

ELISABETE PIVA

BIOFILMES HETEROTÍPICOS FORMADOS POR *C.albicans*
E ESPÉCIES NÃO *albicans*: estudo da interação
microbiana e da sensibilidade à terapia fotodinâmica



2012

ELISABETE PIVA

**BIOFILMES HETEROTÍPICOS FORMADOS POR *C. albicans* E
ESPÉCIES NÃO *albicans*: estudo da interação microbiana e da
sensibilidade à terapia fotodinâmica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE do Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2012

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

P688b Piva, Elisabete.

Biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* e espécies não *albicans*: estudo da interação microbiana e da sensibilidade à terapia fotodinâmica / Elisabete Piva. - São José dos Campos : [s.n.], 2012.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.
Orientador: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira.

1. Candida. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Biofilme heterotípico. 4. LED. 5. Eritrosina. I. Junqueira, Juliana Campos. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 29 de Maio de 2012 .

Assinatura :

E-mail: elisabete.piva@gmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back-Brito

Faculdade de Pindamonhangaba - FAPI

São José dos Campos, 23 de julho de 2012.

DEDICATÓRIA

A Deus, pela oportunidade.

A minha querida mãe, Nilzete Panighel Piva (in memoriam), sempre presente através de tudo o que me ensinou, um exemplo de determinação e fé e, ao meu pai, Waldeir Piva, por todo o apoio, compreensão e integridade. Agradeço pela dedicação e amor imensurável em toda a minha vida.

Ao meu noivo, Leonardo Gomes Vitti, pelo companheirismo e paciência durante a realização deste projeto, e à sua família, em especial, à sua querida mãe Maria Zélia Gomes Vitti, pelo carinho e amizade que me ajudaram a seguir em frente.

Aos meus colegas de trabalho da Prefeitura Municipal de São José dos Campos sempre tão compreensivos para que eu pudesse conciliar os trabalhos e os estudos.

A minha querida família e amigos, compreensivos pela minha distância. Agradeço pelo carinho e apoio em todos os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“Na longa história da espécie humana (e do gênero animal, também), prevaleceram os indivíduos que aprenderam a colaborar e a improvisar com mais eficácia.”

Charles Darwin

À Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, minha orientadora, pela dedicação, apoio em todos os momentos e pela amizade e confiança que depositou em mim. Agradeço pelo seu exemplo como profissional e por suas conquistas admiráveis como pesquisadora, que só nos mostram o quanto vale a pena persistir por nossos ideais.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge por quem tenho grande admiração e respeito como profissional, uma referência na Microbiologia. Agradeço por todos os ensinamentos e exemplos de dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na pessoa do diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Tit. Estevao Tomomitsu Kimpara da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito e do vice coordenador Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa, sempre solícitos.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, pela ajuda em todos os momentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela paciência e colaboração, sempre amigos e prestativos.

A todos os funcionários da Biblioteca por terem colaborado nos momentos de dúvida.

A querida amiga e aluna de iniciação científica Jéssica Diane dos Santos, por toda a ajuda prestada, pela colaboração essencial para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A minha querida amiga Simone Furgeri, uma pessoa admirável. Agradeço por toda a presteza, paciência e carinho com que me ajudou no decorrer desse período. Pelo apoio em todos os momentos, sem o qual tudo teria se tornado mais difícil.

Aos amigos, alunos de Pós-Graduação, Rodnei e Junia, pela disposição, carinho, paciência e pelos momentos de descontração.

A todos os colegas de Pós-Graduação que, de alguma forma, colaboraram comigo: pela amizade, pelo trabalho, pela dedicação a pesquisa, sempre prestativos para compartilhar ensinamentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica da aluna Jéssica Diane dos Santos (processo 2011 / 10071-7).

A todos, enfim, que de forma direta ou indireta auxiliaram para que este trabalho pudesse ser concluído.

*“O futuro tem muitos nomes.
Para os incapazes o inalcançável
para os temerosos o desconhecido,
para os valentes a oportunidade.”*

Victor Hugo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 <i>Candida</i> spp e biofilme.....	19
2.2 Interação entre micro-organismos.....	27
2.3 Terapia Fotodinâmica	31
3 PROPOSIÇÃO.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Micro-organismos.....	38
4.2 Preparo da suspensão de <i>Candida</i>	38
4.3 Formação dos biofilmes monotípicos e heterotípicos	39
4.4 Microscopia eletrônica de varredura	40
4.5 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	41
4.6 Terapia Fotodinâmica	41
4.7 Análise do biofilme pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).....	43
4.8 Análise do biofilme por ensaio colorimétrico por XTT.....	44
4.9 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	46
5.2 Interação entre <i>C. albicans</i> e espécies não <i>albicans</i>	47
5.2.1 Resultados da contagem por UFC/mL.....	47
5.2.2 Resultados do ensaio colorimétrico por XTT	51

5.3 Terapia Fotodinâmica.....	53
5.3.1 Resultados da contagem de UFC/mL	53
5.3.2 Resultados do ensaio colorimétrico por XTT.....	55
6 DISCUSSÃO.....	57
7 CONCLUSÃO.....	66
8 REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO A.....	79
ANEXO B.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação do biofilme de <i>Candida</i> em placa de microtitulação de 96 poços	40
Figura 2 – Diodo Emissor de Luz (LED) – Multifuncional system Twin Flex II, MM Optics, São Carlos, Brasil	42
Figura 3 – Ensaio colorimétrico após redução do sal XTT, após 3h de incubação, com formação de formazan (laranja)	45
Figura 4 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura em biofilme formado por <i>C. albicans</i> (Ca), <i>C. glabrata</i> (Cg), <i>C. tropicalis</i> (Ct) e <i>C. krusei</i> (Ck)	46
Figura 5 – Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> quando organizadas em biofilmes monotípicos e heterotípicos	49
Figura 6 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> quando organizadas em biofilmes monotípicos e heterotípicos	49
Figura 7 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> quando organizadas em biofilmes monotípicos e heterotípicos	50

Figura 8 – Unidades formadoras de colônias dos biofilmes heterotípicos formados por: a) *C. albicans* e *C. glabrata*; b) *C. albicans* e *C. tropicalis*; c) *C. albicans* e *C. krusei* 50

Figura 9 – Média e desvio padrão dos dados de densidade óptica em biofilme monotípico formado por *C. albicans* (Ca) e biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* e *tropicalis* (Ct), *C. albicans* e *C. glabrata* (Cg), *C.albicans* e *C. krusei* (Ck). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0,05$) 52

Figura 10 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL para contagem de *C. albicans* quando organizada em biofilme monotípico e heterotípicos para os grupos F-L- e F+L+ 54

Figura 11 – Média e desvio padrão dos dados de densidade óptica para biofilme monotípico e heterotípicos para os grupos F-L- e F+L+ 56

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Ensaio experimentais em biofilme de <i>Candida</i>	43
Tabela 1 – Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) obtidos nos biofilmes monotípicos formados por <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> ou <i>C. krusei</i>	47
Tabela 2 – Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) obtidos nos biofilmes heterotípicos formados pela interação de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> , e <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	48
Tabela 3 - Estatística descritiva para os dados de densidade óptica dos biofilmes monotípicos formados por <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> ou <i>C. krusei</i>	51
Tabela 4 - Estatística descritiva dos biofilmes heterotípicos formados pela interação de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> , e <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	52
Tabela 5 – Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) de <i>C. albicans</i> e valor de <i>p</i> obtidos nos biofilmes monotípicos e heterotípicos formados pela interação de <i>C. albicans</i> e espécies não <i>albicans</i> , para os grupos F-L- e F+L+	54

Tabela 6 - Estatística descritiva e valor de <i>p</i> obtidos nos biofilmes monotípicos de <i>C. albicans</i> e heterotípicos formados pela interação de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> , e <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> nos grupos F-L- e F+L+.....	55
--	----

Piva E. Biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* e espécies não *albicans*: estudo da interação microbiana e da sensibilidade à terapia fotodinâmica [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

A maioria das infecções por *Candida* estão relacionadas com biofilmes microbianos, que muitas vezes são formados por associações de diferentes espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar as interações entre as diferentes espécies de *Candida* em biofilmes formados *in vitro* e verificar a sensibilidade dos biofilmes monotípicos de *C. albicans* e heterotípicos à terapia fotodinâmica (PDT). Foram estudadas cepas clínicas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. A partir de suspensões padronizadas de cada cepa (10^7 células/mL), biofilmes monotípicos e heterotípicos (formados por *C. albicans* e espécies não *albicans*) foram formados em placas de microtitulação de 96 poços durante 48 horas. A seguir, os biofilmes monotípicos de *C. albicans* e heterotípicos foram submetidos à PDT com fotossensibilizador eritrosina associado ao diodo emissor de luz (LED) verde. Os biofilmes foram analisados por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em HiCrome *Candida* por 48h e pela viabilidade celular através do ensaio colorimétrico XTT (2 metoxi 4 nitro 5 sulfofenil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazolium hidróxido). Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey. Tanto na contagem de UFC/mL quanto no ensaio colorimétrico XTT, foi observado que o crescimento de *C. albicans* em biofilme monotípico e heterotípicos com *C. tropicalis* e *C. glabrata* foi semelhante. Entretanto, foi inibido em biofilme heterotípico com *C. krusei*. Foi demonstrado também que a PDT reduziu a viabilidade celular e a contagem de UFC/mL tanto dos biofilmes monotípicos quanto heterotípicos. Concluiu-se que *C. albicans* estabeleceu relações favoráveis com *C. tropicalis* e *C. glabrata* e relações antagônicas com *C. krusei* em biofilmes heterotípicos. Além disso, os biofilmes monotípicos e heterotípicos foram sensíveis à PDT mediada por LED e eritrosina.

Palavras-chave: *Candida*. Terapia fotodinâmica. Biofilme heterotípico. LED. Eritrosina.

Piva E. *Heterotypic biofilms formed by C. albicans and non-albicans species: study of microbial interactions and sensitivity to photodynamic therap [dissertation].* São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

ABSTRACT

Most *Candida* infections are related to microbial biofilm, which are often formed by the association of different species. The objective of this study was to evaluate the interactions between different species of *Candida* biofilms in vitro and investigate the sensitivity of *C. albicans* monotypic biofilms and heterotypic biofilms to photodynamic therapy (PDT). From standardized suspensions of each strain (10^7 cells/ml), monotypic and heterotypic biofilms (formed by *C. albicans* and non-albicans species) were developed on flat-bottom 96-well microtiter plates for 48 hours. After that, *C. albicans* monotypic biofilms and heterotypic biofilms were subjected to PDT with photosensitizer erythrosine associated with green light emitting diode (LED). Biofilms were analysed by counting colony-forming units (CFU/ml) in *Candida* HiCrome for 48h and by cell viability using the XTT (2 methoxy 4 nitro 5 sulfophenyl 5 phenylamino carbonyl 2H tetrazolium hydroxide) colorimetric assay. The results were subjected to ANOVA and Tukey test. Both in the counting of CFU/ml as in the XTT colorimetric assay, it was observed that the growth of *C. albicans* in monotypic and heterotypic biofilm with *C. glabrata* and *C. tropicalis* was similar. However, it was inhibited in heterotypic biofilm with *C. krusei*. It was also demonstrated that PDT reduced cell viability and the number of CFU/mL of both monotypic and heterotypic biofilms. It was concluded that *C. albicans* had favorable interaction with *C. glabrata* and *C. tropicalis* and antagonistic interaction with *C. krusei* in heterotypic biofilms. In addition, both of monotypic and heterotypic biofilms were sensitive to LED- and erythrosine-mediated Photodynamic Therapy.

Keywords: *Candida*. Photodynamic therapy. Heterotypic biofilm. LED. Erythrosine.

1 INTRODUÇÃO

Na natureza, os micro-organismos estão organizados, predominantemente, em biofilme, uma comunidade microbiana complexa aderida a uma superfície biótica ou abiótica, envolvendo uma ou mais espécies numa matriz polimérica extracelular (Nadell et al., 2009; Peters et al, 2010).

A maioria das infecções microbianas estão relacionadas a formação de biofilme, particularmente as que envolvem materiais médico hospitalares como cateteres e próteses (Douglas, 2003), tornando as espécies mais resistentes às defesas do hospedeiro (Seneviratne et.al, 2008; Ramage et al., 2005).

Dentro desse contexto, as infecções fúngicas tem se destacado devido à capacidade que as espécies de *Candida* têm para formar biofilme (Seneviratne et al., 2009). As espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota comensal do homem, entretanto, na presença de fatores de predisposição são capazes de tornarem-se patogênicas; levando a infecções que podem evoluir de uma lesão superficial na mucosa à uma disseminação sistêmica (McMichael et al.,2004; Souza et al., 2010); podendo ter uma taxa de mortalidade de até 60% relacionada a candidoses invasivas (Eggimann et al., 2003).

Alguns fatores como fumo (Jayatilake et al., 2009), utilização de próteses (Espinoza et al., 2003; Emami et al., 2007) e condições de imunossupressão são importantes na predisposição para infecção por *Candida* (Tylenda et al., 1989), sendo a candidose considerada como a infecção bucal fúngica mais comum diagnosticada em humanos (Muzyka, 2005), com alta incidência em pacientes HIV positivos (Vandeputte et al., 2012) e transplantados (Silva et al., 2008). A

principal espécie envolvida nas infecções fúngicas é *Candida albicans* (Seneviratne et al., 2009).

As infecções das mucosas causadas por *Candida* spp. representam um problema significativo e, muitas vezes, são difíceis de serem tratadas devido à alta frequência de resistência aos antifúngicos convencionais (Chabrier et al., 2008). Em pacientes HIV positivos colonizados por *Candida* spp. a presença de cepas resistentes aos antifúngicos azóis pode chegar a 81% (Teichert et al., 2002).

Sendo assim, surge a necessidade de desenvolvimento de pesquisas por tratamentos antimicrobianos alternativos, incluindo a terapia fotodinâmica (PDT) (Souza et al., 2010; Oriel, Nitzan, 2010). A terapia fotodinâmica envolve um fotossensibilizador exógeno e uma fonte de luz com comprimento de onda adequado, que inicia uma reação celular fotoquímica com danos para as células de organismos procarióticos e eucarióticos (Souza et al., 2010; Oriel, Nitzan, 2010).

O fotossensibilizador ativado pode reagir com as moléculas em seu ambiente imediato, por transferência de elétrons e hidrogênio, levando à produção de radicais (reação tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio, gerando o oxigênio singlete altamente reativo (reação tipo II). Ambos os caminhos podem levar à morte celular (Lambrechts et al., 2005; Rossoni et al., 2010; Fotinos et al., 2008).

A terapia fotodinâmica possui várias características favoráveis para o tratamento de infecções originadas por micro-organismos patogênicos, incluindo um amplo espectro de ação, inativação eficiente de cepas resistentes aos antibióticos e baixo potencial mutagênico (Jori et al., 2006; Junqueira et al., 2009).

A eficácia da PDT depende da estrutura do fotossensibilizador, da modalidade de administração, da fonte de luz e do tipo de micro-organismo (Fritsch et al., 1998). Grande parte dos estudos de PDT sobre micro-organismos tem se concentrado no uso de porfirinas,

ftalocianinas e fenotiazinas como fotossensibilizadores (Perussi, 2007; Souza et al., 2010) associado ao laser de baixa potência. Porém, outras associações podem ser pesquisadas em busca da otimização dos resultados. A eritrosina é um fotossensibilizador pertencente à classe dos xantenos e tem completa aprovação para o uso na boca, sendo muito utilizada para evidenciar a presença de biofilme dentário (Wood et al., 2006).

Recentemente, o diodo emissor de luz (LED) surgiu como uma alternativa ao laser de baixa potência, devido ao seu menor custo e à facilidade de manuseio (Konopka, Goslinski, 2007) sendo promissor seu emprego na PDT (Dovigo et al., 2010).

Costa et al. (2011) demonstraram a sensibilidade de biofilme de *Candida albicans* à PDT mediada por LED e eritrosina. Costa et al. (2012) também verificaram que a PDT mediada por LED e pelo fotossensibilizador rosa bengala foi eficaz sobre biofilmes monotípicos formados por *C. albicans*. Pereira et al. (2011) demonstraram que a PDT teve eficácia sobre biofilmes heterotípicos formados pela associação de *Candida albicans* com espécies bacterianas.

Entretanto, todos os estudos de terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida* spp. foram desenvolvidos em modelos formados por apenas uma espécie de *Candida*; evidenciando-se assim, a necessidade de maiores estudos sobre a interação entre *C. albicans* e espécies não *albicans* e o comportamento de *C. albicans*, frente à PDT, quando associada à espécies não *albicans*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Candida* spp. e biofilme

As leveduras são os únicos fungos pertencentes à microbiota residente do homem, ocorrendo normalmente na cavidade bucal de indivíduos saudáveis. As leveduras do gênero *Candida* encontram-se comumente espalhadas na natureza, sendo que algumas espécies vivem como comensais ou parasitas no homem (Jorge, 2006). Para que se estabeleça uma infecção, o micro-organismo oportunista deve sobreviver à defesa imunológica do hospedeiro e ter mecanismos de invasão de tecidos (Yang, 2003). A imunossupressão causada em pacientes submetidos a transplante, uso de agentes quimioterápicos e, ainda, em portadores do vírus HIV, pode ser considerada como precursora para a instalação da infecção (Seneviratne et al., 2008).

Candida spp. é o agente causador de numerosas doenças que variam desde uma infecção superficial na mucosa, como candidose vulvovaginal e candidose orofaríngea, até uma doença sistêmica potencialmente fatal (Junqueira et al., 2009; Seneviratne et al., 2009; Vandeputte et al., 2012). As infecções fúngicas na cavidade bucal são causadas principalmente pela espécie *Candida albicans* (Cate et al., 2008; Souza et al., 2010), que constitui cerca de 70% dos fungos isolados (Jorge, 2006; Dovigo et al., 2010; Souza et al., 2010), estando comumente presente no dorso da língua, palato e mucosa bucal (Sardi et al., 2010). Sintomas como perda de peso, carência nutricional e anorexia podem estar relacionados à candidose bucal (Sharon, Fazel, 2010).

As candidoses bucais são o resultado da penetração de *Candida* nos tecido bucais quando a defesa imunológica do hospedeiro está comprometida, sendo este o fator determinante para iniciar a instalação da infecção (Cannon et al.,1995). Entretanto, as infecções mais graves causadas pelas espécies de *Candida* são as invasivas ou disseminadas sendo responsáveis por, aproximadamente, 20% das infecções que ocorrem em pacientes internados em UTI, devido em parte, às dificuldades de diagnóstico e ao número limitado de antifúngicos disponíveis. (MacCallum, 2011). Nos EUA, anualmente, os custos para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas causadas por *Candida* spp. chegam a aproximadamente 1,8 bilhão de dólares (Wilson et al., 2002; Moyes, Naglik, 2011).

Phelan et al. (1987) verificaram, em estudo realizado com 103 pacientes acometidos pela infecção pelo vírus HIV, que 90% deles apresentavam candidose bucal. Teichert et al. (2002) observaram que 81% dos pacientes HIV positivos eram colonizados por cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos azóis e que 74% desses pacientes apresentavam recolonização pela mesma cepa de *Candida* após 2 meses de tratamento, e 3% apresentavam cepas resistentes ao tratamento com anfotericina B.

A capacidade dos fungos e demais micro-organismos em causar doenças é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Os fatores de virulência mais importantes associados ao gênero *Candida* são: a aderência ao tecido hospedeiro, a capacidade de formar biofilme, a secreção de enzimas como a fosfolipase, que auxilia na penetração do micro-organismo no hospedeiro e a proteinase que facilita a colonização, a penetração e a proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro. O dimorfismo de algumas espécies, passando da forma de levedura à forma filamentosa (hifas), também é considerado como um fator de virulência. (Yang, 2003; Jorge 2006).

Dentre os fatores citados, as principais virulências atribuídas ao gênero *Candida* são a capacidade de aderência aos tecidos ou às próteses bucais e formação de biofilme (Silva et al., 2008). Segundo Seneviratne et al. (2009), a formação de biofilme proporciona vantagem para a sobrevivência das espécies de *Candida*. Os micro-organismos organizados em biofilme também apresentam maior resistência aos antimicrobianos em relação aos micro-organismos em crescimento planctônico e, cerca de mais de 65% das infecções microbianas estão relacionadas aos biofilmes (Seneviratne et al., 2012).

O biofilme trata-se de uma estrutura complexa e dinâmica aderida às superfícies bióticas ou abióticas (Hall-Stoodley et al., 2004; Seneviratne et al., 2009) e representa um modo de crescimento com proteção para o micro-organismo (Chandra et al., 2001; Hall-Stoodley et al., 2004), permitindo que os mesmos sobrevivam no ambiente e se dispersem para colonizar novos nichos (Hall-Stoodley et al., 2004), onde poderão criar uma fonte de infecção persistente (Chandra et al., 2001).

Os estágios para formação dos biofilmes foram cuidadosamente examinados em condições *in vitro* e incluem: adesão de fungos na superfície da mucosa do hospedeiro, formação de microcolônias, secreção de polissacarídeos na matriz extracelular, maturação dentro de uma estrutura tridimensional e a disseminação de células progenitoras do biofilme (Seneviratne et al., 2009; Silva et al., 2008).

Após a adesão inicial, as células crescem e se dividem para obter a densidade celular característica do biofilme (Nadell et al., 2009). Uma das características mais distintas dos biofilmes microbianos é a secreção de polímeros extracelulares e estão relacionados à sua fixação, ao apoio estrutural e a resistência aos antibióticos (O'Toole et al., 2000). Al-Fattani e Douglas (2006) demonstraram que a presença da matriz extracelular em biofilmes formados por *Candida* está relacionada ao aumento de resistência à anfotericina B e ao fluconazol.

Técnicas genéticas e moleculares recentes, utilizadas para estudo de biofilmes de bactérias e fungos, identificaram genes e mecanismos de regulação importantes para as interações iniciais entre os micro-organismos e a superfície da célula e para o processo de maturação do biofilme (O'Toole et al., 2000).

Uma das características do biofilme é o quorum sensing, uma interação entre as células que torna o biofilme capaz de monitorar sua própria densidade populacional e sua patogenicidade através de sinais intracelulares (Koo et al., 2005; Hogan, 2006; De Sordi, Mühlischlegel, 2009; Nigam et al., 2010). Essa capacidade de coordenar a interação entre as células promove uma melhor adequação ao ambiente, conferindo maior resistência ao micro-organismo (De Sordi, Mühlischlegel, 2009). Os micro-organismos organizados em biofilme são especialmente mais resistentes aos agentes antimicrobianos, incluindo antibióticos, biocidas industriais e antissépticos; entretanto, os mecanismos exatos de resistência aos agentes antimicrobianos ainda não está estabelecido (Seneviratne et al., 2012). Essa resistência também está relacionada a heterogeneidade espacial nos biofilmes (Fux et al., 2005; Nadell et al., 2009).

Diferenças na quantidade e na estrutura de biofilmes formados por diferentes espécies do gênero *Candida* foram demonstradas por Nowak e Kumatowski (2009). Diversos fatores como o substrato, os nutrientes, a presença de saliva, de oxigênio e as espécies envolvidas, podem afetar a formação do biofilme de *Candida* (Seneviratne et al., 2008).

Embora *C. albicans* seja a principal espécie do gênero associada às infecções fúngicas, outras espécies tem sido consideradas clinicamente importantes (Dovigo et al., 2010; Sardi et al., 2010; Mohandas, Ballal, 2011). Junqueira et al. (2012) coletaram amostras da cavidade bucal de 61 pacientes HIV positivos e verificaram que *C. albicans* foi a espécie prevalente, correspondendo a aproximadamente

60% dos isolados. As demais espécies isoladas foram: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*. Entre esses pacientes, 11 apresentaram culturas mistas de *Candida*, formadas por *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*, e *C. albicans* e *C. krusei*.

C. albicans é a principal espécie do gênero e a mais prevalente nas candidoses bucais, vaginais e cutâneas (Sardi et al., 2010; MacCallum, 2011). Esta espécie apresenta dimorfismo e pode passar da forma de levedura à forma filamentosa, iniciando-se com a produção do tubo germinativo seguido de pseudo-hifas ou hifas verdadeiras (Villar et.al, 2004; Noumi et al., 2010).

O primeiro passo para se estabelecer uma infecção é a adesão ao tecido hospedeiro (Yang, 2003). Villar et al. (2004) estudaram *in vitro*, a capacidade de aderência de *C. albicans* à mucosa bucal em leveduras e em cepas na forma de pseudo-hifas e de hifas verdadeiras e verificaram que as hifas são um importante fator para a aderência da espécie estudada às células epiteliais da mucosa bucal.

Mohandas e Ballal (2011) estudaram a produção de proteinase e de fosfolipase em cepas de *Candida albicans* e espécies não *albicans* e verificaram que a produção dessas enzimas foi maior em *C. albicans*.

Segundo estudo realizado por Thein et. al (2007), o biofilme formado por *Candida albicans* é composto por várias camadas embebidas em quantidade considerável de matriz extracelular e é melhor produzido em condições dinâmicas que em condições estáticas; e Jin et al. (2004) demonstraram, em estudo realizado *in vitro*, alterações na adesão e na formação de biofilme de *C. albicans*, mediada por diferentes açúcares e por saliva.

A capacidade de *C. albicans* em crescer organizada na forma de biofilme tem uma grande importância para a saúde, pois

representa uma forma de resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antifúngicos (Seneviratne et al., 2008).

A segunda espécie do gênero, mais relacionada às infecções invasivas nas mucosas e sistema sanguíneo, estando presente em até 20% delas, é *Candida glabrata*. Apesar de durante muitos anos ter sido considerada como um micro-organismo não patogênico, *Candida glabrata* é responsável por causar diversas doenças, capaz de se disseminar rapidamente e levar à altas taxas de mortalidade, especialmente em pacientes imunossuprimidos (Pappas et al., 2003; Ferrari et al., 2009; Silva et al., 2011). Em contraste com as outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* não apresenta dimorfismo, não produzindo hifas (Jorge, 2006) e tem sido observada sua resistência aos antifúngicos azóis e à anfotericina (Onyewu et al., 2003).

A capacidade de aderência de *C. glabrata* aos biomateriais e ao epitélio pode estar relacionada à adesina epitelial de superfície (EPA). *C. glabrata* possui um grau de hidrofobicidade comparável ao de *C. albicans* aderindo-se facilmente a superfícies acrílicas (Silva et al., 2011).

Assim como as outras espécies do gênero, *C. glabrata* também tem a capacidade de se organizar em biofilme. Seneviratne et al. (2009) realizaram um estudo comparativo, *in vitro*, sobre as características de biofilmes formados por *C. albicans* e por *C. glabrata* e observaram que o biofilme formado por *C. albicans* aparentava ser mais espesso e com melhor arranjo espacial, enquanto o biofilme de *C. glabrata* era mais fino e compacto, porém com uma boa aderência ao poliestireno (fundo de placa) utilizado no estudo. Foi também observado que o biofilme de *C. glabrata* era exclusivamente composto de blastóporos, isento de hifas. Thein et al. (2007) concluíram que o biofilme formado por *C. glabrata* é influenciado por condições de aerobiose ou anaerobiose, sendo na primeira condição observada uma maior massa de biofilme, composta por várias camadas ricas em blastóporos.

C. glabrata também é capaz de secretar proteinase (Yang, 2003; Silva et al., 2011), porém em quantidade menor em comparação à *C. albicans* e outras espécies do gênero de acordo com estudo realizado por Mohandas e Ballal (2011).

Outra espécie importante do gênero *Candida* é *C. tropicalis* que está relacionada à candidemia e candidúria, com crescente aumento nas taxas de mortalidade. É comum em pacientes oncológicos e em uso de catéteres intravenosos e tem apresentado uma crescente resistência aos antifúngicos azóis (Bizerra et al, 2008; Negri et al., 2011).

C. tropicalis possui uma notável capacidade de aderência a biomateriais, células humanas e tecidos, influenciada por fatores físico químicos e às proteínas de superfície relacionadas à família de genes ALS (agglutinin-like sequence) de *Candida* (Negri et al., 2011).

Apesar de capaz de secretar as enzimas proteinase e fosfolipase, importante fator de virulência, Mohandas e Ballal (2011) verificaram que esta atividade é maior em *C. albicans*. Apesar disso, existem vários estudos, *in vitro*, que revelam que *C. tropicalis* secreta altos níveis de proteinase em meios de cultura contendo soro fetal bovino como única fonte de nitrogênio (Silva et al., 2011). Outros estudos revelam que, além da proteinase, as lipases também estão relacionadas a virulência de *C. tropicalis*, facilitando a adesão e dano celular ao hospedeiro (Negri et al, 2011).

Estudos realizados *in vivo*, em camundongos imunossuprimidos, indicaram que *Candida albicans* é a espécie mais virulenta, mas que *C. tropicalis* também apresenta alto potencial de virulência, atacando principalmente os rins e dificultando o controle da infecção no hospedeiro (MacCallum, 2011).

Bizerra et al. (2008) estudaram as características da formação do biofilme de *C. tropicalis in vitro* e verificaram que a adesão inicial é seguida por, colonização, produção de hifas, maturação, onde foram observadas leveduras e formas filamentosas.

Al Fattani e Douglas (2006) verificaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que o biofilme de *C. tropicalis*, era rico em matriz extracelular, mesmo quando seu crescimento foi submetido a condições estáticas ao contrário do observado em *C. albicans*, onde o crescimento do biofilme é favorecido por condições de fluxo contínuo. Quanto a composição química analisada, em *C. tropicalis* o principal componente da matriz extracelular é a hexosamina (27%) com pouca concentração de carboidrato e de proteína. Para o biofilme de *C. albicans*, o principal componente é a glicose (32%), apresentando baixa concentração de proteína e de hexosamina.

Outra espécie emergente, que tem se tornado comum em pacientes imunossuprimidos é *C. krusei*. Esta espécie difere das demais em sua aparência, por possuir forma alongada e ovóide, e tem sido uma das espécies mais comumente isoladas da cavidade bucal em associação com *C. albicans*, assim como *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Samaranayake, Samaranayake, 1994). *C. krusei* também tem apresentado resistência aos antifúngicos azóis (Onyewu et.al, 2003).

Estudos revelam que *C. krusei* tem um grau de hidrofobicidade maior que *C. albicans*, contribuindo para a adesão inicial à superfícies acrílicas (Samaranayake, Samaranayake, 1994).

Em estudo realizado em 2002 com diferentes espécie de *Candida*, Kantarcioglu e Yucel verificaram que as cepas de *C. krusei* não tiveram atividade de fosfolipase e de proteinase, já *C. albicans* foi a única espécie do estudo onde foram detectadas atividade de ambas enzimas em mais de 93% das amostras estudadas. Samaranayake e Samaranayake (1994) também relataram a incapacidade de *C. krusei* de produzir fosfolipase e proteinase. Porém, em estudo recente, realizado por Mohandas e Ballal (2011) ficou demonstrada a capacidade de *C. krusei* de produzir fosfolipase e proteinase assim como a considerável produção de biofilme. Junqueira et al. (2012) também detectaram

atividade de fosfolipase e de proteinase em cepas clínicas de *C. krusei* isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos.

Parahitiyawa et al. (2006) estudaram as características do biofilme, formado *in vitro*, de várias espécies de *Candida*, sendo observado em *C. albicans* e *C. krusei* um bom crescimento, formado por espessa massa com várias camadas de blastóporos e grande atividade metabólica. Já para *C. tropicalis* e *C. glabrata* houve um fraco crescimento, sendo observado somente blastóporos. E, em estudo realizado por Thein et al. (2007), *C. krusei* demonstrou ter ótima capacidade de formação de biofilme em superfície de poliestireno tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias.

2.2 Interação entre micro-organismos

A maioria dos micro-organismos na natureza são encontrados organizados em biofilmes, que são constituídos por diferentes espécies microbianas (Peters et al, 2010). Vários fatores do nicho ecológico dos biofilmes podem interferir na colonização e organização das múltiplas espécies, incluindo o teor de oxigênio, a presença de ferro e a competição por espaço físico e nutrientes (Thein et al., 2009). Na natureza, os biofilmes microbianos dificilmente são formados por monoespécies, havendo o predomínio da relação entre diferentes espécies (Peters et al, 2010) e as espécies que o constituem podem viver em relação de cooperação ou de competição (Nadell et al., 2009).

Uma das características do biofilme formado por diferentes espécies é a heterogeneidade observada na estratificação de suas camadas, assim pode haver segregação das espécies de acordo

com suas características como, por exemplo, espécies aeróbias e anaeróbias (Nadell et al., 2009).

As diferentes espécies microbianas do biofilme estabelecem interações altamente dinâmicas que promovem a sobrevivência dos micro-organismos e os defendem não apenas contra condições nutricionais ou ambientais adversas, mas também contra a competição entre as espécies (Peleg et al., 2010). A natureza dessas interações pode ser benéfica, competitiva ou neutra, demonstrando a interferência de uma espécie sobre outra (Van Merode et al., 2007).

Devido às características heterogêneas do biofilme, com diferentes espécies microbianas, tem sido difícil avaliar a contribuição individual de cada uma das espécies para a patogênese. No entanto, com a utilização de avançadas técnicas de biologia molecular e microscópicas fica claro que as interações entre as espécies microbianas no biofilme desempenham um importante papel na colonização e dinâmica da infecção bem como da resposta do hospedeiro (Harriot, Noverr, 2011)

Candida spp. possui diferentes fatores de virulência que facilitam a colonização e a proliferação na mucosa bucal, além disso podem coagregar-se com bactérias e facilitar sua adesão às células epiteliais (Sardi et al., 2010). A coagregação ainda contribui para a formação do biofilme e facilita a comunicação intra celular (Morales, Hogan, 2010).

Bactérias são comumente encontradas associadas em biofilmes heterotípicos *in vivo* com *Candida*, em materiais médicos-hospitalares (Douglas, 2003). Os primeiros estudos sobre biofilmes contendo *Candida* em associação com outro micro-organismo foram publicados por Van der Mei em 2000 e demonstraram *in vitro* que associações com *Lactobacillus* ou *Streptococcus thermophilus*, poderiam controlar a população de leveduras (Cate et al., 2008). Em particular, as espécies do gênero *Lactobacillus* consideradas as prevalentes em infecções vaginais bacterianas, podem prevenir o crescimento das hifas,

caracterizando assim, uma atividade antifúngica direta (Harriot, Noverr, 2011).

As interações celulares antagônicas entre bactérias e fungos têm sido associadas com a secreção de moléculas antifúngicas no ambiente local, pela liberação de toxinas diretamente na célula fúngica ou pelo esgotamento de nutrientes, o que leva a uma redução de fungos no local. Outro mecanismo de interação fúngica-bacteriana é a modificação do ambiente, como uma mudança no pH, que podem influenciar na formação de hifas em *C. albicans*. Além das interações antagônicas, interações mutuamente benéficas em biofilmes mistos também são possíveis, na qual as diferentes espécies podem fornecer proteção umas para as outras contra uma resposta imune ou ação de agentes antimicrobianos (Peleg et al., 2010) da mucosa bucal, contribuindo para o progresso da infecção.

É comum a ocorrência de múltiplas espécies de micro-organismos organizados em biofilme aderidos a catéteres urinários, sendo que em estudo clínico realizado com 535 pacientes, somente 12,5% deles apresentavam uma única espécie de micro-organismo. *C.albicans* estava presente em 141 amostras e outras espécies de *Candida* em 82 amostras (Tournu, Van Dijick, 2012).

Modelos *in vitro* que utilizam discos de catéteres tem sido utilizados para estudo das interações microbianas, como entre *C. albicans* e *S. epidermidis*, o agente mais comumente associado a infecções de catéteres. Além disso, demais estudos sugerem que as células fúngicas podem modular a ação de antibióticos e que as bactérias podem alterar a ação de antifúngicos nesse meio (Douglas, 2003).

Estudos revelam que a interação entre *C.albicans* e espécies do gênero *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Fusobacterium* contribui para a colonização e estabelecimento da candidose bucal (Morales, Hogan, 2010).

Carlson (1983) observou um efeito sinérgico entre *C. albicans* e *Staphylococcus aureus* em infecções experimentais em camundongos, devido ao aumento na mortalidade dos animais após a inoculação intraperitoneal de ambas espécies quando comparada a aplicação isolada de cada micro-organismo.

Harriot e Noverr (2009) estudaram a interação *in vitro* entre *C. albicans* e *Staphylococcus aureus* em modelo de biofilme heterotípico e observaram uma relação sinérgica entre as espécies. Demais estudos indicam que há uma alta incidência de ambas espécies colonizando conjuntamente a cavidade bucal, o mesmo foi observado para estudos realizados *in vitro* em cateteres (Shirliff et al, 2009).

A interação entre *C. albicans* e *Escherichia coli* também tem sido bastante discutida na literatura. Sedgley et al. (1996) demonstraram que a presença de *C. albicans* pré-aderida às superfícies das células epiteliais bucais e às superfícies acrílicas, não provocou impacto na subsequente adesão por *E. coli*. Klaerner et al. (1997) observaram que a inoculação simultânea de *C. albicans* e *E. coli* em camundongos elevou a taxa de mortalidade dos animais em 83,3%, quando comparadas a cada grupo de micro-organismo inoculados isoladamente, concluindo que houve uma interação de sinergismo entre os patógenos *C. albicans* e *E. coli*.

Tampakakis et al. (2009) realizaram estudo *in vivo* sobre a interação entre a espécie *C. albicans* e a bactéria Gram-negativa *Salmonella typhimurium*, observando que a filamentação de *C. albicans* foi inibida pela bactéria, concluindo tratar-se de uma relação antagônica.

Staphylococcus aureus metilina resistentes se ligam às hifas de *C. albicans* mais fortemente que *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (Peters et al., 2010). Em outro estudo, a adição de bactérias ao biofilme pré formado por *C. albicans* reduziu a densidade celular do biofilme da espécie fúngica. Já em biofilmes pré formados por bactérias, houve

redução da adesão do crescimento do biofilme de *Candida albicans*. Além disso, a adição simultânea de diferentes bactérias e de *C. albicans* demonstrou que em todos os casos houve redução da adesão fúngica sem haver alteração no crescimento das bactérias (Tournu, Van Djick, 2012)

Por outro lado, Thein et al. (2006) realizaram experimento com biofilmes mistos de *Candida albicans* e seis espécies de bactérias, entre elas *Actinomyces israelii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Foi demonstrado um efeito inibitório das bactérias sobre as leveduras em todos biofilmes mistos formados.

Kirkpatrick et al. (2000) observaram uma vantagem de *C. albicans* sobre *C. dubliniensis* em crescimento planctônico. Após 96 horas do crescimento em suspensão no meio de cultura, os autores constataram que somente 18% dos ensaios continham ambas as espécies, enquanto que 82% dos ensaios apresentavam apenas células viáveis de *C. albicans*. Em ensaios realizados em biofilmes, *C. dubliniensis* suportou mais a competição em relação ao crescimento planctônico, pois em 52% dos ensaios foram observados *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Até o momento, poucos trabalhos foram desenvolvidos para o esclarecimento das interações entre as diferentes espécies de *Candida* em infecções mistas, sendo a maioria deles focado nos estudos das interações entre fungos e bactérias.

2.3 Terapia Fotodinâmica

A luz solar associada a um agente fotossensibilizador é utilizada desde os primórdios da civilização. Existem relatos de que os

egípcios ingeriam plantas, que ativadas pela luz solar, auxiliavam no tratamento da discromia causada pelo vitiligo (Simplício et al., 2002)

A primeira pesquisa com terapia fotodinâmica data de aproximadamente 100 anos atrás, quando Raab observou que a exposição à acridina e luz eram letais ao protozoário *Paramecium*. A primeira geração de fotossensibilizadores, a base de derivados hematopofirínicos, surgiu na década de 1950. Na década seguinte, foi observado que a associação de porfirinas e luz em tumores de camundongos e ratos levava à regressão da doença (Simplício et al., 2002).

A terapia fotodinâmica envolve três componentes: uma fonte de luz, um agente fotossensibilizador e o oxigênio. O fotossensibilizador ou seu precursor metabólico é administrado ao paciente. Após irradiado com a luz em comprimento de onda específico, o fotossensibilizador passa do estado fundamental de baixa energia para estado singlete reativo; Posteriormente, o fotossensibilizador pode decair de volta para seu estado fundamental, com emissão de fluorescência, ou pode sofrer uma transição para um estado triplete de energia mais alta (Konopka, Goslinski, 2007). Este processo pode causar dano celular levando à sua morte (Perussi, 2007).

A terapia fotodinâmica tem seu uso aprovado para tratamentos clínicos nos Estados Unidos, União Européia, Japão e Canadá e, apesar da terapia fotodinâmica ter seu uso para o tratamento de tumores, muitos estudos têm demonstrado suas propriedades antimicrobianas. A aplicação da PDT em odontologia está crescendo rapidamente para o tratamento de câncer bucal, infecções fúngicas e bacterianas (Konopka, Goslinski, 2007).

O fotossensibilizador eritrosina é um composto cíclico pertencente à classe dos xantenos e que absorve a luz na região visível; é bem conhecido entre os dentistas devido a sua utilização para visualização de biofilmes dentários (Wood et al, 2006).

Wilson e Mia (1993) demonstraram que a terapia fotodinâmica foi eficaz na redução de *C. albicans*, quando suspensões desse micro-organismo foram irradiadas com laser de Helio-Neônio ou de Arseneto de Gálio Alumínio em associação com diferentes fotossensibilizadores, incluindo azul de toluidina, azul de metileno, tionina e cristal violeta.

Teichert et al. (2002) demonstraram que a aplicação tópica do corante azul de metileno (em diferentes concentrações) seguida da aplicação de Laser de diodo, foi capaz de reduzir a população de *C. albicans* das lesões de candidose pseudomembranosa presentes no dorso da língua de camundongos imunodeprimidos. Estas cepas de *C. albicans* haviam sido coletadas de pacientes HIV positivos e então inoculadas na cavidade bucal dos animais. Foi demonstrado que o uso do Laser de diodo no comprimento de onda de 664nm associado às concentrações de 450 e 500 µg/mL do corante foi capaz de promover uma completa eliminação dos micro-organismos. Na análise histológica, os autores verificaram que os camundongos tratados com terapia fotodinâmica não apresentaram candidose, mas apenas uma resposta inflamatória baixa.

Lambrechts et al. (2005) avaliaram os efeitos da Terapia Fotodinâmica em *C. albicans*, utilizando como fotossensibilizador uma porfirina catiônica Trip(4) e luz halógena, como fonte de luz. Após 1 minuto de incubação com 25 µM Trip(4) e aplicação de luz na densidade de energia de 5,4 J/cm², verificou-se que apenas 0,2% das células permaneciam viáveis, enquanto que na densidade de energia de 12,6 J/cm², não houve detecção de células vivas.

Chabrier-Roselló et al. (2005) verificaram que a atividade metabólica de *C. albicans* em biofilme foi reduzida após a aplicação da PDT com photofrin nas concentrações de 10 µg/mL por 30 minutos se comparada ao tratamento com anfotericina B a 10 µg/mL pelo mesmo período.

Wood et al. (2006) demonstraram que o biofilme formado por *Streptococcus mutans* foi mais sensível a PDT com o uso do fotossensibilizador eritrosina em comparação ao azul de metileno e a hematoporfirina. A concentração utilizada para os fotossensibilizadores foi de 22 μM e o tempo de irradiação, com luz branca, foi de 15 minutos.

Souza et al. (2006) realizaram estudo *in vitro* de terapia fotodinâmica sobre suspensões de *Candida* utilizando azul de metileno a 0,1 mg/mL e laser de Arseneto de Gálio Alumínio na densidade de 28 J/cm² pelo tempo de 5 minutos. Os autores observaram redução na contagem de colônias (UFC/mL) de 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dubliniensis*, 91,6% para *C. Krusei* e 82,3% para *C. tropicalis*, concluindo que a fotossensibilização apresentou efeito fungicida sobre todas as espécies estudadas do gênero *Candida*.

Soares et al. (2009), realizaram estudo da aplicação de PDT sobre suspensões de *Candida* spp. e concluíram que o uso de azul de toluidina na concentração de 25 μM associado a aplicação de Diodo Emissor de Luz (LED), por 15 minutos na fluência de 180 J/cm² reduziu o crescimento e a adesão epitelial bucal das cepas de *Candida* estudadas.

Junqueira et al. (2009) induziram candidose bucal na língua de 72 ratos e, posteriormente, realizaram a terapia fotodinâmica. O fotossensibilizador utilizado foi o azul de metileno a 0,1 mg/mL e a irradiação foi feita com laser com comprimento de onda de 660 nm e densidade de energia de 26 J/cm². Após 1 ou 5 dias do tratamento, os ratos foram eutanasiados para análise microscópica do dorso da língua. O grupo controle apresentou maior resposta inflamatória e alterações epiteliais quando comparado ao grupo tratado com PDT, concluindo-se que a PDT reduziu a gravidade das lesões fúngicas *in vivo*.

Giuliani et al. (2010) estudaram a PDT em *C. albicans* utilizando como fonte de energia a luz halógena. O fotossensibilizador utilizado foi a ftalocianina em concentrações que variavam de 0,13 a 3,3 $\mu\text{g/mL}$. A partir da concentração de 1,3 $\mu\text{g/mL}$ e aplicação de luz halógena

no comprimento de onda entre 600-700 nm e densidade de energia de 30 J/cm², observou-se redução de 99,9% nas UFC/mL quando comparadas ao grupo controle.

Mang et al. (2010) demonstraram que cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, resistentes ao fluconazol, isoladas de pacientes HIV-positivos, tiveram uma redução (UFC/mL) significativa após tratamento com o fotossensibilizador Photofrin e irradiação com laser a 630 nm na densidade de 150 mW/cm², demonstrando sua relevância clínica para o tratamento de pacientes com candidoses bucais.

Souza et al. (2010) realizaram estudo *in vitro* para avaliar os efeitos da PDT sobre *C. albicans* por meio da fotossensibilização utilizando os corantes azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita por laser de baixa intensidade nas densidades de energia de 15,8 26,3 e 39,5 J/cm². A redução do número de UFC/mL foi dependente da densidade de energia utilizada. O grupo tratado somente com laser, ou seja, na ausência do fotossensibilizador, também demonstrou redução do número de UFC/mL se comparado ao grupo controle nas densidades de energia de 26,3 e 39,5 J/cm², sugerindo a presença de fotossensibilizadores endógenos neste micro-organismo.

Em outro estudo, realizado em 2011, Dovigo et al. avaliaram *in vitro* a eficácia da PDT sobre biofilmes monotípicos formados por *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. A avaliação foi feita através da mensuração da atividade celular utilizando-se o método de redução do sal XTT (2 metoxi 4 nitro 5 sulfofenil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazolium hidróxido). Observou-se que, com o fotossensibilizador curcumina e o uso de luz LED azul, houve redução de atividade metabólica em todas as concentrações de fotossensibilizador utilizada em todas as densidades de energia testadas. Na concentração de 40 µM de fotossensibilizador associado a fluência de energia de 18J/cm², a redução da atividade metabólica de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foi, respectivamente,

de: 85, 85 e 73% para culturas planctônicas e de 52,3, 69,1 e 64,1% quando organizadas em biofilme; concluindo-se que a PDT foi efetiva sobre as espécies de *Candida* nas condições experimentais testadas.

Embora demonstrada a eficácia da PDT sobre culturas de micro-organismos tanto em crescimento planctônico como em biofilme, não há pesquisas sobre o uso da Terapia Fotodinâmica em biofilmes formados por mais de uma espécie de *Candida*. Dentro desse contexto, o presente estudo objetivou avaliar as interações entre diferentes espécies de *Candida* e o uso da PDT nessas condições, por meio da aplicação de luz LED associada ao fotossensibilizador eritrosina.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

- a) Observar o crescimento *in vitro* de biofilmes monotípicos de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* por Microscopia Eletrônica de Varredura;
- b) Avaliar as interações de *C. albicans* com *C. tropicalis*, com *C. glabrata* e com *C. krusei* em biofilmes formados *in vitro* por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e ensaio colorimétrico com XTT;
- c) Verificar a sensibilidade de *C. albicans* à terapia fotodinâmica quando organizada em biofilme monotípico e heterotípicos por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL);
- d) Comparar a sensibilidade dos biofilmes monotípicos de *C. albicans* e heterotípicos à Terapia Fotodinâmica por meio do ensaio colorimétrico com XTT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP sob o protocolo nº 017/2011 (Anexo A).

Foram utilizadas 4 cepas clínicas de *Candida* spp.: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*. Todas as cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP, tendo sido isoladas da saliva e das lesões de candidose orofaríngea de pacientes HIV-positivos do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

4.2 Preparo da suspensão de *Candida*

Para cada cepa foi preparada suspensão padronizada de micro-organismo contendo 10^7 células/mL.

As cepas de *Candida* foram cultivadas em Agar Sabouraud dextrose por 24 horas a 37 °C. A seguir, cada cepa foi semeada em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) acrescido de 100 mM de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) e incubada a 37 °C por 16 horas.

O crescimento foi centrifugado a 2000 Xg por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento resuspenso em 5 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%), esse procedimento foi

repetido 2 vezes. A contagem do número de células em suspensão foi realizada em Câmara de Neubauer (Laboroptik GmbH, Alemanha).

4.3 Formação dos biofilmes monotípicos e heterotípicos

Para a formação dos biofilmes foi utilizada a metodologia descrita por Seneviratne et al. (2009) com algumas modificações.

Inicialmente, para a formação dos biofilmes monotípicos, foram pipetados 200 µL da suspensão padronizada do micro-organismo nos poços da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA).

Para a formação dos biofilmes heterotípicos foram colocados 100 µL da suspensão de cada espécie de *Candida*. A placa foi incubada em agitação a uma rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37 °C por 90 minutos para fase inicial de adesão. Decorrido este período, o sobrenadante de micro-organismos foi delicadamente aspirado e cada poço lavado com 200 µL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS). A lavagem foi repetida por 2 vezes com solução fisiológica tampão fosfato (PBS) para a remoção das células não aderidas. Em seguida, foi pipetado 200 µL de Caldo YNB (Difco, Detroit, USA) acrescido de 100 mM de glicose e as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas em agitação (Quimis, Diadema, São Paulo). O caldo foi trocado a cada 24 horas.

Após 48 horas, o conteúdo da placa com os biofilmes formados foi aspirado e lavado 2 vezes com solução fisiológica tampão fosfato (PBS).

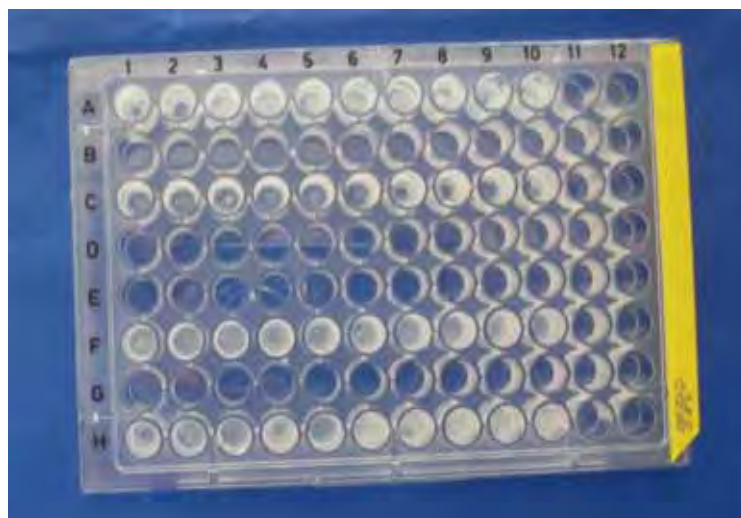


Figura 1 - Formação do biofilme de *Candida* em placa de microtitulação de 96 poços.

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os biofilmes monotípicos de *C. albicans* e espécies não *albicans* (n=3) foram submetidos a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Para a formação do biofilme foram utilizados discos de poliestireno de aproximadamente 8 mm de diâmetro esterilizados em câmara de radiação gama a 20 kGy (Cobalto 60) por 6 horas (Embrarad, São Paulo, SP, Brasil), e depois colocados em placas de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, New York, NY, EUA) contendo 100 μ L da suspensão de *Candida* spp. previamente preparada conforme descrito acima. A seguir, os discos foram transferidos para placa de 24 poços contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 hora e desidratados por 1 mL de soluções de álcool com concentrações crescentes (10%, 25%, 50%, 75% e 90% por 20 minutos e 100% de álcool por 1 hora). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para secagem completa dos discos.

A seguir, os discos foram transferidos para *stubs* de alumínio e recobertos com ouro por 2 minutos a 40 miliamperes (BAL- TEC 50D 050 Sputter Coater, Liechtenstein). Após a metalização, os biofilmes foram examinados e fotografados em MEV (Jeol JSM5310, Tóquio, Japão), operando a 15 kV com aumento de 2000 vezes. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).

4.5 Fotossensibilizador e fonte de luz

O fotossensibilizador (F) utilizado foi a eritrosina (Sigma, São Paulo) na concentração de 400 μM . Para o preparo do fotossensibilizador, o pó foi dissolvido em solução fisiológica e esterilizado por filtração através de filtro com poro 0,22 μm (MFS, Dublin, EUA) e armazenado no escuro. A fonte de luz (L) utilizada foi o Diodo Emissor de Luz (LED) verde (Multifuncional system Twin Flex II, MM Optics, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de $532 \pm 10 \text{ nm}$, potência de 90 mW; tempo de irradiação de 180 segundos, taxa de fluência de 237 mW/cm^2 e fluência de $42,63 \text{ J/cm}^2$. A área irradiada para os biofilmes foi de $0,38 \text{ cm}^2$.

4.6 Terapia Fotodinâmica

Para a realização da fotossensibilização *in vitro*, foram adicionados 200 μL de eritrosina na concentração de 400 μM nos poços das placas contendo o biofilme. Após agitação por 5 minutos (tempo de pré-irradiação) em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil), os biofilmes foram irradiados com LED (Grupo L+F+). Também foram realizados

ensaios para verificar o efeito isolado do fotossensibilizador eritrosina na ausência de luz (Grupo F+L-) e da luz na ausência de fotossensibilizador (Grupo F-L+). O grupo controle não recebeu nenhum tratamento (Grupo F-L-). Para os grupos sem fotossensibilizador (F-L+ e F-L-), ao invés de eritrosina, foram adicionados em cada biofilme 200 μ L de solução fisiológica.

Todo experimento foi realizado no escuro em câmara de fluxo laminar com auxílio de um anteparo negro fosco para evitar espalhamento da luz.



Figura 2 – Diodo Emissor de Luz (LED) - Multifuncional system Twin Flex II, MM Optics, São Carlos, Brasil.

No total, as cepas de *Candida* foram submetidas a 392 ensaios experimentais, divididos nos diferentes grupos conforme demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Ensaios experimentais em biofilme de *Candida*

Biofilmes	Espécies	Análise	F-L-	F+L+	F+L-	F-L+	
Monotípicos	<i>C. albicans</i>	UFC	10	10	10	10	83
		XTT	10	10	10	10	
		MEV	3	-	-	-	
	<i>C. tropicalis</i>	UFC	10	-	-	-	23
		XTT	10	-	-	-	
		MEV	3	-	-	-	
	<i>C. glabrata</i>	UFC	10	-	-	-	23
		XTT	10	-	-	-	
		MEV	3	-	-	-	
	<i>C. krusei</i>	UFC	10	-	-	-	23
		XTT	10	-	-	-	
		MEV	3	-	-	-	
Heterotípicos	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	UFC	10	10	10	10	80
		XTT	10	10	10	10	
	<i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	UFC	10	10	10	10	80
		XTT	10	10	10	10	
	<i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	UFC	10	10	10	10	80
		XTT	10	10	10	10	
Total			152	80	80	80	392

4.7 Análise do biofilme pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)

Após o tratamento, o fundo da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) foi lavado 2 vezes com PBS. A seguir, foi cuidadosamente raspado com um palito de madeira estéril, até desprendimento do biofilme e alíquotas de 100 µL foram transferidas para tubos Falcon contendo 6mL de solução fisiológica.

Os tubos foram homogeneizados por 30 segundos utilizando-se homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200 - Bandelin Eletronic) com potência de 50 W, para homogeneizar o biofilme. A partir desta solução homogeneizada, foram feitas diluições seriadas. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo meio cromogênico HiCrome *Candida* (Himedia, Mumbai, Índia). As placas

foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação, foram determinadas as UFC/mL e os valores transformados em logaritmo. As espécies de *Candida* dos biofilmes heterotípicos foram diferenciadas pela cor da colônia em Agar HiCrome *Candida*: verde clara para *C. albicans*, azul para *C. tropicalis*, creme para *C. glabrata* e roxa para *C. krusei*.

4.8 Análise do biofilme por ensaio colorimétrico por XTT

Os biofilmes formados foram submetidos ao ensaio de XTT (2 metoxi 4 nitro 5 sulfofenil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazolium hidroxido), que avaliou a presença de leveduras metabolicamente ativas. A metodologia descrita foi baseada no trabalho de Jin et al. (2004).

O sal XTT (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi dissolvido em solução fisiológica tampão fosfato (PBS) até atingir a concentração final de 1 mg/mL. A solução foi então esterilizada por filtração em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (MFS, Dublin, EUA) e armazenadas a menos 80 °C até o momento do uso.

Imediatamente antes de cada ensaio, foi preparada solução de Menadiona (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na concentração de 0,4 mM e esterilizada por filtração. A solução XTT foi descongelada e misturada com a solução de menadiona na proporção do volume de vinte para um.

Cada poço, contendo o biofilme aderido, foi lavado 4 vezes com 200 µL da solução fisiológica tampão fosfato (PBS) para remover as células fracamente aderidas. Em seguida, foram inoculados em cada um dos poços: 158 µL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS), 40 µL de XTT e 2 µL de menadiona. Após a incubação no escuro por 3 horas a 37 °C, 100 µL da solução foi transferida para uma nova placa

e a mudança colorimétrica da solução foi medida utilizando um leitor de microplacas a 490 nm. As leituras foram feitas após 48 horas de formação do biofilme, em todos os ensaios realizados.

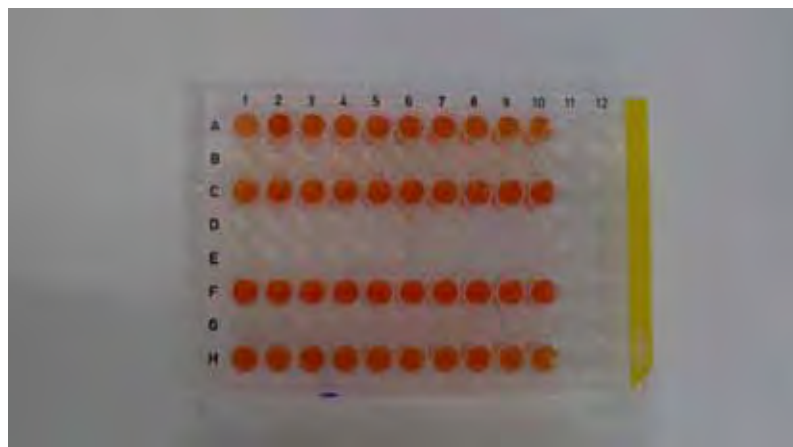


Figura 3 – Ensaio colorimétrico após redução do sal XTT, após 3 h de incubação, com formação de formazan (laranja).

4.9 Análise estatística

Para o estudo da interação microbiana foram feitas análises dos dados obtidos nos grupos sem tratamento (F-L-). Em cada espécie estudada, os resultados de UFC/mL e da atividade metabólica do biofilme homotípico foi comparada ao biofilme heterotípico por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Os efeitos da terapia fotodinâmica sobre os biofilmes monotípicos de *C. albicans* e biofilmes heterotípicos também foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, considerado-se os resultados obtidos na contagem de UFC/mL e XTT nos grupos F-L-, F+L+, F+L- e F-L+.

Todos os testes estatísticos foram realizados no Programa Minitab adotando nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Microscopia eletrônica de varredura

Os biofilmes monotípicos formados por *Candida* spp. estão apresentados na Figura 4.

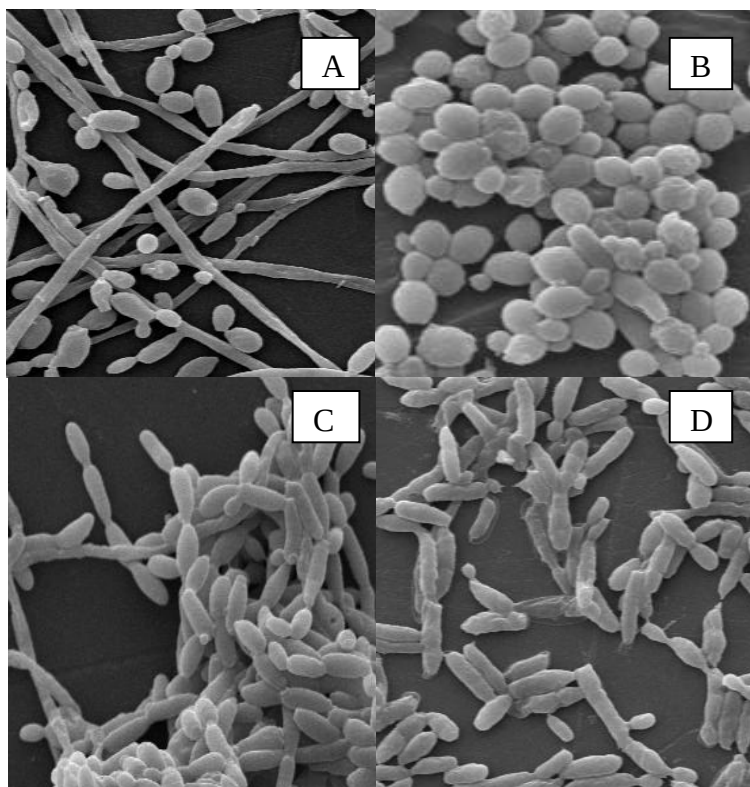


Figura 4 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura em biofilme formado por *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B), *C. tropicalis* (C) e *C. krusei* (D).

A MEV revelou a heterogeneidade do biofilme de *C. albicans* pela presença de blastoconídeos, pseudohifas e grande quantidade de hifas alongadas. No biofilme de *C. tropicalis* foram

também observadas a presença de pseudohifas e de hifas e grande quantidade de blastóporos agrupados. Em *C. krusei*, observou-se a forma ovóide característica desta espécie demonstrando apenas blastóporos e pseudohifas. Para *C. glabrata*, observou-se um biofilme denso com vários blastóporos e ausência de hifas, característico desta espécie.

5.2 Interação entre *C.albicans* e espécies não *albicans*

5.2.1 Resultados da contagem de UFC/mL

A média de UFC/mL e o desvio-padrão após 48 horas de crescimento dos biofilmes estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, para biofilmes monotípicos e heterotípicos. Em biofilme monotípico, o melhor crescimento foi observado para *C. glabrata*. Para os biofilmes heterotípicos a maior contagem de UFC/mL (log) ocorreu para a interação entre *C. albicans* e *C. glabrata*, considerando a contagem de cada espécie.

Tabela 1 - Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) obtidos nos biofilmes monotípicos formados por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ou *C. krusei*

Espécies	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
<i>C. albicans</i>	6,24	0,06	6,14	6,23	6,35
<i>C. tropicalis</i>	6,27	0,09	6,11	6,29	6,42
<i>C. glabrata</i>	6,75	0,06	6,63	6,77	6,80
<i>C. krusei</i>	6,56	0,13	6,38	6,55	6,77

DP: desvio-padrão

Tabela 2 - Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) obtidos nos biofilmes heterotípicos formados pela interação de *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*, e *C. albicans* e *C. krusei*

Interação	Espécies	Média	DP	Mín	Med	Máx
<i>C. albicans</i> e	<i>C. albicans</i>	5,74	0,06	5,61	5,75	5,83
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	6,12	0,08	6,04	6,08	6,28
<i>C. albicans</i> e	<i>C. albicans</i>	5,97	0,12	5,68	5,99	6,10
<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	6,25	0,14	6,04	6,22	6,47
<i>C. albicans</i> e	<i>C. albicans</i>	0,40	0,66	0,00	0,00	1,69
<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	6,31	0,06	6,21	6,32	6,45

DP: desvio-padrão Mín: mínimo Med: Mediana Máx: máximo

As Figuras 5, 6 e 7 representam o crescimento, em UFC/mL (log), das espécies quando organizadas em biofilmes monotípicos e heterotípicos. Nessas Figuras podemos observar que *C. albicans* apresentou interações favoráveis com *C. tropicalis* e *C. glabrata*, e relação antagônica com *C. krusei*. Em biofilme monotípico, *C. albicans* formou 6,24 log de UFC/mL, mas quando cresceu em biofilme heterotípico com *C. krusei* formou apenas 0,40 log de UFC/mL. Esses dados indicam que a presença de *C. krusei* no biofilme inibiu o crescimento de *C. albicans*.

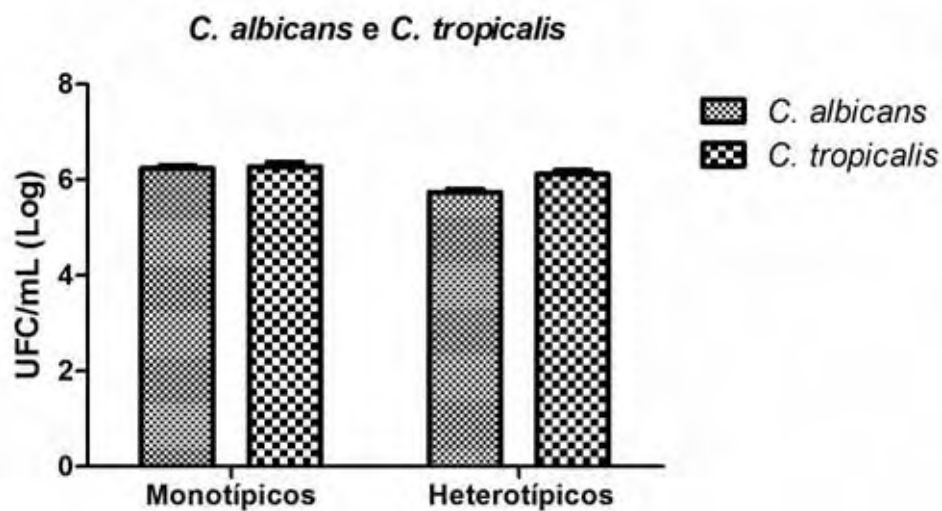


Figura 5 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de *C. albicans* e *C. tropicalis* quando organizadas em biofilmes monotípicos e heterotípicos.

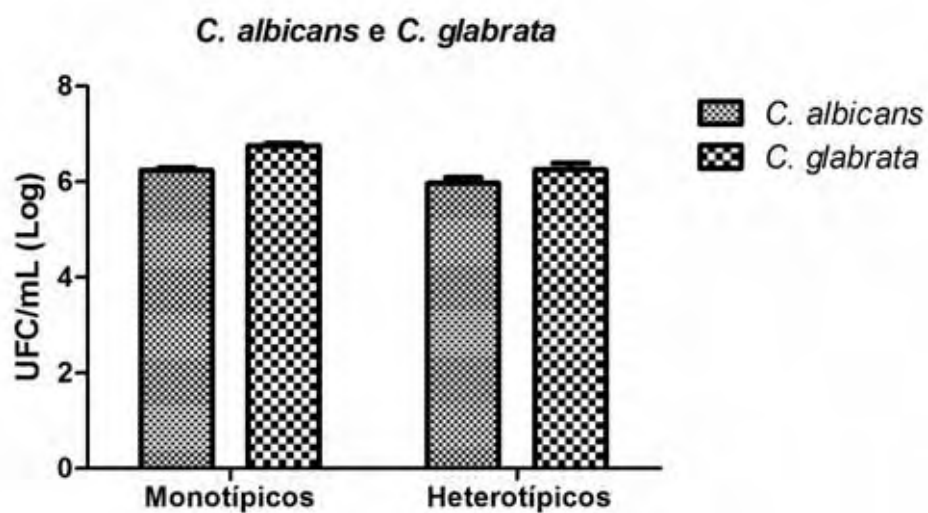


Figura 6 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de *C. albicans* e *C. glabrata* quando organizadas em biofilmes monotípicos e heterotípicos.

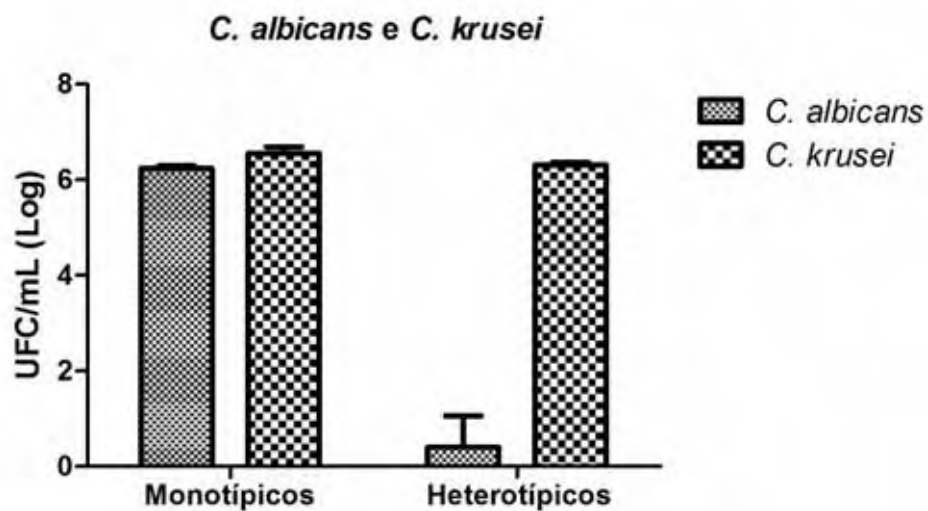


Figura 7 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de *C. albicans* e *C. krusei* quando organizadas em biofilmes monotípicos e heterotípicos.

Abaixo, a Figura 8 ilustra a interação entre as espécies e a identificação de cada uma pela coloração da colônia, após a semeadura em meio cromogênico.

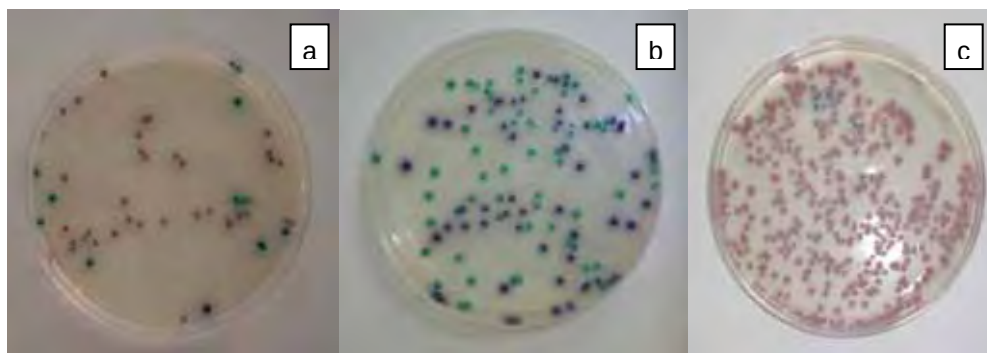


Figura 8 - Unidades formadoras de colônias dos biofilmes heterotípicos formados por: a) *C. albicans* e *C. glabrata*; b) *C. albicans* e *C. tropicalis*; c) *C. albicans* e *C. krusei*.

5.2.2 Resultados do ensaio colorimétrico por XTT

Os resultados de viabilidade celular obtidos por meio do método de redução do XTT para os biofilmes monotípicos formados por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ou *C. krusei* estão apresentados na Tabela 3. A maior atividade metabólica observada foi para *C. glabrata* seguido por *C. albicans*. Na Tabela 4 e Figura 9, estão apresentados os resultados das interações entre *C. albicans* e espécies não *albicans*. O maior valor de densidade óptica apresentado foi para a interação entre *C. albicans* e *C. glabrata*. Sendo assim, podemos verificar que os resultados obtidos no ensaio colorimétrico de XTT foram coincidentes aos obtidos na contagem de UFC/mL.

Tabela 3 - Estatística descritiva para os dados de densidade óptica dos biofilmes monotípicos formados por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ou *C. krusei*

Espécies	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
<i>C. albicans</i>	0,58	0,08	0,43	0,604	0,71
<i>C. tropicalis</i>	0,39	0,03	0,33	0,39	0,44
<i>C. glabrata</i>	0,85	0,13	0,66	0,82	1,16
<i>C. krusei</i>	0,46	0,14	0,27	0,4	0,68

DP : Desvio-padrão

Tabela 4- Estatística descritiva dos biofilmes heterotípicos formados pela interação de *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*, e *C. albicans* e *C. krusei*

Interação	Média	DP	Mín	Mediana	Máx
<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	0,35	0,07	0,26	0,34	0,51
<i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	1,38	0,17	1,05	1,4	1,67
<i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	0,43	0,09	0,3	0,42	0,59

DP: desvio-padrão Min: Mínimo Máx: Máximo

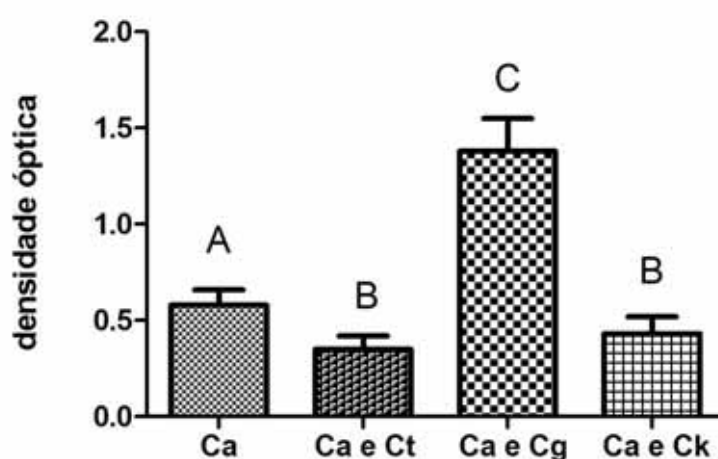


Figura 9 - Média e desvio padrão dos dados de densidade óptica em biofilme monotípico formado por *C. albicans* (Ca) e biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* e *C. tropicalis* (Ct), *C. albicans* e *C. glabrata* (Cg), e *C. albicans* e *C. krusei* (Ck). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

5.3 Terapia Fotodinâmica

5.3.1 Resultados da contagem de UFC/mL

A análise descritiva dos dados de UFC/mL está apresentada nas Tabelas 5 e Figura 10. Em todos os resultados apresentados, exceto para a interação entre *C. albicans* e *C. krusei*, a diferença entre os grupos tratados com PDT (F+L+) e sem PDT (F-L-) foi estatisticamente significativa. Não houve diferença estatística em relação ao grupo controle (F-L-) e os grupos tratados somente com fotossensibilizador (F+L-) ou somente com luz (F-L+). Diante desses resultados, podemos observar que a sensibilidade à PDT de *C. albicans* foi a mesma quando organizada em biofilme monotípico ou heterotípico com *C. tropicalis* ou *C. glabrata*. Para o biofilme heterotípico com *C. krusei*, não foi possível fazer essa observação, uma vez que o crescimento de *C. albicans* foi muito pequeno quando na presença de *C. krusei*.

Tabela 5 - Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) de *C. albicans* e valor de p obtidos nos biofilmes monotípicos e heterotípicos formados pela interação de *C. albicans* e espécies não *albicans*, para os grupos F-L- e F+L+

Espécie	Grupo	Média	DP	Redução (log)	p
<i>C. albicans</i>	F-L-	6,24	0,06	0,24	0,001
	F+L+	6,00	0,09		
<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	F-L-	5,74	0,06	0,18	0,001
	F+L+	5,56	0,06		
<i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	F-L-	5,97	0,12	0,49	0,001
	F+L+	5,48	0,24		
<i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	F-L-	0,40	0,66	-0,08	0,99
	F+L+	0,48	0,63		

DP: desvio-padrão

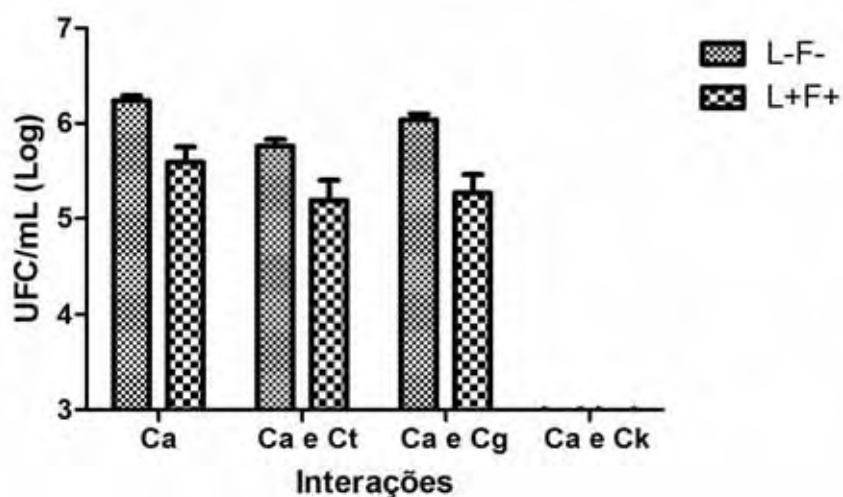


Figura 10 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL para contagem de *C. albicans* quando organizada em biofilme monotípico e heterotípicos para os grupos F-L- e F+L+

5.3.2 Resultado do ensaio colorimétrico por XTT

Os valores de densidade óptica para os grupos de biofilme monotípico formado por *C. albicans* e heterotípicos formados por *C. albicans* e espécies não *albicans* estão representados nas Tabelas 6 e Figura 11. Em todos os resultados obtidos houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que não receberam a PDT (F-L-) e os grupos tratados com Terapia Fotodinâmica (F+L+).

Tabela 6 - Estatística descritiva e valor de p obtidos nos biofilmes monotípicos de *C. albicans* e heterotípicos formados pela interação de *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*, e *C. albicans* e *C. krusei* nos grupos F-L- e F+L+

Espécie	Grupo	Média	DP	Mín	Med	Máx	p
<i>C. albicans</i>	F-L-	0,58	0,08	0,43	0,6	0,71	0,001
	F+L+	0,36	0,12	0,20	0,37	0,61	
<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	F-L-	0,35	0,07	0,26	0,34	0,51	0,009
	F+L+	0,24	0,05	0,17	0,22	0,37	
<i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	F-L-	1,38	0,17	1,05	1,4	1,67	0,001
	F+L+	0,85	0,17	0,59	0,85	1,23	
<i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	F-L-	0,43	0,09	0,30	0,42	0,59	0,001
	F+L+	0,28	0,05	0,20	0,29	0,35	

DP: desvio-padrão Min: Mínimo Med: Mediana Máx: Máximo

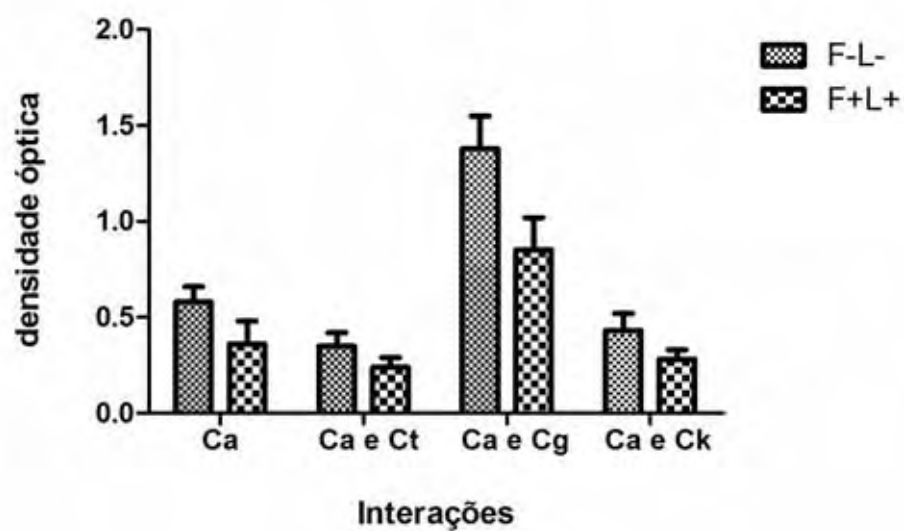


Figura 11 - Média e desvio padrão dos dados de densidade óptica para biofilme monotípico e heterotípicos para os grupos F-L- e F+L+

6 DISCUSSÃO

As leveduras do gênero *Candida* são as mais prevalentes na cavidade bucal e sua capacidade de formar biofilme está ligada a sua patogenicidade (Thein et al., 2007). *C. albicans* é a principal espécie presente em até 70% dos casos, sendo destacada, também, a presença de outras espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Dovigo et al., 2010). Atualmente, sabe-se que os biofilmes, em sua maioria, são formados por mais de uma espécie de micro-organismo (Peters et al., 2010), daí a importância de se estudar as interações entre as diferentes espécies que podem compor o biofilme da cavidade bucal.

Além da capacidade de formar biofilme, a virulência de *C. albicans* é atribuída à sua habilidade de crescimento em diferentes formas: levedura, pseudohifa e hifa verdadeira. As hifas podem alongar-se e invadir tecidos e as leveduras podem se disseminar pelos tecidos e corrente sanguínea, sugerindo que a morfologia é fundamental para a sobrevivência de *C. albicans* em condições adversas. Não apenas as propriedades de *C. albicans*, mas a interação com outros micro-organismos habitantes da cavidade oral podem determinar as características de virulência de *C. albicans* e ser mais uma justificativa para o estudo das interações entre micro-organismos (Pereira-Cenci et al., 2008).

Os resultados obtidos neste estudo por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura corroboram com o estudo de Parahitiyawa (2006) no qual fica evidenciado que o biofilme de *C. glabrata* é formado por rica camada de blastóporos e o biofilme de *C. krusei* apresenta-se com células ovóides e presença de pseudohifas quando formado sobre superfícies acrílicas. As imagens obtidas através da MEV

para *C. albicans* estão de acordo com estudo realizado por Costa et al. (2011) e por Thein et al. (2007), que revelam a diversidade morfológica em biofilme de *C. albicans* formado sobre superfícies acrílicas, observando-se blastóporos, pseudohifas e grande quantidade de hifas. Silva et al. (2009), assim como no presente estudo, observaram após formação de biofilme em fundo de placa acrílica, que *C. tropicalis* apresentou-se tanto na forma de blastóporo como pseudohifa e hifa. Porém, diferentemente dos estudos citados, no presente estudo não houve a visualização de polímeros extracelulares presente nos biofilmes, provavelmente porque no processo de fixação da MEV pode ter ocorrido remoção da matriz polissacarídea extracelular (Seneviratne et al., 2009).

Nesse estudo, de acordo com os dados apresentados, quando analisados os resultados dos valores obtidos para UFC/mL, ficou demonstrado que *C. albicans* interagiu de forma positiva com *C. glabrata* e com *C. tropicalis*, pois em ambos os casos os dados de UFC/mL (Log) foram muito parecidos entre os biofilmes formados por monoespécies e os biofilmes heterotípicos. Nos casos de interações sinérgicas entre as espécies a presença de um dos micro-organismos pode gerar um ambiente favorável para o outro micro-organismo, predispondo a colonização e infecção pelo outra espécie. Além disso, a densa estrutura do biofilme aumenta a oportunidade de transferência genética podendo até tornar um micro-organismo comensal em um patógeno com alto potencial virulento (Jabra-Rizk, 2011).

El Azizi et al. (2004) pesquisaram a interação de *C. albicans* com outras espécies de *Candida* e nos casos em que *C. guilliermondii* ou *C. krusei* ou *C. lipolytica* foram adicionadas ao biofilme pré-formado por *C. albicans* foi observado um aumento no crescimento do biofilme, exceto para *C. guilliermondii*, sendo o mesmo resultado observado quando *C. albicans* foi adicionada simultaneamente com espécies não *albicans* para a formação de biofilme composto por duas espécies fúngicas. No entanto, em biofilmes pré-formados por *C.*

guilliermondi ou *C. krusei* ou *C. lipolytica*, em modelos *in vitro*, verificou-se redução na contagem de UFC/mL de *C. albicans*, indicando uma competição pelos sítios de adesão.

No presente estudo ficou demonstrado que a interação com *C. krusei*, foi desfavorável para *C. albicans*, sugerindo um antagonismo nas relações, com predomínio de *C. krusei*, considerando sua maior contagem de UFC/mL. Thein et al. (2007) estudaram a interação entre *C. albicans* e *C. krusei*, o estudo foi realizado em modelo de biofilme *in vitro* e observou-se um antagonismo na relação entre as espécies com a supressão de, aproximadamente, 85% do crescimento de *C. albicans*. Tais resultados sugerem que pode haver uma competição por nutrientes e que *C. krusei* produz moléculas sinalizadoras que inibem o crescimento de *C. albicans*. Além disso, ainda sugere-se que ocorra uma colonização inicial maior de *C. krusei* a superfícies acrílicas devido a sua alta hidrofobicidade (Samaranayake, Samaranayake, 1994).

Até o presente momento, a maioria dos estudos concentrou-se em analisar as interações entre micro-organismos, através da contagem de UFC/mL, entretanto, Seneviratne et al. (2009) sugeriram que os resultados de desenvolvimento de biofilme devem ser analisados por mais de um método. No presente estudo, além dos resultados apresentados em UFC/mL, foi utilizado o método de ensaio colorimétrico por redução do sal XTT através do qual pode-se quantificar a atividade celular de células eucarióticas presentes nos biofilmes. A redução intracelular do XTT produz um composto denominado formazan que pode ser quantificado, caracterizando a atividade metabólica da célula (Silva et al., 2008).

Os resultados demonstraram, para os biofilmes monotípicos, um maior desenvolvimento para a espécie *C. glabrata*, assim como no resultado apresentado por UFC/mL. Seneviratne et al. (2009) também avaliaram os biofilmes monotípicos formados por *C. albicans* e por *C. glabrata*, através do método colorimétrico XTT, e observaram um

maior desenvolvimento de biofilme para *C. glabrata*, sugerindo, ao contrário de outros estudos, que a formação de hifas não é um pré requisito para a formação do biofilme.

Para os resultados de análise de viabilidade celular pelo método colorimétrico XTT em biofilmes heterotípicos, a avaliação dos resultados levou em consideração a comparação ao biofilme monotípico formado por *C. albicans*, uma vez que na interação não é possível distinguir, através desse método, a atividade celular individual das espécies. Sendo assim, em relação aos biofilmes monotípicos formados por *C. albicans*, os biofilmes heterotípicos foram estatisticamente diferentes, demonstrando para as interações entre *C. albicans* e *C. tropicalis* ou *C. albicans* e *C. krusei* uma viabilidade celular menor se comparada a *C. albicans* em biofilme monotípico. No entanto, para a interação entre *C. albicans* e *C. glabrata*, foi observada uma maior densidade óptica se comparada ao biofilme formado apenas por *C. albicans*.

Pathak et al. (2012) também estudaram, *in vitro*, a interação entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, demonstrando, através de valores de densidade óptica, uma maior capacidade de formação de biofilme resultante da interação entre *C. albicans* e *C. glabrata*, seguida pela interação entre *C. albicans* e *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Entretanto, *C. krusei* produziu um impacto negativo na formação do biofilme de múltiplas espécies; e a presença de *C. albicans* nos biofilmes aumentou a camada dos biofilmes heterotípicos, indicando que *C. albicans* possa fornecer substrato para as espécies não *albicans* em materiais acrílicos. Nesse estudo também foi avaliada a interação de *C. tropicalis* com *C. albicans* e espécies não *albicans*, verificando que *C. tropicalis* retarda o desenvolvimento do biofilme para espécies não *albicans*.

O aumento da prevalência de espécies não *albicans* nas infecções fúngicas, pode ser um reflexo do aumento da resistência dessas

espécies aos tratamentos antifúngicos convencionais, principalmente em casos onde há predomínio de múltiplas espécies (Williams et al., 2011).

As infecções fúngicas são a quarta principal causa de infecções sistêmicas e *C. albicans* é considerada a principal espécie do gênero e a coinfeção com bactéria ou fungo pode elevar a taxa de mortalidade. Os biofilmes formados por múltiplas espécies são mais resistentes aos agentes antimicrobianos se comparados às espécies isoladas (Douglas, 2003; Thein et al., 2007).

Nesse contexto, fica evidente a necessidade de pesquisas por tratamentos que visem atingir as múltiplas espécies envolvidas numa infecção. A Terapia Fotodinâmica apresenta-se como uma alternativa por não causar resistência as espécies envolvidas e porque muitos estudos apresentam suas propriedades antimicrobianas.

O presente estudo é o primeiro a realizar pesquisa da aplicação da Terapia Fotodinâmica sobre *C. albicans*, a principal espécie do gênero, quando organizada em biofilmes heterotípicos com espécies não *albicans*. O fotossensibilizador utilizado foi a eritrosina em associação com LED verde considerando-se que foi demonstrado por Costa et al., (2011) que a eritrosina apresenta pico de absorção máximo que coincide com a emissão de luz em 532 ± 10 nm.

Os resultados obtidos apresentaram média de redução de $0,24 \log_{10}$, após tratamento com PDT, para o biofilme monotípico formado por *C. albicans*, com diferença estatística em relação ao grupo controle (F-L-) e está de acordo com estudo realizado por Costa et al. (2011), que demonstraram, *in vitro*, a eficácia da PDT através do uso de eritrosina na concentração de $400 \mu\text{M}$ como fotossensibilizador e luz LED verde, sobre biofilmes monotípicos formados por cepas ATCC de *C. albicans* e de *C. dubliniensis* com redução de $0,74 \log$ e $0,21 \log$ respectivamente. O estudo foi realizado também sobre culturas planctônicas com resultados que demonstraram que a PDT foi eficaz com menor concentração de

fotossensibilizador (entre 0,39 μM e 200 μM); ficando evidente a resistência dos biofilmes aos tratamentos utilizados.

Assim como no presente estudo, Dovigo et al. (2011) demonstraram que cepas de *C. albicans*, quando organizadas em biofilme foram mais resistentes ao tratamento com Terapia Fotodinâmica, apresentando redução de 0,23 $\log_{10}$ em cepas ATCC após o tratamento com PDT com aplicação de luz Led azul por 50 minutos, fluência de 37,5 J/cm^2 e uso do fotossensibilizador Photogem® na concentração de 25mg/mL. Ainda no estudo citado, foi feita uma comparação da efetividade da PDT sobre culturas planctônicas obtendo-se uma redução de 6,66 $\log_{10}$ nas mesmas condições da PDT. Quando realizado o experimento sobre cepas clínicas, resistentes ao fluconazol, os valores de redução sobre o biofilme formado variaram entre 0,15 $\log_{10}$ e 0,34 $\log_{10}$.

A eficácia da PDT sobre cepas clínicas e cepas ATCC de *Candida albicans* foi avaliada por Costa et al. (2011) em estudo realizado em condições *in vitro* com a associação de eritrosina na concentração de 40 μM e LED azul com a fluência de energia 95 J/cm^2 . Para as culturas planctônicas, a média de redução foi de 3,45 $\log_{10}$ e para os biofilmes variou entre 0,01 a 0,31 $\log_{10}$, evidenciando a diferença de resultados de acordo com a cepa estudada.

Estudos indicam a resistência dos biofilmes aos tratamentos antimicrobianos. Além disso, há de se considerar que o presente estudo foi realizado com cepas clínicas e alguns autores indicam a maior resistência e aderência do material clínico. Seneviratne et al.(2009), demonstraram em estudo *in vitro*, que a capacidade de adesão inicial de *Candida*, é dependente do material isolado estudado. Sendo que, de modo geral, as cepas clínicas aderem melhor a superfícies sólidas que as cepas padrão (ATCC) favorecendo a formação do biofilme. Isso confirma a importância de se realizar novos estudos com mais de um isolado clínico para caracterizar o comportamento específico de cada espécie (Dovigo et al., 2011).

Junqueira et al. (2012) pesquisaram os efeitos da PDT em biofilmes monotípicos formados por cepas clínicas de diferentes espécies de *Candida*, entre elas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Foi utilizado ftalocianina como fotossensibilizador e laser de Arseneto de Gálio alumínio. A redução em log (UFC/mL) obtida foi entre 0,33-0,85 log com diferença estatística entre o grupo controle (sem PDT) e o grupo tratado; sendo que as espécies mais resistentes (diminuição < 0,5 log) foram *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* e para *C. tropicalis* foi observado melhor resultado (redução > 0,5 log).

Entretanto, Mantareva et al. (2011), obtiveram inativação total de biofilme de *C. albicans* formado sobre resina de polimetilmetacrilato após tratamento com PDT que utilizou ftalocianina quimicamente modificada como fotossensibilizador associado ao LED com fluência de 50 J/cm²; sugerindo o potencial da PDT com estes compostos para tratamento de infecções fúngicas bucais.

No presente estudo, as demais reduções de *C. albicans* quando em associação com *C. tropicalis* e *C. glabrata* em relação aos grupos controles (*C. albicans* em biofilmes heterotípicos sem tratamento por PDT) foram 0,18 e 0,49 log₁₀ respectivamente; apresentando diferença estatística entre o grupo tratado e o grupo não tratado; sugerindo que embora estas espécies tenham uma relação positiva de interação e que a colonização de uma espécie não é afetada pela outra, a eficácia da PDT, para *C. albicans*, foi maior na interação com *C. glabrata* quando comparada ao biofilme monotípico, sugerindo que *C. glabrata* possa ter se aderido às hifas de *C. albicans* na formação do biofilme ou interferido com outro fator de virulência, diminuindo a resistência de *C. albicans* a PDT. Isso também pode ser devido a estratificação do biofilme formado por múltiplas espécies e por se sugerir que a PDT atinja predominantemente as camadas mais externas do biofilme. Em relação a *C. tropicalis*, estudos revelam que o biofilme formado por essas espécies tem muitas semelhanças: com presença de hifas, espesso, resistente aos

antifúngicos (Seneviratne et al., 2007) sugerindo-se uma maior resistência de *C. albicans* a PDT quando tais espécies estão associadas.

Quando a associação foi com *C. krusei*, não houve diferença estatística entre os grupos devido a interação entre as duas espécies em que ficou demonstrada a inibição de crescimento promovida por *C. krusei* sobre *C. albicans*.

Pereira et al. (2011) estudaram os efeitos da PDT sobre cepas ATCC de *C. albicans* em biofilme monoespécie e em associação com *S. aureus* e *S. mutans*. Foi utilizado como fotossensibilizador azul de metileno na concentração de 0,1mg/mL e laser como fonte de luz, por 98 segundos. Os resultados obtidos demonstraram uma ótima redução na contagem de UFC/mL de *C. albicans* quando em biofilme monotípico (2,32 log) e redução de 1 log₁₀ quando o biofilme foi formado pela interação entre as três espécies estudadas. Demonstrando uma maior resistência do biofilme em múltiplas espécies (fungo-bactéria). Das espécies estudadas, *C. albicans* foi a que apresentou menor resposta à PDT se comparada as espécies bacterianas. Além disso, a análise da estrutura das espécies sujeitas a PDT revelou que houve menor agregação celular sugerindo que a fotossensibilização ocorre nas camadas mais externas do biofilme.

A análise dos resultados por densidade óptica apresentou resultados, de sensibilidade a PDT, de redução para a interação entre *C. albicans* e *C. glabrata*, com menor redução para a interação entre *C. albicans* e *C. tropicalis*, e para o biofilme monotípico formado por *C. albicans*. Entretanto, para a interação entre *C. albicans* e *C. krusei*, diferente do observado nos resultados de UFC/mL houve diferença estatística entre os grupos F+L+ e F-L- podendo-se sugerir a ação da PDT sobre *C. krusei*, pois além de ser evidenciada neste estudo, a interação desfavorável para *C. albicans* em relação a *C. krusei*, no emprego do método XTT, a detecção de atividade metabólica individual

das espécies eucarióticas não é aplicável. Houve diferença estatística significativa entre todos os grupos tratados e não tratados com PDT.

Na cavidade oral, a presença de biofilme representa uma barreira contra a defesa do hospedeiro e a entrada de antimicrobianos. Os biofilmes formados por *Candida* foram os primeiros a exibir resistência aos antifúngicos. Embora o mecanismo exato de resistência relacionado aos biofilmes não esteja completamente elucidado, diversos autores consideram que a excreção de polímeros extracelulares e proteínas carreadoras de genes associadas a resistência aos antifúngicos azóis estejam envolvidas neste processo (Williams et al., 2011). O processo de *quorum sensing* também é descrito como um dos fatores envolvidos no desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos a medida que secreta sinais extracelulares de comunicação entre as células (Jabra-Rizk, 2011).

A cavidade bucal é colonizada por diferentes espécies de micro-organismos e as infecções geralmente estão associadas a infecções com múltiplas espécies e os tratamentos convencionais podem levar ao aumento de resistência aos antimicrobianos. Assim como demonstrado no presente estudo, a terapia fotodinâmica é uma alternativa promissora para o tratamento de infecções fúngicas com a presença de *Candida albicans* e espécies não *albicans*.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

- ✦ A microscopia eletrônica de varredura confirmou que todas as espécies estudadas foram capazes de formar biofilme *in vitro* no fundo da placa de 96 poços de poliestireno;
- ✦ Tanto na contagem de UFC/mL, como na análise de viabilidade celular por XTT, verificou-se que *C. glabrata* foi a espécie com maior capacidade de formar biofilme de acordo com a metodologia utilizada;
- ✦ Na contagem de UFC/mL dos biofilmes heterotípicos, observou-se que *C. albicans* estabeleceu relações favoráveis com *C. tropicalis* e *C. glabrata* e relações antagônicas com *C. krusei*;
- ✦ Tanto os biofilmes monotípicos formados por *C. albicans* como os heterotípicos apresentaram sensibilidade à Terapia Fotodinâmica mediada por eritrosina e LED.

8 REFERÊNCIAS*

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J. Med Microbiol. 2006;55(8):999-1008.

Bizerra FC, Nakamura CV, De Poersch C, Svidzinski TIE, Quesada RMB, Goldenberg S, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. FEMS Yeast Res. 2008;8(3):442-50.

Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? J Dent Research. 1995;74(5):1152-61.

Carlson E. Effect of strain of *Staphylococcus aureus* on synergism with *Candida albicans* resulting in mouse mortality and morbidity. Infect Immun. 1983;42(1):285-92.

Cate JM, Klis FM, Pereira TC, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead *Candida* biofilm formation. J Dent Research. 2008 Feb;88(2):105-15.

Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(10):4288-95.

*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htm

Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Mitra S, Haidaris CG. Respiratory deficiency enhances the sensitivity *Candida* to photodynamic treatment. *Photobiol Photochem*. 2008 Nov;84 (5):1141-8.

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 Sep;183(18):5385-94.

Costa ACBP, Rasteiro VMC, Pereira CA, Hashimoto ESHS, Beltrame Jr M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol*. 2011;56(11):1299-305.

Costa ACBP, Rasteiro VMC, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*. 2012;55(1):56-63.

De Sordi L, Mühlischlegel FA. Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS Yeast Res*. 2009 Oct; 9(7):990-9.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiol*. 2003;11(1):30-6.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Adriano CS, Bagnato VS. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by photogem[®]. *Braz. J. Microbiol* [serial on the Internet]. 2010 Mar [cited 2012 May 20]; 41(1):42-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000100009>.

Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2011;54(2):123-30.

Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg. Med.* 2011;43(9) 927–34.

El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J App Microbiol.* 2004 May;96(5):1067–73.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(11):685-702.

Emami E, Séguin J, Rompré PH, de Koninck L, de Grandmont P, Barbeau J. The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an *in vivo* / *in vitro* study. *Int J Prosthodont.* 2007;20(5):514-20.

Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *J Oral Pathol.* 2003;32(10):571-75.

Ferrari S, Ischer F, Calabrese D, Posteraro B, Sanguinetti M, Fadda G, et al. Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *Plos Pathog.* 2009; 5(1). doi:10.1371/journal.ppat.1000268.

Fotinos N, Convert M, Piffaretti JC, Gurny R, Lange N. Effects on gram-negative and gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid derivative. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2008;52(4):1366-73.

Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol.* 1998 Feb;134(2):207-14.

Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiol.* 2005;13(1):34–40.

Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. *In vitro* resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2010;54(2):637-42.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):95–108.

Harriot MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2009;53(9):3914-22.

Harriot MM, Noverr MC. Importance of *Candida*–bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends in Microbiol.* 2011;19(11):557-63.

Hogan DA. Talking to Themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic Cell.* 2006;5(4):613-19 .

Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of polymicrobial biofilms. *The open Mycol. J.* 2011;5:39-43.

Jayatilake JA, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathol.* 2009 Oct;168(4):165-73.

Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol.* 2004;49:789-98.

Jorge AOC. *Princípios de microbiologia e imunologia.* São Paulo: Santos; 2006.

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 Jun;38(5):468-81.

Junqueira JC, Martins JS, Faria RL, Colombo CED, Jorge AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):877-84.

Junqueira JC, Jorge AOC, Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, Costa ACBP et al. Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis (phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). *Lasers Med Sci* [serial on the internet]. 2012 Jan [cited 2012 Feb 26] [about 8 p.]. doi: 10.1007/s10103-012-1050-2.

Junqueira JC, Vilela SFG, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa ACBP, Rasteiro VMC et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2012;54(1):17-24.

Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002; 45(5/6):160-5.

Kirkpatrick WR, Lopez-Ribot JL, Mcatee RK, Patterson TF. Growth competition under broth and biofilms growing conditions. *J Clin Microbiol*. 2000 Feb;38(2):902-04.

Klaerner HG, Uknis ME, Acton RD, Dahlberg PS, Carlone-Jambor C, Dunn DL. *Candida albicans* and *Escherichia coli* are synergistic pathogens during experimental microbial peritonitis. *J Surg Res*. 1997;70(2):161-5.

Koo H, Schobel BD, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Research*. 2005;84(11):1016-20.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007 Aug;86(8):694-707.

Lambrechts AG, Aalders MCG, Marle JV. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 May;49(5):2026–34.

MacCallum DM. Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. Int J Microbiol [serial on the internet]. 2011 Oct [cited 2011 Dec 10];[about 12p.]. doi:10.1155/2012/363764.

Mang TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2010 Jun;7(2):98-105.

Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wöhrle D, Dimitrov R, Popova E, et al. Non- aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. Photochem Photobiol Sci. 2011;10(1):91–102.

McMichael AJ, McKee M, Shkolnikov V, Valkonen T. Mortality trends and setbacks: global convergence or divergence? The Lancet. 2004;363(9415):1155-9.

Mohandas V e Ballal M. Distribution of *Candida* Species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and hospholipase production: a study on hospitalized patients in Southern India. J Glob Infect Dis. 2011;3(1):4–8.

Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* Interactions with bacteria in the context of human health and disease. Plos Pathog [serial on the internet]. 2010 Ap [cited 2011 Oct 29];6(4):[about 4p.]. doi:10.1371/journal.ppat.1000886.

Moyes DL, Naglik JR. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection Clin and Develop Immunol [serial on the internet]. 2011 May [cited 2012 Jan 27]; [about 9 p.]. doi:10.1155/2011/346307.

Muzyka BC. Oral fungal infections. Dent Clin North Am. 2005;49(1):49-65.

Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. The sociobiology of biofilms. FEMS Microbiol Reviews. 2009;33(1):206–24.

Negri M, Silva S, Henriques M, Oliveira R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. Eur J Clin Microbiol Infect [serial on the internet]. 2009 Oct [cited 2012 Apr 8];31(7):1399-412. doi: 10.1007/s10096-011-1455-z.

Nigam S, Ciccoli R, Ivanov I, Szczepanski M, Deva R. On Mechanism of Quorum sensing in *Candida albicans* by 3(R) – Hydroxy-Tetradecaenoic Acid Curr Microbiol. 2010 May;62(1):55-63.

Noumi E, Snoussi M, Bakhrouf A. *In vitro* effect of *Melaleuca alternifolia* and *Eucalyptus globulus* essential oils on mycelia formation by oral *Candida albicans* strains. African J of Microbiol Res. 2010;4(12):1332-6.

Nowak M, Kurnatowski P. Biofilm caused by fungi-structure, quorum sensing, morphogenetic changes, resistance to drugs. Wiad Parazytol. 2009;55(1):19-25.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000;54(1):49-79.

Onyewu C, Jill R, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol Biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemoter. 2003;47(3):956-64.

Oriel S, Nitzan Y. Photoinactivation of *Candida albicans* by its own endogenous porphyrins. Curr Microbiol. 2010;60(2):117-23.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. Clin Infect Dis. 2003;37(5):634–43.

Parahitiyawa NB, Samaranayake YH, Samaranayake LP, Ye J, Tsang PWK et al. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. APMIS. 2006;114(4):298–306.

Pathak KA, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. J Appl Oral Sci [serial on the internet]. 2012 Jan [cited 2012 Apr 11];20(1):70-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-77572012000100013>.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. Nature Rev Microbiol. 2010 May;8(5):340-49.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa ACBP, Machado AKS, Junqueira JC, Jorge AOC. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. Lasers Med Sci. 2011;26(3):341-8.

Pereira-Cenci, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Del Bel Cury AA, Cate JM et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. Arch Oral Biol. 2008;53(18):755-64.

Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. Quim Nova. 2007;30(4):988-94.

Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton W, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* dual-species biofilms. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010;59(3):493-503.

Phelan JA, Saltzman BR, Friedland GH, Klein RS. Oral findings in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Oral surg Oral med Oral pathol. 1987;64(1):50-6

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. *Candida* biofilms: an update. Eukaryotic cell. 2005;4(4):633-8.

Rossoni RD, Junqueira JC, Santos ELS, Costa ACB, Jorge AOC. Comparison of the efficacy of rose bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. Lasers Med Sci. 2010;25(3):581-6.

Samaranayake HY, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. J Med Microbiol. 1994;41(5):295-310.

Sardi JCO, Duque C, Mariano FS, Peixoto ITA, Hofling JF, Gonçalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. J Oral Sci. 2010; 52(2):177-85.

Sedgley CM, Samaranayake LP, Darvell BW. The influence of incubation conditions on the adherence of oral Enterobacteriaceae to HeLa cells. APMIS. 1996;104(7/8):583–90.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Diseases. 2008;14(7):582-90.

Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. Arch Oral Biol. 2009 Aug;54(11):2260-69.

Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Wong SS, Herath TD, Samaranayake LP. Unraveling the resistance of microbial biofilms: Has proteomics been helpful? Proteomics. 2012;12(4/5):651-65.

Sharon V, Fazel N. Oral candidiasis and angular cheilitis. Dermatol Ther. 2010;23(3):230-42.

Shirliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. FEMS Microbiol. 2009;299(1):1-8.

Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa NB, Rosa EAR, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. Braz Dent J. 2008;19(4):364-9.

Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non- *Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. Medical Mycology. 2009;47(7):681-9.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends in Microbiol. 2011;19(5):241-7.

Simplício FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços no desenvolvimento de medicamentos. Quim Nova. 2002;25(5):801-7.

Soares BM, Silva DL, Sousa GR, Amorim JCF, Resende MA, Pinotti M. et al. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. Photochem Photobiol B Biol. 2009;94(1):65-70.

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 and Photobiol. 2006;83(1):34–8.

Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. Lasers Med Sci. 2010;25(3):385-9.

Tampakakis E, Peleg AY, Mylonakis E. Interaction of *Candida albicans* with an intestinal pathogen, *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. Eukaryotic Cell. 2009;8(5):732-7.

Teichert MC, Jones JW, 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(2):155-60.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. Arch Oral Biol 2006; 51(8):672–80.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture surfaces. Arch Oral Biol. 2007; 52(12):1200-8.

Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. Arch Oral Biol 2007;52(8):761-7.

Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses. 2009;52(6):467-75.

Tournu H, Van Djick P. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. Int J Microbiol [serial on the internet]. 2011 Sep [cited 2012 Mar 8] [about 16p.]. doi:10.1155/2012/845352.

Tylenda CA, Larsen J, Yeh CK, Lane HC, Fox PC. High levels of oral yeasts in early HIV-1 infection. J Oral Pathol Med. 1989;18(9):520-524.

Van Merode AEJ, Pothoven DC, Van der Mei HC, Busscher HJ, Krom BP. Surface charge influences enterococcal prevalence in mixed-species biofilms. J Appl Microbiol. 2007;102(6):1254-60.

Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. Int J Microbiol [serial on the internet]. 2012 [cited 2012 May 7] [about 26p.]. doi:10.1155/2012/713687.

Villar CC, Kashleva H, Dongari-Bagtzoglou A. Role of *Candida albicans* polymorphisms in interactions with oral epithelial cells. Oral Microbiol Immunol 2004;19(4):262–9.

Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis M. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. Periodontol 2000. 2011;55(1):250-65.

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

Wilson LS, Reyes CM, Stolpman M, Speckman J, Allen K, Beney J. The Direct Cost and Incidence of Systemic Fungal Infections. Value in Health. 2002;5(1):26-3

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. J. Antimicrob. Chemother. 2006;57:680–4

Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect. 2003;36(4):223-28.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

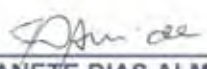
  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 – E. janete@fjo.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **017/2011-PH/CEP**, referente ao Projeto intitulado **“Fotoinativação dos isolados de Candida spp. da cavidade bucal de pacientes HIV-Positivos por laser e luz halógena via fotoreceptores endógenos”**, sob a responsabilidade de **ELISABETE PIVA**, tendo como orientadora a Profa. Assist. Dra. **JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme, Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 29 de abril de 2011.



Profa. Adjunto **JANETE DIAS ALMEIDA**
Coordenadora

ANEXO B – Alteração do título junto ao comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – São Dimas – CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9000 – FAX (12) 3947-9028 -



**Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos**

São José dos Campos, 27 de março de 2012

Ofício nº 03/12-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	ELISABETE PIVA
Projeto	Fotoinativação dos isolados de <i>Candida</i> spp. da cavidade bucal de pacientes HIV-Positivos por laser e luz halógena via fotoreceptores endógenos
PARECER	
De acordo com solicitação da Pesquisadora Responsável fica alterado o título do projeto para "Biofilmes heterotípicos formados por <i>Candida albicans</i> e espécie não <i>albicans</i> : estudo da interação microbiana e da sensibilidade à Terapia Fotodinâmica". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 017/2011-PH/CEP de 29/04/2011.	

Atenciosamente,


Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora