viabilidade celular de *C. albicans* presentes nas lesões. A associação da indução de candidose oral em modelos animais experimentais e o subsequente tratamento por meio da PDT parecem simular adequadamente situações encontradas clinicamente. Entretanto, os resultados da presente investigação não podem ser extrapolados à situações clínicas uma vez que os indivíduos apresentam variações em suas condições orais como diferentes hábitos alimentares, composição da microbiota oral e diferente fluxo salivar. Dessa maneira, estudos futuros são necessários para se determinar parâmetros clínicos efetivos para uma adequada resposta à PDT em pacientes com candidose oral.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais avaliadas os resultados obtidos permitiram concluir que:

- A PDT promoveu redução significativa dos valores de UFC/mL de *C. albicans* presentes nas lesões bucais dos camundongos com candidose oral induzida por meio da aplicação de 100, 125 e 150mg/L de PDZ;
- A PDT, com a utilização de 100mg/L de FS resultou na maior redução de células de *C. albicans* que foi equivalente a 4.36 log₁₀;
- A PDT não provocou efeitos adversos nos tecidos das línguas dos animais avaliados, independente das condições experimentais;
- O PDZ possui adequada ação antifúngica podendo ser considerado um FS efetivo para ser utilizado em PDT;
- O método de indução de candidose utilizado foi adequado para reprodução dessa infecção.



Referências

8 REFERENCIAS*

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002; 78: 455-9.
2. Allen CM, Rossie KM, Haring JI, Beck FM. Resolution of candidal lesions of the dorsal rat tongue by ketoconazole. *J Oral Pathol.* 1988; 17: 158-63.
3. Allen CM. Animal models of oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78: 216-21.
4. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc.* 1995; 61: 199-200, 203-5.
5. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist.* 2001; 21: 4-8.
6. Bertoloni G, Reddi E, Gatta M, Burlini C, Jori G. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 1989; 135: 957-66.
7. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-6.
8. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 2001; 57: 9513-47.
9. Budtz-Jorgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32: 1859-63.
10. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J Dent.* 1994; 22: 273-8.

* De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

11. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9: 327-35.
12. Chabrier-Rosello Y, Foster TH, Perez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 4288-95.
13. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001; 183: 5385-94.
14. Chlorin e₆-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2009; 6: 94-6.
15. Costerton, JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284: 1318-22.
16. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2329-35.
17. De Rosa FS, Bentley MVLB. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. Pharm Res. 2000; 17: 1447-55.
18. Derosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. Coord Chem Rev. 2002; 233: 351-71.
19. DeSimone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Phys Ther. 1999; 79: 839-46.
20. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. Arch Oral Biol. 1992; 37: 883-7.
21. Donnelly RF, MsCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res. 2008; 163: 1-12.

22. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant. *Mycoses*. 2009; 2 [Epub ahead of print].
23. Ferreira J, Menezes PFC, Kurachi C, Sibata C, Allison RR, Bagnato VS. Photostability of different chlorine photosensitizers. *Laser Phys Lett*. 2008; 5: 156-61.
24. Jackson Z, Meghji S, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med Sci*. 1999; 14: 150-7.
25. Jorge AOC, Totti MAG, Almeida OP, Scully C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. *J Oral Pathol Med*. 1993; 22: 54-6.
26. Jorge AOC, Totti MAG, Almeida OP, Scully C. Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. *J Oral Pathol Med*. 1993; 22: 138-40.
27. 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: 468-81.
28. Junqueira JC, Martins JS, Faria RL, Colombo CED, Jorge AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009; 1.
29. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994; 72: 283-8.
30. Lambrechts SAG, Aalders MCG, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 2026-34.

31. Lopez-Ribot J, McAtee R, Perea S. Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* coexist during episodes of orofaringeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1621-30.
32. Lyon LP, de Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 632-38.
33. Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V, Biscanin A. Fungicidal effect of diode laser irradiation in patients with denture stomatitis. *Lasers Surg Med.* 2004; 35: 259-62.
34. Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V. Effect of low-level therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis – Case report. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 328-32.
35. Mima EGO, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CAS, Kurashi C et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine modelo of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 392-401.
36. Nakajima J, Papaah P, Yoshizawa M, Marotta F, Nakajima T, Mihara S et al. Effect of a novel phyto-compound on mucosal candidiasis: Further evidence from an ex vivo study. *J Dig Dis.* 2007; 8: 48-51.
37. Neppelenbroek, KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008; 35: 836-46.
38. Oschner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1997; 39: 1-18.
39. Park JH, Moon YH, Bang IS, Kim YC, Kim SA, Ahn SG et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorine e₆. *Laser Med Sci.* 2010; 25: 705-10.

40. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei Jr G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 2005; 50: 353-9.
41. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of Candida species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. J Prosthet Dent. 2005; 93: 288-93.
42. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 398-429.
43. Schwab U, Milatovic D, Braveny I. Increased adherence of Candida albicans to buccal epithelial cells from patients with AIDS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16: 848-51.
44. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1994; 5: 125-57.
45. Seneviratne CJ, Silva WJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of Candida albicans and Candida glabrata. Arch Oral Biol. 2009; 54: 1052-60.
46. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: Enhancement of photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. Lasers Surg Med. 2003; 33: 161-68.
47. Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different Candida species by low power laser light. J Photochem Photobiol B. 2006; 83: 34-8.
48. Strackhovskaya MG, Belenikina NS, Ivanova EV, Chemeris YK, Stranadko EF. The photodynamic inactivation of the yeast Candida guilliermondii in the presence of photodithazine. Microbiology. 2002; 71: 345-48.
49. Sweet SP, Cookson S, Challacombe SJ. Candida albicans isolates from HIV-infected and AIDS patients exhibited enhanced adherence to epithelial cells. J Med Microbiol 1995; 43: 452-57.

50. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Ushida K, Yamaguchi H et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol.* 2003; 47: 321-26.
51. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P et al. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin (e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1402-10.
52. Teichert MC, Jones MD, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 155-60.
53. Totti MAG, Jorge AOC, Santos EB, Almeida OP, Scully C. Implantation of *Candida albicans* and other *Candida* species in the oral cavities of rats. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25: 308-10.
54. Totti MAG, Santos EB, Almeida OP, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. *Braz Oral Res.* 2004; 18: 202-7.
55. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 13-28.
56. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 382-402.
57. Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J.* 1998; 185: 380-4.
58. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22: 354-7.
59. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Brugnera Jr A, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 324-30.

60. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 2001; 144: 274-8.



Apêndices

APÊNDICE 1

- 5000mg/L – concentração de solução de PDZ.
- Preparo de Concentração de 75mg/L de PDZ para o volume final de 400µL (5 animais com aplicação de 70µL em cada):

5000mg/L----- 100%

75mg/L ----- x

X = 1,5%

400µL -----100%

y ----- 1,5%

y = **6µL de PDZ**

394µL se solução salina

- Preparo de Concentração de 100mg/L de PDZ para o volume final de 400µL (5 animais com aplicação de 70µL em cada):

5000mg/L----- 100%

100mg/L ----- x

X = 2%

400µL -----100%

y ----- 2%

y = **8µL de PDZ**

392µL se solução salina

- Preparo de Concentração de 125mg/L de PDZ para o volume final de 400µL (5 animais com aplicação de 70µL em cada):

5000mg/L----- 100%

125mg/L ----- x

X = 2,5%

400µL -----100%

y ----- 2,5%

y = **10µL de PDZ**

390µL se solução salina

- Preparo de Concentração de 100mg/L de PDZ para o volume final de 400 μ L (5 animais com aplicação de 70 μ L em cada):

5000mg/L----- 100%

150mg/L ----- x

X = 3%

400 μ L -----100%

y ----- 3%

y = **12 μ L de PDZ**

388 μ L se solução salina

APÊNDICE 2

Cálculo do tempo de iluminação:

$$\text{Dose de luz (J/cm}^2\text{)} = \text{Potência (W/cm}^2\text{)} \times \text{Tempo de iluminação (seg)}$$

$$\text{Dose de luz} = 37,5\text{J/cm}^2$$

$$\text{Potência do aparelho} = 44,5\text{mW} = 0,0445\text{W}$$

$$37,5\text{J/cm}^2 = 0,0445\text{W/cm}^2 \times T$$

$$T = 833,33 \text{ segundos} \div 60 = \mathbf{14 \text{ minutos de iluminação}}$$

APÊNDICE 3

Tabela 1A – Valores originais obtidos da coleta de *C. albicans* ATCC, das línguas dos camundongos submetidos a PDT, após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Grupos PDT	Amostra	Número de colônias viáveis			Ufc/mL	Log ₁₀
		Duplicata 1	Duplicata 2	Média		
P+L+ 75 mg/L	1	52	44	48	1,92E+05	5,283303
	2	54	31	42,5	1,70E+04	4,230474
	3	203	110	156,5	6,26E+04	4,796581
	4	37	32	34,5	1,38E+05	5,139882
	5	31	35	33	1,32E+04	4,120607
P+L+ 100 mg/L	1	3	14	8,5	3,40E+02	2,532754
	2	0	0	0	0,00E+00	0
	3	0	0	0	0,00E+00	0
	4	18	9	13,5	5,40E+02	2,733197
	5	0	0	0	0,00E+00	0
P+L+ 125 mg/L	1	0	0	0	0,00E+00	0
	2	0	0	0	0,00E+00	0
	3	31	42	36,5	1,46E+05	5,164356
	4	153	132	142,5	5,70E+04	4,755882
	5	0	3	1,5	6,00E+01	1,78533
P+L+ 150 mg/L	1	0	6	3	1,20E+02	2,082785
	2	13	18	15,5	6,20E+02	2,793092
	3	0	0	0	0,00E+00	0
	4	111	122	116,5	4,66E+03	3,668479
	5	17	13	15	6,00E+02	2,778874

Tabela 2A – Valores originais obtidos da coleta de *C. albicans* ATCC, dos camundongos submetidos apenas a luz ou ao FS ou aqueles que receberam apenas inoculação fúngica ou não receberam tratamento algum, após 48 horas da semeadura em placas de Petri.

Grupos Controles	Amostra	Número de colônias viáveis				
		Duplicata 1	Duplicata 2	Média	Ufc/mL	Log ₁₀
P-L+ 37,5J/cm ²	1	56	53	54,5	2,18E+05	5,338458
	2	182	156	169	6,76E+04	4,829953
	3	140	170	155	6,20E+04	4,792399
	4	51	49	50	2,00E+04	4,301052
	5	100	114	107	9,19E+04	4,96332
P+L- 75 mg/L	1	55	71	63	2,52E+05	5,401402
	2	38	41	39,5	1,58E+05	5,19866
	3	130	136	133	5,32E+05	5,725912
	4	96	67	81,5	3,26E+05	5,513219
	5	47	41	44	1,76E+05	5,245515
P+L- 100 mg/L	1	58	79	68,5	2,74E+04	4,437766
	2	48	62	55	2,20E+05	5,342425
	3	38	43	40,5	1,62E+05	5,209518
	4	46	31	38,5	1,54E+05	5,187524
	5	31	39	35	1,40E+05	5,146131
P+L- 125 mg/L	1	58	61	59,5	2,38E+04	4,376595
	2	82	95	88,5	3,54E+04	4,549016
	3	53	61	57	2,28E+04	4,357954
	4	226	198	212	8,48E+04	4,928401
	5	41	49	45	1,80E+05	5,255275
P+L- 150mg/L	1	21	24	22,5	9,00E+02	2,954725
	2	28	26	27	1,08E+03	3,033826
	3	47	46	46,5	1,86E+05	5,269515
	4	48	44	46	1,84E+05	5,2482
	5	50	31	35,5	9,30E+04	4,968464
P-L-	1	126	144	129	4,80E+05	5,681242
	2	73	87	80	3,20E+04	4,505164
	3	96	91	93,5	3,74E+05	5,572873
	4	66	57	61,5	2,46E+04	4,390953
	5	76	86	81	3,24E+04	4,510558
CN	1	0	0	0	0,00E+00	0
	2	0	0	0	0,00E+00	0
	3	0	0	0	0,00E+00	0
	4	0	0	0	0,00E+00	0
	5	0	0	0	0,00E+00	0



Anexo

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 05/2008

Araraquara, 02 de julho de 2008

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 02/07/2008, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Estudo in vivo da efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana na inativação de *Candida albicans*. Avaliação de dois fotossensibilizadores" (Proc. CEEA nº 05/2008) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL (JULHO/2011)**

Atenciosamente.


Profa. Dra. ELENY BALDUCCI ROSLINDO
Coordenadora do CEEA

À
Profª Drª ANA CLÁUDIA PAVARINA
a/c. Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa e Lívia Nordi Dovigo
Pesquisador Responsável
Nesta

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 28 de março de 2011.

JULIANA CABRINI CARMELLO