

**ANNA CAROLINA BORGES PEREIRA DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM**  
*Candida albicans in vitro E in vivo*



2011

**ANNA CAROLINA BORGES PEREIRA DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM *Candida albicans* in  
vitro E in vivo**

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

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2011

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.

C823a Costa, Anna Carolina Borges Pereira da.  
Avaliação da terapia fotodinâmica em candida albicans in vitro e in vivo /  
Anna Carolina Borges Pereira da Costa. \_\_ São José dos Campos : [s.n.],  
2011  
121 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia  
de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.  
Orientador: Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge

1. Candida albicans. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Eritrosina. 4. Candidíase  
bucal. 5. Adesão celular. I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso. II. Universidade  
Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III.  
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, 25 de julho de 2011.

Assinatura :

E-mail: carol\_biolog@yahoo.com.br

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge** (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP- Univ Estadual Paulista

**Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP- Univ Estadual Paulista

**Prof. Dr. Aguinaldo Silva Garcez Segundo**

Centro de Pesquisa e Pósgraduação São Leopoldo Mandic

São José dos Campos, 25 de julho de 2011.

## DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Benedita Aparecida (*in memorian*) e Alaor (*in memorian*), que tanto me incentivaram e não estarão presentes neste momento tão importante.

Aos meus pais, Simone e Roberto, e ao meu irmão, Gustavo, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Muito obrigada pelo apoio e carinho.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador, Professor Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge, pela paciência, conhecimentos transmitidos, disponibilidade, confiança e oportunidade. Muito obrigada por contribuir neste momento da minha vida.

À Professora Doutora Juliana Campos Junqueira, pelos conhecimentos transmitidos, paciência, disponibilidade e oportunidade. Muito obrigada por tudo.

Meus sinceros agradecimentos por serem pessoas brilhantes que iluminaram meu caminho na minha formação científica.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na coordenação da Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito e Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida no início deste caminho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo concedida (processo 2009/12005-1), pela bolsa de Iniciação Científica concedida a aluna Emily Setsuko Halter da Silva Hashimoto (processo 2010/01988-1) e pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou aquisição dos materiais necessários para a realização deste projeto (processo 2010/18753-7).

Ao Carlos Guedes, pela paciência em nos ajudar quanto aos processos da FAPESP.

Aos secretários da Seção de Pós-Graduação Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consíglia de Souza e Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, por serem sempre solícitos.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Ao meu namorado, Rogério Ribeiro, que tanto me incentivou, ajudou e perseverou comigo. Muito obrigada por todo amor, amizade e carinho.

Ao meu tio, Alaor José, que sempre esteve ao meu lado e me incentivou. Muito obrigada pelo carinho e apoio.

À minha amiga, mais que amiga, Cristiane Aparecida Pereira Correia, por todos estes anos de amizade e dedicação. Não há palavras para agradecer seus incentivos e confiança.

À minha companheira, Vanessa Maria de Campos Rasteiro, pelo apoio, amizade, dedicação e perseverança. Sem você, seria impossível realizar este trabalho.

Às “nossas alunas de Iniciação Científica”, Emily Setsuko Halter da Silva Hashimoto e Cássia Araújo Fernandes, pela dedicação, disponibilidade, amizade e auxílio durante a fase experimental. Vocês foram fundamentais.

À Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha por nos ensinar a trabalhar com os camundongos, pelos conhecimentos transmitidos e disponibilidade.

À Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, pela disponibilidade e auxílios com os cortes histológicos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, na pessoa do Prof. Tit. Oslei Paes de Almeida e ao Biólogo Adriano Luis Martins pelo auxílio com o Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima pelas dicas e conhecimentos transmitidos com relação ao protocolo de imunossupressão dos animais e tratamento.

Ao Prof. Dr. Milton Beltrame Junior, por todos os anos de amizade, apoio e incentivo. Muito obrigada por acreditar em mim.

À Profa. Dra. Sônia Khouri, que nos inspirou e nos fez sonhar. Muito obrigada pela amizade e carinho.



Às Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back-Brito e Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão, pelo convívio e amizade.

À Profa. Adj. Marcia Carneiro Valera, por nos ceder espaço em seu freezer -80°C.

Aos técnicos de laboratório Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, pela amizade e auxílio.

Às bibliotecárias, em especial Silvana Alvarez e Ana Paula Mattozo Durante, pela disponibilidade em atender sempre que necessário.

Aos técnicos de laboratório Maria Salete Faria e Walter Cruz, pelo cuidado e auxílio na preparação dos cortes histológicos.

Aos técnicos do biotério, Marco Antonio Correa Alfredo, Antonio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcellos e Lourival Jacobs, pelos ensinamentos e paciência.

À todos os colegas do laboratório, Guilherme Rodrigues Teodoro, Ana Karina da Silva Machado, Simone Furgeri Godinho Vilela, Jonata Rafael de Oliveira, Rodnei Dennis Rossoni, Bruno Mello de Matos, Polyana das Graças Figueiredo Vilela, Cláudia de Moura Carreira, Raffaella Di Iorio Jeronymo, Fernanda Freire, Patrícia Pimentel de Barros, José Chibebe Junior, Isabel Chaves Silva Carvalho e aos demais colegas do Programa de Biopatologia Bucal, pela convivência e amizade.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos e a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Sem sonhos, as pedras se tornam insuportáveis,  
as pedras do caminho se tornam montanhas,  
os fracassos se transformam em golpes fatais.*

*Mas, se você tiver grandes sonhos...  
seus erros produzirão conhecimento,  
seus desafios produzirão oportunidades,  
seus medos produzirão coragem.*

*Por isso, NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS!!!”*

*Augusto Cury*

## SUMÁRIO

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                         | <b>12</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                       | <b>14</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                   | <b>16</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                        | <b>20</b> |
| <b>2.1 Candidose bucal.....</b>                                                                            | <b>20</b> |
| <b>2.2 Biofilme de <i>Candida</i>.....</b>                                                                 | <b>24</b> |
| <b>2.3 Parede celular de <i>Candida albicans</i> e aderência.....</b>                                      | <b>31</b> |
| <b>2.4 Candidose experimental.....</b>                                                                     | <b>35</b> |
| <b>2.5 Terapia Fotodinâmica (TFD).....</b>                                                                 | <b>41</b> |
| 2.5.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFD).....                                                       | 42        |
| 2.5.2 Eritrosina.....                                                                                      | 47        |
| 2.5.3 Diodo Emissor de Luz (LED).....                                                                      | 49        |
| <b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>                                                                                   | <b>51</b> |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                          | <b>52</b> |
| <b>4.1 Comitê de Ética.....</b>                                                                            | <b>52</b> |
| <b>4.2 Fotossensibilizador e fonte de luz.....</b>                                                         | <b>52</b> |
| <b>4.3 Terapia Fotodinâmica (TFD) <i>in vitro</i>.....</b>                                                 | <b>53</b> |
| 4.3.1 Terapia Fotodinâmica em cultura planctônica.....                                                     | 53        |
| 4.3.2 Terapia Fotodinâmica em biofilme.....                                                                | 55        |
| 4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o biofilme.....                                       | 57        |
| <b>4.4 Terapia Fotodinâmica (TFD) <i>in vivo</i>.....</b>                                                  | <b>58</b> |
| 4.4.1 Animais experimentais.....                                                                           | 58        |
| 4.4.2 Verificação de colonização natural por <i>Candida</i> spp. na<br>cavidade bucal dos camundongos..... | 59        |
| 4.4.3 Imunossupressão e administração de tetraciclina.....                                                 | 60        |
| 4.4.4 Preparo da suspensão de <i>C. albicans</i> .....                                                     | 60        |

|                                                                                                                         |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.4.5 Inoculação da suspensão de <i>C. albicans</i> na cavidade bucal dos camundongos.....                              | 61         |
| 4.4.6 Terapia Fotodinâmica de <i>C. albicans</i> .....                                                                  | 61         |
| 4.4.7 Recuperação de <i>C. albicans</i> da cavidade bucal dos camundongos.....                                          | 62         |
| 4.4.8 Eutanásia dos animais.....                                                                                        | 63         |
| 4.4.9 Análise macroscópica de candidose no dorso da língua.....                                                         | 63         |
| 4.4.10 Análise histológica de <i>C. albicans</i> no dorso da língua.....                                                | 63         |
| 4.4.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das línguas dos camundongos.....                                       | 64         |
| <b>4.5 Aderência de <i>C. albicans</i> as células do epitélio bucal humano: análise em microscopia óptica.....</b>      | <b>65</b>  |
| 4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de <i>C. albicans</i> aderidas às células do epitélio bucal humano..... | 66         |
| <b>4.6 Análise estatística.....</b>                                                                                     | <b>67</b>  |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>                                                                                                | <b>68</b>  |
| <b>5.1 Terapia Fotodinâmica em cultura planctônica.....</b>                                                             | <b>68</b>  |
| <b>5.2 Terapia Fotodinâmica em biofilme.....</b>                                                                        | <b>69</b>  |
| <b>5.3 Morfologia do dorso da língua dos camundongos não infectados por <i>C. albicans</i>.....</b>                     | <b>71</b>  |
| <b>5.4 Recuperação de <i>C. albicans</i> da cavidade bucal dos camundongos.....</b>                                     | <b>73</b>  |
| <b>5.5 Análise macroscópica de <i>C. albicans</i> no dorso da língua.....</b>                                           | <b>74</b>  |
| <b>5.6 Análise histológica de <i>C. albicans</i> no dorso da língua.....</b>                                            | <b>76</b>  |
| <b>5.7 Análise da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das línguas dos camundongos.....</b>                        | <b>82</b>  |
| <b>5.8 Aderência de <i>C. albicans</i> às células do epitélio bucal humano.....</b>                                     | <b>87</b>  |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                 | <b>90</b>  |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                 | <b>102</b> |
| <b>8 REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                               | <b>103</b> |

|                        |            |
|------------------------|------------|
| <b>APÊNDICE A.....</b> | <b>117</b> |
| <b>APÊNDICE B.....</b> | <b>118</b> |
| <b>APÊNDICE C.....</b> | <b>119</b> |
| <b>ANEXO A.....</b>    | <b>120</b> |
| <b>ANEXO B.....</b>    | <b>121</b> |

Costa ACBP. Avaliação da Terapia Fotodinâmica em *Candida albicans* *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP- Univ Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2011.

## RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a ação antifúngica da Terapia Fotodinâmica (TFD) em culturas planctônicas e biofilmes de *Candida albicans* formados *in vitro* e em modelo de candidose experimental em camundongos, bem como sua interferência na aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais humanas *in vitro*. Foi utilizada cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) para os ensaios. Como fonte de luz foi utilizado o Diodo Emissor de Luz (LED) com emissão de luz verde ( $532\pm 10$  nm) com potência de 90 mW e fotossensibilizador eritrosina nas concentrações variando de 200 a  $0,39\ \mu\text{M}$  para os ensaios em cultura plactônica. O biofilme foi formado em placas de 96 poços e tratado com o fotossensibilizador eritrosina na concentração de  $400\ \mu\text{M}$  e luz LED. 56 camundongos machos e adultos foram imunossuprimidos e inoculados com suspensões contendo  $10^8$  células/mL de *C. albicans*. Os animais foram submetidos a TFD mediada pelo corante eritrosina ( $400\ \mu\text{M}$ ) e irradiados por LED. Antes e após os tratamentos, foram recuperadas leveduras da cavidade bucal dos animais. As leveduras recuperadas após a TFD e grupo controle foram avaliadas quanto a interferência da TFD na aderência de *C. albicans* às células do epitélio bucal humano. Em seguida, os animais foram sacrificados e as línguas retiradas para análise macroscópica e histológica. Os biofilmes, línguas e lâminas de aderência foram também analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A análise dos dados foi feita por ANOVA e Teste de Tukey, teste *t* de Student e Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). A TFD aplicada à cultura planctônica de *C. albicans* foi dose-dependente com redução significativa a partir da menor concentração testada ( $0,39\ \mu\text{M}$ ) e 100% de morte das células a partir de  $3,12\ \mu\text{M}$ . A TFD em biofilme formado *in vitro* reduziu  $0,74\ \log_{10}$  de *C. albicans* com redução de leveduras e hifas verificada por MEV. *In vivo*, ocorreu redução de *C. albicans* de  $0,73\ \log_{10}$  e 35% de aderência às células epiteliais bucais, porém não houve redução significativa das lesões macroscópicas e histológicas. A MEV revelou numerosas hifas e alterações na língua. Foram encontrados blastoconídios em brotamento e tubos germinativos aderidos às células epiteliais bucais analisadas por microscopia de luz e

MEV. Os resultados demonstraram que a terapia fotodinâmica, mediada por eritrosina e LED verde, foi efetiva contra culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans* formados *in vitro* e apresentou atividade antifúngica para o tratamento de candidose bucal em modelo murino sem danificar os tecidos adjacentes. A aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais humanas foi significativamente reduzida após a terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Terapia Fotodinâmica. Eritrosina. Candidíase bucal. Adesão celular.

Costa ACBP. *In vitro and in vivo evaluation of Photodynamic Therapy on Candida albicans* [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2011.

## **ABSTRACT**

The aims of the present study were evaluate the antifungal action of Photodynamic Therapy (PDT) on *Candida albicans* planktonic cultures and biofilms formed in vitro and experimental candidosis model in mice, as well as its interference on *C. albicans* adherence on humans buccal epithelial cells in vitro. Standard strain of *C. albicans* (ATCC 18804) was used for assays. Green Light Emitting Diode (LED- 532  $\pm$  10 nm) was used as light source with an output power of 90 mW and erythrosine photosensitizer at concentrations range from 200 to 0.39  $\mu$ M for the assays on plaktonic cultures. The biofilm was formed on plates of 96- wells and treated with the erythrosine photosensitizer at a concentration of 400  $\mu$ M and LED light. 56 adults and males mice were immunosuppressed and inoculated with suspensions containing  $10^8$  cells/ mL of *C. albicans*. The animals were submitted to erythrosine dye- mediated PDT (400  $\mu$ M) and irradiated by LED. Before and after the treatments, yeasts from the animals' oral cavities were recovered. The yeasts recovered after PDT and control group were evaluated for interference of PDT on *C. albicans* adherence to humans buccal epithelial cells. Following, the animals were sacrificed and their tongues taken away for macroscopic and histological analysis. The biofilms, tongues and adherence slices were also analized by Scanning Electron Microscopy (SEM). The analysis of the dates were done by ANOVA and Tukey test, Student t test and Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). PDT applied on *C. albicans* planktonic culture was concentration-dependent with significant reduction from minor concentration tested (0.39  $\mu$ M) and 100% of cells death from 3.12  $\mu$ M. *C. albicans* biofilm formed in vitro was reduced 0.74  $\log_{10}$  by PDT with reduction of yeasts and hyphaes verified by SEM. In vivo, 0.73  $\log_{10}$  of *C. albicans* and 35% adherence on buccal epithelial cells were reduced, but there was not significant reduction of macroscopic and histological lesions. SEM revealed numerous hyphaes and alterations on the tongue. Blastoconidia budding and germ tubes were seen adhered on buccal epithelial cells analized by light microscopy and SEM. The results demonstrated PDT mediated by erythrosine and green LED was effective against *C. albicans* planktonic cultures and biofilms formed in vitro and presented antifungal activity for



*the treatment of oral candidosis in murine model without damaging the adjacent tissue. C. albicans adherence on humans buccal epithelial cells was significantly reduced by PDT.*

*Keywords: Candida albicans. Photodynamic therapy. Erythrosine. Oral candidosis. Cell adherence.*

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida albicans* constitui uma levedura comensal da cavidade bucal sendo a espécie mais virulenta do gênero. Alterações no ambiente do hospedeiro podem resultar em transição de *C. albicans* da fase comensal para a patogênica provocando infecções superficiais e até sistêmicas (Samaranayake et al., 2009; Wilson et al., 2009). Por se tratar de um microrganismo oportunista, para o estabelecimento da infecção são requeridos fatores predisponentes sistêmicos e ou locais, como o uso de agentes imunossupressores, antibióticos, estrogênios, xerostomia, uso de prótese e má higienização bucal (Jorge et al., 1993b; Naglik et al., 2008; de Souza et al., 2008).

Em pacientes imunodeprimidos, como os indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a candidose bucal é a manifestação fúngica mais comum constituindo um indicador da progressão da infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), revelando falha imunológica dos pacientes, pois a imunidade celular adquirida desempenha papel importante na prevenção contra a candidose bucal (Gaitán-Cepeda et al., 2005). Episódios recorrentes e exposição prévia aos antifúngicos convencionais são as principais causas de falha terapêutica para o tratamento da candidose bucal em pacientes com AIDS (Wilhelm et al., 2009).

A candidose pseudomembranosa é uma forma de candidose classificada como infecção aguda caracterizada pela presença de pseudomembranas brancas formadas por biofilme de *Candida*, formado por uma mistura heterogênea de blastoconídios, pseudohifas e hifas embebidas em substâncias poliméricas extracelulares (Seneviratne et al., 2008a; Samaranayake et al., 2009). Esta estrutura é um dos fatores

de virulência mais importantes na patogenicidade de *Candida*, além de ser difícil de ser erradicado em virtude de sua alta resistência aos antifúngicos disponíveis (Hawser, Douglas, 1995).

O primeiro passo para a formação do biofilme ocorre após a aderência das leveduras as células epiteliais do hospedeiro. A aderência é mediada por manoproteínas, quitinas, N-acetilglicosaminas e glicosaminas presentes na parede celular, as quais se ligam a receptores das células do hospedeiro localizados na matriz extracelular, como colágeno, vitronectina, fibronectina, laminina, tenascina-C e alguns peptídios e a moléculas do soro, como componentes do sistema complemento (C3d, iC3b, C4BP, fator H e FHL-1), hemoglobina, plasminogênio e fibrinogênio (Chaffin, 2008). A partir da aderência, as leveduras são capazes de invadir as células epiteliais e provocar danos (Wellmer, Bernhardt, 1997; Zhu, Filler, 2010).

O estudo da candidose bucal tem sido auxiliado pela busca e desenvolvimento de um modelo experimental adequado que forneça uma ferramenta padronizada e passível de controle e manipulação, para o conhecimento do processo da doença (Samaranayake, Samaranayake, 2001). Para o desenvolvimento da candidose bucal em animais foram utilizados fatores predisponentes como o uso de antibiótico de amplo espectro, xerostomia, influência de hormônios ovarianos e uso de corticóides (Allen et al., 1985; Jorge et al., 1993a; Jorge et al., 1993b; Totti et al., 2002; Takakura et al., 2003; Junqueira et al., 2005; Ishibashi et al., 2007)

Em modelo animal imunossuprimido, o camundongo é o animal mais indicado, pois apresenta sistema imunológico mais próximo ao do ser humano e não possui leveduras do gênero *Candida* como parte da microbiota bucal residente (Samaranayake; Samaranayake, 2001; Naglik et al., 2008).

Em virtude do acometimento de inúmeros indivíduos debilitados por infecções por leveduras do gênero *Candida* e a falha

terapêutica observada nestas situações, são propostas novas opções de tratamento para a redução destas leveduras na cavidade bucal, como o uso da Terapia Fotodinâmica (TFD). Esta terapia consiste em administrar um agente fotossensível não tóxico, por via tópica ou sistêmica, seguida de irradiação por uma fonte de luz em comprimento de onda adequado na presença ou não de oxigênio com consequente produção de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, os quais provocam danos inespecíficos nos microrganismos podendo provocar o extravasamento dos constituintes celulares e inativação de sistemas de transporte de membrana e enzimas, porém não apresentam efeitos mutagênicos (Hamblin, Hasan, 2004; Maisch, 2007; Konopka, Goslinski, 2007; Donnelly et al., 2008).

O fotossensibilizador eritrosina apresenta como principais vantagens em relação aos demais agentes fotossensíveis, aprovação para uso em Odontologia, falta de toxicidade para o hospedeiro e disponibilidade de uso (Wood et al., 2006). É indicado na prática odontológica para evidenciação de biofilme dentário. Este corante apresentou potente atividade fotodinâmica na redução de 3,0 a 3,7  $\log_{10}$  de biofilme de *Streptococcus mutans* (Wood et al., 2006; Metcalf et al., 2006).

A TFD requer uma fonte de luz que ative o fotossensibilizador por exposição à luz visível de baixa potência e com específico comprimento de onda (Konopka, Goslinski, 2007). Atualmente, o laser e outras fontes não coerentes de luz são utilizadas em TFD (Maisch, 2007). O laser compreende uma luz monocromática que produz linhas espectrais estreitas, altamente direcional, coerente, podendo ser focalizada em região muito pequena com grande precisão, concentrando alta quantidade de energia luminosa (Halliday et al., 2003). Como fonte de luz não coerente, o Diodo Emissor de Luz (*Light Emitting-Diode*- LED) tem sido apontado como fonte alternativa para a luz laser devido a maior banda de emissão, tamanho menor, leveza, baixo custo, maior

flexibilidade no tempo de irradiação e facilidade de operação (Zanin et al., 2005; Konopka, Goslinski, 2007). O LED é utilizado em Odontologia para polimerização de materiais restauradores e, portanto não é nocivo para os tecidos bucais. Estudos demonstraram que o LED apresentou potente atividade na TFD e ausência de ação antimicrobiana isoladamente (Zanin et al., 2005; Bevilacqua et al., 2007; Giusti et al., 2008).

A TFD, mediada por azul de metileno e laser Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl), já foi aplicada *in vivo* para o tratamento de candidose bucal induzida em ratos demonstrando reduzir as alterações epiteliais e resposta inflamatória crônica, porém sem redução do número de leveduras (Junqueira et al., 2009; Martins et al., 2011). Outros trabalhos alcançaram redução de leveduras do gênero *Candida* de 1,04 log<sub>10</sub> a 2,74 log<sub>10</sub> utilizando altas concentrações de fotossensibilizador, Photogen® e azul de metileno, e longos períodos de irradiação por LED azul e vermelho e laser (Teichert et al., 2002; Mima et al., 2010). Por isso torna-se importante o estudo da TFD *in vitro* para a avaliação da suscetibilidade dos microrganismos frente a este desafio, bem como o efeito desta terapia em alvos como fatores de virulência, para o desenvolvimento de protocolos de tratamento. É também importante o estudo da TFD *in vivo* em modelos de candidose experimental em animais, os quais se aproximam mais às condições clínicas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Candidose bucal

As leveduras mais comumente encontradas na cavidade bucal de indivíduos saudáveis são do gênero *Candida* e são isoladas de aproximadamente 62% dos indivíduos (Martins et al., 2002). Espécies de *Candida* são causa freqüente de infecção fúngica da mucosa e causa de infecções invasivas de origem endógena, sendo dano na mucosa e depleção neutrofílica pré-requisitos para a transição de colonização a disseminação (d'Enfert, 2009). As espécies mais prevalentes são *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Martins et al., 2002).

Como infecção oportunista, a candidose bucal ocorre em decorrência da virulência do microrganismo e a habilidade do hospedeiro em prevenir a colonização microbiana ou invasão, que pode ser facilitado por fatores de risco locais e sistêmicos como xerostomia, uso de prótese, má higienização bucal, uso de antibiótico de amplo espectro por tempo prolongado, corticosteróides, transplante de medula óssea e órgãos sólidos (fígado e rim), nascimento prematuro e de baixo peso, hemodiálise, queimadura, granulocitopenia, permanência prolongada (mais que 3 dias) em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), hospitalização prolongada, ventilação mecânica, pancreatite, trauma severo, cirurgia recente (especialmente do trato gastrointestinal), uso de cateter venoso central, cirurgias invasivas, infecção por HIV, doenças degenerativas e/ou neoplásicas, entre outros fatores que acometem pacientes imunodeprimidos, podem resultar em transição de *C. albicans* da fase comensal para patogênica (Jorge et al., 1993b; Gaitán-Cepeda et al.,

2005; Soysa et al., 2008; Souza et al., 2008; Meiller et al., 2009; Wilson et al., 2009; Vazquez, 2010).

Os fatores de virulência expressos pelas leveduras são principalmente a aderência as células do hospedeiro, hidrofobicidade, mudança morfológica (dimorfismo), secreção de aspartil proteinase, produção de fosfolipase e capacidade de formação de biofilme (Pomarico et al., 2009; Ellepola, Samaranayake, 1998; Lyon, Resende, 2006; Nobile, Mitchell, 2006).

A candidose bucal é a manifestação fúngica mais comum em pacientes com AIDS (Coogan et al., 2006). Entre 84 a 100% dos indivíduos HIV positivos desenvolvem pelo menos um episódio de colonização por *Candida* spp. e acima de 90% desenvolvem candidose pseudomembranosa sintomática. A candidose constitui um indicador da progressão da infecção por HIV, revelando falha imunológica dos pacientes (Samaranayake, Samaranayake, 2001; Gaitán-Cepeda et al., 2005; Samaranayake et al., 2009).

O uso de imunossupressores, como os glicocorticóides podem aumentar o risco de desenvolvimento de infecção oportunista severa (Ellepola, Samaranayake, 2001; Tanaka et al., 2002).

A metilprednisolona tem sido utilizada para tratamento de desordens reumáticas, estados alérgicos, dermatológicos, oftalmológicos, doenças neoplásicas, esclerose múltipla aguda e progressiva, nefropatia, pacientes transplantados e lupus eritematoso sistêmico (Gyetvai et al., 2007). Como efeito colateral local, este imunossupressor quando utilizado para o tratamento de asma pode causar candidose bucal em decorrência da diminuição da imunidade local envolvendo funções de defesa de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T na superfície da mucosa bucal e do esôfago e aumento dos níveis de glicose na saliva (Buhl, 2006). Pacientes que fazem uso de prednisolona em altas concentrações tendem a desenvolver infecções sistêmicas por *Candida* spp. como candidemia e meningite (Tanaka et al., 2002; Kee et al., 2004; Koch et al., 2004).

Os glicocorticóides inibem muitos processos associados com inflamação e resposta imune, como inibição da síntese de eicosanóides e produção de citocinas pelos linfócitos, reduzem a permeabilidade capilar causada por histamina e bradicinina, inibem a produção de bradicinina e migração de leucócitos para o sítio da inflamação e diminuem a produção de IL-2. Em modelo experimental para candidose bucal, o uso de glicocorticóide revelou em estudo histológico, supressão da reação inflamatória e imunidade celular (Ellepola, Samaranayake, 2001).

A candidose pseudomembranosa é uma infecção aguda caracterizada pela presença de pseudomembranas sobre a superfície da mucosa labial, língua e palato (Samaranayake et al., 2009). A pseudomembrana é formada por uma massa entrelaçada de hifas, blastoconídios, bactérias, células inflamatórias, fibrina e células epiteliais descamadas (Samaranayake et al., 2009). A análise histológica revela leveduras predominantemente localizadas em/ ou entre as células epiteliais descamadas e desprendidas, crescimento de hifas em direção as células epiteliais frouxas, deformação da membrana do epitélio e citoesqueleto e formação de invaginação das células epiteliais ao redor das hifas (Vitkov et al., 2002).

Para causar doença, inicialmente, é necessário o contato físico e aderência da levedura as camadas superiores do tecido do hospedeiro e proliferação fúngica. A seguir, ocorre invasão das hifas por penetração ativa e endocitose correlacionado com moderado dano tecidual e, então, ocorre severa destruição tecidual pela secreção de enzimas histolíticas (Zakikhany et al., 2007; Wilson et al., 2009; Zhu, Filler, 2010).

O tratamento da candidose bucal em pacientes HIV positivos é dificultado em virtude de episódios recorrentes e exposição intermitente e/ ou contínua de terapia antifúngica, que favorece a seleção de cepas resistentes. Estudos demonstraram que *C. albicans* e cepas



não-*albicans* podem desenvolver resistência ao fluconazol e anfotericina B (Winteger et al., 2007). O fluconazol é o antifúngico de escolha para tratamento de candidose bucal em indivíduos com HIV, entretanto Delgado et al. (2009) observaram sensibilidade dose-dependente para as cepas *C. glabrata*, *C. norvegensis* e *C. krusei*.

Wilheim et al. (2009) avaliaram o perfil de sensibilidade de 42 leveduras do gênero *Candida* isoladas de candidose de esôfago e obtiveram 14,28% de resistência e 4,76% de cepas com sensibilidade dose-dependente ao fluconazol, sendo que metade das cepas resistentes eram de pacientes previamente expostos a este antifúngico.

Os mecanismos de resistência aos antifúngicos azóis são decorrentes de mutação na enzima alvo (citocromo P450 lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase) no sítio de ligação, superexpressão do gene da enzima alvo (ERG 11) e bombas de efluxo (White et al., 2002; Mishra et al., 2007; Borecká-Melkusová et al., 2009; Niimi et al., 2010)

A anfotericina B tem sido utilizada como alternativa para o tratamento de candidose bucal (Samaranayake et al., 2009). A resistência a este antifúngico, apesar de ser rara, já foi relatada, além deste antifúngico apresentar efeitos colaterais consideráveis (Winteger et al., 2007; Samaranayake et al., 2009). O mecanismo de resistência deve-se a redução da quantidade de ergosterol na membrana plasmática (Niimi et al., 2010).

Os agentes antifúngicos normalmente não falham, entretanto, além da resistência relatada na literatura, na cavidade bucal o efeito diluente da saliva e ação da mucosa bucal frequentemente tendem a diminuir a disponibilidade dos antifúngicos abaixo da concentração terapêutica efetiva diminuindo a possibilidade de cura (Samaranayake et al., 2009).

## 2.2 Biofilme de *Candida*

Os microrganismos são encontrados na natureza na forma de biofilme, ou seja, estão arranjados em comunidades inseridas em uma matrix de substâncias poliméricas extracelulares, demonstrando características fenotípicas que se diferenciam da planctônica (Seneviratne et al., 2008a).

É documentado que pelo menos 65% de todas as infecções microbianas estejam relacionadas a presença de biofilme sobre a superfície de tecidos, órgãos e dispositivos médicos (Seneviratne et al., 2008b; Uppuluri et al., 2009).

O biofilme de *C. albicans* é formado por uma mistura heterogênea de blastoconídios, pseudohifas e hifas embebidas em substâncias poliméricas extracelulares que formam canais e poros (Seneviratne et al., 2008a). As substâncias poliméricas extracelulares são compostas por polissacarídeos, proteínas, hexosaminas, ácido urônico e DNA e apresentam como funções promover a aderência e formação do biofilme, proteger as células da fagocitose, manter a integridade do biofilme e limitar a difusão de substâncias (Douglas, 2003; Seneviratne et al., 2008a).

O biofilme pode ser formado no meio ambiente natural bem como em hospedeiros. As vantagens incluem proteção no ambiente, resistência à remoção física e química, cooperação metabólica e regulação da expressão de genes baseados na comunidade (Ramage et al., 2009).

A formação do biofilme ocorre, inicialmente, com a aderência das leveduras ao substrato, seguida por coagregação das células e colonização (Seneviratne et al., 2008a; Nobile, Mitchell, 2006). A presença das leveduras é importante para o ancoramento do biofilme a superfície (Douglas, 2002). A seguir, ocorrem crescimento e proliferação

das células permitindo a formação da camada basal e ancoragem das células e finalmente, ocorre maturação com o crescimento de pseudohifas e concomitante extensão das hifas a partir de tubos germinativos. Após aderência, a formação de tubos germinativos é estimulada pelo contato com uma superfície plástica com produção de material da matrix extracelular e disseminação das células (Douglas, 2002; Mitchell, 2006; Seneviratne et al., 2008a; Nobile, Ramage et al., 2009).

O mecanismo molecular de regulação da formação do biofilme já foi descrito por alguns autores (Blankenship, Mitchell, 2006; Ramage et al., 2009; Nobile et al., 2009; Nailis et al., 2009). A aderência, primeiro passo para a formação do biofilme é conferida pelos genes da família *ALS* responsáveis por aderência e agregação a outros microrganismos expressos por leveduras e hifas. O gene *HWP1* codifica uma adesina expressa somente por hifas, o gene *EAP1* confere aderência a poliestireno e o gene *CSH1* confere aderência relacionada com hidrofobicidade da superfície celular da levedura, além de outras adesinas menos conhecidas (Chaffin, 2008; ten Cate et al., 2009; Karkowska-Kuleta et al., 2009). Após aderência, segue-se a maturação com a formação de hifas e expressão do gene *EFG1* envolvido na regulação da transição morfológica e habilidade de formar estrutura coerente sobre poliestireno, poliuretano e vidro. Outros genes também são requeridos para a diferenciação morfológica como *TEC1*, *SUV3*, *NUP85*, *UME6*, *NRG1*, *MDS3* e *KEM3* (Blankenship, Mitchell, 2006; Ramage et al., 2009). A produção de matriz extracelular é realizada pelo gene *ADH1* e outros (Blankenship; Mitchell, 2006). Após o estabelecimento do biofilme, ocorre a invasão e dano celular por meio da expressão de genes para as principais enzimas histolíticas, aspartil proteinase secretoras (*SAPs*) e fosfolipases (*PLBs*) (Zhu, Filler, 2010).

As células presentes em biofilmes de bactérias ou fungos são capazes de coordenar suas atividades pela secreção de fatores de sinalização e responder a estes fatores (Blankenship, Mitchell, 2006).

Este fenômeno é conhecido como *Quorum-sensing* e é definido como a habilidade do microrganismo em comunicar e coordenar seu comportamento via secreção de moléculas de sinalização na população (Ramage et al., 2009). Sua função é prevenir a superpopulação desnecessária e controlar a competição por nutrientes, além de possuir importantes implicações no processo infeccioso. Em biofilmes de *Candida* são descritos dois principais sinalizadores com efeitos contrários, o farnesol que inibe a filamentação de *C. albicans* e o tirosol que favorece o crescimento e estimula a filamentação sob condições favoráveis para formação de tubo germinativo (Ramage et al., 2005).

Martins et al. (2007) investigaram o efeito de cinco sinalizadores, álcool isoamil, 2- feniletanol, 1-dodecanol, E- nerolidol e E,E- farnesol, secretados por células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, o qual foi coletado o sobrenadante das culturas e avaliados quanto ao controle da morfogênese. Os resultados demonstraram que os sobrenadantes das duas espécies tiveram atividade inibitória para a transição morfológica das formas leveduriformes para a forma filamentosa de *C. albicans* e pseudohifa de *C. dubliniensis*, com atividade inter e intraespécie, porém não houve restrição do crescimento.

O gene *ZAP1* codifica uma proteína-reguladora dependente de zinco, que segundo Nobile et al. (2009) parece influenciar no *Quorum-sensing*, pois esta proteína funciona amplamente como reguladora negativa da maturação do biofilme através da regulação negativa da produção de  $\beta$ -1,3- glucana solúvel, o maior componente da matriz extracelular.

A dificuldade no tratamento de infecções causadas por biofilmes de *Candida* deve-se principalmente a duas características: resistência aos antifúngicos e reduzida suscetibilidade ao sistema imune do hospedeiro (Nett et al., 2009). Os mecanismos de resistência aos azóis são os mais estudados em biofilmes de *Candida*, por estes serem

intrinsecamente resistentes a esta classe de antifúngicos (Chandra et al., 2005).

Bombas de efluxo codificadas pela superfamília de proteínas ABC (cassete-ligadora de ATP) e MFS (facilitador maior) possuem afinidade pelo antifúngico fluconazol e são os principais responsáveis pela resistência a este antifúngico. ABC codifica os genes *CDR1* e *CDR2* e MFS codifica *MDR1*. A superexpressão destes genes ocorre na fase intermediária e madura, porém se inicia na fase inicial da formação do biofilme (Prasad, Kappor, 2005; Chandra et al., 2005).

Em biofilmes de bactérias já foram relatadas a presença de células “persistentes” que representam uma menor população e são resistentes aos tratamentos com antibióticos. Estas células são protegidas das defesas do hospedeiro pela matriz extracelular e após a exposição ao antibiótico podem repovoar o biofilme, representando outro mecanismo de resistência que também já foi descrito em biofilmes de *C. albicans* (d’Enfert, 2009). Sugere-se que as células “persistentes” não sejam programadas para a morte celular, favorecendo a tolerância aos agentes antimicrobianos e a escassez de nutrientes no biofilme (Jabra-Risk et al., 2004).

Avaliações da suscetibilidade de biofilmes de *C. albicans* aos antifúngicos como anfotericina B, fluconazol, 5-fluorocitosina, itraconazol e cetoconazol revelaram que o biofilme desta espécie é altamente resistente aos agentes antifúngicos, permanecendo 5 a 8 vezes mais ativos metabolicamente do que as células planctônicas e 30 a 2000 vezes mais resistentes do que a Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo o fluconazol o agente antifúngico mais efetivo (Hawser, Douglas, 1995).

Kunh et al. (2002) avaliaram a sensibilidade de biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* ao fluconazol, voriconazol, anfotericina B, nistatina, ravuconazol, terbinafina, caspofungina, micafungina, clorexidina, complexo lipídico de anfotericina B e anfotericina B lipossomal. O biofilme

foi resistente ao fluconazol, voriconazol, clorexidina, anfotericina B, nistatina, terbinafina e ravuconazol em relação às células planctônicas. Porém os antifúngicos caspofungina, micafungina, complexo lipídico de anfoterina B e anfotericina B lipossomal apresentaram efeito contra os biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Foi realizado também pré-tratamento do biofilme de *C. albicans* com voriconazol, caspofungina e complexo lipídico de anfotericina B, resultando em diminuição da habilidade das células em formar biofilme, perda de viabilidade, parede celular distorcida e pseudohifas deformadas quando tratadas com voriconazol. Para caspofungina foi observada parede celular brutalmente distorcida e sem evidência de viabilidade, enquanto que para complexo lipídico de anfotericina B foram observadas células menores e grandes vacúolos. Os autores sugerem que as equinocandinas (caspofungina e micafungina) podem afetar o biofilme dissolvendo a matriz extracelular e tornando as células fúngicas vulneráveis e o complexo lipídico de anfoterina B e anfotericina B lipossomal tem a habilidade de dispersar-se nos fosfolipídios e facilitar a passagem através dos polissacarídios carregados da matriz.

Em estudo *in vivo* realizado por Lazzell et al. (2009), foi avaliado o efeito preventivo e tratamento por caspofungina em biofilme de *C. albicans* formado em cateter venoso central em camundongos. O tratamento com caspofungina reduziu, aproximadamente, 4 log<sub>10</sub> de células do biofilme e 99% de células disseminadas para os rins. A prevenção da formação do biofilme reduziu quase 3 log<sub>10</sub> de células e a disseminação para os rins, indicando que a caspofungina constitui importante agente na prevenção e tratamento de infecções causadas por biofilmes de *C. albicans* e disseminação para órgãos distantes.

Estudo realizado por Al-Fattani e Douglas (2004) com biofilmes mistos de *C. albicans* e *Staphylococcus epidermidis* produtor e não produtor de *slime* demonstrou que houve diminuição da difusão dos antifúngicos fluconazol, anfotericina B, 5-fluorocitosina e voriconazol no

biofilme misto de *C. albicans* e *S. epidermidis* produtor e não produtor de *slime*, porém a presença da matriz não explicou a resistência do biofilme de *C. albicans* aos antifúngicos. Os mesmos autores em 2006 utilizando as mesmas cepas e associações de *C. albicans* e *S. epidermidis* produtor e não produtor de *slime* observaram que, quando crescidos em condições estáticas e de fluxo contínuo *C. albicans* associada com *S. epidermidis* produtor de *slime* foi altamente resistente a anfotericina B e ao fluconazol e quando associada a cepa não produtora de *slime* *C. albicans* foi mais sensível em condições estáticas do que em fluxo contínuo, apesar do perfil de resistência ainda elevado.

Estes estudos demonstram que apesar da matriz extracelular parecer afetar a difusão dos antifúngicos, este não é o motivo mais importante (Al-Fattani, Douglas, 2006; Al-Fattani, Douglas, 2004), pois a matriz extracelular desempenha um papel parcial na resistência de células sésseis, uma vez que biofilmes crescidos em agitação ou em fluxo contínuo produzem mais substância polimérica extracelular do que biofilmes formados em condições estáticas, porém são igualmente resistentes aos antifúngicos e células planctônicas derivadas de biofilmes também são resistentes aos antifúngicos, porém em um nível menor do que quando estavam no biofilme, demonstrando que a resistência do biofilme de *C. albicans* é multifatorial (Mukherjee, Chandra, 2004; Ramage et al., 2005; Hawser, Douglas, 1995; Blankenship, Mitchell, 2006).

A diminuição da suscetibilidade do biofilme aos antifúngicos em relação às células planctônicas provavelmente devem-se a heterogeneidade da população do biofilme, restrição da penetração dos antimicrobianos devido ao material da matrix extracelular, diminuição da taxa de crescimento das células dentro do biofilme e diferença de expressão de genes (Nobile, Mitchell, 2006; Ramage et al., 2001).

Seneviratne et al. (2009) desenvolveram um modelo de biofilme de *Candida* crescido no fundo da placa de 96 poços de

poliestireno em meio de cultura *Yeast Nitrogen Base* (YNB) suplementado com 100 mM de glicose para a avaliação de biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, o qual foi observado que  $1-7 \times 10^5$  células/mL aderem a superfície de poliestireno em 1,5 horas. *C. albicans* formou um biofilme grosso e complexo composto por blastoconídios, pseudohifas e hifas embebidas em matriz polissacarídica extracelular. O biofilme formado por *C. glabrata* foi fino, desigual e bastante compacto, formado por blastoconídios embebidos em matriz polissacarídica extracelular. Após a fase de aderência de 1,5 horas, a 48 horas os biofilmes atingiram a maturidade e alcançaram um platô de  $0,3-2,2 \times 10^8$  células/mL e declinaram e desintegraram a 72 horas. Os autores relataram que a presença de hifas em biofilmes de *C. albicans* contribuíram para a formação de um biofilme robusto suportando a matriz polissacarídica extracelular e blastoconídios em uma comunidade multicamada. A forte aderência a superfície da placa de poliestireno deve-se a afinidade desta levedura por superfícies hidrofóbicas (Harrison et al., 2007).

Hasan et al. (2009) avaliaram a virulência de biofilmes de *C. albicans* de isolados clínicos e de lesão em mucosa bucal com alta capacidade de formação de biofilme (AFB), baixa capacidade de formação de biofilme (BFB) e não formação de biofilme (NFB) em candidemia induzida em camundongos. Na candidemia induzida por cepas AFB houve correlação entre formação de biofilme e virulência, alta carga fúngica nos rins, fígado e pulmão e rápida mortalidade de 1-4 dias, contra 10 a 20 dias para BFB e mais que 40 dias para NFB, devido a formação de hifas por estas cepas. Segundo Angiolella et al. (2008) a produção de hifas pode promover a formação de biofilme e possivelmente o choque, pois a hifa é muito mais adesiva e menos fagocitada que as leveduras. Os resultados destacaram a capacidade de formação de biofilme como importante fator de virulência em infecções causadas por *C. albicans*.



Martins et al. (2010) investigaram a presença de DNA extracelular em matriz extracelular de biofilme de *C. albicans* e avaliaram o efeito de DNase e DNA exógeno na formação do biofilme. Os biofilmes foram crescidos em RPMI, YNB suplementado com 0,9% de glicose e meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD). A quantidade de DNA extracelular e a razão DNA/proteína foi maior para o meio YNB do que para RPMI e YPD. Estes dados sugerem que o acúmulo de DNA foi influenciado pelo meio de cultura. A adição de DNase ao biofilme pré-formado causou a diminuição da biomassa, o qual foram observadas células destacadas, entretanto não afetou a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL, já a adição de DNA exógeno levou ao aumento da biomassa do biofilme. Os resultados indicaram que o DNA extracelular pode contribuir para a manutenção e estabilidade do biofilme maduro de *C. albicans*.

### **2.3 Parede celular de *Candida albicans* e aderência**

A parede celular de *C. albicans* é uma estrutura rígida que possui como principais funções manter a integridade da célula e interagir com o ambiente (Chaffin, 2008). É constituída por 4 componentes majoritários: manoproteínas,  $\beta$ -1,3-glucana,  $\beta$ -1,6-glucana e quitina.

A parede celular de *C. albicans* é formada internamente por uma rede tridimensional de  $\beta$ -1,3-glucana ramificada, o qual está fixado  $\beta$ -1,6-glucana e quitina. Algumas quitinas podem estar fixadas a  $\beta$ -1,6-glucana (Chaffin, 2008; ten Cate et al., 2009). O componente  $\beta$ -1,3-glucana é a principal estrutura polissacarídica, é moderadamente ramificada e a elasticidade da parede reflete a conformação helicoidal da mesma. As  $\beta$ -1,6-glucanas estão covalentemente ligadas a finais não reduzidos de  $\beta$ -1,3-glucanas, altamente ramificadas, solúveis em água,

que funcionam como ligantes flexíveis entre as proteínas e são mais rígidas que a camada de  $\beta$ -1,3-glucana (Klis et al., 2009). A quitina é formada por polímeros não ramificados de N- D- acetilglicosamina com ligações  $\beta$ -1,4. As proteínas da parede celular (*Cell Wall Proteins- CWP*s) estão ligadas covalentemente a este emaranhado fibrilar de polissacarídios de duas formas. A primeira e mais abundante classe de proteínas da parede celular está fixada a  $\beta$ -1,6-glucana por meio da glicofosfatidilinositol (*Glycophosphatidylinositol- GPI*), fortemente manosilada e fosforilada. A segunda classe de proteínas, chamada proteínas com repetições internas (*Proteins with internal repeats- Pir*) estão ligadas a  $\beta$ -1,3-glucana, contribuindo com a arquitetura da parede celular. A terceira classe de proteínas não está fixada a matriz polissacarídica (Chaffin et al., 2008; ten Cate et al., 2009).

Existem aproximadamente 20 tipos de proteínas da parede celular (CWP)s que desempenham importantes papéis na adaptação e virulência, contribuem para a integridade da parede, evitam a detecção por dectina-1, promovem a formação de biofilme, medeiam a aderência as células do hospedeiro e a dispositivos médicos abióticos, promovem a invasão das camadas epiteliais, oferecem proteção contra o ataque do sistema imune inato, estão envolvidas na aquisição de ferro, além de propriedades como permeabilidade da parede celular e carga (Klis et al., 2009). Dentre as principais GPI-CWP)s fixadas a parede celular estão as 8 adesinas da família *ALS*, *HWP1*, *EAP1* e *PGA30*, sendo esta última responsável por restringir a permeabilidade da parede celular (Klis et al., 2009). Além disso, existem CWP)s não fixadas covalentemente a parede celular com função enzimática, como por exemplo enzimas hidrolíticas que tem a capacidade de hidrolisar grandes ou complexos substratos e transportá-los para dentro da célula como fonte de nutrientes. Outras enzimas agem como fatores de virulência degradando os tecidos do hospedeiro facilitando a colonização ou invasão. Exemplos destas CWP)s são as proteínas da família da aspartil proteinase,

fosfolipase, quitinases, proteínas para biossíntese de  $\beta$ -1,6-glucana e enzimas com atividade para glucanase (Chaffin et al., 2008).

No processo de infecção e colonização, a aderência mediada pelas CWP's é o primeiro passo para a interação física da célula com o hospedeiro (Karkowska-Kuleta et al., 2009). Além disso, *C. albicans* pode aderir a si mesma por floculação e a outros microrganismos por coagregação (Chaffin et al., 2008).

As adesinas de *C. albicans* são constituídas por manoproteínas, quitina, N-acetilglicosamina e glicosamina, estas se ligam a receptores das células do hospedeiro localizados na matriz extracelular, como colágeno, vitronectina, fibronectina, laminina, tenascina-C e alguns peptídeos. Moléculas do soro também podem se ligar a superfície de *C. albicans*, como por exemplo, componentes do sistema complemento (C3d, iC3b, C4BP, fator H e FHL-1), hemoglobina, plasminogênio e fibrinogênio (Chaffin, 2008).

A infecção por *C. albicans* ocorre com a aderência da levedura a superfície do hospedeiro seguida de internalização com conseqüente dano tecidual com invasão por endocitose, penetração ativa por pseudópodes e passagem através da junção intercelular. Muitos estudos relacionados a compreensão do processo provocado pela aderência de *C. albicans* no epitélio bucal foram realizados (Wellmer, Bernhardt, 1997; Drago et al., 2000; Kriznik et al., 2005; Zhu, Filler, 2010; Dalle et al., 2010).

A aderência às células do epitélio bucal é mediada por Als1p, Als3p e Als5p que se ligam ao colágeno, fibronectina, laminina, células endoteliais e epiteliais e Hwp1p expressa somente por hifas (Karkowska-Kuleta et al., 2009). Além disso, Hwp1p se liga a Als1p e Als3p mediando à aderência de uma hifa a outra. Após a aderência, a internalização é mediada também por Als3p e por atividade da enzima aspartil proteinase (Zhu, Filler, 2010).

Wellmer e Bernhardt (1997) avaliaram aderência as células do epitélio bucal por 11 isolados de *C. albicans*. Os autores observaram formação de tubo germinativo após 30 minutos de contato com as células e formação de micélio após 90 minutos, entretanto houve variação de aderência entre os isolados. As cepas com maior valor de aderência, mais de 30% de células do epitélio bucal com leveduras aderidas e mais de 300 leveduras por 200 células mostraram ser mais rápidas e houve maior formação de tubo germinativo em modelo de fluxo contínuo destacando a importância destes fatores de virulência durante o processo infeccioso. Outro estudo realizado por Kriznik et al. (2005) revelou que a aderência às células do epitélio bucal foi maior para formas filamentosas de *C. albicans* (95%) do que para leveduras (33%).

Drago et al. (2000) estudaram a internalização de *C. albicans* por células do epitélio bucal, vaginal e células HeLa, demonstrando que as células não tipicamente fagocíticas, como bucais e vaginais, são capazes de internalizar *C. albicans*, sugerindo que este processo protegeria a levedura da ação de antifúngicos. Além disso, os autores destacaram o uso deste modelo experimental para avaliar novos fármacos com alvos na aderência e internalização de *C. albicans*.

Em estudo realizado por Dalle et al. (2010) em cultura de células do epitélio bucal de diversos tempos (3, 7, 14 e 21 dias) de diferenciação foi observado que após 30 minutos de contato com *C. albicans* houve 21,6% de aderência com aumento do valor da aderência ao longo do curso do tempo de diferenciação. A penetração das hifas nas células do epitélio bucal ocorreu próximo aos espaços intercelulares entre as células adjacentes alcançando 75,6% de invasão após 3 horas de contato com células de 3 dias, o qual foi observado que a forma filamentosa foi a forma invasiva de *C. albicans*. Nas primeiras horas de contato a invasão ocorreu por endocitose, entretanto o mecanismo de penetração ativa durante o curso da infecção parece ser mais comum, pois as camadas superiores estão mortas, uma vez que para que ocorra

endocitose necessita-se de atividade celular, pois este processo é dependente da ação de filamentos de actina. Foi avaliado o potencial de penetração dado por aspartil proteinase inibindo sua ação com uso de pepstatina A, observando-se redução da invasão das células do epitélio bucal, demonstrando que esta enzima pode estar envolvida na penetração ativa e indução de endocitose.

## 2.4 Candidose experimental

No estudo da candidose bucal, modelos animais adequados para a avaliação da etiopatologia, diagnóstico e gerenciamento do processo da doença são necessários (Samaranayake; Samaranayake, 2001). O modelo animal em camundongo tem sido útil para o desenvolvimento de candidose experimental, pois o mesmo não possui *Candida* spp. como constituinte da microbiota e resposta imune secundária contra este microrganismo. Além disso, este animal é facilmente obtido em grande número, apresenta sistema imune mais semelhante ao do ser humano e sua manutenção é mais barata (Samaranayake, Samaranayake, 2001; Takakura et al., 2003; Totti et al., 2002; Naglik et al., 2008).

A presença de xerostomia é um importante fator predisponente para o aparecimento da candidose bucal comprovando o efeito protetor da saliva. Estudos realizados em ratos sialoadenectomizados e inoculados com *C. albicans* demonstraram que após 5 semanas de inoculação, as leveduras foram recuperadas de 50% dos ratos controles e 100% dos ratos sialoadenectomizados e após 32 semanas de inoculação, 20% dos animais controles e 70% dos ratos sialoadenectomizados apresentavam infecção por *C. albicans* (Jorge et al., 1993a; Jorge et al., 1993b).

Totti et al. (2002) avaliaram o efeito da xerostomia em camundongos sialoadenectomizados demonstrando que os animais permaneceram colonizados por *C. albicans* até 75 dias após a inoculação, contra 30 dias de colonização para os animais controles. O uso de camundongos no estudo favoreceu a permanência de *C. albicans* na cavidade bucal, uma vez que estes animais não são portadores de leveduras do gênero *Candida* na boca.

Com o objetivo de estudar o efeito da sialoadenectomia no desenvolvimento de candidose bucal em camundongos após 1 e 4 inoculações de *C. albicans*, Totti et al. (2004) observaram que houve maior permanência de *C. albicans* após 4 inoculações do que 1 inoculação em animais sialoadenectomizados do que em animais controles. A análise histológica do dorso da língua dos animais sialoadenectomizados revelou presença de pseudohifas dentro do epitélio, achatamento da papila lingual, acantose, infiltrado inflamatório neutrofílico formando microabscessos intraepiteliais com prevalência das lesões na região das papilas cônicas e verdadeiras. O estudo demonstrou que a sialoadenectomia e uma maior frequência de inoculações influenciaram na presença e extensão das lesões de candidose.

Junqueira et al. (2005) avaliaram os efeitos dos hormônios ovarianos na candidose bucal estudando ratas controles e ovariectomizadas. Após três inoculações consecutivas com suspensão de *C. albicans*, os animais foram sacrificados nos intervalos de 6 horas, 24 horas, 7 dias e 15 dias após a última inoculação. Os animais ovariectomizados apresentaram menos ocorrência de lesões de candidose e menos recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal em relação às ratas controles, sugerindo que os hormônios ovarianos têm influência significativa sobre a candidose bucal.

Takakura et al. (2003) desenvolveram um modelo animal para candidose pseudomembranosa utilizando camundongos imunossuprimidos. A indução foi facilitada com a administração de cloreto

de tetraciclina a 0,83 mg/mL na água de beber e administração de prednisolona na dose de 100 mg/Kg de massa corpórea. Os resultados indicaram que a combinação de tetraciclina e prednisolona aumentaram a colonização de *Candida* na cavidade bucal e que houve correlação com o grau de candidose pseudomembranosa. O tratamento com fluconazol e anfotericina B apresentou atividade terapêutica com melhora das manifestações bucais. Segundo os autores, o modelo experimental constitui uma importante ferramenta para a avaliação da atividade terapêutica de novos antimicrobianos.

O modelo murino para candidose experimental desenvolvido por Takakura et al. (2003) inspirou vários trabalhos com o intuito de estudar o processo da doença e avaliar os efeitos de novas opções terapêuticas (Ishibashi et al., 2007; Kamagata- Kiyoura et al., 2004; Hisajima et al., 2008; Yanagi et al., 2008; Takakura et al., 2004; Taguchi et al., 2010). Kamagata- Kiyoura et al. (2004) avaliaram o efeito da saliva humana pré- aquecida a 60°C e a 100°C e água destilada após 3, 6, 12, 24 e 36 horas de inoculação com *C. albicans* de acordo com o modelo experimental desenvolvido por Takakura et al. (2003). A saliva pré- aquecida a 60°C administrada 5 vezes em temperatura ambiente reduziu significativamente a contagem de células viáveis de *Candida* comparada com 1 tratamento com saliva pré- aquecida a 100°C ou água destilada. Os animais tratados com saliva pré- aquecida a 100°C por 20 minutos apresentaram as mesmas condições de infecção que os animais controles. Sugeriu-se que a saliva pode ter afetado o processo de infecção e colonização através dos fatores antimicrobianos não destruídos a 60°C.

A lactoferrina foi avaliada no tratamento de candidose bucal, não somente para seu efeito antifúngico como também para o efeito na resposta imune local e sistêmica por Takakura et al. (2004). A lactoferrina bovina foi colocada na água de beber 1 dia antes da infecção com *C. albicans* e as coletas de amostras foram realizadas durante 7 dias

após a infecção. A partir do 5º dia foi observada diminuição de *C. albicans* e dos escores da lesão, embora estes resultados tenham sido mais significantes a partir do sexto e sétimo dia. O tratamento com lactoferrina bovina promoveu a diminuição de linfócitos, porém não houve diferença para neutrófilos. As células extraídas dos linfonodos dos animais tratados e cultivadas com *C. albicans* produziram mais IFN- $\gamma$  e IL-12 que os controles a partir do 5º dia, com diminuição de IL-12 no 6º dia. Neste dia ocorreu correlação inversa entre os níveis IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e os valores de UFC/mL. Os dados sugeriram que a lactoferrina apresentou além de atividade antifúngica, ação imunomodulatória direta e que esta substância presente no leite bovino poderia ser usada não somente como enxágüe bucal como também ser incluída na dieta.

Ishibashi et al. (2007) utilizaram o modelo experimental proposto por Takakura et al. (2003) para o desenvolvimento de candidose de esofaringe. Após 3 inoculações, os autores observaram nos cortes histológicos hifas nas placas brancas e formação de tubo germinativo no tecido epitelial da mucosa com reação inflamatória, destacando a formação do tubo germinativo como o mais importante fator de virulência para a invasão tecidual. O uso do imunossupressor prednisolona foi necessário para o estabelecimento da infecção, pois sabe-se que este glicocorticóide é um fator predisponente bem conhecido para a candidose de mucosa.

O primeiro trabalho avaliando o efeito protetor do farnesol, uma importante substância que participa do *Quorum-sensing*, em candidose de mucosa foi realizado por Hisajima et al. (2008). O tratamento resultou em redução das lesões, redução de células de *C. albicans* e análise histológica com poucos micélios e células inflamatórias. O trabalho demonstrou que o farnesol preveniu a invasão do fungo na mucosa.

Yanagi et al. (2008) avaliaram o efeito de filme de propionato de beclometasona em camundongos com candidose bucal. Os



animais com filme sobre a língua apresentaram 10 vezes mais células viáveis de *C. albicans* e quando foram imunossuprimidos com prednisolona e tratados com filme impregnado houve 100 vezes mais células viáveis de *C. albicans* que o controle. Além disso, a análise histológica exibiu próximo ao filme regiões cobertas por leveduras e hifas enquanto que para o controle quase não houve crescimento de hifas. O estudo demonstrou que o uso de filme impregnado com propionato de beclometasona agravou o quadro de candidose.

Taguchi et al. (2010) avaliaram o efeito dos extratos de capim santo (*Cymbopogon citratus*), chá verde (*Camellia sinensis*) e canela (*Cinnamomum cassia*) após três dias de inoculação de *C. albicans*. Os extratos de capim santo e chá verde não mostraram melhora significativa nos sintomas e número de células viáveis, enquanto que o extrato de canela exibiu redução significativa das lesões clínicas. Além disso, as línguas apresentaram aparência normal e saudável e a análise histológica revelou menos hifas e infiltrado inflamatório. Os autores destacaram que o extrato de canela poderia ser candidato como ferramenta profilática ou terapêutica contra infecções por *C. albicans*.

A prednisolona foi avaliada por Gyetvai et al. (2007) quanto a influência nos fatores de virulência e fisiologia (defesa contra estresse oxidativo) de *C. albicans*. Os autores observaram que esta substância apresentou ação ambígua, pois houve aumento do crescimento em caldo Sabouraud dextrose, aumento da capacidade de germinação em soro de carneiro e aumento da produção de fosfolipase que foram contrabalanceados por aumento do reconhecimento por leucócitos polimorfonucleares (PMN) e aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo. Não foi observada influência na aderência a materiais plásticos e liberação de aspartil proteinase.

Na literatura existem trabalhos com outras metodologias com animais imunossuprimidos para candidose bucal para estudo de novos tratamentos e processo da doença, descritos por Chami et al.

(2004) e Dongari-Bagtzoglou et al. (2009), respectivamente. Chami et al. (2004) avaliaram o efeito de duas substâncias de origem vegetal, carvacrol e eugenol, em candidose experimental induzida em ratos Wistar imunossuprimidos com o glicocorticóide dexametasona e tratados com tetraciclina na água de beber, demonstrando que os animais controles apresentaram extensiva colonização por hifas na superfície dorsal da língua. Para os animais tratados com carvacrol não foi encontrada infecção por *Candida* e para os animais tratados com eugenol foram encontrados poucos focos ocupados por hifas. Nos animais tratados com carvacrol ou eugenol não foram encontradas leveduras nas dobras da língua como encontrado para o grupo tratado com nistatina, podendo constituir focos para infecções recorrentes. Os autores relataram que a imunossupressão foi necessária para o sucesso do modelo experimental.

Dongari-Bagtzoglou et al. (2009) utilizaram camundongos imunossuprimidos para indução de candidose pseudomembranosa de orofaringe para posterior caracterização sistemática da composição do biofilme na mucosa *in situ*. Os animais foram imunossuprimidos com acetato de cortisona e inoculados com *swab* encharcado com cepa clínica de *C. albicans* duas vezes, a segunda vez 2 dias mais tarde, e administrado suspensões de leveduras na água de beber. A microscopia confocal a laser revelou variações microanatômicas do epitélio da papila lingual, formando depressões, altas elevações de empilhamento de células fúngicas como também áreas escuras entre os microrganismos sugestivo de matriz extracelular. No tecido seccionado foi investigada a presença de  $\beta$ -glucana através de anticorpo anti  $\beta$ -glucana sendo imunoacessível por toda a massa do biofilme e notado na superfície da hifa e levedura. Foram observados neutrófilos que migraram por toda a mucosa formando microabscessos. O biofilme formado sobre a língua foi constituído por biofilme misto de *C. albicans* e bactérias sendo algumas identificadas como *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e

*Staphylococcus* spp., em que foram vistas bactérias invadindo o epitélio junto com *C. albicans*.

## 2.5 Terapia Fotodinâmica (TFD)

O protocolo de tratamento com TFD refere-se a administração de um fotossensibilizador seguida de irradiação do tecido fotossensibilizado com luz de comprimento de onda adequado. O fotossensibilizador passa por uma transição do estado fundamental de baixa energia para o estado triplete de alta energia. O estado triplete do fotossensibilizador pode reagir diretamente com biomoléculas para produzir radicais livres e espécies reativas de oxigênio (reação tipo I) ou com oxigênio molecular para produzir oxigênio singleto reativo (reação tipo II) (Maisch, 2007; Pleatzer et al., 2009). A reação tipo I é caracterizada pela transferência de elétrons (ou prótons) para o oxigênio e outras moléculas adjacentes para formar radical ânion ou cátion, respectivamente. Estes radicais podem reagir com o oxigênio molecular para formar espécies reativas de oxigênio. Os ânions superóxidos reagem com sistemas biológicos podendo produzir peróxido de hidrogênio responsável por dano celular. Este composto passa facilmente através da membrana citoplasmática não sendo restrito ao compartimento celular. A reação tipo I não requer necessariamente a presença de oxigênio ocorrendo através da ação de radicais livres formados que causam dano celular. Na reação fotoquímica tipo II ocorre transferência de energia ao oxigênio molecular com formação de oxigênio singleto. Os dois tipos de reação ocorrem em paralelo e dependem do fotossensibilizador usado e principalmente da concentração de oxigênio. A maioria dos fotossensibilizadores apresenta a reação tipo II como reação dominante (Pleatzer et al., 2009).

A reação fotodinâmica ocorre quando o fotossensibilizador no estado singleto em seu nível fundamental absorve fótons de luz de específico comprimento de onda e então a molécula é promovida ao estado excitado, o qual também é estado singleto. Alternativamente, o fotossensibilizador pode converter-se para o estado tripleto de menor energia, porém com tempo de vida mais longo que o estado singleto. Esta conversão envolve uma mudança no *spin* de um elétron. O fotossensibilizador pode retornar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou por conversão com perda de calor sem alteração química, podendo participar novamente do processo (Donnelly et al., 2008). Pode ocorrer também destruição do fotossensibilizador em fragmentos pequenos, o qual estes não absorverão na região do espectro visível (Pleatzer et al., 2009).

O interesse nos fotossensibilizados que sofrem reação tipo II deve-se ao fato de as células possuírem enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e catalase que protegem contra alguns radicais oxigenados, mas não contra oxigênio singleto que provoca danos em ácidos graxos insaturados de membranas lipídicas, passando por reações de peroxidação e danos em enzimas por reações específicas com os aminoácidos metionina, triptofano e tirosina e danos nos ácidos nucléicos por interação inicial com bases guaninas (Konopka, Goslinski, 2007; Banks et al., 1985).

### 2.5.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFD)

A TFD antimicrobiana foi realizada pela primeira vez em 1900 por Oskar Raab que observou toxicidade em células de *Paramecia caudatum* tratado com acridina sob efeito da luz. Mais tarde em 1904 von

Tappeiner nomeou este fenômeno como reação fotodinâmica (Maisch, 2007).

Na metade do século passado a TFD foi esquecida devido à descoberta dos antibióticos e então direcionada para o tratamento do câncer a partir de 1975 (Maisch, 2007; Pleatzer et al., 2009). Entretanto, nos últimos anos vem crescendo o interesse por novas alternativas de tratamentos de infecções causadas por bactérias e fungos resistentes aos antibióticos e antifúngicos disponíveis, respectivamente, com interesse particular para o tratamento de infecções fúngicas, pois o número de drogas disponíveis é limitado quando comparado com a terapia antibiótica (Casey et al., 2007; Donnelly et al., 2008).

A vantagem da TFD antimicrobiana em relação aos demais tratamentos é o improvável desenvolvimento de resistência a TFD antimicrobiana, visto que em células microbianas o oxigênio singlete e os radicais livres interagem com várias estruturas celulares e vias metabólicas diferentes. Esta terapia é igualmente efetiva contra bactérias e fungos resistentes e sensíveis aos antimicrobianos, além de não induzir a seleção de cepas resistentes (Konopka, Goslinski, 2007).

Demidova e Hamblin (2005) avaliaram a inativação fotodinâmica mediada por três fotossensibilizadores, clorina conjugada poli-L-lisina, azul de toluidina e rosa bengala, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *C. albicans*. O nível de suscetibilidade foi maior para *S. aureus* seguida de *E. coli* e de *C. albicans*. *C. albicans* mostrou-se o mais resistente, provavelmente devido ao seu tamanho 10 a 50 vezes maior do que as bactérias, que requer maior quantidade de oxigênio singlete, pois apresenta mais alvos por unidade de volume da célula, como também a presença da membrana nuclear que atua como uma barreira adicional dificultando o sucesso da terapia (Zeina et al., 2001; Donnelly et al., 2007).

O estudo da TFD contra *C. albicans* tem sido investigada também quanto ao seu efeito na célula e fatores de virulência em

combinações de tratamentos com diversas fontes de luz e fotossensibilizadores (Lambrechts et al., 2005; Cormick et al., 2009; Bliss et al., 2004; Girollo et al., 2009; Chabrier-Roselló et al., 2005; Munin et al., 2007).

O fotofrin e irradiação com lâmpada de mercúrio ( $9 \text{ J.cm}^{-2}$ ) foram estudados em *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*, em que as duas últimas espécies foram mais resistentes a TFD que *C. albicans*, porém *C. glabrata* foi modestamente reduzida mesmo nas concentrações mais altas. Após o tratamento, foi observada pouca recuperação do crescimento após várias horas, poucas colônias formadas e células deformadas, uma vez que o blastoconídio foi mais resistente a TFD do que a forma filamentosa (Bliss et al., 2004).

Trabalhos utilizando porfirinas na inativação fotodinâmica de *C. albicans* reduziram 5- 6  $\log_{10}$  de células e foi relatado que os tratamentos interferiram na membrana citoplasmática com subsequente dano nos alvos intracelulares (Lambrechts et al., 2005; Cormick et al., 2009).

Estudos demonstraram o efeito da TFD em fatores de virulência de *C. albicans* como formação de tubo germinativo e biofilme. Chabrier-Roselló et al. (2005) avaliaram o efeito do fotossensibilizador fotofrin irradiado por lâmpada de mercúrio ( $18 \text{ J.cm}^{-2}$ ) em biofilme e tubo germinativo de *C. albicans*. Os resultados demonstraram que os biofilmes tratados com a TFD apresentaram significativa redução em relação aos tratados com o antifúngico convencional anfotericina B. O tratamento em tubo germinativo demonstrou que houve perda da integridade da membrana e morte celular. Os autores sugeriram que sejam feitas mais pesquisas para designar estudos em animais para o tratamento de candidose cutânea e mucocutânea.

Munin et al. (2007) conseguiram com o uso da TFD mediada por azul de metileno nas concentrações de 0,027 a 13,37 mM associado ao laser AsGaAl (683 nm) com fluência de  $28 \text{ J.cm}^{-2}$  reduzir

significativamente o número de UFC/mL observando células de aparência anormal e tamanho pequeno. Além disso, conseguiram diminuir significativamente a porcentagem de células formando tubos germinativos, uma vez que este representa um importante fator de virulência para a invasão.

O aumento da permeabilidade da membrana foi apontada como causa de morte de células de *C. albicans* quando submetida a TFD com azul de metileno na concentração de 133,7  $\mu\text{M}$  e irradiado por laser de diodo ( $28 \text{ J.cm}^{-2}$ ) com redução de  $3,7 \log_{10}$  de células, provavelmente devido a geração de espécies reativas de oxigênio (Giroldo et al., 2009).

O primeiro trabalho de TFD em modelo animal de candidose experimental foi realizado por Teichert et al. (2002) para o tratamento de candidose bucal induzida em camundongos com doença imunodeficiente severa combinada com TFD mediada por azul de metileno associada ao laser ( $275 \text{ J.cm}^{-2}$ ) de diodo de comprimento de onda de 664 nm. Os animais foram inoculados com *swabs* diretamente da colônia três vezes por semana durante 4 semanas, além de ser administrado suspensão de *C. albicans* na água de beber. Foram colhidas amostras da cavidade bucal dos animais antes do experimento, as quais foram negativas para *C. albicans*. Os resultados da TFD foram dose-dependente, obtendo redução fúngica nas concentrações de 668,6  $\mu\text{M}$  a 1069,8  $\mu\text{M}$  e erradicação total de *C. albicans* de  $2,5 \log_{10}$  e  $2,74 \log_{10}$  a 0 para as concentrações de 1203,5  $\mu\text{M}$  e 1337,2  $\mu\text{M}$  de azul de metileno. Os dados sugerem que a TFD pode ser efetiva para o tratamento de candidose bucal em pacientes imunodeprimidos consistindo em uma opção terapêutica simples, barata e segura para tratamentos repetitivos sem o risco de desenvolvimento de resistência fúngica.

Junqueira et al. (2009) trataram candidose bucal induzida em ratos utilizando como fotossensibilizador azul de metileno (312,6  $\mu\text{M}$ ) e fonte de luz laser AsGaAl ( $26 \text{ J.cm}^{-2}$ ) e observaram que o grupo que recebeu a TFD exibiu alterações epiteliais menos intensas e menor

resposta inflamatória crônica do que os controles. Para o grupo tratado somente com laser foram observadas mais alterações intensas no epitélio e resposta inflamatória crônica que os demais. Os resultados demonstraram que a TFD mostrou eficácia no tratamento de candidose experimental.

Em trabalho mais recente de TFD em animal, Mima et al. (2010) utilizaram a mesma metodologia proposta por Takakura et al. (2003) para indução de candidose bucal em camundongos imunossuprimidos, os quais foram tratados com o fotossensibilizador Photogen®, composto por uma mistura de hematoporfirinas, nas concentrações de 400, 500 e 1000 mg/L e irradiados ( $305 \text{ J.cm}^{-2}$ ) por LED azul (455 nm) com redução de células de *C. albicans* de 1,04, 1,39 e 1,41  $\log_{10}$ , respectivamente, e LED vermelho (630 nm) com redução de 1,05, 1,59 e 1,40  $\log_{10}$ , respectivamente, os quais os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos controles. Para ambos os grupos controle e TFD, a análise histológica revelou presença de leveduras e pseudohifas limitadas a camada queratinizada do dorso da língua, em que não houve evidência de invasão de leveduras e pseudohifas dentro das camadas mais profundas do epitélio contínuo. Além disso, o tecido conectivo subjacente exibiu leve infiltrado inflamatório mediado por células mononucleares. O estudo demonstrou que a TFD mediada por Photogen® promoveu significativa redução da viabilidade de biofilmes de *C. albicans* sem danificar os tecidos da língua. Entretanto, os autores argumentaram que os resultados mostraram a importância clínica do estudo para determinar a efetividade *in vivo* de parâmetros para a TFD antes da aplicação clínica e que para isto são necessários mais estudos para avaliar os efeitos da TFD como tratamento de candidose bucal.

Além da atividade antimicrobiana da TFD, tem sido estudado o efeito desta terapia em fatores de virulência. Martins et al. (2011) avaliaram o efeito da TFD mediada por azul de metileno ( $312,6 \mu\text{M}$ )



e irradiação com laser AsGaAl ( $245 \text{ J.cm}^{-2}$ ) em candidose bucal induzida em ratos e seus efeitos na secreção de enzimas extracelulares, como proteinase e fosfolipase. A TFD reduziu o número de células viáveis recuperadas após os tratamentos e a atividade de fosfolipase, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos, por outro lado houve diferença estatisticamente significativa para a TFD na redução das lesões microscópicas de candidose e atividade da proteinase, sem danos para os tecidos normais. Estes resultados despertam interesse para o estudo de novos mecanismos de ação da TFD em alvos celulares ainda não explorados pelos antifúngicos convencionais.

### 2.5.2 Eritrosina

Para uso em Odontologia, o corante eritrosina tem despertado grande interesse para a TFD, pois já é utilizado na prática odontológica para evidenciação de biofilme dentário nas concentrações de 9- 25 mM e apresenta como vantagens em relação aos demais fotossensibilizadores falta de toxicidade para o hospedeiro, uso aprovado em Odontologia e disponibilidade de uso (Wood et al., 2006; Allaker, Douglas, 2009).

A eritrosina pertence ao grupo dos xantenos que são compostos cíclicos com três anéis aromáticos com arranjo linear com um átomo de oxigênio no centro do anel, com absorção de luz na faixa do visível (500-550 nm) com conseqüente reação fotoquímica (Perussi, 2007; Wood et al., 2006).

O corante eritrosina foi aplicado em associação com LED de emissão de luz azul ( $95 \text{ J.cm}^{-2}$ ) na TFD contra culturas planctônicas de *S. mutans* e bactérias Gram- negativas nas concentrações de 2  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente, com redução de 5,16  $\log_{10}$  de células viáveis de

*S. mutans*, enquanto que para as bactérias Gram-negativas não houve redução (Rossoni et al., 2010; Costa et al., 2010).

Wood et al. (2006) estudaram o efeito da TFD em biofilmes de *S. mutans* formados *in vitro* tratados com eritrosina, azul de metileno e fotofrin irradiados por lâmpada de filamento de tungstênio de 400 W. Os autores observaram redução de  $2,2 \pm 0,2 \log_{10}$  de UFC para biofilmes de 24 horas e  $3,0 \pm 0,3 \log_{10}$  de UFC para biofilmes de 288 horas para o corante eritrosina na concentração de 22  $\mu\text{M}$ , o qual foi o mais efetivo entre os corantes testados destacando seu potencial como fotossensibilizador para o controle e tratamento de biofilmes bucais. Em outro trabalho, Metcalf et al. (2006) avaliaram o efeito do fracionamento da luz branca na irradiação de biofilmes de *S. mutans* formados nas mesmas condições do que no trabalho anterior, obtendo  $1,7 \log_{10}$  de redução das células a mais que a irradiação por luz contínua. Segundo os autores, isto pode ter ocorrido devido ao reabastecimento de alvos moleculares, como o oxigênio, durante os períodos escuros.

Contra *C. albicans* não foram encontrados trabalhos na literatura de TFD mediada por eritrosina, entretanto Demidova e Hamblin (2005) utilizaram como fotossensibilizador outro representante do grupo dos xantenos, rosa bengala, que foi capaz de inativar células de *C. albicans* na concentração de 200  $\mu\text{M}$  com redução de 4 e 6  $\log_{10}$  nas densidades celulares de  $10^7$  e  $10^6$  células/mL, respectivamente, somente quando o corante foi deixado na solução, sugerindo que este fotossensibilizador teve efeito fotodinâmico provocando danos no exterior da célula.

### 2.5.3 Diodio Emissor de Luz (LED)

O LED é uma fonte de luz não coerente, produzindo luz através de eletroluminescência (Bevilacqua et al., 2007; Soares et al., 2009). É um componente eletrônico moderno semelhante aos lasers de diodo. Foi desenvolvido pela Agência Espacial Norte Americana (*North American Spacial Agency*- NASA), para incremento do número de mitoses celulares no espaço, com excelentes resultados. Esta luz é conhecida como “Stand by” encontrada em aparelhos eletrônicos. Este tipo de luz tem como vantagem, em relação aos lasers o uso de pouca energia o que influencia na escolha por custo/ benefício (Bispo, 2007).

Zanin et al. (2005) avaliaram os efeitos da TFD em biofilmes de *S. mutans* tratados com azul de toluidina na concentração de 326,9  $\mu\text{M}$  nos tempos de pré-irradiação de 5, 15 e 30 minutos e fluência de 49, 147 e 294  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  com subsequente irradiação por LED (620-660 nm) e laser de Hélio Neônio (HeNe) (632,8 nm). Foram obtidas reduções da viabilidade das células de 3,12 a 4,29  $\log_{10}$  e de 2,10 a 3,1  $\log_{10}$ , respectivamente para cada fonte de luz. Os resultados demonstraram que a associação do azul de toluidina e LED foi mais efetivo que azul de toluidina e laser HeNe na redução das células, indicando o potencial dos LEDs na TFD para o tratamento de doenças bucais, visto que sua segurança é comprovada para tecidos bucais.

Outros estudos descreveram o potencial do LED para a TFD em *S. mutans* (Giusti et al., 2008; Bevilacqua et al., 2007). Bevilacqua et al. (2007) avaliaram o efeito da TFD mediada por azul de toluidina na concentração de 326,9  $\mu\text{M}$  e irradiado por LED (640 nm) com fluência de 2,18  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  em biofilmes de *S. mutans* formados sobre a superfície de tubos capilares de vidro e obtiveram 7,91  $\log_{10}$  de redução de células demonstrando a excelente atividade deste LED na TFD quando associado ao azul de toluidina.

Em *C. albicans* foram encontrados na literatura alguns trabalhos de TFD com aplicação do LED. Peli et al. (2008) avaliaram a ação fotodinâmica do azul de metileno na concentração de 35,2  $\mu\text{M}$  irradiado por LED (2-12  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) com comprimento de onda de 663 nm por 10, 20, 30 e 60 minutos em *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* com redução em  $\log_{10}$  de 2,34-3,71, 1,61-3,41 e 2,77-3,87, respectivamente. Os autores sugeriram que o LED pode ser promissor como fonte de luz para a TFD, não somente por não ser monocromático, mas também por sua alta eficiência e baixo custo, além de não ter efeito antifúngico quando aplicado sozinho.

Soares et al. (2009) testaram a TFD com azul de toluidina combinada ao LED (36-180  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) com comprimento de onda de 630 nm em cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol apresentando média de redução de 3,41  $\log_{10}$  e redução da aderência as células do epitélio bucal de 55%, demonstrando significativo resultado. A fonte de luz sozinha não apresentou atividade contra a viabilidade das células e aderência. Os autores sugeriram que esta nova modalidade terapêutica pode auxiliar o tratamento das infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal, principalmente as causadas por microrganismos resistentes inibindo o crescimento e a aderência ao epitélio bucal.

Com aplicação de LED de emissão de luz azul (37,5  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), foi encontrado trabalho de Dovidio et al. (2009) que avaliou o efeito antifúngico da TFD mediada por Photogen® na concentração de 25 mg/L em cepas padrão de *C. albicans* e *C. glabrata* e cepas resistentes ao fluconazol. Em culturas planctônicas, todos os microrganismos foram inativados nestes parâmetros. Para o biofilme de espécies únicas foram conseguidos menos de 1  $\log_{10}$  de média de redução, sendo a espécie *C. glabrata* a mais resistente. Os autores não observaram efeito citotóxico do fotossensibilizador e do LED quando utilizados isoladamente comprovando que a taxa de morte foi decorrente de efeito fotodinâmico.

### 3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) avaliar o efeito antifúngico da Terapia Fotodinâmica (TFD) *in vitro* em culturas planctônicas e biofilmes formados por *Candida albicans*;
- b) avaliar o efeito antifúngico da TFD num modelo murino de candidose bucal, bem como analisar macroscopicamente e histologicamente o efeito da TFD;
- c) avaliar a aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais humanas *in vitro* após a TFD.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Comitê de Ética

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais e Seres Humanos da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP, conforme protocolos nº 022/2009 - PA/CEP (Anexo A) e 008/2011 – PH/CEP (Anexo B), e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme, Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

### 4.2 Fotossensibilizador e fonte de luz

Para a sensibilização de *C. albicans* foi utilizado o fotossensibilizador aniônico eritrosina B, solúvel, 95+% (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EUA), que apresenta fórmula molecular  $C_{20}H_{14}O_5$ , peso molecular igual  $338,34 \text{ g.mol}^{-1}$  e ponto de fusão de  $303^\circ\text{C}$ . A solução do fotossensibilizador foi preparada pela dissolução do pó em solução fisiológica tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e esterilizada por filtração em membrana com poros de diâmetro de  $0,22 \mu\text{m}$  (MFS, Dublin, CA, EUA). Após a filtração, a solução do corante foi mantida no escuro. O espectro de absorção da solução do corante eritrosina ( $1,0 \mu\text{M}$  em PBS) foi

verificado em espectrofotômetro (Cary 50 Bio, Varian Inc., Palo Alto, CA, EUA) no laboratório de Síntese Orgânica da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

Foi utilizado como fonte de luz um Diodo Emissor de Luz (LED) de cor verde (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) com comprimento de onda de  $532 \pm 10$  nm, potência de 90 mW, energia de 16,2 J e tempo de irradiação de 3 minutos. Os demais parâmetros de irradiação para culturas planctônicas, biofilmes e línguas dos camundongos estão descritos no quadro 1.

Quadro 1- Parâmetros de irradiação de acordo com o ensaio.

| Parâmetros       | Cultura planctônica       | Biofilme                  | Língua                    |
|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Taxa de fluência | $237 \text{ mW.cm}^{-2}$  | $237 \text{ mW.cm}^{-2}$  | $80 \text{ mW.cm}^{-2}$   |
| Fluência         | $42,63 \text{ J.cm}^{-2}$ | $42,63 \text{ J.cm}^{-2}$ | $14,34 \text{ J.cm}^{-2}$ |
| Área irradiada   | $0,38 \text{ cm}^2$       | $0,38 \text{ cm}^2$       | $1,13 \text{ cm}^2$       |

Foi realizado monitoramento da temperatura na base da placa de 96 poços (Costar Corning, New York, NY, EUA) com termômetro infravermelho (MX4, Raytek, Sorocaba, SP, Brasil), observando-se que não houve aumento de temperatura após a irradiação com LED.

### 4.3 Terapia Fotodinâmica (TFD) *in vitro*

#### 4.3.1 Terapia Fotodinâmica em cultura planctônica

Cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) foi semeada em ágar Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) e

incubada a 37°C por 24 horas. A seguir, o microrganismo foi cultivado em caldo Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) a 37°C por 16 horas.

O crescimento microbiano no caldo foi centrifugado a 358 x g durante 10 minutos e lavado duas vezes com PBS. O sedimento foi, então, ressuspendido em PBS. A seguir, a suspensão padronizada da cepa em PBS na concentração de  $10^6$  células/mL foi preparada com auxílio de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica (DO) de 0,284.

Para o estabelecimento da curva de morte para as culturas planctônicas, foram realizados 220 ensaios com a suspensão padronizada com o corante eritrosina nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 e 0,39  $\mu$ M, sendo realizados 10 ensaios para cada concentração. Os ensaios foram divididos nas seguintes condições experimentais (n= 10), conforme quadro 2.

Quadro 2- Divisão dos grupos experimentais para cultura planctônica

| Grupos experimentais | Condições experimentais                                                                                                         | Ensaio |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| F-L-                 | PBS                                                                                                                             | 10     |
| F-L+                 | LED (42,63 J.cm <sup>-2</sup> )                                                                                                 | 10     |
| F+L-                 | Eritrosina nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 $\mu$ M                                   | 100    |
| F+L+                 | Eritrosina nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 $\mu$ M + LED (42,63 J.cm <sup>-2</sup> ) | 100    |
| Total                |                                                                                                                                 | 220    |

De acordo com as condições experimentais, foi adicionado 0,1 mL da suspensão de *C. albicans* em cada orifício, de placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano (Costar Corning) com área de 0,38 cm<sup>2</sup>. Posteriormente, os grupos F+L+ e F+L- receberam



0,1 mL de cada concentração da solução de eritrosina. Os grupos F-L+ e F-L- receberam 0,1 mL de PBS. A placa foi agitada por 5 minutos (tempo de pré-irradiação) em agitador orbital (Solab, Piracicaba, SP, Brasil). A seguir, os grupos F+L+ com as respectivas concentrações do fotossensibilizador e F-L+ foram irradiados por 3 minutos com fluência de  $42,63 \text{ J.cm}^{-2}$ , de acordo com o protocolo descrito no item 4.2.

Após a irradiação, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL foram semeadas, com auxílio de alça de Drigalski, em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C por 48 horas. Decorrido o período de incubação, foi realizada contagem das UFC/mL que foram transformadas em logaritmo.

#### 4.3.2 Terapia Fotodinâmica em biofilme

Para crescimento do biofilme foi utilizada a metodologia descrita por Seneviratne et al. (2009), com modificações.

Cultura de *C. albicans* (ATCC 18804) de 18 horas a 37°C em ágar Sabouraud dextrose foi semeada em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB- Himedia) suplementado com glicose (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) na concentração de 50 mM. Após o período de incubação de 18 horas a 37°C, as leveduras foram centrifugadas a  $358 \times g$  por 10 minutos, lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em YNB suplementado com 100 mM de glicose e padronizada na concentração de  $10^7$  células/mL em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 530 nm e DO de 0,381.

Foi colocado 250 µL da suspensão de *C. albicans* nos poços da placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano com área de  $0,38 \text{ cm}^2$ . A placa foi incubada em agitação de 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 37°C por 90 minutos para fase inicial de adesão. Decorrido

este período, os poços foram lavados com 250 µL de PBS, para a remoção das células não aderidas. A seguir, foi adicionado 250 µL de YNB acrescido de 100 mM de glicose e a placa incubada a 37°C por 48 horas em agitação de 75 rpm. O caldo foi trocado a cada 24 horas. A seguir, a placa com os biofilmes formados de *C. albicans* foi lavada com 250 µL de PBS, para remoção das células não aderidas.

Após a TFD em culturas planctônicas, foi feito um estudo piloto com soluções de eritrosina a partir da concentração que apresentou 100% de redução de células de *C. albicans* para determinar a concentração efetiva para TFD em biofilmes de *C. albicans* e tratamento de candidose bucal que foi de 400 µM.

Foram avaliados os seguintes grupos experimentais (n= 10) de acordo com o quadro 3. Os grupos F+L+ e F+L- receberam 250 µL da solução do corante eritrosina na concentração de 400 µM e os grupos F-L+ e F-L- receberam 250 µL de PBS.

Quadro 3- Divisão dos grupos experimentais para biofilme

| Grupos experimentais | Condições experimentais                               | Ensaio |
|----------------------|-------------------------------------------------------|--------|
| F-L-                 | PBS                                                   | 10     |
| F-L+                 | LED (42,63 J.cm <sup>-2</sup> )                       | 10     |
| F+L-                 | Eritrosina (400 µM)                                   | 10     |
| F+L+                 | Eritrosina (400 µM) + LED (42,63 J.cm <sup>-2</sup> ) | 10     |
| Total                |                                                       | 40     |

Os biofilmes ficaram imersos na solução do corante ou PBS por 5 minutos (tempo de pré-irradiação) em agitador orbital.

Para a irradiação dos grupos F+L+ F-L+, os biofilmes foram irradiados (42,63 J.cm<sup>-2</sup>) por 3 minutos com a placa suspensa, conforme o protocolo já descrito no item 4.2.

Após os tratamentos, os biofilmes no fundo da placa foram raspados com auxílio de palito de madeira estéril e transferidos para tubos Falcon contendo 10 mL de PBS. A seguir, os tubos foram homogeneizados por 30 segundos em homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200– Bandelin Eletronic, Berlim, Brandemburgo, Alemanha) com potência de 50 W. A solução contendo PBS e células do biofilme foi considerada como fator de diluição  $10^{-1}$ , a partir daí foram feitas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foi semeada em placas de ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram determinadas as UFC/mL e os valores transformados em logaritmo.

As irradiações das culturas planctônicas e biofilmes foram realizadas em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar e com a luz apagada, onde foi utilizado um anteparo negro fosco com orifício de diâmetro coincidente ao da entrada do poço evitando-se assim o espalhamento de luz.

#### 4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o biofilme

Biofilmes dos grupos F+L+ (n= 2) e F-L- (n= 2) foram submetidos a análise em MEV.

Os biofilmes foram formados conforme descrito no item 4.3.2 e submetidos aos tratamentos de acordo com os grupos experimentais F+L+ e F-L-, porém os biofilmes foram formados sobre 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). Os discos foram colocados em placas de cultura de células de 24 poços (Costar Corning), na qual o volume da suspensão, PBS, meio de cultura e corante foi de 1 mL. A

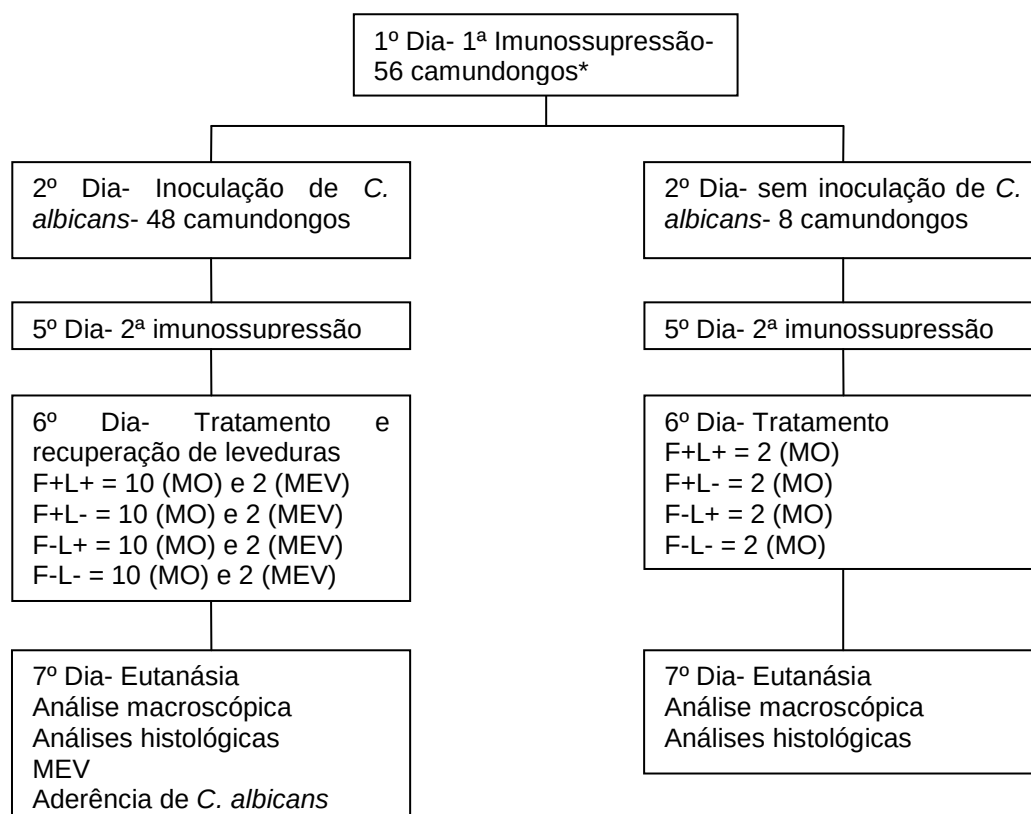
seguir, os discos foram transferidos para placa de 24 poços contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 hora e desidratados por 1 mL de soluções de álcool com concentrações crescentes (10%, 25%, 50%, 75% e 90% por 20 minutos e 100% de álcool por 1 hora). As placas foram incubadas em estufa 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 120 segundos a 40 miliamperes (BAL- TEC 50D 050 Sputter Coater, Liechtenstein). Após a metalização, os biofilmes foram examinados e fotografados em MEV (Jeol JSM5600, Tóquio, Japão), operando a 15 kV com aumentos de 1000 e 5000 x.

#### **4.4 Terapia Fotodinâmica (TFD) *in vivo***

##### **4.4.1 Animais experimentais**

Foram utilizados 56 camundongos (*Mus musculus*, albinos, Swiss) machos e adultos, com peso variando de 30 a 60 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, sendo utilizados 48 animais para o estudo do efeito da TFD em candidose experimental induzida por *C. albicans* e 8 animais para o estudo do efeito da TFD no dorso da língua sem a inoculação por *C. albicans*. O fluxograma do estudo está descrito na Figura 1.



\*Todos os animais receberam cloridrato de tetraciclina durante todo o período.

Figura 1 - Fluxograma do estudo. F+L+: tratado com eritrosina e LED; F+L-: tratado com eritrosina; F-L+: tratado com LED; F-L-: grupo controle. MO= Microscopia Óptica; MEV= Microscopia Eletrônica de Varredura.

#### 4.4.2 Verificação de colonização natural por *Candida* spp. na cavidade bucal dos camundongos

Antes de iniciar a indução de candidose bucal por *C. albicans*, foi verificada a colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de todos os animais. Para isto foi coletado, com o auxílio de um *swab* (Absorve, Cral, São Paulo, SP, Brasil) estéril, material de toda a cavidade bucal, principalmente do dorso da língua. O *swab* foi imediatamente semeado em placas com ágar Sabouraud dextrose acrescido de 0,1 mg de cloranfenicol (Vixmicina, São Paulo, SP,

Brasil) por mL de meio. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, e quando não houve crescimento, as placas foram incubadas por mais 5 dias em temperatura ambiente. Neste trabalho, foram utilizados animais com cultura negativa para *Candida* spp. na cavidade bucal.

#### 4.4.3 Imunossupressão e administração de tetraciclina

Os animais foram imunossuprimidos com duas injeções subcutâneas no dorso de prednisolona (Depo- Medrol, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, SP, Brasil) na dose de 100 mg/Kg de massa corpórea 1 dia antes e 3 dias após a infecção com *Candida*.

Na água de beber foi administrado cloridrato de tetraciclina (Terramicina, Pfizer, Guarulhos, SP, Brasil) na concentração de 0,83 mg/mL iniciando 1 dia antes da infecção e mantido até o final do experimento. A imunossupressão e administração de tetraciclina foram realizadas de acordo com o modelo experimental desenvolvido por Takakura et al. (2003)

#### 4.4.4 Preparo da suspensão de *C. albicans*

Cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) foi semeada em placa de ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 24 horas. O crescimento foi suspenso em 10 mL de PBS e centrifugado a 358 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido novamente. O sedimento foi suspenso em 10 mL de PBS e padronizado em 10<sup>8</sup> células viáveis/mL em câmara de Neubauer (Laboroptik GMBH, Bad Homburg, Alemanha).

#### 4.4.5 Inoculação da suspensão de *C. albicans* na cavidade bucal dos camundongos

Os camundongos foram sedados via intramuscular com injeções de cloridrato de clorpromazina (Amplictil, Sanofi Aventis, Suzano, SP, Brasil) na dose de 10 mg/Kg de massa corpórea no volume de 50  $\mu$ L em cada pata traseira. Os camundongos foram inoculados com swab estéril encharcado na suspensão do microrganismo padronizada em  $10^8$  células/mL esfregado por 1 minuto sobre o dorso da língua, um dia após a primeira administração de prednisolona.

Os grupos que não foram inoculados com *C. albicans* (8 camundongos) receberam tetraciclina e foram imunossuprimidos, conforme item 4.4.3.

#### 4.4.6 Terapia Fotodinâmica de *C. albicans*

Para a sensibilização foi utilizado corante eritrosina (400  $\mu$ M). A fonte de luz utilizada foi o LED com os mesmos padrões já descritos de acordo com o item 4.2. A aplicação do LED foi feita por contato por 3 minutos ( $14,34 \text{ J.cm}^{-2}$ ).

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

A solução de eritrosina foi pipetada no dorso da língua no volume de 50  $\mu$ L. Decorrido 1 minuto (período pré-irradiação) foi realizada

a aplicação com o LED (Grupo F+L+, n = 14). Além disso, foi avaliado o efeito isolado da solução do fotossensibilizador eritrosina (Grupo F+L-, n = 14) e o efeito isolado da fonte de luz utilizando-se PBS (Grupo F-L+, n = 14). O grupo controle recebeu apenas PBS na ausência de luz (Grupo F-L-, n= 14).

#### 4.4.7 Recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos

Antes e após os tratamentos experimentais, foram coletadas amostras do dorso da língua dos animais com mini- *swab* estéreis, confeccionados com palito de madeira e algodão, passado 1 minuto sobre o dorso da língua, os quais foram imediatamente colocados em tubos de ensaio (15 x 120 mm) contendo 0,99 mL de PBS, e agitado durante 1 minuto, considerando-se a diluição como sendo  $10^{-2}$ . Foram realizadas diluições seriadas. A seguir, 0,1 mL de cada diluição foi semeada em duplicata na superfície de placas de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas a 37°C por 48 horas. Foram contadas colônias típicas de *Candida* em placas que apresentaram de 30 a 300 colônias para a determinação de UFC/mL. As placas contendo número de colônias inferior a 30 na diluição  $10^{-2}$  foram consideradas como  $10^{-1}$  células de *Candida* (Jorge et al., 1993b).

As leveduras recuperadas dos animais dos grupos F+L+ (n= 10) e F-L- (n= 10) foram colhidas em caldo *Yeast Peptone Dextrose* (YPD- Himedia) suplementado com 20% de glicerol em tubos *ependorfs* e armazenadas em freezer a -80°C.



#### 4.4.8 Eutanásia dos animais

A eutanásia dos camundongos foi realizada 24 horas após o tratamento experimental. Esse procedimento foi realizado administrando-se dose excessiva de anestésico. A seguir, as línguas foram removidas para a realização das análises macroscópica, histológica e microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.4.9 Análise macroscópica de candidose no dorso da língua

Após a eutanásia dos animais, foram observadas lesões características de candidose no dorso da língua dos camundongos e foram atribuídos escores de 0-4 de acordo com as lesões: 0) normal; 1) lesões em menos de 20%; 2) lesões variando de 21- 90 %; 3) lesões em mais de 91%; 4) lesões espessas com pseudomembrana em mais de 91% (Takakura et al., 2003). As línguas retiradas foram observadas com o auxílio de lupa estereoscópica (Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 6,5; 8; 10 e 12,5 vezes.

#### 4.4.10 Análise histológica de *C. albicans* no dorso da língua

Para a análise histológica das lesões, as línguas foram fixadas em formol a 10% por 24 horas. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 5 µm de espessura que foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

A presença de candidose foi pesquisada, com auxílio de microscópio óptico (Olympus, CX41, Toquio, Japão) com aumento de 400 x, e a descrição dos cortes histológicos foi realizada de acordo com a presença de leveduras e hifas, localização e extensão das lesões e alterações dos tecidos envolvidos.

A presença de leveduras e hifas foi quantificada de acordo com a metodologia de Junqueira et al. (2005), atribuindo-se os seguintes escores para 21 campos histológicos: 0) ausência de leveduras e hifas; 1) de 1 a 5; 2) de 6 a 15; 3) de 16 a 50; 4) mais de 50 leveduras e/ou hifas.

Foi realizada avaliação da intensidade das lesões teciduais e atribuição de escores à resposta inflamatória no tecido conjuntivo de acordo com Junqueira et al. (2009). Foram observadas as seguintes alterações teciduais no dorso da língua de cada camundongo: hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, exocitose, espongiose, perda das papilas filiformes, hiperqueratose e formação de microabscessos intraepiteliais. Para o infiltrado inflamatório, foram atribuídos os seguintes escores: 0) ausência de células inflamatórias; 1) infiltrado inflamatório leve; 2) infiltrado inflamatório moderado; e, 3) infiltrado inflamatório intenso.

#### 4.4.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das línguas dos camundongos

Para a observação em microscopia eletrônica de varredura, os espécimes (n= 2) de cada grupo experimental inoculado com *C. albicans* foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (0,1 M e pH 7,3) por 24 horas a 4°C.

As peças foram lavadas em solução fisiológica (NaCl 0,85%), sendo que a lavagem teve duração de 30 minutos. A seguir, os espécimes foram submetidos à desidratação com concentrações crescentes de álcool a 50%, 70% e 90% por 20 minutos e, então, a 100% por 20 minutos 3 vezes. Após a desidratação, foi realizada a secagem ao ponto crítico com CO<sup>2</sup> (Denton Vacuum DCP 1, Moorestown, NJ, EUA). As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio e recobertas com ouro por 120 segundos a 40 miliamperes e avaliadas em MEV, operando a 15 kV.

#### **4.5 Aderência de *C. albicans* às células do epitélio bucal humano: análise em microscopia óptica**

Os testes de aderência de *C. albicans* às células do epitélio bucal humano foram executados de acordo com a metodologia de Soares et al. (2009), com modificações.

As células do epitélio bucal foram colhidas de quatro voluntários jovens e saudáveis por meio de raspagem da mucosa da bochecha com auxílio de *swab* estéril, que foi colocado em tubo Falcon contendo 10 mL de PBS e homogeneizado por 3 minutos. A seguir, o *swab* foi retirado e o *pool* de células foi centrifugado a 1096 x g por 10 minutos e lavado quatro vezes com PBS, para a remoção de leveduras fixadas. A suspensão de *pool* de células foi padronizada a 10<sup>5</sup> células/mL em câmara de Neubauer.

As leveduras recuperadas dos animais dos grupos experimentais F+L+ (n= 10) e F-L- (n= 10) após os tratamentos que foram armazenadas em freezer a -80°C em YPD suplementado com 20% de glicerol, foram semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram preparadas

suspensões das células em PBS que foram padronizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 520 nm e DO de 1,5. Após a padronização da suspensão, foi pipetado 1 mL do inóculo em 4 mL de caldo Sabouraud dextrose, obtendo-se suspensão final de  $10^6$  -  $10^7$  células/mL.

Em um tubo de ensaio, foi pipetado 500 µL da suspensão de células do epitélio bucal e 500 µL da suspensão final de *C. albicans* e incubado a 37°C por 1 hora em agitação de 75 rpm.

Decorrido o período de incubação, a suspensão de leveduras e células do epitélio bucal humano foi filtrada por filtro de polycarbonato com poros de 12 µm de diâmetro (KTP4700, Millipore, Irlanda) e lavado duas vezes com 50 mL de PBS para remoção de *C. albicans* não aderidas às células do epitélio bucal. A seguir, com auxílio de uma pinça, o filtro foi removido e firmemente colocado sobre uma lâmina de vidro para a aderência das células. A lâmina foi secada ao ar, fixada e corada por Gram.

Foram observadas 100 células do epitélio bucal em zigue-zague a partir da borda direita da lâmina e as leveduras aderidas quantificadas duas vezes por microscopia de luz com aumento de 1000 x. O experimento foi realizado em duplicata.

O resultado foi expresso como a média do número de leveduras aderidas a cem células epiteliais bucais.

#### 4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *C. albicans* aderidas às células do epitélio bucal humano

Foi confeccionada 1 lâmina de cada grupo experimental, F+L+ e F-L-, para a realização da MEV.

As lâminas foram colocadas em placas de Petri contendo 10 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram submersas em 10 mL de soluções de álcool nas concentrações de 10%, 25%, 50%, 75% e 90% por 20 minutos e, posteriormente, em 100% de álcool por 1 hora. As lâminas foram incubadas em estufa microbiológica por 24 horas para secagem.

A seguir, as lâminas foram transferidas para *stubs* de alumínio e recobertas com ouro por 120 segundos a 40 miliamperes. Após a metalização, as lâminas foram examinadas e fotografadas em MEV, operando a 15 kV. A MEV realizada para os espécimes *in vitro* e *in vivo* foi realizada na disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas/ UNICAMP.

#### 4.6 Análise estatística

Foi realizada análise estatística dos resultados com o auxílio do programa Minitab 14, considerando-se nível de significância de 5%. Para a análise dos dados de UFC/mL e análise das lesões epiteliais foi utilizado ANOVA e teste de Tukey. Para avaliação dos escores obtidos na análise macroscópica, contagem de leveduras e hifas na análise histológica e infiltrado inflamatório foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos para a aderência de *C. albicans* as células do epitélio bucal humano foram analisados por teste *t* de Student.

## 5 RESULTADOS

A estrutura química e espectro de absorção do corante eritrosina estão representados na Figura 2. A eritrosina apresentou absorção de luz na faixa de 460- 560 nm com pico de absorção de aproximadamente 530 nm.

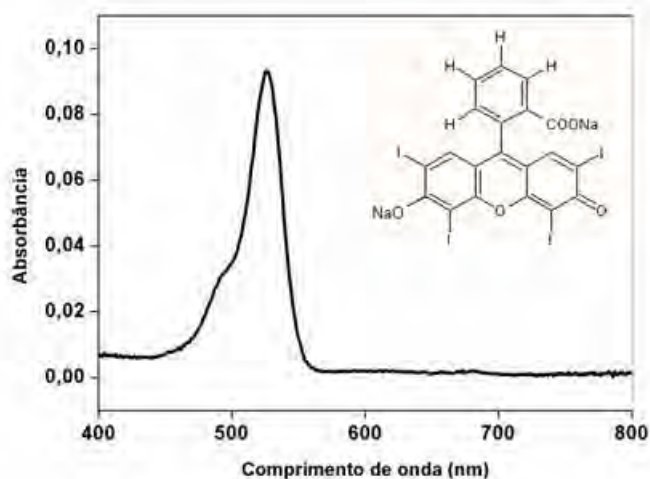


Figura 2 - Estrutura química e espectro de absorção do fotossensibilizador eritrosina (1,0  $\mu$ M em PBS).

### 5.1 Terapia Fotodinâmica (TFD) em cultura planctônica

A curva de morte obtida para as culturas planctônicas de *C. albicans* está representada na Figura 3. Nesta figura, pode-se observar que a TFD apresentou atividade antimicrobiana dependente da concentração do fotossensibilizador.

O valor de UFC/mL do grupo F+L+ que apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (F-L-) ocorreu a partir da concentração de 0,39  $\mu$ M com redução microbiana de 100% quando o corante foi utilizado nas concentrações de 3,12  $\mu$ M ou superiores.

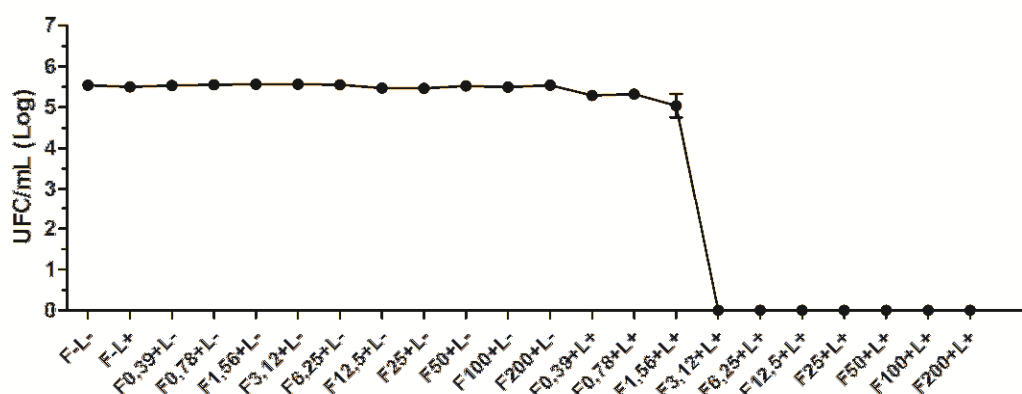


Figura 3 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para a curva de morte das culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas aos seguintes tratamentos: PBS como grupo controle (F-L-), PBS e LED (F-L+), tratado apenas com diferentes concentrações de eritrosina (F+L-), tratado pelas diferentes concentrações de eritrosina e LED (F+L+).

## 5.2 Terapia fotodinâmica em biofilme

A ação da TFD mediada por eritrosina na concentração de 400  $\mu$ M e LED sobre biofilmes de *C. albicans* resultou em 0,74  $\log_{10}$  de redução (Figura 4). O resultado obtido para o grupo F+L+ apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos (F-L-, F-L+ e F+L-), com valor de *P* igual a 0,001 em relação ao grupo controle (F-L-).

A MEV revelou que o biofilme do grupo controle (F-L-) formado por *C. albicans* foi constituído por blastoconídios, pseudohifas e hifas (Figura 5- 1A e 1B). Os biofilmes submetidos a TFD (F+L+)

demonstraram redução da quantidade de estruturas fúngicas (Figura 5-2A e 2B).

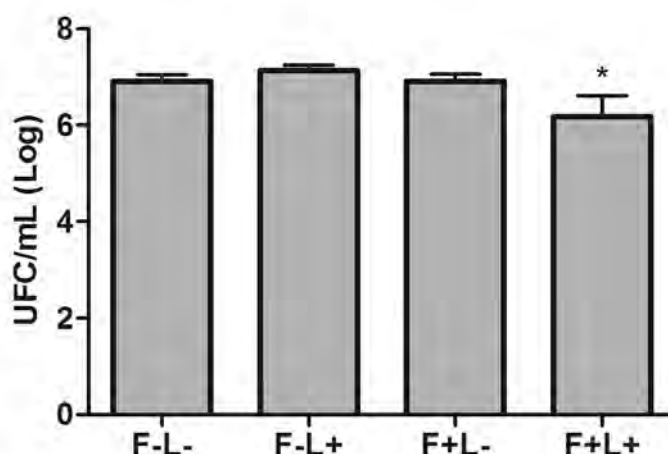


Figura 4 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos aos seguintes tratamentos: PBS como grupo controle (F-L-), PBS e LED (F-L+), eritrosina na concentração de 400  $\mu$ M (F+L-), eritrosina na concentração de 400  $\mu$ M e LED (F+L+). \*Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ) quando comparado com os grupos F-L-, F-L+ e F+L-.

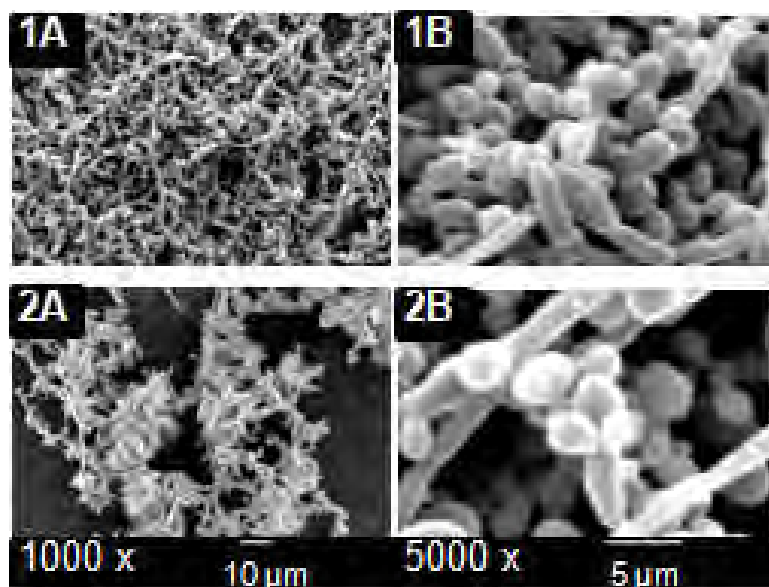


Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura para os biofilmes de *C. albicans*: PBS como grupo controle (F-L-) (1A e 1B) e eritrosina na concentração de 400  $\mu$ M e LED (F+L+) (2A e 2B).



### 5.3 Morfologia do dorso da língua dos camundongos não infectados por *C. albicans*

Na análise macroscópica, histológica e na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) observou-se aspecto de normalidade da língua dos 8 camundongos não infectados por *C. albicans* após os tratamentos experimentais (Figura 6).

A língua do camundongo é um órgão muscular revestido por epitélio queratinizado formado por uma região superior, o dorso, e uma inferior, o ventre. O dorso da língua apresenta uma porção bucal que se estende desde a ponta da língua até a papila valada e uma porção faríngea, posterior a esta estrutura. A porção bucal divide-se em duas partes: 2/3 anteriores que apresentam sulco mediado que se estende na direção do longo eixo e o tubérculo intermolar que corresponde ao terço posterior (Figura 6- A).

O dorso da língua é revestido por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, formando interdigitações com o conjuntivo subjacente. Abaixo deste, a língua é formada por músculo estriado, cujas fibras se encontram agrupadas em feixes dispostos em três planos. Entre as fibras musculares da região posterior da língua, estão presentes glândulas salivares serosas e mucosas. Abaixo do tecido muscular, o ventre da língua é revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e conjuntivo rico em vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 6- B).

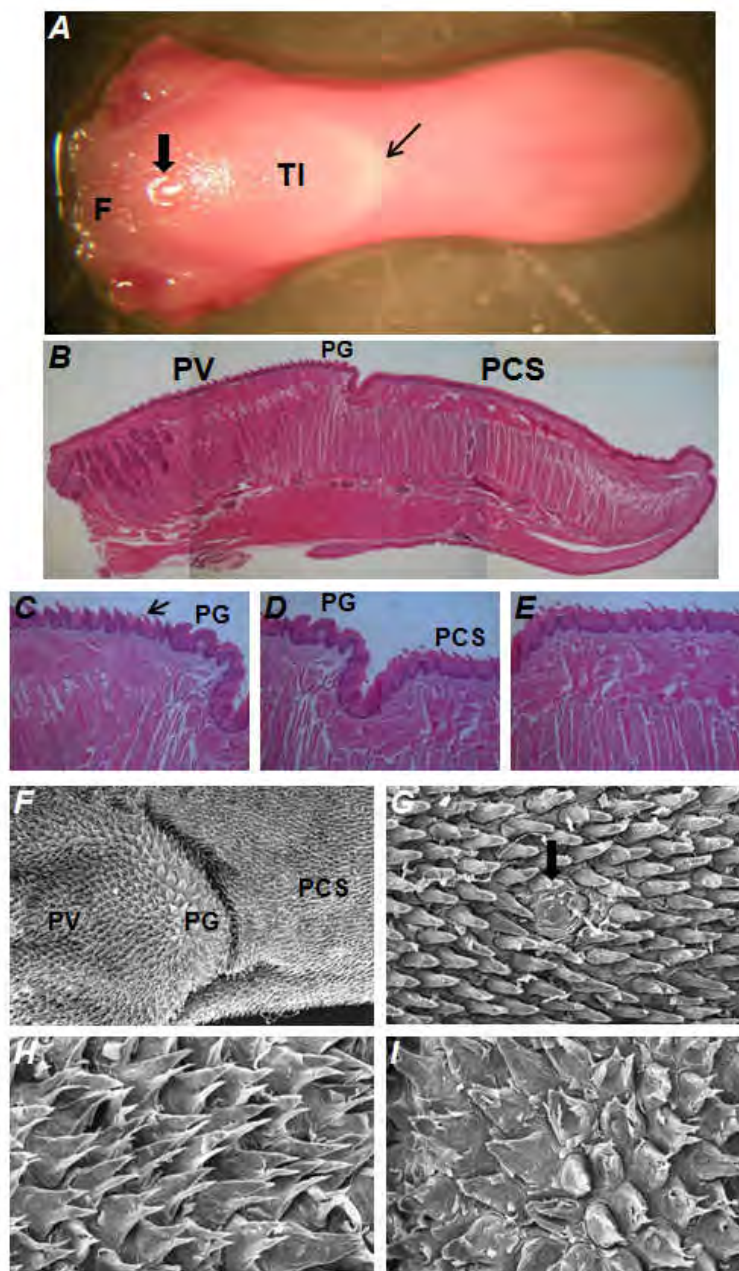


Figura 6 – Análise macroscópica, histológica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da língua do camundongo sem infecção por *C. albicans*. A: Aspecto macroscópico. A papila valada (↓) separa a porção faríngea (F) da porção bucal. As papilas gigantes (↓) separam os dois terços anteriores da língua do tubérculo intermolar (TI). B: Análise histológica. Distribuição das papilas simples (PCS), papilas gigantes (PG) e papilas verdadeiras (PV). HE; aumento original: 25X. C: Papilas verdadeiras (↓) e papilas gigantes (PG). HE; aumento: 100X. D: Papilas gigantes (PG) e papilas cônicas simples (PCS). HE; aumento: 100X. E: Papilas cônicas simples. HE; aumento: 100X. F: MEV. Distribuição das papilas cônicas simples (PCS), papilas gigantes (PG) e papilas verdadeiras (PV). Aumento original: 35X. G: Papilas cônicas simples e papila fungiforme (↓). Aumento original: 200X. H: Papilas verdadeiras. Aumento original: 220X. I: Papilas gigantes. Aumento original: 180X.

Na porção bucal do dorso da língua são encontradas projeções, chamadas papilas filiformes, classificadas em papilas cônicas simples presentes nos dois terços anteriores, papilas verdadeiras localizadas no tubérculo intermolar e papilas gigantes que separam as papilas cônicas simples das verdadeiras (Figura 6- C, D e E). Entre as papilas cônicas simples, estão presentes em menor número as papilas fungiformes que são curtas e largas, com base arredondada contendo corpúsculo gustativo no epitélio da superfície superior (Figura 6- G).

As papilas cônicas simples são curtas, exibem base estreita e estão distantes umas das outras, com bastante superfície interpapilar. Ao contrário das papilas verdadeiras que são mais alongadas e pontiagudas, apresentam base mais larga e estão mais próximas umas das outras, com pouca superfície interpapilar. Estes dois tipos de papilas apresentam região anterior convexa e posterior côncava, enquanto que para as papilas gigantes isto é ao contrário. As papilas gigantes são maiores, apresentam menor localização e são mais visíveis que as outras papilas (Figura 6- F, G, H e I).

#### **5.4 Recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos**

Os resultados obtidos na recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos antes e após os tratamentos experimentais dos grupos F-L-, F+L-, F-L+ e F+L+ estão descritos na figura 7. Todos os grupos experimentais apresentaram redução de células viáveis após os tratamentos (Apêndice A- Tabela 1). O grupo TFD (F+L+) apresentou média de redução de células de 0,73  $\log_{10}$  com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos (F-L-, F-L+ e F+L-) (Apêndice A- Tabela 2).

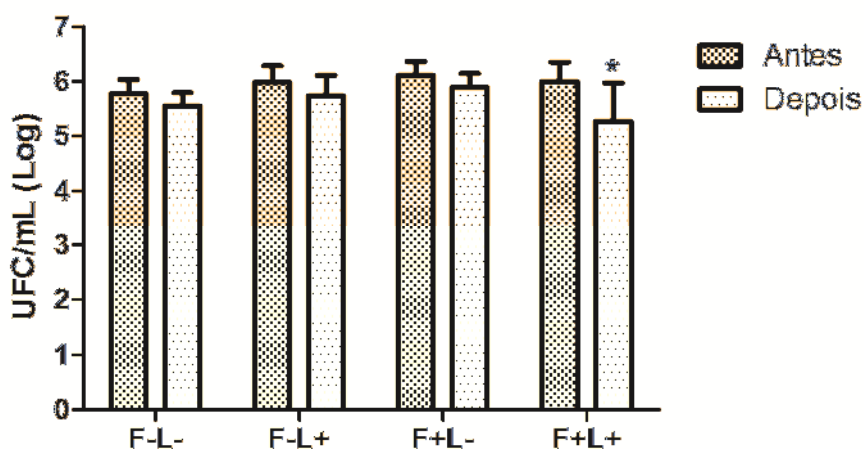


Figura 7 – Médias dos valores de UFC/mL (Log) obtidos antes e após os tratamentos experimentais (n= 10): F-L-, grupo controle; F+L-, fotossensibilização com eritrosina; F-L+, irradiação com LED; F+L+, fotossensibilização com eritrosina e irradiação com LED. \*Diferença estatisticamente significativa entre o grupo F+L+ e os demais grupos F-L-, F-L+ e F+L- (P = 0,018, 0,03 e 0,018, respectivamente).

### 5.5 Análise macroscópica de *C. albicans* no dorso da língua

A análise macroscópica revelou que todas as línguas submetidas aos grupos F-L-, F+L- e F-L+, apresentaram lesões de candidose sobre o dorso da língua. Para o grupo submetido a TFD (F+L+) apenas um animal apresentou o dorso da língua com aspecto normal, enquanto que todos os outros animais apresentaram lesões de candidose. Essas lesões foram caracterizadas pela presença de regiões esbranquiçadas com áreas de atrofia papilar localizadas principalmente na região das papilas cônicas simples (Figura 8).

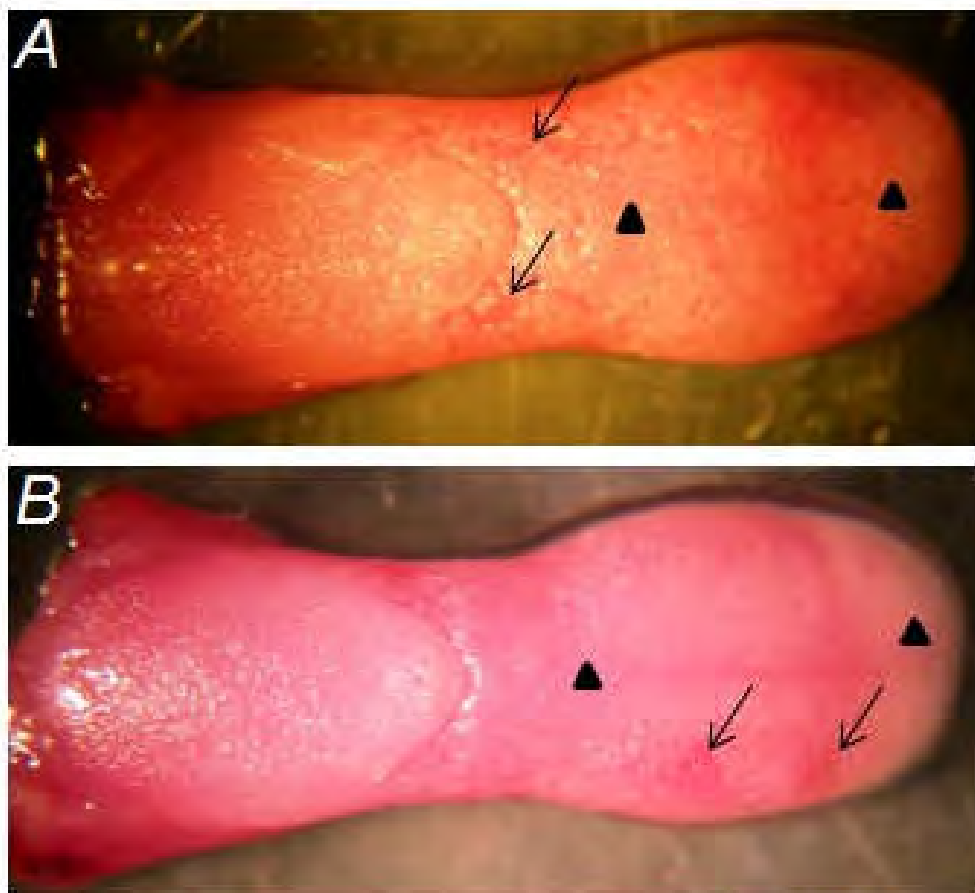


Figura 8 – Aspecto das lesões da língua do camundongo. Grupo F-L- (A) e grupo F+L+ (B), presença de regiões esbranquiçada (▲) e atrofia papilar (↓).

Para a extensão das lesões de candidose foram atribuídos escores, o qual o grupo tratado com a TFD (F+L+) apresentou apenas uma língua que recebeu escore 0, pois não apresentou lesão característica de candidose. O valor da mediana encontrado para o grupo F+L+ foi menor que para os demais grupos, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Apêndice B- Tabela 3).

## 5.6 Análise histológica de *C. albicans* no dorso da língua

Na análise histológica foi verificada a quantidade de leveduras e hifas em cada campo histológico, alterações epiteliais e extensão do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo.

Nas lesões de candidose foram observadas leveduras e hifas limitadas à camada queratinizada do dorso da língua, localizadas principalmente nas papilas cônicas simples. Foram observadas leveduras e hifas concentradas em algumas papilas e, às vezes, espalhadas. Quando havia maior concentração de *Candida*, notavam-se a presença de leucócitos polimorfonucleares no epitélio, inclusive formando microabscessos intraepiteliais (Figura 9- 12).

A presença de leveduras e hifas foi quantificada e então, atribuídos escores para 21 campos histológicos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Apêndice C- Tabela 4).

As alterações epiteliais do tecido foram quantificadas para os grupos F-L-, F-L+, F+L- e F+L+, revelando numerosas lesões epiteliais, como perda das papilas filiformes, hiperplasia epitelial, exocitose, espongiose, hiperqueratose, desorganização da camada basal com focos de duplicação e perda da estratificação, aumento do número de mitoses na camada basal e formação de microabscessos intraepiteliais. Nas áreas de lesões teciduais, a lâmina própria exibiu, principalmente, infiltrado inflamatório leve com predomínio de leucócitos polimorfonucleares, caracterizados por neutrófilos. Em alguns casos, foram encontrados infiltrados inflamatórios moderados e células mononucleares na lâmina própria e camada basal e, ocasionalmente, presença de vasos sanguíneos congestos. As lesões estavam localizadas, predominantemente, na região das papilas cônicas simples (Figura 13- 18).

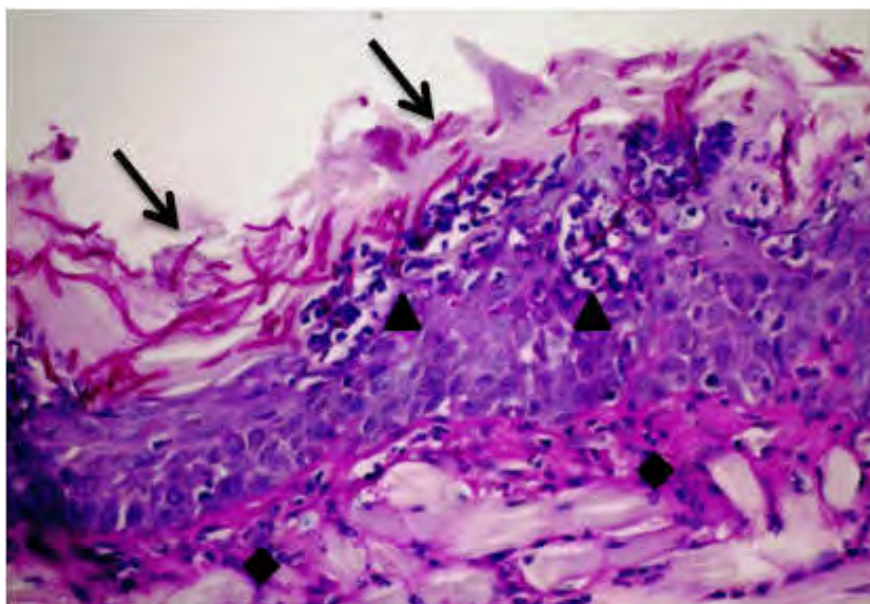


Figura 9 – Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F-L-. Observam-se leveduras e hifas (↓) na queratina, microabscessos intraepiteliais (▲) e células inflamatórias (◆) na lâmina própria. PAS; aumento original: 400X.

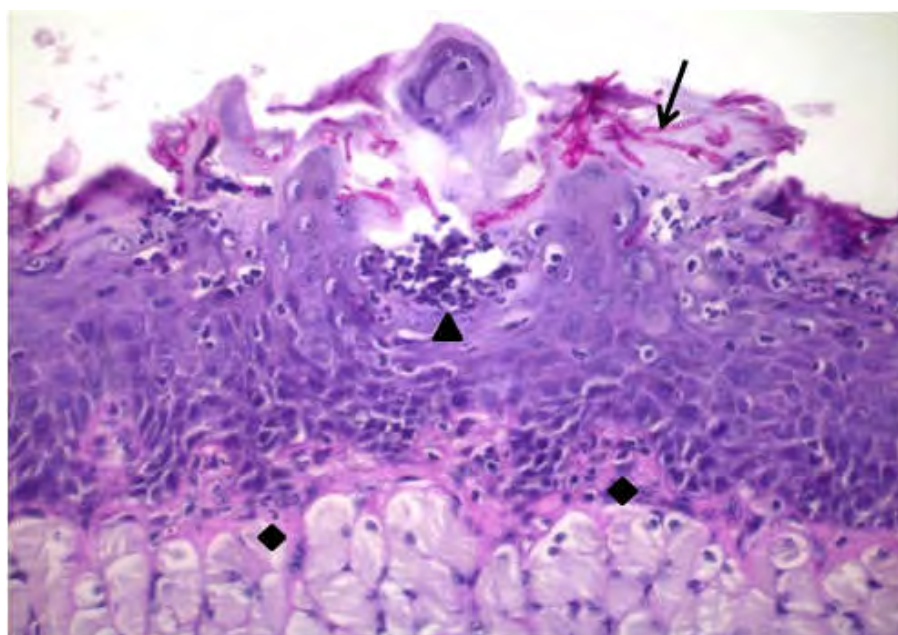


Figura 10 – Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F-L+. Observam-se leveduras e hifas (↓) na queratina, microabscesso intraepitelial (▲) e células inflamatórias na lâmina própria (◆). PAS; aumento original: 400X.



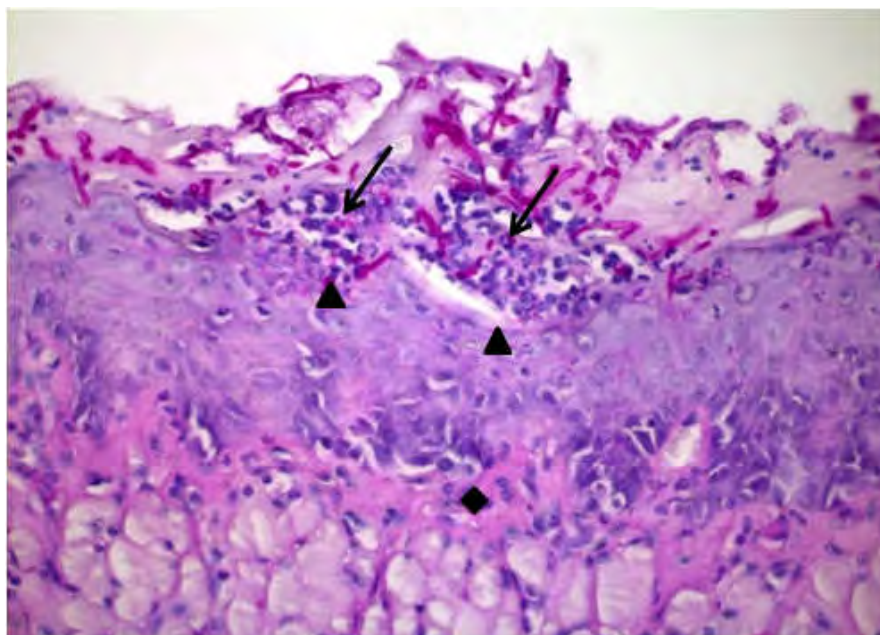


Figura 11 – Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F+L-. Observam-se leveduras e hifas (↓) dentro dos microabscessos intraepiteliais (▲) e células inflamatórias na lâmina própria (◆). PAS; aumento original: 400X.

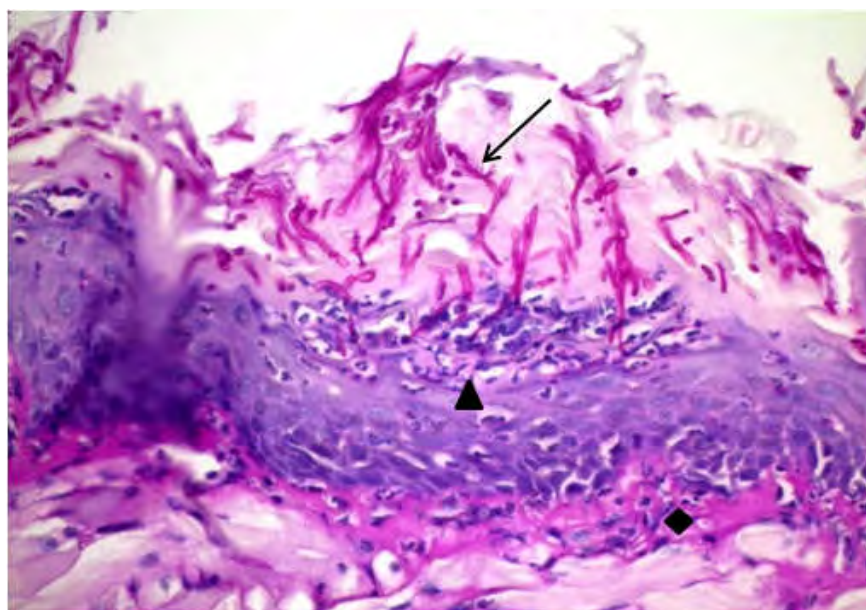


Figura 12 – Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F+L+. Observam-se leveduras e hifas (↓) na queratina, microabscesso intraepitelial (▲) e células inflamatórias na lâmina própria (◆). PAS; aumento original: 400X.



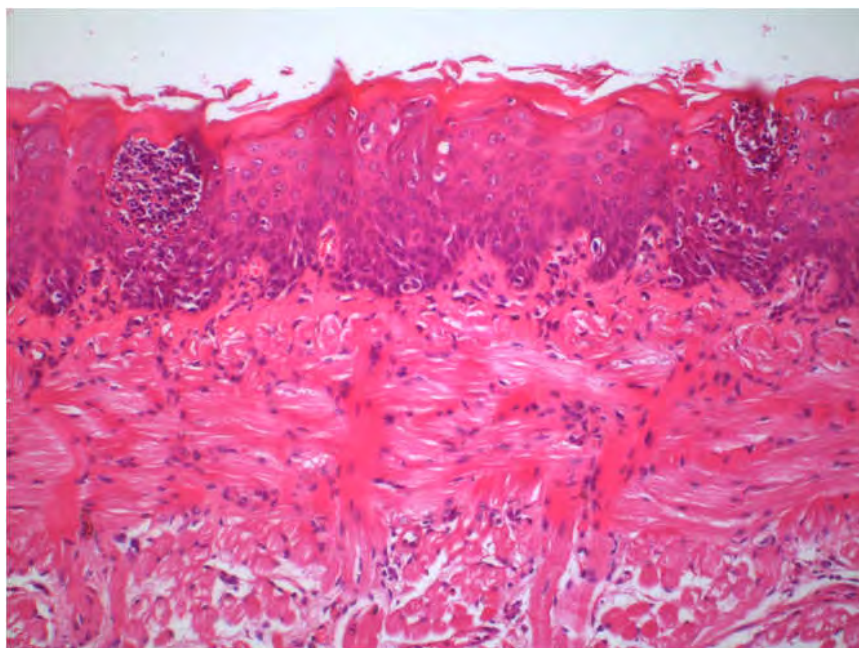


Figura 13 – Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F-L-: observam-se a presença de microabscessos intraepiteliais, hiperplasia epitelial, duplicação da camada basal, perda das papilas filiformes, espongiose e exocitose. Na lâmina própria observam-se vasos sanguíneos congestionados e infiltrado inflamatório moderado. HE; aumento 200X.

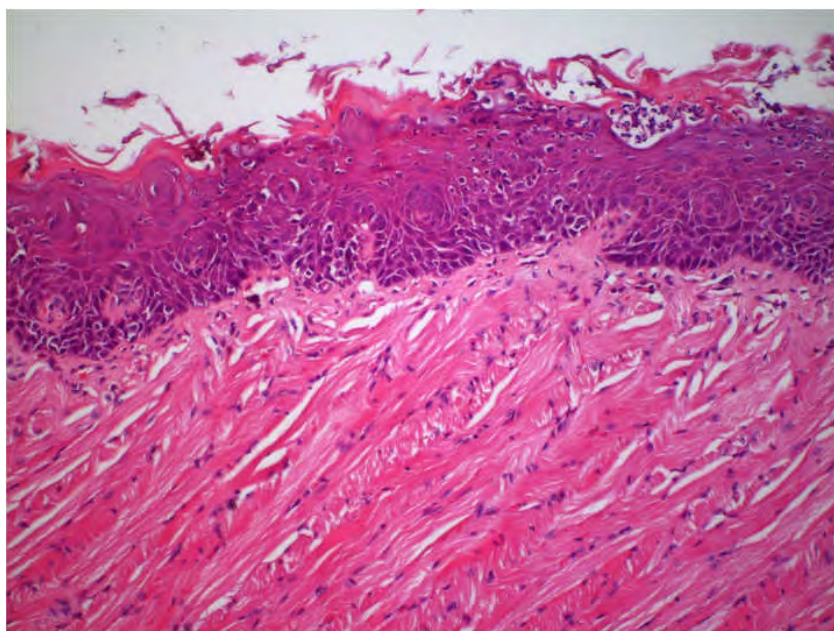


Figura 14 - Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F-L+: observam-se a presença de microabscessos intraepiteliais, duplicação da camada basal e perda da estratificação, espongiose, exocitose, perda das papilas filiformes e descamação do epitélio. Na lâmina própria observa-se infiltrado inflamatório leve. HE; aumento 200X.

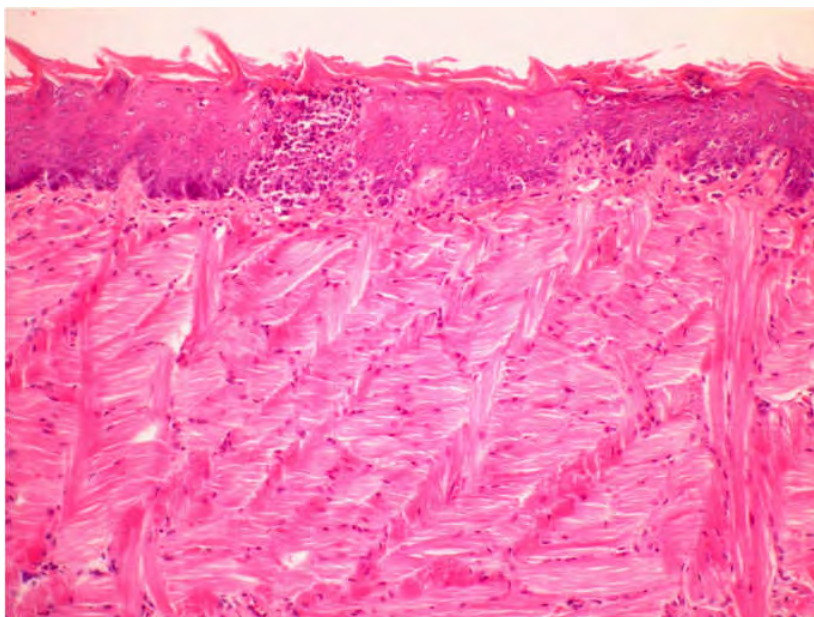


Figura 15 - Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F+L-: observa-se a presença de microabscesso intraepitelial, hiperplasia epitelial, exocitose e perda das papilas filiformes. Na lâmina própria observa-se infiltrado inflamatório leve. HE; aumento 200X.

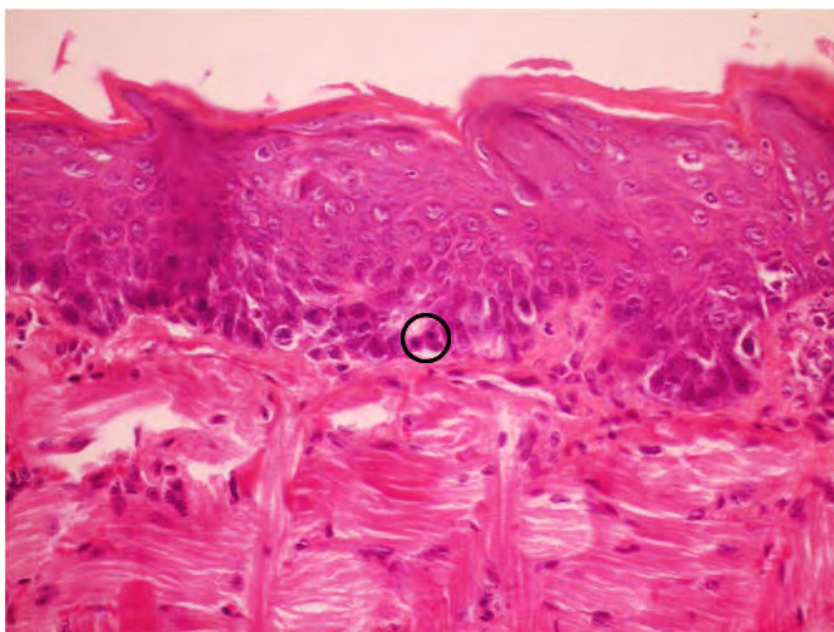


Figura 16 - Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F+L-: observa-se a presença de hiperplasia epitelial, duplicação da camada basal e mitose (○) e espongiose. Na lâmina própria observa-se infiltrado inflamatório leve. HE; aumento 400X.



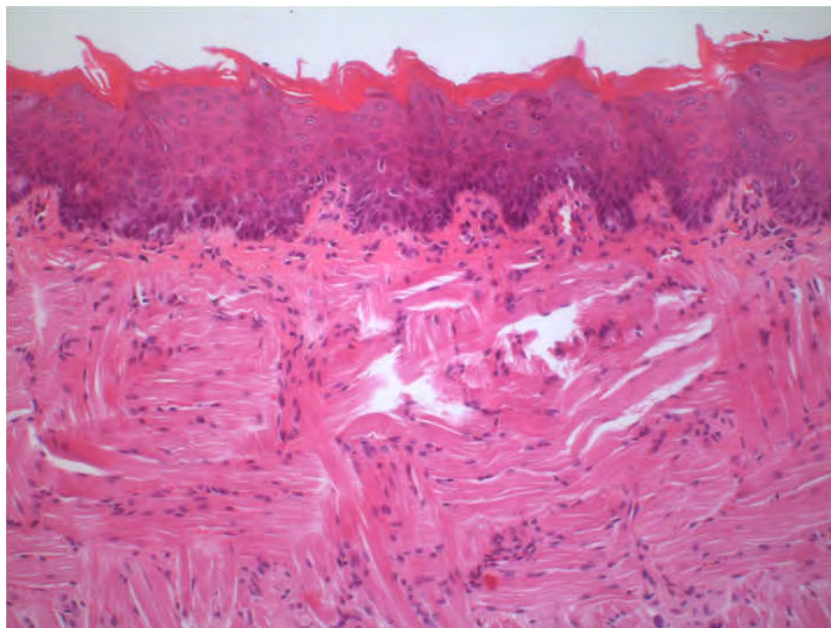


Figura 17 - Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F+L+: observa-se a presença hiperplasia epitelial, duplicação da camada basal, espongiose, exocitose e perda das papilas filiformes. Na lâmina própria observa-se infiltrado inflamatório leve. HE; aumento 200X.

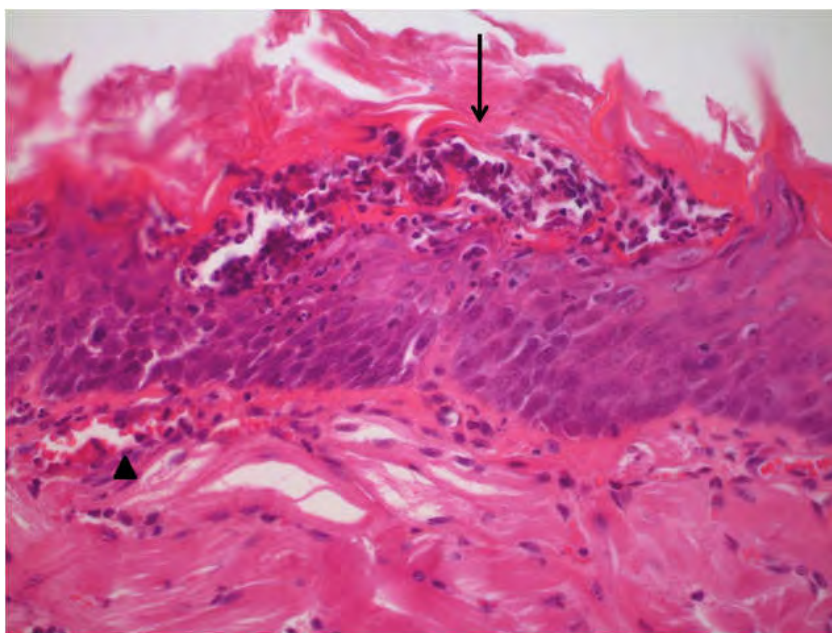


Figura 18 - Corte sagital do dorso da língua do camundongo do grupo F+L+: observa-se a presença microabscesso intraepitelial (↓), duplicação da camada basal, exocitose, espongiose, hiperortoqueratose e descamação do epitélio. Na lâmina própria observa-se vaso sanguíneo congestionado e dilatado com leucócitos e infiltrado inflamatório moderado. HE; aumento 400X.



quantidade de hifas penetrando o tecido de forma perpendicular, fato observado nos maiores aumentos. Neste estágio de infecção foram observadas somente hifas sobre a língua. As hifas foram observadas penetrando o tecido na porção anterior das papilas, sendo encontradas predominantemente em regiões isoladas nas papilas cônicas simples.

A infecção por *C. albicans* resultou em degradação tecidual e descamação celular, observados nos maiores aumentos e, atrofia e destruição das papilas filiformes com aumento da superfície interpapilar, observados nos menores aumentos. As lesões foram encontradas nas papilas cônicas simples e papilas gigantes.

Os grupos experimentais F+L-, F-L+ e F+L+ apresentaram infecção por *Candida* e lesões semelhantes (Figura 20- 27), enquanto que o grupo F-L- exibiu maior quantidade de hifas e extensão da infecção (Figura 20 e 21).

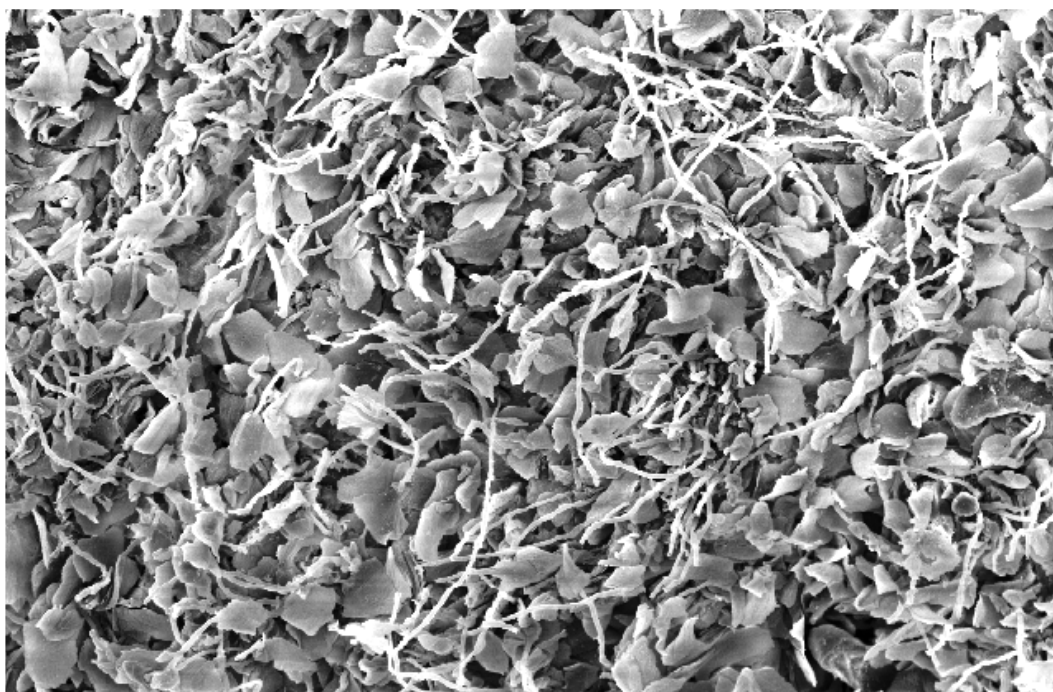


Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua do camundongo do grupo F-L-: observam-se numerosas hifas entre as papilas cônicas simples destruídas. Aumento original: 250X.

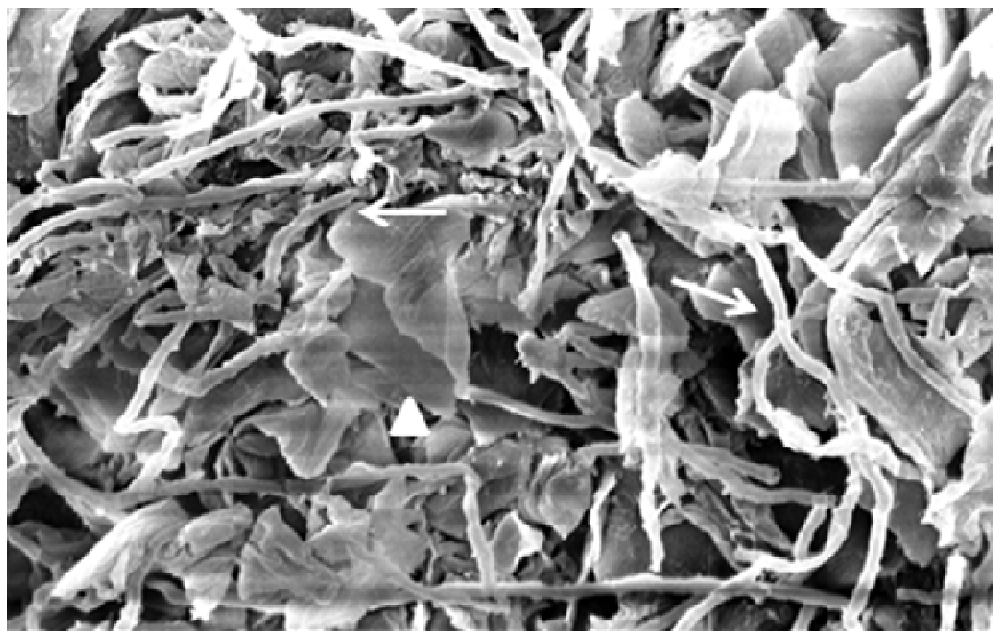


Figura 21 – Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua do camundongo do grupo F-L-: observam-se numerosas hifas (↓) sob as células descamadas (▲) das papilas cônicas simples. Aumento original: 750X.

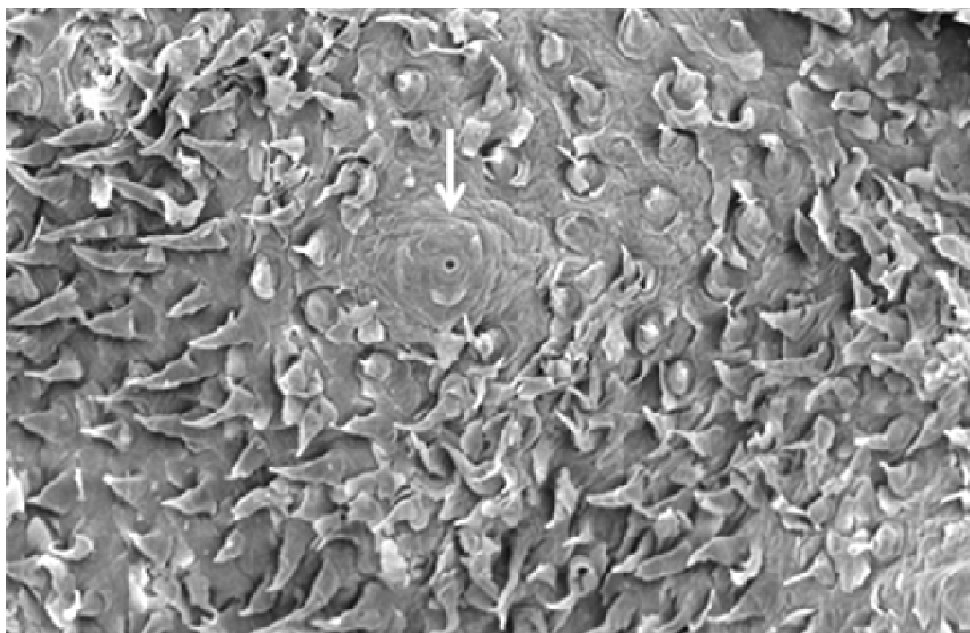


Figura 22 – Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua do camundongo do grupo F-L+: observa-se atrofia e destruição das papilas cônicas simples com aumento da superfície interpapilar e presença de papila fungiforme (↓). Aumento original: 160X.

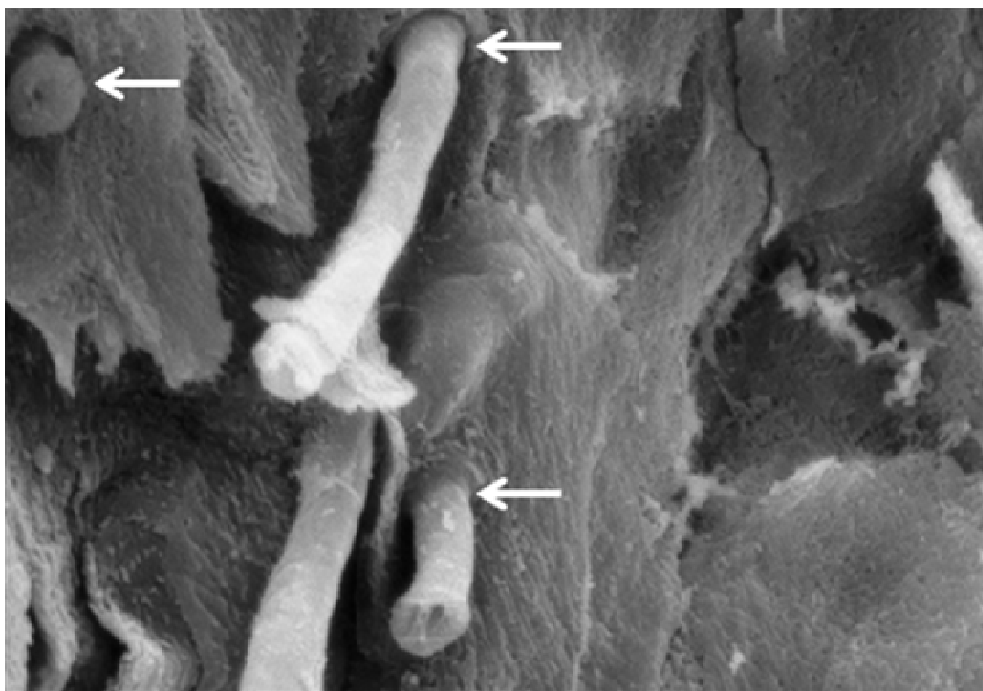


Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua do camundongo do grupo F-L+: observa-se penetração perpendicular das hifas no tecido (↓). Aumento original: 3700X.

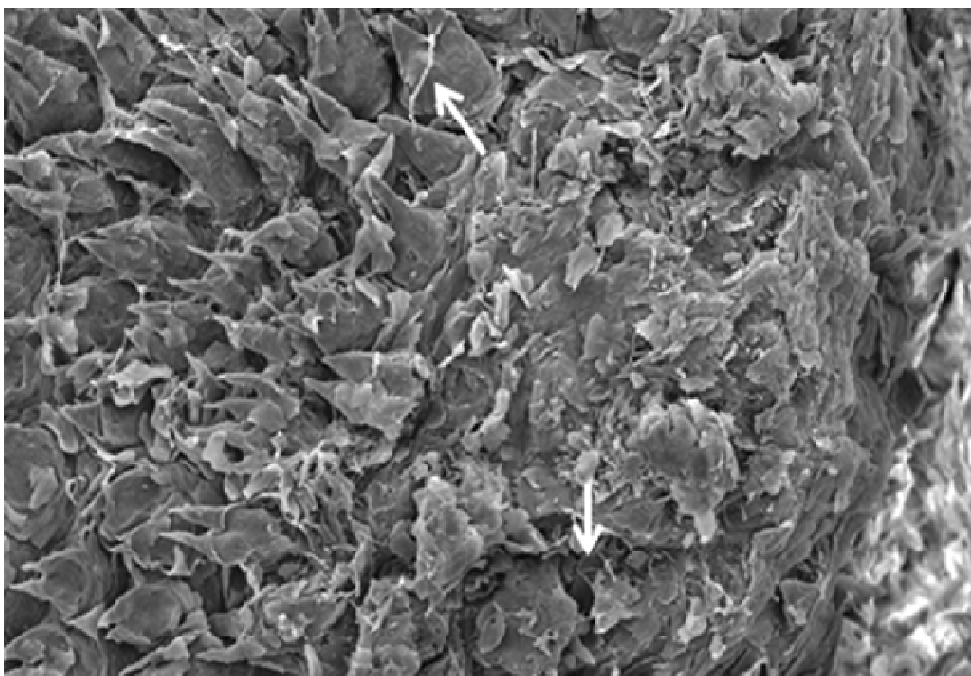


Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua do camundongo do grupo F-L-: observa-se destruição das papilas gigantes e presença de hifas (↓). Aumento original: 150X.

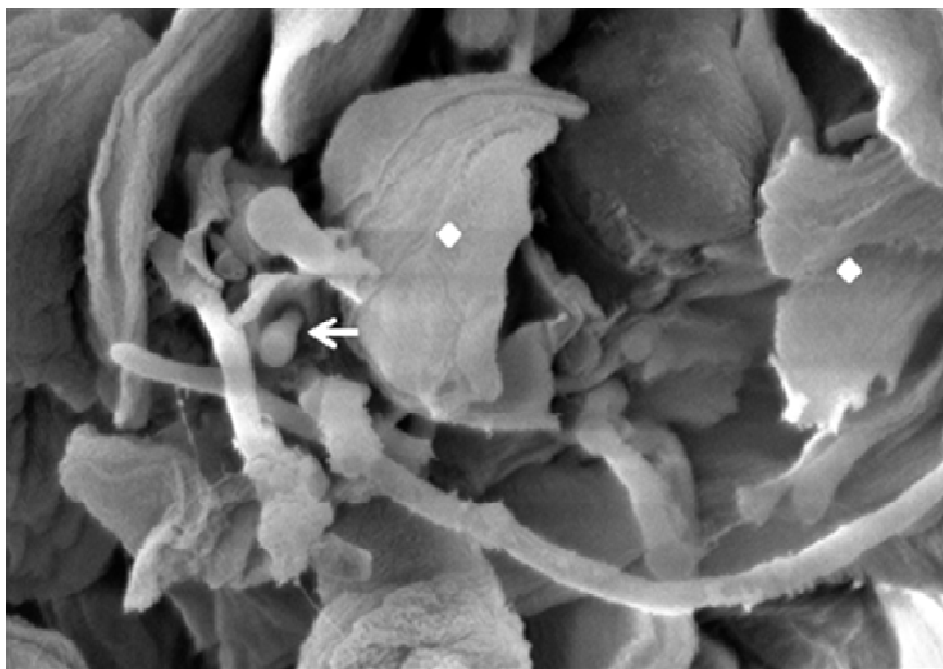


Figura 25 – Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua do camundongo do grupo F+L-: observam-se hifas penetrando o tecido (↓) e descamação celular (♦). Aumento original: 2000X.

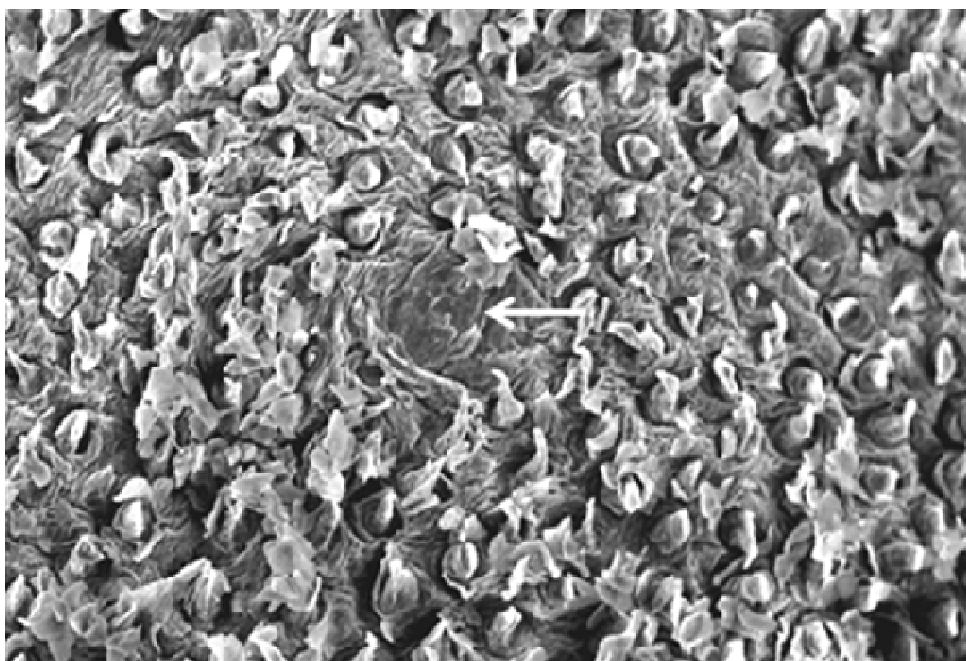


Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua do camundongo do grupo F+L+: observa-se atrofia e destruição das papilas cônicas simples com aumento da superfície interpapilar e presença de papila fungiforme (↓). Aumento original: 160X.



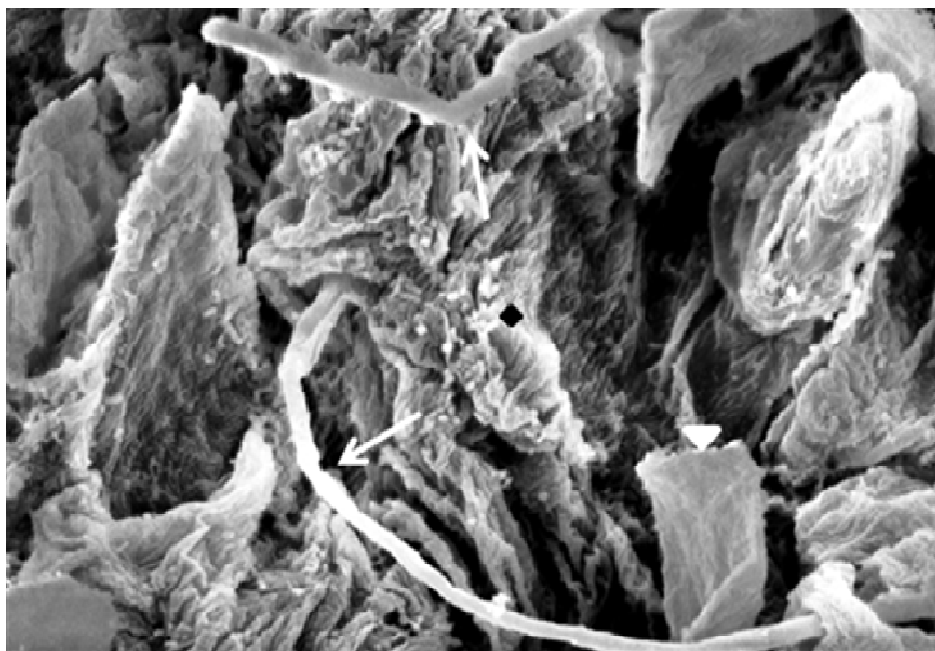


Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura do dorso da língua do camundongo do grupo F+L+: observam-se hifas penetrando o tecido (↓), descamação de células (▼) e degradação tecidual (◆). Aumento original: 1500X.

### 5.8 Aderência de *C. albicans* às células do epitélio bucal humano

A aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais humanas foi avaliada *in vitro* após os tratamentos F-L- e F+L+ realizados nos camundongos. A TFD (F+L+) reduziu a aderência das leveduras às células epiteliais bucais em relação ao grupo controle (F-L-) com diferença estatisticamente significativa (Figura 28). A redução da aderência para o grupo F+L+ foi de 35% em relação ao grupo F-L-.

Na microscopia de luz, observaram-se células em brotamento e tubos germinativos aderidos às células epiteliais bucais e na microscopia eletrônica de varredura foram observadas células em brotamento (Figura 29).

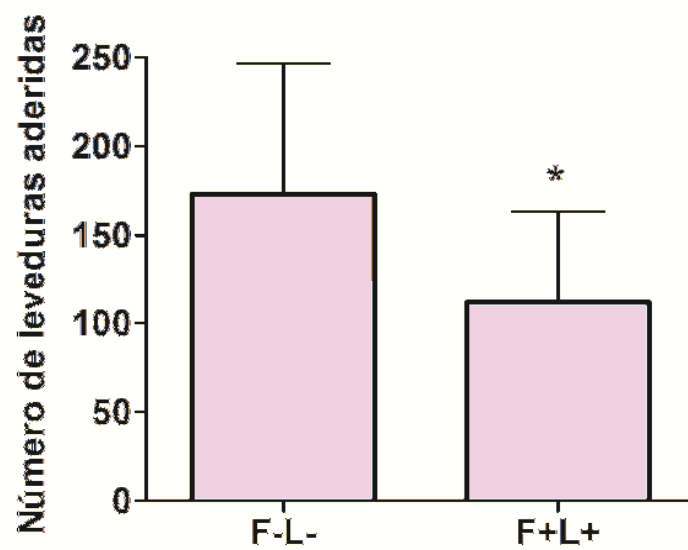


Figura 28 – Efeito da terapia fotodinâmica na redução da aderência de *C. albicans* a 100 células epiteliais bucais humanas *in vitro*. \*Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste *t* de Student = 0,045).

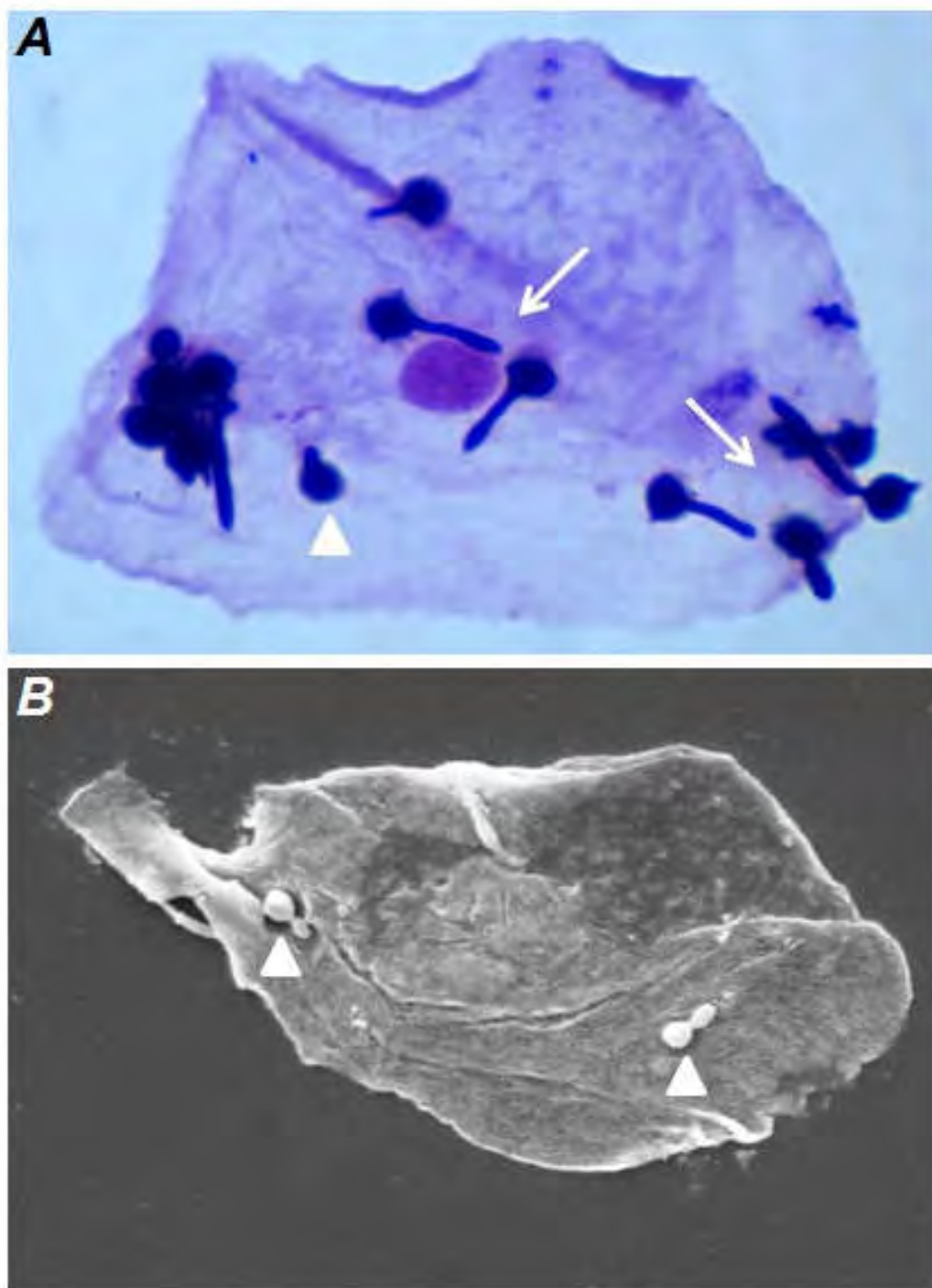


Figura 29 – Microscopia de luz (A) e microscopia eletrônica de varredura (B) da aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais humanas *in vitro*. Observou-se a presença de células em brotamento (▲) e tubos germinativos (↓) aderidos. Aumento original: 1000X (A) e 1100X (B).

## 6 DISCUSSÃO

A produção de espécies reativas de oxigênio pela TFD depende da interação de fótons da luz visível, em comprimento de onda adequado com o fotossensibilizador. Sendo assim, para que ocorra esta interação, o laser ou LED devem emitir luz no comprimento de onda que o fotossensibilizador é capaz de absorver (Donnelly et al., 2008). No presente trabalho, a escolha do LED com emissão de luz verde em  $532 \pm 10$  nm foi adequada para a reação fotodinâmica, pois verificou-se na análise do espectro de absorção do fotossensibilizador que a eritrosina apresentou pico de absorção (530 nm) coincidente com o pico de emissão da fonte de luz utilizada.

O efeito da terapia fotodinâmica mediada por eritrosina irradiada por LED apresentou redução significativa de culturas planctônicas, biofilmes formados *in vitro* e *in vivo* de *C. albicans*. Estes resultados são importantes, pois trata-se do primeiro estudo de TFD antimicrobiana mediada por LED de emissão de luz verde em *C. albicans*.

A cultura planctônica de *C. albicans* submetida à TFD demonstrou expressiva redução da viabilidade das células com diferença estatisticamente significativa a partir da menor concentração testada (0,39  $\mu$ M) apresentando redução de 100% de leveduras a partir da concentração de eritrosina de 3,12  $\mu$ M e LED irradiado por 3 minutos com fluência de 42,63 J.cm<sup>-2</sup>. Estes resultados demonstraram que o efeito da TFD foi dose-dependente.

Dovigo et al. (2011) também obtiveram inativação completa de *Candida*, quando utilizaram LED de emissão de luz azul (37,5 J.cm<sup>-2</sup>) associado ao fotossensibilizador Photogen® (25 mg/L) em

culturas planctônicas de cepas padrão e cepas resistentes ao fluconazol de *C. albicans* e *C. glabrata*.

Os dados obtidos no presente trabalho alcançaram maior redução microbiana em menores concentrações do fotossensibilizador do que o estudo realizado por Peloi et al. (2008). Estes autores avaliaram a ação fotodinâmica do fotossensibilizador azul de metileno na concentração de 35,2  $\mu\text{M}$  irradiado por LED (2- 12  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) de emissão de luz vermelha por 10 a 60 minutos em culturas planctônicas de *C. albicans* obtendo reduções de 2,77-3,87  $\log_{10}$ . Entretanto, a fluência do LED utilizado no trabalho de Peloi et al. (2008) foi aproximadamente 3,5 vezes menor que a fluência do LED utilizado no presente trabalho.

Soares et al. (2009) utilizaram LED de emissão de luz vermelha com fluência de 180  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  e irradiação por 15 minutos associado a 25  $\mu\text{M}$  de azul de toluidina e obtiveram redução de 3,41  $\log_{10}$  de cepas de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol. No presente trabalho foram alcançadas maiores reduções microbianas com fluência do LED, tempo de irradiação e concentração do corante menores em relação ao estudo de Soares et al. (2009).

O biofilme de *C. albicans* submetido a TFD mediada por eritrosina na concentração de 400  $\mu\text{M}$  e LED verde apresentou redução estatisticamente significativa de 0,74  $\log_{10}$  em relação ao grupo controle. A redução das células viáveis do biofilme alcançada no presente trabalho foi mais expressiva que os resultados descritos por Dovigo et al. (2011) para a TFD em biofilmes de cepas padrão e cepas sensíveis e resistentes ao fluconazol de *C. albicans* e *C. glabrata*, que obtiveram redução de 0,24 log e 0,16 log, respectivamente.

A suscetibilidade reduzida do biofilme de *C. albicans* à TFD em relação às células planctônicas, provavelmente, deve-se a heterogeneidade da população do biofilme, restrição da penetração de substâncias devido ao material da matriz extracelular, diminuição da taxa

de crescimento das células dentro do biofilme e diferença de expressão de genes (Ramage et al., 2001; Nobile; Mitchell, 2006).

Em estudo realizado por Chabrier-Roselló et al. (2005) foram avaliados os efeitos da TFD mediada por fotofrin (10 mg/L) e lâmpada de mercúrio ( $18 \text{ J.cm}^{-2}$ ) sobre biofilmes e tubos germinativos de *C. albicans*. Os resultados demonstraram que os biofilmes tratados com a TFD apresentaram significativa redução metabólica em relação aos tratados com o antifúngico convencional anfotericina B. O tratamento em *C. albicans* expressando tubos germinativos demonstrou que houve perda da integridade da membrana e morte celular. Os autores destacaram o potencial da terapia fotodinâmica como tratamento coadjuvante ou alternativo contra infecções cutâneas ou mucocutâneas causadas por *C. albicans*.

Na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) realizada neste trabalho, os biofilmes do grupo controle apresentaram estrutura complexa formada por blastoconídios, pseudohifas e hifas, entretanto não foi observada a presença de matriz polissacarídica extracelular. Provavelmente, este fato pode ser atribuído ao processo de fixação realizado para visualização dos espécimes em MEV, que pode remover a matriz polissacarídica extracelular, dificultando a sua visualização em microscopia (Ramage et al., 2001; Seneviratne et al., 2009).

Os biofilmes do grupo TFD submetidos à MEV apresentaram redução da quantidade de estruturas fúngicas. Esses dados também foram observados por Pereira et al. (2011), que avaliaram os efeitos do azul de metileno ( $312,6 \mu\text{M}$ ) e laser de Fosfeto de Índio-Gálio- Alumínio (InGaAlP) ( $350 \text{ J.cm}^{-2}$ ) sobre biofilmes monotípicos e heterotípicos formados por *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Tanto nos biofilmes monotípicos, como nos biofilmes heterotípicos, foram observadas diminuições dos agregados celulares nas camadas mais externas do biofilme. Entretanto, no biofilme heterotípico foi observada

maior resistência das cepas à TFD, sugerindo que a complexidade do biofilme aumenta a sua resistência à TFD.

Em MEV observou-se, também, que para o biofilme de *C. albicans* submetido à TFD ocorreu redução de todas as estruturas fúngicas presentes, inclusive redução de hifas que é a forma mais invasiva e aderente (Villar et al., 2004; Karkouska-Kuleta et al., 2009). Segundo Bliss et al. (2004), as formas filamentosas de *Candida* foram mais sensíveis a TFD mediada por fotofrin do que o blastoconídio, este fato deve-se, segundo os autores, a melhor captura deste fotossensibilizador pela forma filamentosa.

O LED verde e o fotossensibilizador eritrosina utilizados no presente trabalho não apresentaram efeitos citotóxicos quando utilizados isoladamente tanto em culturas planctônicas quanto em biofilmes, sendo que estes dados já foram comprovados anteriormente por outros trabalhos utilizando LED vermelho e azul e atividade citotóxica de eritrosina sobre células microbianas (Paulino et al., 2005; Peli et al., 2008; Soares et al., 2009; Dovigo et al., 2011; Costa et al., 2010).

Na TFD aplicada *in vivo* foi utilizado o modelo de candidose experimental descrito por Takakura et al. (2003), com modificações, demonstrando que a metodologia foi adequada para a reprodução de candidose bucal apresentando altas contagens de células viáveis de *Candida* ( $5,77 \log_{10}$  a  $6,11 \log_{10}$ ) após 4 dias de inoculação. Resultados do presente estudo estão de acordo com estudo destes autores que obtiveram  $5,70 \log_{10}$  de recuperação de leveduras após 3 dias de inoculação. A grande quantidade de leveduras obtidas na recuperação deve ter ocorrido pela sedação dos animais, de aproximadamente 3 horas, para inoculação da *C. albicans* o que manteve a suspensão na cavidade bucal. Quando em contato com as células do epitélio bucal a formação de tubo germinativo começa após 30 minutos, o qual é importante fator de virulência para aderência, e a formação de micélio se estende após 90 minutos (Wellmer, Bernhardt, 1997).

A contagem elevada de células viáveis de *Candida* após 4 dias de inoculação foi obtida, provavelmente, devido ao estado de imunossupressão do animal conferida pelo potente imunossupressor utilizado (prednisolona). Segundo Samaranayake e Samaranayake (2001) durante o desenvolvimento de candidose bucal experimental, as leveduras e hifas são eliminadas do hospedeiro pela ação do sistema imunológico. Além disso, a administração diária de tetraciclina, que é um antibiótico de amplo espectro, pode ter interferido no equilíbrio existente entre bactérias e fungos na cavidade bucal favorecendo o supercrescimento de leveduras (Soyas et al., 2008).

Os tratamentos controles realizados *in vivo* com eritrosina (F+L) ou LED (F-L+) apresentaram redução de células. Isto deve ter ocorrido, provavelmente, devido à primeira coleta realizada antes do tratamento que deve ter removido parte do biofilme presente. Esta redução também foi observada para o grupo controle (F-L-), porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos F-L-, F+L- e F-L+.

O tratamento com TFD mostrou resultados semelhantes de redução de biofilmes de *C. albicans* formados *in vivo* ( $0,73 \log_{10}$ ) e *in vitro* ( $0,74 \log_{10}$ ) para a concentração de  $400 \mu\text{M}$  de eritrosina, desta forma pode-se notar que o biofilme formado *in vitro* pode ser usado como *screening* para perfis de suscetibilidade de biofilmes de *C. albicans* formados *in vivo*.

Teichert et al. (2002) avaliaram a TFD mediada por azul de metileno nas concentrações de  $1203,5 \mu\text{M}$  e  $1337,2 \mu\text{M}$  e irradiação por laser de diodo (664 nm) com redução de  $2,54 \log_{10}$  e  $2,74 \log_{10}$  a 0, respectivamente, para o tratamento de candidose bucal induzida por *C. albicans* em camundongos imunodeprimidos. Embora os autores tenham obtido maiores reduções de células que o presente trabalho a média do número de células para o grupo controle (F-L-) foi de  $2,34 \log_{10}$  e para o presente trabalho foi de  $5,55 \log_{10}$ , o que demonstrou que a colonização dos camundongos do presente trabalho foi maior do que o trabalho de



Teichert et al. (2002). Segundo Demidova e Hamblin (2005), maiores concentrações de células podem interferir na efetividade da TFD.

No trabalho realizado por Mima et al. (2010) foi usada a mesma metodologia para indução de candidose bucal que o presente estudo, sendo que os animais foram tratados com o fotossensibilizador Photogen® nas concentrações de 400, 500 e 1000 mg/L e irradiados por LED azul com redução de células de *C. albicans* de 1,04, 1,39 e 1,41 log<sub>10</sub>, respectivamente, e LED vermelho com redução de 1,05, 1,59 e 1,40 log<sub>10</sub>, respectivamente. Embora a redução alcançada por este tratamento tenha sido maior que a do presente trabalho, a concentração do fotossensibilizador utilizada foi até três vezes maior que a utilizada para a eritrosina e o tempo de irradiação foi de 20 minutos e a fluência de 305 J.cm<sup>-2</sup>, enquanto que para o presente trabalho o tempo de irradiação foi de 3 minutos e a fluência de 14,34 J.cm<sup>-2</sup>.

No presente trabalho foi observada pequena redução de células de *C. albicans* (0,73 log<sub>10</sub>) na cavidade bucal dos camundongos após uma seção de TFD. A redução, provavelmente, teria sido maior se fossem feitas mais seções de TFD para tratamento da candidose bucal. Não foi possível, entretanto, realizar vários tratamentos, pois em estudo piloto os animais não resistiram a tantos tratamentos anestésicos e a redução da carga fúngica alcançada após a TFD não foi suficiente para restabelecer a saúde dos animais. Da mesma forma, Martins et al. (2011) trataram candidose bucal induzida em ratos em duas seções com TFD mediada por azul de metileno (312,6 µM) e laser AsGaAl (245 J.cm<sup>-2</sup>) obtendo redução das lesões microscópicas de candidose e atividade de proteinase. Entretanto, estes autores relataram que para o sucesso clínico da terapia seriam necessárias mais aplicações da TFD, a qual não foi possível, pois os animais não suportaram tantos tratamentos anestésicos.

Além disso, muitos camundongos não apresentaram aparência saudável e alguns não sobreviveram até o final do experimento, ainda assim com 7 dias de experimento houve perda de peso e alguns

animais morreram, enquanto que Mima et al. (2010) não observaram estes fatos. Desta forma, os animais debilitados foram substituídos, obtendo-se o número de animais propostos.

A perda de peso e morte dos animais deve ter ocorrido pelo estado de imunossupressão e/ou diferenças na virulência da cepa utilizada, uma vez que a cepa utilizada foi capaz de formar biofilme maduro, tanto *in vitro* como *in vivo*, que constitui um importante fator de virulência correlacionado com rápida mortalidade de camundongos (Hasan et al., 2009).

Em estudo realizado por Yanagi et al. (2008) foram avaliados os efeitos de propionato de beclometasona no desenvolvimento de candidose bucal utilizando o modelo experimental desenvolvido por Takakura et al. (2003). Os autores observaram perda de peso dos animais com a progressão da infecção por *C. albicans* após apenas 3 dias de inoculação com *C. albicans* para o grupo imunossuprimido com prednisolona com diferença estatisticamente significante entre os grupos, demonstrando que a imunossupressão causada por prednisolona e presença de candidose bucal causou severos prejuízos a saúde sistêmica dos animais.

As análises macroscópicas e histológicas dos dorsos das línguas dos animais que não receberam inoculações de *C. albicans* demonstraram que os tratamentos somente com eritrosina (F+L-), LED (F-L+) e TFD (F+L+) não causaram danos aos tecidos da língua, demonstrando que TFD foi eficaz contra biofilme de *C. albicans in vivo* sem alterar os tecidos adjacentes.

As línguas dos camundongos inoculados com *C. albicans* exibiram lesões macroscópicas características de candidose, como presença de regiões esbranquiçadas com áreas de atrofia papilar localizadas principalmente na região das papilas cônicas simples. O grupo tratado com a TFD (F+L+) apresentou mediana de escore para a análise macroscópica menor que os demais grupos (F-L-, F-L+ e F+L-), mas sem

diferença estatisticamente significativa. Teichert et al. (2002) e Mima et al. (2010) observaram lesões características de candidose pseudomembranosa no dorso da língua dos camundongos, entretanto estes autores não avaliaram os sinais clínicos da doença após a TFD.

Na análise histológica foram encontradas muitas leveduras e hifas no dorso da língua dos animais e numerosas lesões epiteliais. Foi observado infiltrado inflamatório leve na maioria dos cortes histológicos com predomínio de leucócitos polimorfonucleares, porém foram encontradas células mononucleares. Estes achados coincidem com lesões característica de candidose bucal também reportado por outros autores (Takakura et al., 2003; Totti et al., 2004; Mima et al., 2010). A análise estatística dos achados histológicos não apresentaram diferenças significantes entre os grupos estudados.

Foram observados microabscessos intraepiteliais no epitélio e leucócitos na lâmina própria subjacentes as leveduras e hifas localizadas na camada de queratina, pois a presença destas estruturas leva a mudanças histológicas nos tecidos mais profundos devido aos efeitos mediados pela secreção de enzimas extracelulares, como proteinase e fosfolipase, por *C. albicans* (Samaranayake; Samaranayake, 2001).

Estudos utilizando a mesma metodologia do presente trabalho também encontraram numerosas leveduras e hifas na camada queratinizada da língua (Takakura et al., 2003; Hisajima et al. 2008; Mima et al., 2010). Entretanto, em relação a TFD, Mima et al. (2010) não observaram diferença na quantidade de estruturas fúngicas na análise histológica entre os grupos estudados.

O efeito da TFD em candidose bucal foi avaliado por alguns autores com resultados diferentes aos nossos (Junqueira et al., 2009; Martins et al., 2011). Junqueira et al. (2009) induziram candidose bucal em ratos que foram tratados com TFD mediada por azul de metileno (312,6  $\mu\text{M}$ ) e laser de AsGaAl (26  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), embora não tenham observado

diferença estatisticamente significativa entre os grupos F+L+, F+L-, F-L+ e F-L- na recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal após os tratamentos, os autores observaram que animais tratados pela TFD, após 1 e 5 dias, exibiram poucas lesões epiteliais e baixa resposta inflamatória crônica, enquanto que os demais grupos apresentaram lesões característica de infecção por *Candida*. Em trabalho semelhante, Martins et al. (2011) utilizaram fotossensibilizador na mesma concentração e fonte de luz com fluência de  $245 \text{ J.cm}^{-2}$  para tratamento de candidose bucal induzida em ratos obtendo redução da contagem de UFC/mL, porém sem diferença estatisticamente significativa, e diminuição das lesões microscópicas após a TFD com diferença estatisticamente significativa.

No nosso trabalho, assim como no estudo realizado por Mima et al. (2010), foram obtidos resultados contrários aos anteriores: redução estatisticamente significativa da contagem de UFC/mL e lesões microscópicas semelhantes entre os grupos. Junqueira et al. (2009) relataram que as respostas do tecido aos efeitos da TFD ocorreram após 24 horas da aplicação, entretanto estes efeitos não foram observados para os animais estudados no presente trabalho. Isto deve ter ocorrido, provavelmente, pois os animais estavam imunossuprimidos e, portanto, não puderam desenvolver uma resposta inflamatória eficiente contra a infecção após a morte de algumas estruturas fúngicas pela TFD ou, ainda, para este modelo experimental seria necessário que a eutanásia fosse feita após 48 horas ou mais para análise das alterações microscópicas. Além disso, Junqueira et al. (2009) e Martins et al. (2010) induziram candidose bucal em ratos, uma vez que este animal possui imunidade inata mais potente que o camundongo podendo responder mais rapidamente à infecção apresentando menos lesões microscópicas e menor recuperação de *C. albicans*. Um dado interessante relatado por Junqueira et al. (2009) foi que o grupo tratado somente com laser (F-L+) apresentou alterações epiteliais e respostas inflamatórias crônicas mais intensas que os demais grupos, provavelmente, devido à habilidade do

laser em estimular a resposta biológica do hospedeiro sugerindo que sejam feitos mais estudos para elucidar os efeitos do laser de baixa potência em lesões de candidose.

As línguas foram submetidas à análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após 5 dias de inoculação demonstrando grande quantidade de hifas penetrando o tecido e lesões, como degradação tecidual, descamação tecidual, atrofia e destruição das papilas filiformes com aumento da superfície interpapilar localizadas nas papilas cônicas simples e papilas gigantes. Estes achados são coincidentes com o que foi observado na análise histológica, os quais também correspondem às lesões observadas na análise macroscópica características de lesões de candidose bucal.

Junqueira et al. (2005) avaliaram o desenvolvimento de candidose bucal em ratas controles e ovariectomizadas por MEV após 6, horas, 24 horas, 7 dias e 15 dias da última inoculação de *C. albicans*, o qual após 24 horas foram observadas características semelhantes as encontradas no presente trabalho, como degradação tecidual, descamação da queratina e aglomeração de hifas entre as papilas filiformes. Após 7 dias da última inoculação, período mais próximo ao do presente trabalho, observou-se atrofia e destruição das papilas filiformes e aumento da superfície interpapilar semelhante ao encontrado, porém leveduras e hifas foram raramente observadas no dorso da língua, demonstrando que o modelo murino imunossuprimido utilizado apresentou infecção por *C. albicans* por mais tempo.

Foi observada na MEV invasão das hifas no epitélio da língua. A capacidade de invasão está relacionada com a habilidade em exibir a transição de levedura para hifa, sendo que a invasão ocorre através dos queratinócitos e também pelas junções das células epiteliais (Malic et al., 2007). Com a invasão das hifas foram observadas também modificações no epitélio que levaram a destruição dos tecidos. Segundo Villar et al. (2004), a destruição tecidual deve-se a capacidade de *C.*

*albicans* formar hifas que promovem a lise dos queratinócitos, induzindo lise acima de 96% nas células do epitélio bucal.

Em microscopia eletrônica de transmissão a invasão das hifas foi descrita pelo crescimento destas através das células epiteliais frouxas levando a deformação da membrana do epitélio e citoesqueleto e invaginação das células epiteliais ao redor da hifa (Vitkov et al., 2002).

A análise em MEV realizada para o grupo submetido a TFD (F+L+) mostrou poucas hifas sobre o dorso da língua em relação ao grupo controle (F-L-), assim como foi observada menor recuperação de *C. albicans* e menor mediana de escore para a análise macroscópica das lesões após a TFD, entretanto não houve diferença na quantificação de leveduras e hifas na análise histológica entre os grupos. Os dados mostraram que este tratamento afetou as estruturas fúngicas expostas na superfície da língua sem atingir as camadas mais internas da queratina. Para aumentar a eficácia da TFD contra candidose bucal sugere-se que sejam desenvolvidos protocolos de tratamentos eficazes realizados em seções auxiliado por tratamento sistêmico com antifúngicos para prevenir a invasão de *C. albicans* e impedir episódios de recidivas comuns em indivíduos imunodeprimidos.

A aderência é um importante passo para colonização de *C. albicans*, com subsequente desenvolvimento do biofilme e dano aos tecidos do hospedeiro. Assim, este fator de virulência constitui um importante alvo para a busca de novas terapias. As leveduras recuperadas após o tratamento controle (F-L-) e TFD (F+L+) foram avaliadas quanto à interferência na aderência às células epiteliais bucais humanas. Foi obtido 35% de redução da aderência após a TFD com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Porém a redução da aderência foi menos expressiva do que a redução de 55% de aderência de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol às células epiteliais bucais alcançada por Soares et al. (2009) na TFD *in vitro* mediada por azul de toluidina (25  $\mu$ M) e LED vermelho (180 J.cm<sup>-2</sup>).

A redução da aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais foi relatada como outra característica benéfica encontrada para os antifúngicos azólicos e poliênicos. Segundo os autores estes antifúngicos causaram alterações na membrana plasmática fúngica levando a redução da aderência de *C. albicans* (Ellepola, Samaranayake, 1998; Lyon, Resende, 2006). Soares et al. (2009) também levantaram a hipótese de que a TFD causou redução da aderência por interferência na membrana plasmática.

A aderência de *Candida* spp. é mediada por adesinas, como quitina, glucanas, lipídios, proteínas e manoproteínas, presentes na parede celular fúngica e também pela enzima proteinase que auxilia na colonização e penetração nos tecidos do hospedeiro (Mishra et al., 2007). O estresse oxidativo exercido pelo mecanismo de ação da TFD pode ter interferido na função dos componentes da parede celular ou, ainda, interferido na expressão ou regulação dos genes (*BCR1*, *ALS* e *HWP1*) envolvidos na aderência. Bliss et al. (2004) observaram leveduras deformadas após a TFD sugestivo de dano na parede celular.

Martins et al. (2011) avaliaram os efeitos da TFD sobre a atividade de proteinase de *C. albicans* recuperadas de candidose bucal experimental e observaram a redução da atividade desta enzima, sendo que este efeito da TFD poderia diminuir a aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais. Segundo Mane et al. (2010) existe correlação entre capacidade de aderência e atividade de proteinase para cepas de *Candida* spp. isoladas de indivíduos HIV- positivos com candidose bucal.

Nas análises em microscopia de luz e MEV, foram observados blastoconídios em brotamento, inclusive tubos germinativos após 1 hora de incubação. O contato com uma superfície estimulou a mudança de morfotipos, sendo esta estrutura primordial para o desenvolvimento da hifa necessária para colonização (Douglas, 2002).

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que:

- a) a terapia fotodiâmica foi efetiva em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans* formados *in vitro*;
- b) a terapia fotodinâmica apresentou atividade antifúngica para o tratamento de candidose bucal em modelo murino, sem danificar os tecidos adjacentes;
- c) a aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais humanas foi significativamente reduzida após a terapia fotodinâmica.



## 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(Pt 8):999-1008.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(9):3291-7.

Allaker RP, Douglas CWI. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. Int J Antimicrob Agents. 2009;33(1):8-13.

Allen CM, Beck FM, Lurie FA, Pinsky HM. Role of tetracycline in pathogenesis of chronic candidiasis of rat tongues. Infect Immun. 1985;47(2):480-3.

Angiolella L, Stringaro AR, Bernardis FD, Posteraro B, Bonito M, Toccaceli L, et al. Increase of virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(3):927-36.

Banks JG, Board RG, Carter J, Dodge AD. The cytotoxic and photodynamic inactivation of micro-organisms by rose bengal. J Appl Bacteriol. 1985;58(4):391-400.

---

\* 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.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera Junior A, Teodoro GR, Zângaro RA, et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg.* 2007;256(6):513-8.

Bispo LB. Diodos emissores de luz: o comprimento de onda e sua importância. *Rev Dent on line.* 2007;7(16):110-3.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(6):588-94.

Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2004;48(6):2000-6.

Borecká-Melkusová S, Moran GP, Sullivan DJ, Kucharíková S, Chorvát Jr D, Bujdáková H. The expression of genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms exposed to fluconazole. *Mycoses.* 2009;52(2):118-28.

Buhl R. Local oropharyngeal side effects of inhaled of corticosteroids in patients with asthma. *Allergy.* 2006;61(5):518-26.

Casey AL, Lambert PA, Elliot TSJ. Staphylococci. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29(3):S23-S32.

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

Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72(3):495-544.

Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(3):217-26.

Chandra J, Zhou G, Ghannoum M. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets*. 2005;6(8):887-94.

Coogan MM, Fidel PL Jr, Komesu MC, Maeda N, Samaranayake LP. (B1) *Candida* and mycotic infections. *Adv Dent Res*. 2006;19(1):130-8.

Cormick MP, Alvarez MG, Rovera M, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra- cationic porphyrin derivatives. *Eur J Med Chem*. 2009;44(4):1592-9.

Costa ACBP, Chibebe Junior J, Pereira CA, Machado AKS, Beltrame Junior M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of planktonic culture of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. *Braz Oral Res*. 2010;24(4):413-8.

Dalle F, Wachtler B, L'Ollivier K, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 2010;12(2):248-71.

Delgado ACD, Pedro RJ, Aoki FH, Resende MR, Trapasso P, Colombo AL, et al. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(4):364-71.

Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell- photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents Chemother*. 2005;49(6):2329-35.

d'Enfert C. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12(4):358-64.

de Souza RD, Mores AU, Cavalca L, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EAR. Cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* isolated from elder patients undergoing denture-related candidosis. *Gerodontology*. 2009;26(2):157-61.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P, Vasilakos J. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. PLoS One. 2009;4(11):e7967.

Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res. 2008;163(1):1-12.

Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potencial of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design of characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. Photochem Photobiol B Biol. 2007;89(1):59-69.

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

Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol. 2002;19(3):139-43.

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.

Drago L, Mombelli B, Vecchi ED, Bonaccorso C, Fassina MC, Gismondo MR. *Candida albicans* cellular internalization: a new pathogenic factor? Int J Antimicrob Agents. 2000;16(4):545-7.

Ellepola ANB, Samaranayake LP. Inhalation and topical steroids, and oral candidosis: a mini review. Oral Dis. 2001;7(4):211-6.

Ellepola ANB, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. Arch Oral Biol. 1998;43(11):879-87.

Gaitán-Cepeda LA, Martínez-González M, Ceballos-Salobreña A. Oral candidosis as a clinical marker of immune failure in patients with HIV/AIDS on HAART. *AIDS Patient Care STDS*. 2005;19(2):70-7.

Giroldo LM, Felipe MP, Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009;24(1):109-12.

Giusti JSM, Pinto-Santos L, Pizzolito AC, Helmerson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(4):281-7.

Gyetvai A, Emri T, Fekete A, Varga Z, Gazdag Z, Pesti M, et al. High-dose methylprednisolone influences the physiology and virulence of *Candida albicans* ambiguously and enhances the candidacidal activity of the polyene antibiotic amphotericin B and the superoxide-generating agent menadione. *FEMS Yeast Res*. 2007;7(2):265-75.

Halliday D, Resnick R, Walker J. *Fundamentos de Física*. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC; 2003. 350p.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(5):436-50.

Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Rabiei M, Hu Y, Martinuzzi R, et al. Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(15):4940-9.

Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect*. 2009;11(8-9):753-61.

Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrobial Agents Chemother*. 1995;39(9):2128-31.

Hisajima T, Maruyama N, Tanabe Y, Ishibashi H, Yamada T, Makimura K, et al. Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. *Microbiol Immunol*. 2008;52(7):327-33.

Ishibashi H, Hisajima T, Hu W, Yamaguchi H, Nishiyama Y, Abe S. A murine model of esophageal candidiasis with local characteristic symptoms. *Microbiol Immunol*. 2007;51(5):501-6.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(1):14-9.

Jorge AOC, Totti MAG, Almeida OP, Scully C. Effect of sialoadenectomised on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. *J Oral Pathol Med*. 1993a;22(3):138-40.

Jorge AOC, Totti MAG, Almeida OP, Scully C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. *J Oral Pathol Med*. 1993b;22(2):52-6.

Junqueira JC, Colombo CED, Martins JS, Koga-Ito CY, Carvalho YR, Jorge AOC. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. *Microbiol Immunol*. 2005;49(3):199-207.

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.

Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H, Nitta T. Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. *J Infect Chemother*. 2004;10(4):253-5.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(2):211-24.

Kee T, Lu YM, Vathsala A. Spectrum of severe infections in an Asian renal transplant population. *Transplant Proc.* 2004;36(7):2001-3.

Klis FM, Sosinska GJ, Groot PWJ, Brul S. Covalently linked cell wall proteins *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Res.* 2009;9(7):1013-28.

Koch S, Rudel B, Tietz HJ. Lethal otogenic *Candida* meningitis. *Mycosis.* 2004;47(9-10):450-3.

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

Kriznik A, Bouillot M, Coulon J, Gaboriaud F. Morphological specificity of yeast and filamentous *Candida albicans* forms on surface properties. *C R Biol.* 2005;328(10-11):928-35.

Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Channoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1773-80.

Lambrechts SAG, Aalders MCG, Marle JV. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2005;49(5):2026-34.

Lazzell AL, Chaturvedi AK, Pierce CG, Prasad D, Uppuluri P, Lopez-Ribot JL. Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(3):567-70.

Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(5):632-8.

Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 2007;22(2):83-91.

Malic S, Hill KE, Ralphs JR, Hayes S, Thomas DW, Potts AJ, et al. Characterization of *Candida albicans* infection of an *in vitro* oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:188-94.

Mane A, Pawale C, Gaikwad S, Bembalkar S, Risbud A. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV- infected individuals. *Med Mycol.* In press 2010.

Martins CA, Ito-Koga CY, Jorge AOC. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral cavity. *Braz J Microbiol.* 2002;33(3):236-40.

Martins JS, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CED, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;111(1):71-7.

Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA, Oliveira R. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryot Cell.* 2007;6(12):2429-36.

Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilm. *Mycopathologia.* 2010;169(5):323-31.

Meiller TF, Hube B, Schild L, Shirtliff ME, Scheper MA, Winkler R, et al. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS One.* 2009;17(12):1553-7.

Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(1):190-2.



Mima EGO, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CAS, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(3):392-401.

Mishra MM, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2007;54(3):201-35.

Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat*. 2004;7(4-5):301-9.

Munin E, Girolardo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Photochem Photobiol B Biol*. 2007;88(1):16-20.

Naglik JR, Fidel PL Jr, Odds FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Yeast Res*. 2008;283(2):129-39.

Nailis H, Vandenbroucke R, Tilleman K, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Monitoring ALS1 and ALS3 gene expression during in vitro *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia*. 2009;167(1):9-17.

Nett JE, Lepak AJ, Marchillo K, Andes DR. Time course global gene expression analysis of an in vivo *Candida* biofilm. *J Infect Dis*. 2009;200(2):307-13.

Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*. 2010;98(1):15-25.

Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol*. 2006;8(9):1382-91.

Nobile CJ, Nett JE, Hernday AD, Homann OR, Deneault JB, Nantel A, et al. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol*. 2009;7(6):e1000-117.

Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G Jr, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 2005;50(3):353-9.

Peloi LS, Soares RRS, Biondo CEG, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light emitting-diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. J Biosci. 2008;33(2):231-7.

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.

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

Pleatzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. Lasers Med Sci. 2009;24(2):259-68.

Pomarico L, Cerqueira DF, Soares RMA, Souza IPR, Castro GFBA, Socransky S, et al. Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral *Candida* species and salivary immunoglobulin A in HIV- infected children. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108(2):203-10.

Prasad R, Kapoor K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. Int Rev Cytol. 2005;242:215-48.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. Crit Rev Microbiol. 2009;35(4):340-55.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell. 2005;4(4):633-8.

Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol. 2001;39(9):3234-40.

Rossoni RD, Junqueira JC, Santos EL, Costa AC, Jorge AO. Comparison of the efficacy of rose bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. *Lasers Med Sci.* 2010;25(4):581-6.

Samaranayake LP, Leung WK, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol 2000.* 2009;49:39-59.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):398-429.

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

Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2009;54(11):1052-60.

Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranayake LP. *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics.* 2008b;8(14):2936-47.

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.

Soyas NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Antimicrobial as a contributory factor in oral candidosis- a brief overview. *Oral Dis.* 2008;14(2):138-43.

Taguchi Y, Takizawa T, Ishibashi H, Sagawa T, Arai R, Inoue S, et al. Therapeutic effects on murine oral candidiasis by oral administration of Cassia (*Cinnamomum cassia*) preparation. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2010;51(1):13-21.

Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 2003;47(5):321-6.

Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y, et al. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 6):495-500.

Tanaka H, Suzuki H, Nakahata T, Tateyama T, Sugimoto K, Ito E, et al. Disseminated candidiasis following prednisolone therapy in systemic lupus erythematosus. *Pediatr Int*. 2002;44(6):702-4.

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.

ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PWJ. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*. 2009;88(2):105-15.

Totti MAG, Santos EB, Almeida OP, Jorge AOC. Implantation and permanency of *Candida albicans* in the oral cavity of normal sialodenectomized mice after a single inoculation of yeast. *Braz J Oral Sci*. 2002;1(3):133-6.

Totti MAG, Santos EB, Almeida OP, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. *Braz Oral Res*. 2004;18(3):202-7.

Uppuluri P, Pierce CG, López-Ribot JL. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future Microbiol*. 2009;4(10):1235-7.

Vazquez JA. Invasive fungal infections in the intensive care unit. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010;31(1):79-86.

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

Vitkov L, Krautgartner WD, Hannig M, Weitgasser R, Stoiber W. *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(1):60-4.

Wellmer S, Bernhardt H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tube formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. *Mycoses.* 1997;40(9-10):363-8.

White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1704-13.

Wilheim AB, Miranda-Filho DB, Nogueira RA, Rêgo RSM, Lima KM, Pereira LMMB. The resistance to fluconazole in patients with esophageal candidiasis. *Arq Gastroenterol.* 2009;46(1):32-7.

Wilson D, Thewes S, Zakikhany K, Fradin C, Albrecht A, Almeida R, et al. Identifying infection associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. *FEMS Yeast Res.* 2009;9(5):688-700.

Winteger MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidizinski TIE. Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(3):272-6.

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(4):680-4.

Yanagi M, Hisajima T, Ishibashi H, Amemiya H, Abe S, Watanabe M. Oral candidiasis deteriorated by local application of a glucocorticoid-containing film in a mouse model. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(2):278-83.

Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt- Westhausen A, Holland G, Schaller M, Hube B. *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. Cell Microbiol.2007;9(12):2938-54.

Zanin ICJ, Gonçalves RB, Brugnera Junior A, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. J Antimicrob Chemother. 2005;56(2):324-30.

Zeina B, Greeman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. Br J Dermatol. 2001;144(2):274-8.

Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. Cell Microbiol. 2010;12(3):273-82.

**APÊNDICE A** - Valores da redução de UFC/mL dos grupos experimentais para cada animal.

Tabela 1 - Valores de UFC/mL (Log) obtidos na recuperação antes (A) e depois (D) dos tratamentos experimentais: F-L-, grupo controle; F+L, fotossensibilização com eritrosina; F-L+, irradiação com LED; F+L+, fotossensibilização com eritrosina e irradiação com LED

| Animal | F-L- |      | F-L+ |      | F+L- |      | F+L+ |      |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|        | A    | D    | A    | D    | A    | D    | A    | D    |
| 1      | 6,01 | 5,57 | 6,36 | 5,96 | 6,13 | 6,06 | 5,67 | 3,36 |
| 2      | 5,73 | 5,48 | 5,53 | 4,79 | 6,36 | 5,87 | 6,16 | 5,10 |
| 3      | 6,10 | 5,58 | 6,08 | 6,08 | 5,62 | 5,62 | 5,38 | 5,00 |
| 4      | 5,63 | 5,45 | 5,57 | 5,55 | 6,06 | 6,01 | 6,54 | 5,72 |
| 5      | 5,51 | 5,31 | 6,25 | 6,23 | 6,14 | 6,10 | 6,41 | 5,56 |
| 6      | 6,26 | 6,15 | 5,67 | 5,67 | 5,69 | 5,69 | 6,32 | 6,14 |
| 7      | 5,42 | 5,17 | 6,05 | 5,95 | 6,24 | 5,93 | 5,79 | 5,48 |
| 8      | 5,75 | 5,65 | 5,92 | 5,62 | 6,34 | 6,03 | 6,17 | 5,51 |
| 9      | 5,67 | 5,61 | 6,45 | 5,84 | 6,42 | 6,22 | 5,82 | 5,28 |
| 10     | 5,58 | 5,51 | 5,95 | 5,64 | 6,08 | 5,37 | 5,73 | 5,52 |
| Média  | 5,77 | 5,55 | 5,98 | 5,73 | 6,11 | 5,89 | 6,00 | 5,27 |

Tabela 2 - Valores da diferença de UFC/mL (Log) entre os dados obtidos antes e após os tratamentos experimentais nos diferentes grupos

| Animal      | F-L-        | F-L+        | F+L-        | F+L+        |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1           | 0,45        | 0,40        | 0,07        | 2,31        |
| 2           | 0,25        | 0,74        | 0,49        | 1,06        |
| 3           | 0,52        | 0,00        | 0,00        | 0,38        |
| 4           | 0,17        | 0,02        | 0,05        | 0,82        |
| 5           | 0,20        | 0,02        | 0,04        | 0,85        |
| 6           | 0,11        | 0,00        | 0,00        | 0,18        |
| 7           | 0,25        | 0,10        | 0,31        | 0,31        |
| 8           | 0,10        | 0,30        | 0,31        | 0,66        |
| 9           | 0,06        | 0,61        | 0,20        | 0,54        |
| 10          | 0,07        | 0,31        | 0,71        | 0,21        |
| Média ± DP* | 0,22 ± 0,16 | 0,25 ± 0,27 | 0,22 ± 0,24 | 0,73 ± 0,63 |

\*DP: Desvio Padrão.

**APÊNDICE B** - Escores e medianas dos grupos experimentais obtidos para a análise macroscópica para cada animal.

Tabela 3 – Valores de escores e medianas atribuídos para análise macroscópica da língua de cada animal em relação ao grupo experimental, sendo: 0) normal; 1) lesão em menos de 20%; 2) lesões variando de 21- 90 %; 3) lesões em mais de 91%; 4) lesões espessas com pseudomembrana em mais de 91%

| <b>Animal</b> | <b>F-L-</b> | <b>F-L+</b> | <b>F+L-</b> | <b>F+L+</b> |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1             | 1           | 1           | 1           | 1           |
| 2             | 2           | 2           | 2           | 1           |
| 3             | 2           | 2           | 2           | 0           |
| 4             | 2           | 2           | 2           | 2           |
| 5             | 2           | 1           | 2           | 1           |
| 6             | 2           | 1           | 2           | 1           |
| 7             | 1           | 2           | 2           | 2           |
| 8             | 2           | 2           | 2           | 1           |
| 9             | 2           | 2           | 1           | 2           |
| 10            | 2           | 1           | 1           | 1           |
| Mediana       | 2           | 2           | 2           | 1           |

Teste de Kruskal- Wallis ( $P= 0,098$ ).



**APÊNDICE C** - Médias e medianas dos escores atribuídos para a quantificação de leveduras e hifas e infiltrado inflamatório na lâmina própria.

Tabela 4 – Médias dos escores atribuídos para cada animal e valor da mediana para cada grupo experimental na quantificação de leveduras e hifas para 21 campos histológicos analisados

| Animal  | F-L- | F-L+ | F+L- | F+L+ |
|---------|------|------|------|------|
| 1       | 1,48 | 2,50 | 1,90 | 3,00 |
| 2       | 2,19 | 1,70 | 3,00 | 1,20 |
| 3       | 1,52 | 2,20 | 3,20 | 2,10 |
| 4       | 1,29 | 1,50 | 2,70 | 1,80 |
| 5       | 1,33 | 2,00 | 1,00 | 0,70 |
| 6       | 1,86 | 2,00 | 2,80 | 1,70 |
| 7       | 2,19 | 1,90 | 2,40 | 2,30 |
| 8       | 1,57 | 1,60 | 2,20 | 1,10 |
| 9       | 1,38 | 1,40 | 1,60 | 2,60 |
| 10      | 1,38 | 1,30 | 2,50 | 2,60 |
| Mediana | 1,50 | 1,80 | 2,45 | 1,95 |

Teste de Kruskal- Wallis ( $P= 0,054$ ).

Tabela 5 – Medianas e escores atribuídos para o infiltrado inflamatório da lâmina própria na lesão de candidose

| Animal  | F-L- | F-L+ | F+L- | F+L+ |
|---------|------|------|------|------|
| 1       | 1    | 2    | 2    | 2    |
| 2       | 1    | 1    | 1    | 1    |
| 3       | 1    | 2    | 1    | 1    |
| 4       | 1    | 1    | 1    | 1    |
| 5       | 1    | 1    | 1    | 1    |
| 6       | 1    | 2    | 2    | 1    |
| 7       | 1    | 1    | 1    | 2    |
| 8       | 2    | 2    | 1    | 1    |
| 9       | 1    | 1    | 1    | 1    |
| 10      | 2    | 1    | 1    | 1    |
| Mediana | 1    | 1    | 1    | 1    |

Teste de Kruskal-Wallis ( $P = 0,668$ ).

**ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo animais.**

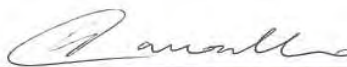
 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas  
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028 / 9037  
Fax (12) 3947-9010 / [unioff@focj.unesp.br](mailto:unioff@focj.unesp.br) / [Guedes@focj.unesp.br](mailto:Guedes@focj.unesp.br)

---



**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **022/2009-PA/CEP**, sobre **“Avaliação da terapia fotodinâmica em *Cândida albicans* in vitro e in vivo”** sob responsabilidade de **ANNA CAROLINA BORGES PEREIRA DA COSTA**, tendo como orientador o Prof. Titular **ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 23 de setembro de 2009



---

**Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO**  
**Coordenadora**

**ANEXO B** - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos.

|                                                                                                                                                        |                                                                                   |                                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                       |  | <b>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA</b><br><b>CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS</b><br><b>FACULDADE DE ODONTOLOGIA</b> |
| <small>Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas<br/>CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028<br/>Fax (12) 3947-9010 / janete@fosjc.unesp.br</small> |                                                                                   |                                                                                                                  |

---



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

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **008/2011-PH/CEP**, referente ao Projeto intitulado **“Avaliação da interferência da terapia fotodinâmica aplicada in vivo na adesão de Candida albicans às células epiteliais bucais humanas in vitro”**, sob a responsabilidade de **ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE**, 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, 15 de março de 2011.

  
**Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA**  
**Coordenadora**