

JOYCE DA SILVA MARTINS

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE A PATOGENICIDADE
DE *Candida albicans* E *Candida dubliniensis* NA CANDIDOSE
BUCAL EM RATOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2009

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; 2008

M366e Martins, Joyce da Silva.
Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a patogenicidade de *C.albicans*
e *C dubliniensis* na candidose bucal em ratos / Joyce da Silva Martins.
— São José dos Campos : [s.n.], 2009
94f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de
Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista,
2009.

Orientador: Prof. Dra Juliana Campos Junqueira

1.Terapia fotodinâmica. 2. Candidose experimental. 3. Candida
albicans. 4. Candida dubliniensis. 5. Fatores de virulência. I. Junqueira,
Juliana Campos. 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, 9 junho de 2009.

Assinatura:

E-mail: joyceodonto@bol.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista / UNESP

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista / UNESP

Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Tecnologia Nuclear do Departamento de Instituto de Pesquisas

Energéticas e Nucleares

Universidade de São Paulo / USP

São José dos Campos, 09 de Junho de 2009.

DEDICATÓRIA

A **DEUS**, pai e senhor do homem e da ciência, aquele que nos dá a sabedoria necessária para podermos compreender um pouco das maravilhas e dos encantos da sua criação.

Aos meus pais, **Celia Aparecida da Silva Martins** e **Carlos Moreno de Paiva Martins**, pelo carinho e dedicação. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que ambos fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu irmão **Hugo Leonardo** pela alegria e carinho, o que tornou os momentos difíceis menos fatigantes.

Ao meu melhor amigo e esposo **Jefferson**, fonte de um amor tão puro e profundo que nem mesmo o tempo e a distância são capazes de abalar.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora **Juliana Campos Junqueira**, pelos conhecimentos transmitidos, por seu entusiasmo contagiante, por sua grande força de vontade, persistência, paciência e confiança desde o início, que serviram de ânimo e de apoio durante as dificuldades encontradas ao longo deste trabalho.

Ao professor Titular **Antonio Olavo Cardoso Jorge**, por contribuir brilhantemente com minha formação acadêmica, e pela sua amizade e apoio nos diversos momentos deste curso.

Ao Professor Doutor **Carlos Eduardo Dias Colombo**, pela amizade e imensa colaboração durante vários momentos desta pesquisa.

Muito Obrigada!

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. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito e Profa. Rosilene Fernandes da Rocha.

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

Ao Prof. Ivan Balducci, pelo auxílio na elaboração da análise estatística.

Ao Instituto Adolfo Lutz, por conceder a cepa de *Candida dubliniensis* utilizada para desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste projeto (processo 07/58780-0).

Ao Prof. Francisco Gorgonio da Nóbrega e Doutorando Adolfo José da Mota, pela confirmação na identificação da cepa de *C. dubliniensis* por técnicas de biologia molecular.

À Profa. Luciane Dias de Oliveira, por sua amizade e incentivo.

Aos amigos de curso Cristiane Aparecida Pereira, Polyana das Graças Figueiredo Vilela, Mary Anne Moreira Barbara, Marta Majewski, Bruno Mello de Matos, Guilherme Rodrigues Teodoro, Anna Carolina Borges Pereira da Costa e Rosilene de Aguiar Almeida, os quais contribuíram para dias alegres nesta jornada.

Aos Alunos de Iniciação Científica Raquel Lourdes Faria e Naiara Fonseca Santiago, pela amizade e imenso auxílio durante toda a fase experimental.

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

Ao técnico Walter Cruz, pela atenção e cuidado durante o preparo dos cortes histológicos.

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

Às bibliotecárias, em especial Silvana Alvarez, pela disponibilidade em atender sempre que necessário.

As secretária da Seção de Pós Graduação Rosemay de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Lílian Faris das Graças e Maria Aparecida Consíglío de Souza, pela ajuda e informações dispensadas.

A todos os outros colegas de laboratório, pela convivência amiga e fraterna.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einsten

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
RESUMO.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Gênero <i>Candida</i>	18
2.2 <i>Candida albicans</i>	20
2.3 <i>Candida dubliniensis</i>	22
2.4 Candidose experimental.....	25
2.5 Fatores de virulência.....	27
2.6 Tratamentos convencionais e terapia fotodinâmica.....	30
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais experimentais.....	36
4.2 Colonização natural por <i>Candida</i> spp. na cavidade bucal dos ratos.....	37
4.3 Administração de tetraciclina.....	38
4.4 Preparo da suspensão de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	38
4.5 Inoculação de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> na cavidade bucal dos ratos.....	39
4.6 Fotossensibilizador e laser.....	39
4.7 Terapia fotodinâmica.....	40
4.8 Recuperação de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> da cavidade bucal dos ratos.....	40
4.9 Eutanásia dos animais.....	41

4.10	Análise macroscópica de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> no dorso da língua.....	41
4.11	Análise microscópica de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> no dorso da língua.....	42
4.12	Avaliação dos fatores de patogenicidade de <i>C. albicans</i>.....	43
4.12.1	Produção de proteinase por <i>C. albicans</i>	43
4.12.2	Produção de fosfolipase por <i>C. albicans</i>	43
4.12.3	Medida das atividades enzimáticas de <i>C. albicans</i>	45
4.13	Avaliação dos fatores de patogenicidade de <i>C. dubliniensis</i>.....	45
4.13.1	Fotossensibilização <i>in vitro</i> de <i>C. dubliniensis</i>	46
4.13.2	Atividade enzimática de <i>C. dubliniensis</i>	47
4.14	Análise estatística.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Recuperação de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> da cavidade bucal dos ratos.....	48
5.2	Análise macroscópica de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> no dorso da língua.....	51
5.3	Análise microscópica de <i>C. albicans</i> no dorso da língua.....	52
5.4	Análise microscópica de <i>C. dubliniensis</i> no dorso da língua.....	58
5.5	Análise microscópica dos ratos sem inoculação de <i>Candida</i>.....	63
5.6	Fatores de patogenicidade de <i>C. albicans</i>.....	64
5.7	Fatores de patogenicidade de <i>C. dubliniensis</i>.....	69
5.7.1	Fotossensibilização <i>in vitro</i> de <i>C. dubliniensis</i>	69
5.7.2	Atividade enzimática de <i>C. dubliniensis</i>	71

6	DISCUSSÃO.....	74
7	CONCLUSÃO.....	80
8	REFERÊNCIAS.....	81
	ANEXOS.....	92
	ABSTRACT.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AsGa = Arseneto de Gálio

AsGaAl = Arseneto de Gálio e Alumínio

COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

cm² = Centímetro Quadrado

DE = Densidade de Energia

F = Fotossensibilizador

g = Grama

h = Hora

HIV = Vírus da Imunodeficiência Adquirida

HE = Hematoxilina-Eosina

H₂O₂ = Peróxido de Hidrogênio

J = Joule

kg = Kilograma

L = Laser

LED = Diodo Emissor de Luz

LPS = Lipopolissacarídeo

Log = Logarítimo

MB = Azul de Metileno

mg = Miligrama

mL = Mililitro

mm = Milímetro

mW = Miliwatts

NaCl = Cloreto de Sódio

nm = Nanometro

PACT = Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

PAS = Ácido Periódico de Schiff

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

PDT = *Photodynamic Therapy*

Saps = Proteinases Aspartil Secretórias

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

W = Watts

µg = Micrograma

µm = Micrometro

% = Porcentagem

°C = Grau Celsius

Martins JS. Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a patogenicidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis* na candidose bucal em ratos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre a patogenicidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis* na candidose bucal em ratos. Foram utilizados 96 ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*), sendo que 80 animais foram submetidos à indução de candidose experimental no dorso da língua por *C. albicans* ou *C. dubliniensis* e 16 ratos não foram infectados por *Candida*. Após 5 dias da indução da candidose, foram realizados diferentes tratamentos: laser e azul de metileno como fotossensibilizador (Grupo L+F+), apenas laser (Grupo L+F-), apenas fotossensibilizador (Grupo L-F+) e grupo sem laser e fotossensibilizador (Grupo L-F-). Após 1 dia, amostras do dorso da língua foram coletadas e semeadas em ágar Sabouraud para contagem de UFC/mL recuperadas da cavidade bucal. Os animais foram submetidos à eutanásia para análise microscópica do dorso da língua. Foi avaliada também a capacidade de produção de fosfolipase e proteinase por *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Os resultados demonstraram que a quantidade de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal dos ratos foram semelhantes entre os quatro grupos estudados. *C. dubliniensis* não foi recuperada da cavidade bucal dos ratos estudados. Na análise microscópica do dorso da língua, observou-se a presença de várias lesões teciduais induzidas por *C. albicans*, sendo que no grupo L+F+ essas lesões foram menores em relação aos demais grupos estudados. *C. dubliniensis* exibiu lesões teciduais discretas sem diferença estatística entre os grupos. Em relação aos fatores de patogenicidade de *C. albicans*, o grupo L+F+ produziu menor quantidade de fosfolipase e proteinase em relação aos demais grupos. *C. dubliniensis* produziu menor quantidade de fosfolipase em relação à *C. albicans*, sem diferença entre os 4 grupos estudados. Entretanto, *C. dubliniensis* não foi capaz de produzir proteinase. Concluiu-se que o desenvolvimento de candidose experimental por *C. dubliniensis* foi inferior à candidose induzida por *C. albicans*. A terapia fotodinâmica foi eficaz no tratamento da candidose bucal induzida por *C. albicans* e inibiu a produção de fosfolipase e proteinase por essa espécie.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Candidose experimental. *Candida albicans*. *Candida dubliniensis*. Fatores de virulência.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são importantes agentes etiológicos causadores de doenças humanas. Entre os principais patógenos fúngicos estão as espécies de leveduras do gênero *Candida*. Essas espécies podem causar diversas doenças, que variam de infecções mucosas superficiais, como candidose vulvovaginal e candidose orofaríngea, até infecções invasivas potencialmente fatais. Na maioria dos casos, a candidose orofaríngea e infecções sistêmicas ocorrem em indivíduos com sistema imunológico severamente comprometido, sendo muito comum em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), enquanto infecções sistêmicas profundas são freqüentemente associadas com neutropenia, resultante de terapia antineoplásica ou terapia imunossupressiva após transplante de órgãos (Sullivan et al., 2004).

Entre os agentes etiológicos das infecções fúngicas, *C. albicans* é freqüentemente isolada das lesões de candidose (Donnelly et al., 2007). Entretanto, outras espécies também podem ser consideradas importantes patógenos humanos (Cannon et al., 1995; Mccullough et al., 1996). Além disso, têm sido sugerido que a incidência de infecções causadas por espécies não *albicans* está aumentando (Sullivan et al., 2004).

C. dubliniensis é uma nova espécie, e vem sendo associada principalmente com casos de candidose sistêmica em pacientes imunossuprimidos pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), uso de quimioterapia, transplante de medula óssea, doenças hematológicas, diabetes *mellitus*, lupus eritematoso sistêmico e infecções em população pediátrica (Brandt et al., 2000; Ahmad et al., 2004).

O tratamento com antifúngicos polienos (nistatina e anfotericina B) e clotrimazol resultam apenas em melhora transitória da candidose, sendo muito comum a ocorrência de recidivas, principalmente em casos de imunodeficiência. Melhores resultados estão sendo obtidos com antifúngicos sistêmicos como ketoconazol, fluconazol e itroconazol. Entretanto, o uso desses medicamentos provoca efeitos colaterais e pode desenvolver resistência microbiana (Wilson e Mia, 1993 ; Donnelly et al., 2007).

Alguns autores, frente ao aumento da resistência aos antifúngicos convencionais vem buscando alternativas para tratamento das lesões de candidose. Hasenoehrl et al. (2006), realizaram testes *in vivo* e *in vitro* sobre a eficácia de um novo agente antifúngico oral, o Icofungipen (PLD-118). Esse medicamento apresentou resultados promissores para o tratamento das lesões causadas por *Candida albicans*.

Logo, tendo em vista a frequência das infecções fúngicas, e as terapias existentes para tratamento da candidose e suas limitações, cada vez mais tem se tornado necessário o desenvolvimento de terapias alternativas, como a terapia fotodinâmica (PDT) (Wilson; Mia, 1993; Teichert et al., 2002).

Embora os conhecimentos sobre PDT pareçam recentes, os primeiros experimentos utilizando essa terapia datam de aproximadamente cem anos atrás, quando Raab observou que a exposição ao corante acridina associado a luz poderia ocasionar a morte de paramécios. A PDT ou terapia fotodinâmica antimicrobiana, consiste na associação de um agente fotossensibilizador e uma fonte de luz visível, a qual resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singleto e radicais livres. Essas espécies químicas reativas, são em sua maioria tóxicas e podem causar: destruição de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outros componentes celulares, resultando na destruição das células microbianas (Konopka; Golinski, 2007).

Vários estudos tem demonstrado a eficácia da PDT na destruição de vírus e protozoários, assim como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Resultados de pesquisas experimentais demonstraram que leveduras podem ser mortas pela ação fotodinâmica empregando fotossensibilizadores fenotiazínicos, porfirinas e fitalocianinas (Donnely et al., 2008).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da PDT sobre a patogenicidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis* na candidose bucal em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Candida*

Os fungos são seres uni ou multicelulares, que habitam diversos ecossistemas, sendo classificados como Reino Fungi (Whittaker; Margulis, 1978).

O Reino Fungi é responsável por abrigar uma vasta diversidade de espécies; no entanto, poucas dessas espécies produzem doença em seres humanos. Embora alguns fungos sejam patógenos primários, ou seja, capazes de causar infecção mesmo na ausência de fatores predisponentes, há um segundo grupo, conhecido como oportunista, que manifesta seu potencial patogênico em hospedeiros com comprometimento imunológico. Neste último grupo estão incluídas as espécies do gênero *Candida* (Haynes, 2001).

As espécies de *Candida* estão incluídas na classe dos Deuteromicetos, sendo encontradas em ecossistemas distintos, como florestas, rios e solos; entretanto, algumas dessas espécies colonizam também seres humanos e animais (Höfling; Rosa, 1999). Semelhante aos demais fungos, as espécies de *Candida* são organismos eucariotos, não fotossintéticos, possuem organelas citoplasmáticas, parede celular e uma membrana plasmática rica em esteróis (Akpan; Morgan, 2002).

Os fungos também representam importantes agentes etiológicos causadores de doenças humanas. E entre os principais patógenos fúngicos incluem-se leveduras do gênero *Candida*. Este gênero é composto por cerca de 150 espécies de leveduras, das quais algumas apresentam importância médica, incluindo *C. albicans*, *C.*

tropicalis, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (Cannon et al., 1995; Samaranayake; Samaranayake, 2001).

Células do gênero *Candida* podem apresentar-se como leveduras ou hifas. Leveduras são organismos eucarióticos, unicelulares, que medem aproximadamente 2 a 8 μm de largura por 3 a 14 μm de comprimento, e se multiplicam por um processo específico de divisão celular mitótica conhecido como brotamento. Hifas são filamentos lineares contendo múltiplas unidades celulares divididas por septos, podendo se originar de uma hifa já existente ou de uma levedura (Webb et al., 1998). A produção de leveduras a partir de outras com forma linear resulta em uma estrutura denominada pseudohifa, que pode ser definida como cadeia de células alongadas com constrictões nas regiões de septos (Liu, 2001).

Algumas espécies de *Candida* fazem parte da microbiota comensal da boca; entretanto, sob determinadas condições, comportam-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções denominadas candidoses, que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas (Leung et al., 2000; Hanula, 2000).

O gênero *Candida* apresenta vários fatores de patogenicidade, entre eles pode-se citar: capacidade de aderência à mucosa, habilidade em formar tubos germinativos, formação de hifas e secreção de enzimas histolíticas, como a fosfolipase e proteinase (Akpan; Morgan, 2002).

2.2 *Candida albicans*

C. albicans é a espécie mais freqüentemente isolada do organismo humano, tanto como microrganismo comensal como patógeno oportunista (Cannon et al., 1995; Mccullough et al., 1996). Mosca et al. (2005) encontraram 75% de *C. albicans* entre as leveduras isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, seguido por *C. glabrata* (16,6%) e *C. dubliniensis* (8,3%).

Infecções causadas por *C. albicans* também estão associadas a pacientes em tratamento com quimioterápicos, antibióticos de amplo espectro e corticosteróides, deficiência na imunidade celular, transplantes, uso de catéter venoso, respiração bucal, uso de próteses totais e aparelhos ortodônticos, entre outros (Allen et al., 1994; Jorge et al., 1997; Schorling et al., 2000; Dubus et al., 2001).

Esta espécie tem sido considerada importante patógeno, principalmente por viver como comensal e causar infecções em vários grupos populacionais humanos e em diferentes sítios anatômicos, cada qual com suas condições ambientais distintas (Schmid et al., 1999; Calderone; Fonzi, 2001; Oksuz et al., 2007).

Uma propriedade particular de *C. albicans* é a sua habilidade em produzir clamidoconídios, compartilhada apenas com *C. dubliniensis*. Clamidoconídios são células arredondadas, com dupla parede e ricas em RNA, consideradas como formas de resistência, sendo formadas em situações específicas, nas terminações das hifas ou pseudo-hifas. Estas formações podem ser induzidas em meios pobres em nutrientes, como é o caso do agar-fubá, em situações de disponibilidade limitada de oxigênio, em temperaturas inferiores à faixa ótima de crescimento (Nobile et al., 2003).

C. albicans possui a capacidade de fermentar glicose e maltose, e apresenta ação fermentativa variável para sacarose e

galactose. Assimila galactose, maltose, trealose, amido solúvel, D-xilose e D-manitol. A assimilação é variável com L-sorbose, sacarose, melezitose, L-arabinose, D-arabinose, glicerol, ribitol, D-glucitol, DL-ácido láctico, ácido succínico e ácido cítrico (Lacaz et al., 1998).

Como já citado, *C. albicans* apresenta-se como um fungo dimórfico (Farah et al.2000). A transição de células leveduriformes de *C. albicans* para a forma filamentosa necessita de algumas condições, como estágio nutritivo apropriado da levedura, presença de fatores indutores, temperatura elevada (maior que 33°C) e pH próximo ao neutro (Samaranayake; Mcfarlane, 1990).

Quando coloniza superfícies epiteliais, *C. albicans* encontra-se na forma leveduriforme. Ambientes favoráveis como fluido crevicular gengival e bolsas gengivais, promovem desenvolvimento de hifas e tubos germinativos, os quais possuem habilidade em penetrar no tecido hospedeiro levando a inflamações (Järvensivu et al., 2004). Entre os mecanismos de patogenicidade de *C. albicans* está a capacidade de formação de tubo germinativo, constituindo um fenômeno que ocorre em algumas espécies do gênero *Candida* e reflete a capacidade da espécie de filamentar em determinadas condições. Este fator de patogenicidade também é um método laboratorial utilizado para a identificação de *C. albicans*, com 95% de positividade entre os isolados desta espécie (Perry; Miller, 1987; Williams; Lewis; 2000). Este teste envolve a indução de crescimento tubos germinativos em leveduras incubadas em soro por 2-4 h a 37°C. Esta característica também é apresentada por *C. dubliniensis* (Sullivan; Coleman, 1998).

Alguns autores relataram que o aumento da aderência a células epiteliais, pode estar relacionado à formação de tubos germinativos e hifas por *C. albicans*. Existem várias evidências da associação entre formação de hifas e patogenicidade de *C. albicans*, visto que as mesmas sempre estão presentes nas lesões causadas por *C.*

albicans, e são frequentemente observadas na cavidade bucal de pessoas com candidose (Kimura; Pearsall, 1980; Soares et al., 2009).

2.3 *Candida dubliniensis*

C. dubliniensis foi classificada como uma nova espécie em 1995, e vem sendo muito estudada recentemente (Marot-Leblond et al., 2004). Está associada em diversas partes do mundo com casos de candidose sistêmica em pacientes imunossuprimidos pelo HIV, transplante de medula óssea, uso de quimioterapia, doenças terminais hematológicas, diabetes *mellitus*, lúpus eritematoso sistêmico e infecções em populações pediátricas (Brandt et al., 2000; Jabra-Rizk et al., 2000; Tan et al., 2002; Kim et al., 2003; Ahmad et al., 2004). Infecções bucais causadas por *C. dubliniensis* têm sido observadas também em indivíduos saudáveis, embora esteja mais relacionada com indivíduos portadores do HIV com história de candidose bucal recorrente (Coleman et al., 1997; Jabra-Rizk et al., 2000; Sullivan et al., 2004).

Jabra-Rizk et al. (2001) descreveram o isolamento desta espécie também em bolsas periodontais de pacientes HIV-positivos, e indicaram a necessidade de mais estudos para esclarecer o papel de *C. dubliniensis* na patogênese das doenças periodontais. Há relatos também de colonização bucal assintomática (Hannula et al., 1997; Al-Karaawi et al., 2002), assim como de candidoses em HIV-negativos (Coleman et al. 1997).

Hannula et al. (2000) encontraram 26 cepas de *C. dubliniensis* em pacientes sem história de comprometimento imunológico, que procuravam atendimento odontológico de rotina. Esta espécie também foi identificada por Montour et al. (2003), em dois de 39 indivíduos saudáveis de uma comunidade no Canadá.

Willis et al. (2000) relataram o isolamento de *C. dubliniensis* em pacientes diabéticos. No entanto, Tekeli et al. (2004) não encontraram nenhum isolado de *C. dubliniensis* em um estudo realizado em pacientes portadores de diabetes melito insulino-dependente.

Sullivan et al. (1995), baseados em testes fenotípicos caracterizaram *C. dubliniensis*, como:

- a) levedura dimórfica apresentando blastoconídeos ovóides ou esféricos;
- b) crescimento em colônias creme convexas quando semeadas em ágar Sabouraud dextrose e creme esbranquiçadas em ágar batata dextrose;
- c) produção de abundantes clamidoconídeos, geralmente dispostos em trios ou aos pares, localizados terminalmente em uma única ramificação de pseudohifa (apresenta poucas hifas verdadeiras), quando semeados em microcultivo de ágar fubá adicionado de tween 80 e corante lactofenol azul de algodão;
- d) produção de tubo germinativo;
- e) bom crescimento entre 30°C e 37°C, mas não a 42°C;
- f) capacidade de assimilação dos açúcares: galactose, glicose, maltose, sacarose, manitol, sorbitol, 2 cetogluconato e glicosamina, porém incapacidade de utilizar as outras 18 fontes de carbono e nitrogênio testadas através do sistema de identificação API ID 32C;
- g) capacidade de crescimento na presença de ciclohexamida, mas não na de hidrolisado de esculina;
- h) pertencente ao sorotipo A;

- i) habilidade em assimilar palatinose e trealose.

Testes fenotípicos são úteis para identificação presuntiva de *C. dubliniensis*, mas não fornecem identificação definitiva. Pesquisadores em diversas partes do mundo estão investigando atualmente, técnicas laboratoriais que permitam a distinção rápida, fácil e com menor custo, entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método molecular que permite identificar com segurança um isolado de *C. dubliniensis* em curto espaço de tempo (Mähnß et al. 2005).

Marot-Leblond et al. (2004) propuseram um método de diferenciação das cepas de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e outras espécies de leveduras. Esse método consiste em análise imunocromatográfica (imunocromatográfico membrana [ICM], albi-dubli teste; SR2B, Avrille, França) que envolve dois anticorpos monoclonais distintos, capazes de reconhecer epítomos expressos por ambas as espécies ou específicos para uma espécie. O teste acima demonstrou sensibilidade e especificidade de 93 a 100% na identificação das espécies. Os autores concluíram que o método acima apresenta grande efetividade, podendo ser aplicado rotineiramente nos laboratórios de microbiologia.

Somogyvari et al. (2007) diante da similaridade fenotípica entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, propuseram uma rápida discriminação entre as espécies através da utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo-real. Concluindo que análises genotípicas, como o método citado são simples, rápidos e mais eficazes na diferenciação entre as espécies.

Alguns fatores de virulência, como a produção de proteinases e fosfolipase, são claramente observados na espécie *C. albicans*, mas apresentam resultados contraditórios em relação à *C. dubliniensis* (Sullivan et al., 2004). Fotedar e Al-Hedaithy (2005) realizaram comparação da produção de fosfolipase e proteinase entre *C.*

albicans e *C. dubliniensis*, e concluíram que a virulência de *C. albicans* está relacionada com a produção destes fatores, entretanto a ausência da produção ou a menor expressão destas enzimas pela espécie *C. dubliniensis* pode ser indicativo de sua menor virulência.

2.4 Candidose experimental

A candidose bucal tem sido muito estudada em modelos animais experimentais, principalmente em ratos e camundongos (Samaranayake; Samaranayake, 2001). Entretanto, existem poucos trabalhos de candidose experimental induzida por espécies não *albicans*, como por exemplo *C. dubliniensis*.

Jorge et al. (1993) avaliaram o efeito da xerostomia, provocada pela remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores, na presença de *Candida* na cavidade bucal de ratos. Esses animais receberam doses orais de 0,1 mg/mL/dia de tetraciclina durante todo o experimento. Após cinco semanas da inoculação, leveduras foram recuperadas em 50% dos ratos normais e em 100% dos animais sialoadenectomizados. Demonstrando então que a sialoadenectomia predispõe à candidose bucal, confirmando a importância dos constituintes salivares na proteção contra esses fungos.

Totti et al. (1996) analisaram a colonização de diferentes espécies de *Candida* na cavidade bucal de ratos convencionais e sialoadenectomizados durante 30 dias. Os animais foram inoculados com diferentes espécies, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilhermondii* e *C. krusei*. Tanto nos animais convencionais como nos xerostômicos, *C. albicans* foi a espécie que permaneceu na cavidade bucal dos animais por maior período de tempo.

Takakura et al. (2003) observaram o desenvolvimento de um modelo de candidose pseudomembranosa na cavidade bucal de camundongos, por meio da utilização de um sedativo durante a inoculação de *C. albicans*. Os animais foram imunossuprimidos com duas injeções subcutâneas de prednisolona (100 mg/kg) e tratados com tetraciclina na água de beber (0,83 mg/mL). Para inoculação de *C. albicans*, um *swab* embebido em suspensão contendo $2,5 \times 10^7$ células viáveis/mL, foi aplicado no dorso da língua de camundongos previamente sedados. Durante sete dias após a inoculação de *C. albicans*, foram realizadas recuperações de leveduras da cavidade bucal e análises macroscópicas das lesões no dorso da língua. Conforme aumentava o tempo de sedação, o grau de infecção aumentou, indicando que 10mg/kg (3 h) de clorpromazina é a dose ideal para esse modelo de candidose experimental. Além disso, os autores observaram que a contagem de leveduras (ufc/mL) recuperadas da cavidade bucal e a quantidade de lesões de candidose pseudomembranosa formadas na língua se interligavam, sugerindo então que as lesões clínicas indicam o grau de colonização da cavidade bucal por *C. albicans*.

Para avaliar os efeitos dos hormônios ovarianos na candidose bucal, Junqueira et al. (2005) inocularam uma suspensão de *C. albicans* na cavidade bucal de ratas controles e ovariectomizadas. Após 6 h, 24 h e 7 dias da inoculação, as lesões de candidose no dorso da língua foram menos freqüentes no grupo ovariectomizado em relação ao controle. O número de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal foi menor no grupo ovariectomizado do que no controle, nos períodos de 1, 2, 5, 7 e 22 dias após a inoculação. Além disso, *C. albicans* foi recuperada da cavidade bucal das ratas por 67 dias no grupo controle e por apenas 22 dias no grupo ovariectomizado, sugerindo que os hormônios ovarianos atuaram significativamente na candidose bucal.

Faria et al. (2007) também estudaram os efeitos da terapia fotodinâmica na candidose bucal em ratos. A candidose experimental foi induzida por inoculações orais de *C. albicans*. Após 7 dias, a lesão de candidose formada no dorso da língua foi tratada com terapia fotodinâmica em uma única sessão, utilizando-se azul de metileno como fotossensibilizador. Os grupos que receberam terapia fotodinâmica (L+F+) exibiram menor alteração epitelial e menor resposta inflamatória crônica em relação ao grupo tratado apenas com solução fisiológica (L-F). O grupo tratado apenas com laser (L+F-) apresentou lesões epiteliais e resposta inflamatória crônica mais intensas do que os demais grupos. O grupo tratado apenas com fotossensibilizador (L-F+) demonstrou lesões teciduais semelhantes ao grupo (L-F-).

2.5 Fatores de virulência

Durante os eventos de colonização e infecção dos tecidos, alguns fatores de virulência são expressos pelas espécies de *Candida*, como por exemplo, a adesão do fungo aos tecidos do hospedeiro, as alterações morfogênicas e a secreção enzimática (Calderone; Fonzi, 2001). Algumas espécies de *Candida* secretam hidrolases, incluindo proteinases e fosfolipases (Wu et al., 1996; Ghannoum, 2000).

Entre as alterações morfogênicas, a transição do estado de comensalismo para o de patogenicidade é bem controlada nos fungos do gênero *Candida*, sendo atribuída à expressão seletiva de vários fatores de virulência, que agem de forma sinérgica, sob condições predisponentes favoráveis. Assim, o tipo, o estágio e o sítio da infecção, além da natureza da resposta imune, fazem com que a levedura expresse alguns dos seus fatores de virulência (Hube; Naglik, 2001). Dentre os

quais, a atividade enzimática extracelular, proteolítica ou lipolítica, parece desempenhar um papel principal na patogenicidade desses microrganismos (Kaminishi et al., 1995; Willis et al., 2001).

A produção de enzimas, como as proteinases, fosfolipases e lipases, desempenham um papel importante na patogenicidade destes fungos, sendo capazes de hidrolisar fosfolipídios e proteínas que representam importantes constituintes da membrana citoplasmática da célula hospedeira. Esse processo resulta na ruptura da membrana celular pelo microrganismo invasor (Hube; Naglik, 2001; Niewerth; Korting, 2001).

Shimizu et al. (1996) avaliaram a produção simultânea de quatro enzimas: hialuronidase, condroitin sulfatase, proteinases e fosfolipases, por espécies de *Candida* e sua relação com a virulência em ratos. A maioria das cepas de *C. albicans* (73%) foram produtoras dos quatro tipos enzimáticos, as quais apresentaram maior virulência em ratos. Cepas que apresentaram perda da capacidade de produção de proteinases foram menos virulentas do que cepas com perda da capacidade de produção de fosfolipases. Almeida et al. (1991) também relataram que a cepa de *C. albicans* com capacidade de alta letalidade para camundongos também foi produtora de proteinase, hialuronidase, condroitin-sulfatase e fosfatase.

De acordo com Ghannoum et al. (2000), o termo fosfolipase se refere a um grupo heterogêneo de enzimas que compartilham a habilidade de hidrolisar uma ou mais ligações do tipo éster em glicerofosfolipídios. Embora todas as fosfolipases tenham como substrato fosfolipídios, cada enzima tem a habilidade de clivar uma ligação “éster” específica. Através da clivagem de fosfolipídios, as fosfolipases desestabilizam a membrana, resultando na lise celular. Conseqüentemente, as fosfolipases tem sido incluídas dentre os fatores de virulência relacionados ao dano celular no hospedeiro.

Price et al. (1982) descreveram um método prático para detecção de fosfolipases produzida por *C. albicans*, no qual se adiciona gema de ovo ao Ágar Sabouraud Dextrose. Isolados fosfolipase ativos hidrolisam os fosfolipídios, presentes em grande quantidade na gema do ovo, formando uma zona de precipitação ao redor das colônias que crescem sobre o ágar. A capacidade de produzir fosfolipase pode ser explorada como um critério para biotipagem de *C. albicans* (Candido et al., 2000; Knopk; Goseinkit, 2007).

As proteinases produzidas por *C. albicans* podem ser secretadas ou apresentarem-se associadas à membrana da célula. Dentre as proteinases secretadas por cepas de *Candida* patogênicas, as proteinases aspartil secretoras (Saps) exercem um importante papel no processo de infecção. As proteínas Saps são codificadas por uma família de 10 genes denominados de SAP. Estas enzimas degradam proteínas relacionadas às defesas estrutural e imunológica do hospedeiro, facilitando assim a penetração no organismo, opondo-se ao seu sistema de defesa (Hube; Naglik, 2001). Muitas espécies de *Candida* patogênicas apresentam os genes SAP, as quais produzem atividade de proteinase extracelular *in vitro* (Naglik et al., 2003; Hamal et al., 2004).

Pichová et al. (2001) isolaram proteinases de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae*. A indução da secreção de proteinases é feita com meios enriquecidos com proteínas, como a albumina, isentos de fontes de nitrogênio simples (Ruchel et al. 1982). A frequência na produção de proteinases por cepas de *C. albicans* pode variar bastante. Penha et al. (2000) analisando amostras de *Candida* proveniente da cavidade bucal, verificaram que 100% eram proteinases positivas. Oksuz et al. (2007) em um trabalho semelhante, observaram que *C. albicans* foi a espécie com maior produção de proteinase e fosfolipase entre todas as espécies estudadas.

As enzimas proteolíticas têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, sendo que as *Saps* representam o principal foco de

investigação na virulência de *C. albicans*. Essas enzimas foram detectadas também em bactérias como *Pseudomonas*, *Porphyromonas* e *Serratia*, induzindo o aparecimento de reações inflamatórias, com os conseqüentes sintomas clínicos (Kaminishi et al., 1995).

Dentro do gênero *Candida*, essas enzimas são secretadas pela maioria das cepas de espécies consideradas mais patogênicas, como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, estando ausentes em leveduras não-patogênicas como *Saccharomyces cerevisiae*, o que colabora com a hipótese de que essas enzimas estejam envolvidas na virulência (Shimizu et al., 1996).

Ghannoum et al. (2000) ressaltaram que o estudo dos fatores de virulência é relativamente recente e está em rápida evolução, o que auxiliará na evidenciação da importância destas enzimas para a virulência fúngica. Contribuindo assim, com os diversos experimentos que visam encontrar alternativas para tratamento das lesões fúngicas.

2.6 Tratamentos convencionais e terapia fotodinâmica

Vários fatores têm contribuído para o aumento, nas últimas décadas, da incidência de infecções fúngicas oportunistas, e o mais relevante pode ser o crescimento das populações de indivíduos gravemente enfermos e/ou de imunossuprimidos, que sobrevivem com os avanços da medicina, recém-nascidos de baixo peso, infecção pelo HIV, neutropenias induzidas por quimioterapia, transplantes de órgãos, queimaduras severas, procedimentos médicos invasivos, como cirurgias extensas ou catéteres vasculares, ou mesmo medicamentos como antibióticos ou corticosteróides (Donnelly et al., 2007; De Backer et al., 2000; Groll et al., 1998).

Uma outra razão para a relevância das infecções provocadas por estes microrganismos é que, embora existam muitos compostos antifúngicos disponíveis no mercado, esses fármacos têm limitações em sua utilização, por apresentarem toxicidade ao hospedeiro, e também pelo aumento gradativo da resistência aos diversos medicamentos, por diferentes espécies e subespécies de *Candida* (Powderly et al., 1993).

O tratamento da candidose com antifúngicos convencionais como os polienos (nistatina e anfotericina B) e clotrimazol resultam apenas em melhora transitória da candidose, sendo muito comum a ocorrência de recidivas, principalmente em casos de imunodeficiência. Melhores resultados estão sendo obtidos com antifúngicos sistêmicos como ketoconazol, fluconazol e itroconazol. Entretanto, o uso desses medicamentos provoca efeitos colaterais e muitos autores vem alertando para o desenvolvendo de resistência microbiana (Soares et al., 2009; Gauwerky et al., 2009; Donnelly et al., 2008; Donnelly et al., 2007; Wilson; Mia, 1993).

Frente ao aumento da resistência aos antifúngicos convencionais e à grande quantidade de efeitos colaterais existentes, alguns autores vêm buscando alternativas para o tratamento das lesões de candidose. Hasenoehrl et al. (2006) realizaram testes *in vivo* e *in vitro* sobre a eficácia um novo agente antifúngico oral, o Icofungipen (PLD-118). Esse medicamento apresentou resultados promissores para o tratamento das lesões causadas por *C. albicans*.

Entre as terapias alternativas, a terapia fotodinâmica (PDT) tem representado tratamento inovador dentro das diversas áreas da saúde. A grande propriedade de atuar sobre microrganismos, levando a pequenos danos ao tecido adjacente, não apresentando efeitos genotóxicos e mutagênicos, e impedido assim a resistência microbiana, torna esta tecnologia importante alternativa a ser utilizada (Konopka ; Goslinski et al., 2007).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a terapia fotodinâmica é um excelente método de redução microbiana, encontrando-se na literatura estudos em que a redução bacteriana atingiu 99% (Teichert et al., 2002; Munin et al., 2007).

A PDT consiste na associação entre um agente fotossensibilizador, normalmente exógeno ao organismo, e uma fonte de luz em baixa intensidade (Garcez et al., 2003; Donnelly et al., 2008). A PDT baseia-se na penetração de um fotossensibilizador seguido pela ativação de luz de baixa intensidade, resultando na liberação de espécies reativas de oxigênio, os quais apresentam toxicidade para diversos microrganismos (Maisch et al., 2006; Jori et al., 2006; Konopka; Goslinski, 2007).

Teichert et al. (2002) avaliaram a eficácia da PDT mediada por azul de metileno no tratamento da candidose bucal em camundongos imunossuprimidos. Durante um mês, os animais foram inoculados três vezes por semana com *swab* contendo *C. albicans*, obtido diretamente das colônias no ágar Sabouraud dextrose. Além disso, uma suspensão de *C. albicans* foi adicionada à água de beber. No dia do tratamento, os camundongos receberam aplicação tópica bucal de azul de metileno nas seguintes concentrações: 250, 275, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/mL, e irradiação com laser diodo no comprimento de onda de 664 nm. Coletas de amostras bucais para pesquisa de leveduras foram realizadas antes e após o tratamento. Os efeitos dessa terapia foram dependentes da dose do azul de metileno, sendo que concentrações entre 250 a 400 µg/mL apenas reduziram o crescimento fúngico, enquanto que concentrações de 450 e 500 µg/mL erradicaram totalmente as leveduras da cavidade bucal. Esses dados sugerem que a PDT pode ser utilizada no tratamento da candidose em pacientes imunodeficientes.

Souza et al. (2006) estudaram *in vitro* os efeitos da radiação laser com comprimento de onda de 685 nm e DE de 28 J/cm² na presença do azul de metileno a 0,1 mg/mL, sobre várias espécies de

Candida, e observaram redução do número de UFC/ml de 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dubliniensis*, 91,6% para *C. krusei* e 82,3% para *C. tropicalis*, concluindo que a fotossensibilização apresentou efeito fungicida sobre todas as espécies do gênero *Candida* estudadas.

Almeida et al. (2007), analisaram *in vivo* a influência da PDT no desenvolvimento de periodontite em ratos. Os autores introduziram ligaduras no 1º molar dos animais, sendo estes distribuídos em quatro grupos: sem nenhum tratamento (Grupo 1); tratamento tópico com azul de metileno (MB) a 100 µg/mL (Grupo 2); tratamento com laser de baixa potência de Arseneto de gálio alumínio (Grupo 3); tratamento com laser associado ao corante azul de metileno (Grupo 4). Os animais foram sacrificados 5, 15 e 30 dias após o tratamento. Análise histológica e radiográfica foram realizadas. Os autores verificaram que nos períodos de sacrifício de 5 e 15 dias, menores perdas ósseas foram observadas no grupo tratado com laser e fotossensibilizador em relação ao grupo controle. Histologicamente, até o décimo quinto dia de sacrifício os resultados demonstraram diferenças significantes entre os grupos, sendo maior a inflamação no grupo tratado apenas com laser. Os autores concluíram que o uso isolado do laser promoveu aumento da inflamação. Entretanto, a associação corante e laser reduziu a doença periodontal.

Munin et al. (2007) realizaram trabalho *in vitro* para verificar os efeitos da PDT sobre a formação de tubo germinativo por *C. albicans*. Foi utilizado azul de metileno como fotossensibilizador e laser de Arseneto de Gálio Alumínio com comprimento de onda de 683 nm. A PDT inibiu totalmente o crescimento e a formação de tubo germinativo por *C. albicans*, concluindo que essa terapia apresenta eficácia também sobre os fatores de patogenicidade desta espécie.

Soares et al. (2009) avaliaram *in vitro* a capacidade de aderência de *C. albicans* às células epiteliais. Esses autores analisaram diversas cepas clínicas de *Candida*, incluindo cepas resistentes ao fluconazol. Foi utilizado o fotossensibilizador azul de toluidina e diodo

emissor de luz (LED) com DE de 180 J/cm². O uso isolado do laser ou do fotossensibilizador não demonstraram efeitos fungicidas sobre *Candida*. Entretanto, a PDT foi eficaz na inibição do crescimento microbiano e na adesão das cepas estudadas às células epiteliais. Os autores sugerem que a PDT pode ser um tratamento promissor, podendo ser utilizada como terapia antifúngica alternativa, inclusive nos casos em que houver o desenvolvimento de resistência ao fluconazol.

Konopka, Goslinski (2008) e Donnelly et al. (2008) em revisão de literatura descreveram que os primeiros estudos de PDT datam de aproximadamente 100 anos atrás. Entretanto, apenas recentemente tem se desenvolvido estudos detalhados na busca de tratamentos alternativos para patógenos resistentes aos antibióticos. A PDT vem mostrando-se altamente eficaz na destruição *in vitro* de vírus e protozoários, bem como bactérias e fungos. Os autores relataram também que apesar do sucesso das crescentes investigações sobre o assunto, apenas um número muito pequeno de trabalhos *in vivo* tem sido publicado. Logo, fica evidente a necessidade de mais trabalhos *in vivo* que possam contribuir para o futuro tratamento das infecções fúngicas.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) comparar o desenvolvimento de candidose experimental induzida por *C. albicans* e *C. dubliniensis* na língua de ratos;
- b) avaliar os efeitos da PDT no desenvolvimento de candidose no dorso da língua de ratos após inoculações de *C. albicans* e *C. dubliniensis*;
- c) verificar a ação da PDT sobre os fatores de patogenicidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP o protocolo nº 035/2007-PA/CEP (Anexo A).

Foram utilizados 96 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar) com massa corpórea inicial de aproximadamente 250 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ UNESP, sendo 40 ratos para o estudo da candidose experimental induzida por *C. albicans*, 40 para a indução de candidose experimental por *C. dubliniensis* e 16 animais para o estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica no dorso da língua sem infecção por *Candida*. A distribuição dos grupos experimentais foi realizada conforme descrito na Figura 1.

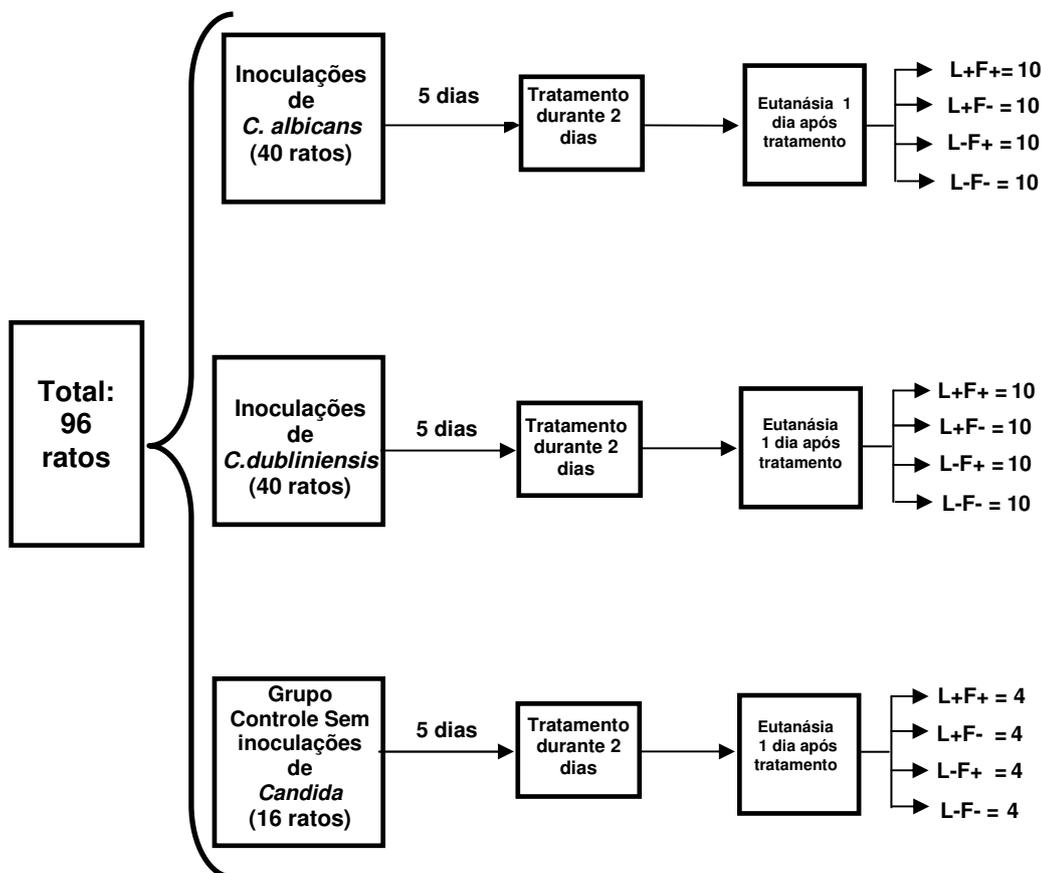


Figura 1- Fluxograma ilustrando a distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais

4.2 Colonização natural por *Candida* spp. na cavidade bucal dos ratos

No início desse experimento, foi determinada a colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de todos os animais. Para isso foi coletado material de toda a cavidade bucal, principalmente do dorso da língua, utilizando-se *swab* esterilizado, sendo imediatamente semeado em placas com ágar Sabouraud dextrose

(Difco) adicionado de cloranfenicol (0,1 mg/mL, Carlo Erba) em duplicata. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e, quando não houve crescimento, permaneceram por mais cinco dias à temperatura ambiente. Neste trabalho, foram utilizados ratos negativos para *Candida* spp. na cavidade bucal.

4.3 Administração de tetraciclina

Os ratos receberam solução de cloridrato de tetraciclina (Terramicina, Pfizer) na beber na concentração de 0,1% durante todo o experimento, baseado na metodologia proposta por Allen et al. (1982).

4.4 Preparo da suspensão de *C. albicans* e *C. dubliniensis*

As suspensões de *Candida* inoculadas na cavidade bucal dos ratos foram preparadas utilizando-se as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 18804), provenientes do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP e *C. dubliniensis* (ATCC 7978), proveniente do Instituto de Pesquisa Adolfo Lutz de São Paulo.

Para obtenção da suspensão com número conhecido de microrganismos, cada cepa foi semeada em ágar Sabouraud dextrose e incubada a 37 °C por 48 h. O crescimento foi suspenso em 5 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%) e centrifugado a 2000 Xg durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido novamente e o sedimento ressuspenso em 5 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%).

As suspensões de *Candida* foram padronizadas em 10^8 células viáveis/mL em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo), com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,680.

4.5 Inoculação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* na cavidade bucal dos ratos

Para a inoculação da suspensão de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, os animais foram anestesiados, via intramuscular, com 13 mg/Kg de cloridrato de xilasina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí, SP) e 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen, Vetbrands, Jacareí, SP).

Os ratos receberam inóculo contendo 10^8 células viáveis de *Candida* em três dias consecutivos. As inoculações foram realizadas colocando-se 0,2 mL da suspensão do microrganismo na boca dos animais, com auxílio de seringa. Imediatamente após a inoculação, o material foi espalhado uniformemente pela mucosa do dorso da língua, com auxílio de um *swab* previamente esterilizado e embebido na suspensão.

4.6 Fotossensibilizador e laser

Como fotossensibilizador, foi utilizado solução de azul de metileno na concentração de 0,1 mg/ml, em solução fisiológica de NaCl (0,85%). A seguir, a solução foi filtrada em membrana de éster celulose de 0,22 μ m (Millipore) esterilizada.

Foi utilizado laser de Arseneto de Gálio Alumínio (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm

(vermelho visível), potência de 100 mW, Energia de 7 J, Densidade de Energia de 245 J/cm² e Tempo de 69 s. A aplicação do laser foi realizada por contato.

4.7 Terapia fotodinâmica

Após 5 dias da última inoculação, os ratos foram novamente anestesiados, conforme descrito no item 4.5, para realização da PDT. Essa terapia foi realizada em 2 dias consecutivos. Os animais receberam aplicação tópica de solução de azul de metileno no dorso da língua com *swab* esterilizado. Decorrido 1 min (tempo pré-irradiação, foram feitas 2 aplicações de laser, uma na porção anterior da língua e outra na região de papilas gigantes (Grupo L+F+). O efeito isolado do fotossensibilizador foi testado pela aplicação do azul de metileno pelo mesmo período do grupo anterior, porém na ausência de luz (Grupo L-F+). Para verificação do efeito isolado do laser, a aplicação de azul de metileno foi substituída por solução fisiológica (Grupo L+F-). Além disso, alguns animais receberam apenas solução fisiológica na ausência de luz (Grupo L-F-).

4.8 Recuperação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* da cavidade bucal dos ratos

Após 1 dia da última aplicação de PDT, foram coletadas amostras do dorso da língua dos animais com *swab*, sendo o mesmo imediatamente colocado em tubo de ensaio (15 x 120 mm), contendo 0,99 mL de solução fisiológica, e agitado durante 30 s, considerando-se a

diluição como sendo 10^{-2} . Foram realizadas diluições até 10^{-6} . A seguir, 0,1 mL de cada diluição foi semeado em duplicata na superfície de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e as placas incubadas a 37 °C por 48 h. Colônias típicas de *Candida* foram contadas em placas que exibiram entre trinta a trezentas colônias para determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Placas com número de colônias inferior a trinta na diluição 10^{-2} foram consideradas como 10^{-1} células de *Candida*.

4.9 Eutanásia dos animais

Os ratos foram submetidos à eutanásia 1 dia após a PDT. Esse procedimento foi realizado por dose excessiva de anestésico e as línguas foram removidas para a realização das análises macroscópica e microscópica.

4.10 Análise macroscópica de *C. albicans* e *C. dubliniensis* no dorso da língua

Observações macroscópicas do dorso da língua foram feitas com auxílio de lupa estereoscópica (Zeiss), com aumentos de 6,5; 8; 10 e 12,5 vezes, procurando-se a presença de lesões clínicas características de candidose.

4.11 Análise microscópica de *C. albicans* e *C. dubliniensis* no dorso da língua

Para análise em microscopia de luz, as línguas foram fixadas em formol a 10% por 24 h e seccionadas em duas partes no sentido sagital. 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 em toda a superfície do dorso da língua e a descrição dos cortes histológicos foi realizada de acordo com presença de leveduras e hifas, localização e extensão das lesões, e alterações dos tecidos envolvidos.

Foi realizada uma avaliação da intensidade das lesões teciduais por meio da atribuição de escores às alterações epiteliais e à resposta inflamatória no tecido conjuntivo (Faria et al. 2007).

Foram atribuídos códigos de 0 a 7 para quantificar as alterações teciduais no dorso da língua de cada rato: hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, exocitose, espongirose, perda das papilas filiformes, hiperqueratose e formação de microabscessos intra-epiteliais.

Em relação ao infiltrado inflamatório crônico do tecido conjuntivo, foram atribuídos os seguintes escores: 0 (ausência de células inflamatórias), 1 (infiltrado inflamatório discreto), 2 (infiltrado inflamatório moderado) e 3 (infiltrado inflamatório acentuado).

4.12 Avaliação dos fatores de patogenicidade de *C. albicans*

A partir do crescimento nas placas de ágar Sabouraud de cada animal, conforme descrito no item 4.8, foram isoladas culturas puras de duas colônias de *Candida* para avaliação dos fatores de patogenicidade desse microrganismo.

Para o isolamento de *Candida*, foram realizados esfregaços corados pelo Gram das colônias esféricas, branco-foscas e com aparência de porcelana. Quando na microscopia, foram observadas células ovaladas, Gram-positivas, com ou sem brotamento, apresentando aspecto de *Candida*, as colônias foram transferidas para ágar Sabouraud dextrose inclinado para obtenção de culturas puras.

Os isolados obtidos foram submetidos aos testes de produção de proteinase e fosfolipase.

4.12.1 Produção de proteinase por *C. albicans*

Foi utilizada a técnica descrita por Ruchell et al. (1982), utilizando o meio ágar proteinase (Anexo B).

O meio B foi esterilizado por filtração (membrana Millipore de 0,22 µm) e o meio A foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min. Depois de resfriado a 50 °C, o meio B foi adicionado ao A, e após homogeneização, distribuído em placas de Petri esterilizadas. Foi seguida a proporção de 500 mL do meio A para a mesma quantidade de Meio B.

As amostras de *Candida* obtidas a partir de culturas de 24 h (37 °C) foram semeadas na superfície do meio ágar proteinase. As amostras foram repicadas com agulha de platina em pontos eqüidistantes no meio. O teste foi realizado em duplicata. As placas contendo 4

inóculos de diferentes cultivos, permaneceram incubadas a 37 °C durante 4 dias. Após esse período foi adicionado solução corante sobre a superfície do meio, a qual foi esgotada imediatamente e foi então adicionada solução reveladora de ácido acético.

A atividade enzimática foi evidenciada pela formação de halo hialino ao redor da colônia, resultante da hidrólise do substrato, que não é corado em azul pela solução.

4.12.2 Produção de fosfolipase por *C. albicans*

A técnica utilizada para essa pesquisa foi descrita por Price et al. (1982). O meio base foi o Ágar Sabouraud Dextrose (Difco), acrescido de: Cloreto de sódio (57,3 g), Cloreto de cálcio (0,55 g) e Água destilada (1000 mL).

Após aquecimento para dissolução dos ingredientes, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min, foi resfriado a 56°C, e adicionado 80 g de gema de ovo estéril, homogeneizada. Para obtenção da gema homogeneizada, os ovos foram lavados e escovados com detergente, enxaguados por 3 vezes em água destilada esterilizada e deixados por 3 h imersos em álcool etílico a 77 °GL. A seguir, as gemas foram separadas assepticamente e homogeneizadas em frasco Erlenmeyer de 50 mL.

O meio foi então, distribuído em placas de Petri esterilizadas. Em cada placa, foram semeadas 4 amostras de cada cepa em pontos equidistantes utilizando agulha de platina.

Após 48 h de incubação a 37 °C, a presença da enzima foi observada pela formação de um halo de cor amarelada ao redor da colônia.

4.12.3 Medidas das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas (fosfolipase e proteinase) foram medidas de acordo com a técnica de Price et al. (1982), obtendo-se o valor de Pz, através da divisão do diâmetro da colônia em mm, pelo diâmetro da colônia mais o halo formado pela atividade enzimática. De acordo com este sistema, Pz = 1,00 significa que a amostra não produziu halo, isto é, não apresenta atividade enzimática. Quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática da amostra. Os resultados foram classificados em códigos, de acordo com o proposto por Price et al. (1982), expressos no Quadro 1.

Quadro 1 - Atividade enzimática conforme o Pz e o código, segundo Price et al. (1982)

Pz	Atividade enzimática	Código
= 1,00	negativa	1
$\geq 0,64 < 1,00$	positiva	2
< 0,64	Fortemente positiva	3

4.13 Avaliação dos fatores de patogenicidade de *C. dubliniensis*

Como não houve crescimento de colônias de *C. dubliniensis* nas placas de ágar Sabouraud semeadas com amostras da cavidade bucal dos animais (item 4.8), foi realizada uma fotossensibilização *in vitro* de *C. dubliniensis* para avaliação dos fatores de patogenicidade.

4.13.1 Fotossensibilização *in vitro* de *C. dubliniensis*

Uma cepa padrão de *C. dubliniensis* (ATCC 7978) foi submetida a 4 condições experimentais *in vitro*: tratamento com laser e fotossensibilizador (L+F+); tratamento apenas com laser (L+F-); tratamento apenas com fotossensibilizador (L-F+); tratamento apenas com solução fisiológica, ou seja, sem laser e fotossensibilizador (L-F-). Em cada grupo foram realizados 8 ensaios experimentais.

A suspensão de *C. dubliniensis* foi preparada de acordo com a metodologia descrita no item 4.4. Essa suspensão foi padronizada em 10^6 células/mL em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo), com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,280.

Para a fotossensibilização *in vitro*, foi utilizado solução de azul de metileno a 1 mg/mL e laser de Arseneto de Gálio Alumínio (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), potência de 100 mW, Área irradiada de 0,38 cm², Energia de 9,8 J, Densidade de Energia de 25,78 J/cm² e tempo de exposição de 98 s.

Em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizadas e com tampa, foi adicionado 0,1 mL de suspensão de *Candida* e 0,1 mL do fotossensibilizador ou de solução fisiológica. A seguir, a placa contendo as amostras foi agitada durante 5 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Após esse período, o conteúdo de cada poço foi irradiado de acordo com os grupos previamente descritos.

Após a irradiação, a partir de cada amostra, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA). Após incubação a 37° C por 48 horas, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

4.13.2 Atividade enzimática de *C. dubliniensis*

A partir do crescimento em ágar Sabouraud, foram isoladas duas colônias de *Candida* de cada placa para avaliação dos fatores de patogenicidade desse microrganismo. Os isolados foram submetidos aos testes de produção de proteinase e fosfolipase, conforme descrito nos itens 4.12.1, 4.12.2 e 4.12.3.

4.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no Programa Minitab, considerado-se nível de significância de 5%. Para análise dos dados de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e fatores de patogenicidade foi utilizado Análise de Variância e teste de Tukey. Para avaliação dos dados obtidos na análise histológica foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Bonferroni.

5 RESULTADOS

5.1 Recuperação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* da cavidade bucal dos ratos

Os resultados obtidos na contagem de unidades formadoras de colônia de *C. albicans* (UFC/mL) recuperadas da cavidade bucal dos ratos antes e após o tratamento experimental dos grupos L+F+, L+F-, L-F+ e L-F- estão apresentados na Tabela 1 e Figuras 2 - 3.

Tabela 1 - Valores de UFC/mL (Log) obtidos antes (A) e depois (D) do tratamento experimental realizado nos diferentes grupos estudados

Rato	L+F+		L+F-		L-F+		L-F-	
	A	D	A	D	A	D	A	D
1	4,11	3,69	4,32	3,77	4,89	4,47	3,30	3,00
2	4,90	4,62	5,01	4,63	4,27	3,00	4,98	4,43
3	5,22	4,93	4,51	3,92	4,39	3,69	3,69	3,60
4	5,22	4,93	4,51	3,92	5,41	4,92	4,88	4,13
5	4,47	3,77	4,75	3,84	5,47	5,19	3,47	3,00
6	4,46	4,39	3,00	0,00	5,22	5,22	5,55	4,56
7	5,26	4,65	3,95	3,30	4,81	4,75	3,47	3,00
8	5,74	5,57	3,60	3,30	5,24	4,77	4,25	3,47
9	5,22	4,93	4,57	3,47	5,19	4,14	4,92	4,36
10	5,43	5,00	4,41	3,69	5,26	4,71	5,07	4,43
Média	5,00	4,64	4,26	3,38	5,01	4,48	4,35	3,79

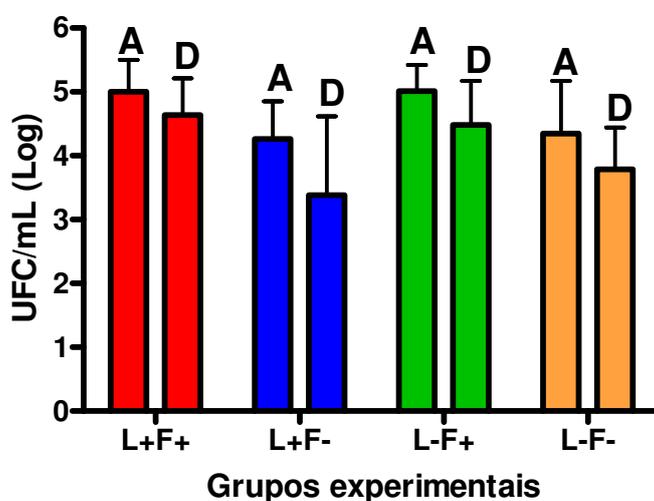


Figura 2 - Médias e Desvios-padrão de UFC/mL de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal dos ratos Antes (A) e Depois (D) do tratamento experimental

Observa-se na Tabela 1 e Figura 2, que nos quatro grupos estudados houve redução de UFC/mL (Log) depois do tratamento experimental. Sendo assim, foi aplicado teste estatístico ANOVA sobre os valores da diferença de UFC/mL (Log) entre os dados obtidos antes (A) e depois (D) do tratamento experimental (Tabela 2). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos L+F+, L+F-, L-F+ e L-F- ($p = 0,106$).

Tabela 2 - Valores da diferença de UFC/mL (Log) entre os dados obtidos antes (A) e depois (D) do tratamento experimental nos diferentes grupos

Rato	L+F+	L+F-	L-F+	L-F-
1	0,42	0,55	0,42	0,30
2	0,28	0,38	1,27	0,55
3	0,29	0,59	0,70	0,09
4	0,29	0,59	0,49	0,75
5	0,70	0,91	0,28	0,47
6	0,07	3,00	0,00	0,99
7	0,61	0,65	0,06	0,47
8	0,17	0,30	0,47	0,78
9	0,29	1,10	1,05	0,56
10	0,43	0,72	0,55	0,64
Média ± DP	0,35 ± 0,19	0,87 ± 0,78	0,52 ± 0,39	0,56 ± 0,25

O crescimento de colônias de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal dos ratos está ilustrado na Figura 3.



Figura 3 - Colônias de *C. albicans* em ágar Sabouraud recuperadas da cavidade bucal dos ratos

Em todos os grupos experimentais estudados, não houve crescimento de *C. dubliniensis* nas placas de ágar Sabouraud semeadas com amostras do dorso da língua dos ratos, demonstrando que após 7 dias da indução da candidose experimental não foi possível recuperar *C. dubliniensis* da cavidade bucal dos animais.

5.2 Análise macroscópica de *C. albicans* e *C. dubliniensis* no dorso da língua

Através das observações macroscópicas do dorso da língua com o auxílio de esteriomicroscópio, foi encontrada a presença de lesões de candidose em alguns dos animais estudados que receberam inoculações bucais de *C. albicans*, conforme demonstrado na Tabela 3. Essas lesões foram caracterizadas por áreas de atrofia papilar localizadas principalmente na região de papilas gigantes.

Tabela 3 - Número de lesões macroscópicas observadas no dorso da língua dos animais

Grupos	n	Lesões	Porcentagem
L+F+	10	4	40
L+F-	10	10	100
L-F+	10	9	90
L-F-	10	9	90

Para os animais que receberam inoculações de *C. dubliniensis*, não foram observadas lesões clínicas características de candidose no dorso da língua em todos os grupos experimentais estudados.

5.3 Análise microscópica de *C. albicans* no dorso da língua

Os ratos foram submetidos à eutanásia 1 dia após o tratamento experimental dos grupos L+F+ (terapia fotodinâmica), L+F- (laser), L-F+ (fotossensibilizador) e L-F- (controle), o que correspondeu a 7 dias após a indução da candidose experimental. Neste período de eutanásia todos os animais não apresentavam mais colonização por hifas de *Candida* no dorso da língua. Entretanto, foram observadas lesões teciduais de candidose, caracterizadas por alterações no tecido epitelial e infiltrado inflamatório na lâmina própria.

As lesões teciduais observadas foram representadas por várias alterações no tecido epitelial, incluindo hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, exocitose, espongirose, aumento do número de mitoses na camada basal, perda das papilas filiformes, microabscessos e hiperqueratose. Nessas áreas de lesões teciduais, a lâmina própria exibia infiltrado inflamatório mononuclear e vasos

Tabela 4 – Valores de p para os grupos experimentais estudados em relação ao estudo das alterações epiteliais (Teste de Bonferroni)

	L+F+	L+F-	L-F+	L-F-
L+F+	-	-	-	-
L+F-	0,0072*	-	-	-
L-F+	0,0114*	0,8753	-	-
L-F-	0,0017*	0,6519	0,5432	-

*Diferença estatisticamente significativa

Também foram atribuídos escores para a intensidade do infiltrado inflamatório observado na região de lesão de candidose. As medianas dos escores obtidas nos vários grupos estudados foram semelhantes entre si (Tabela 5).

Tabela 5 - Escores atribuídos ao infiltrado inflamatório da lâmina própria na lesão de candidose

Rato	L+F+	L+F-	L-F+	L-F-
1	1	1	0	1
2	1	1	1	1
3	1	1	2	0
4	1	0	1	1
5	0	1	1	1
6	0	1	0	1
7	1	1	1	1
8	1	1	1	0
9	0	1	1	1
10	1	1	1	0
Mediana	1,00	1,00	1,00	1,00

Teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,6200$)

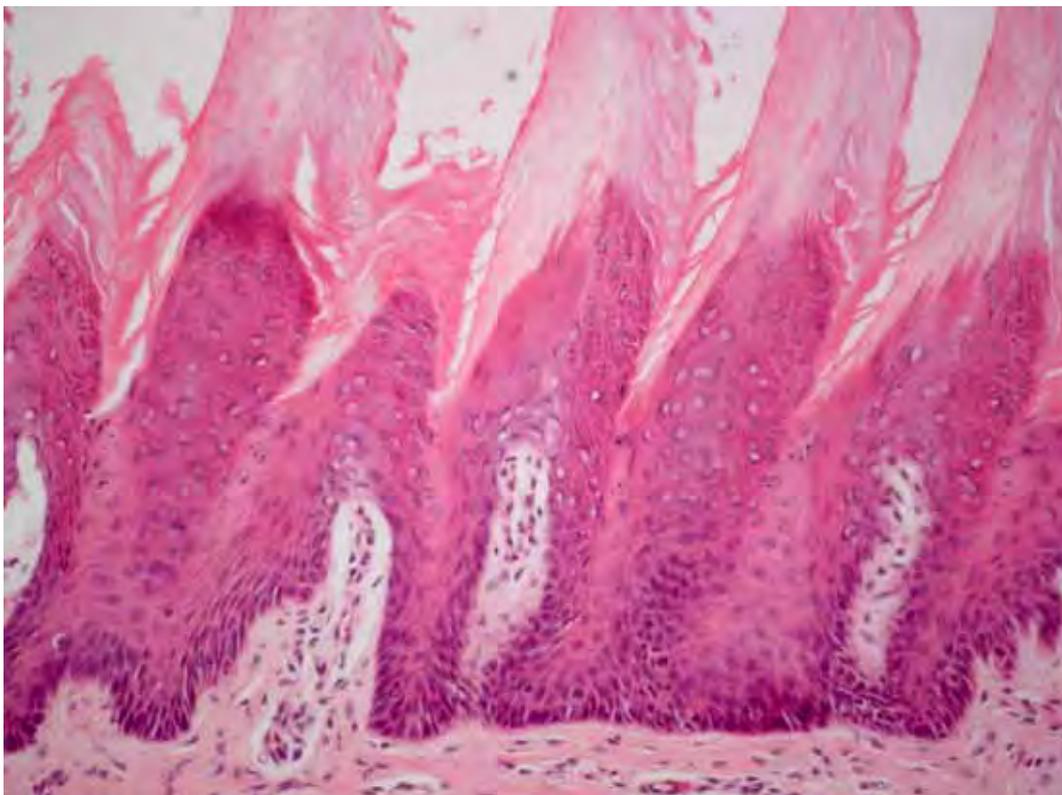


Figura 5 - Corte sagital do dorso da língua de rato do grupo L+F+: demonstrando a presença de infiltrado inflamatório discreto na lâmina própria. HE; aumento 200X.

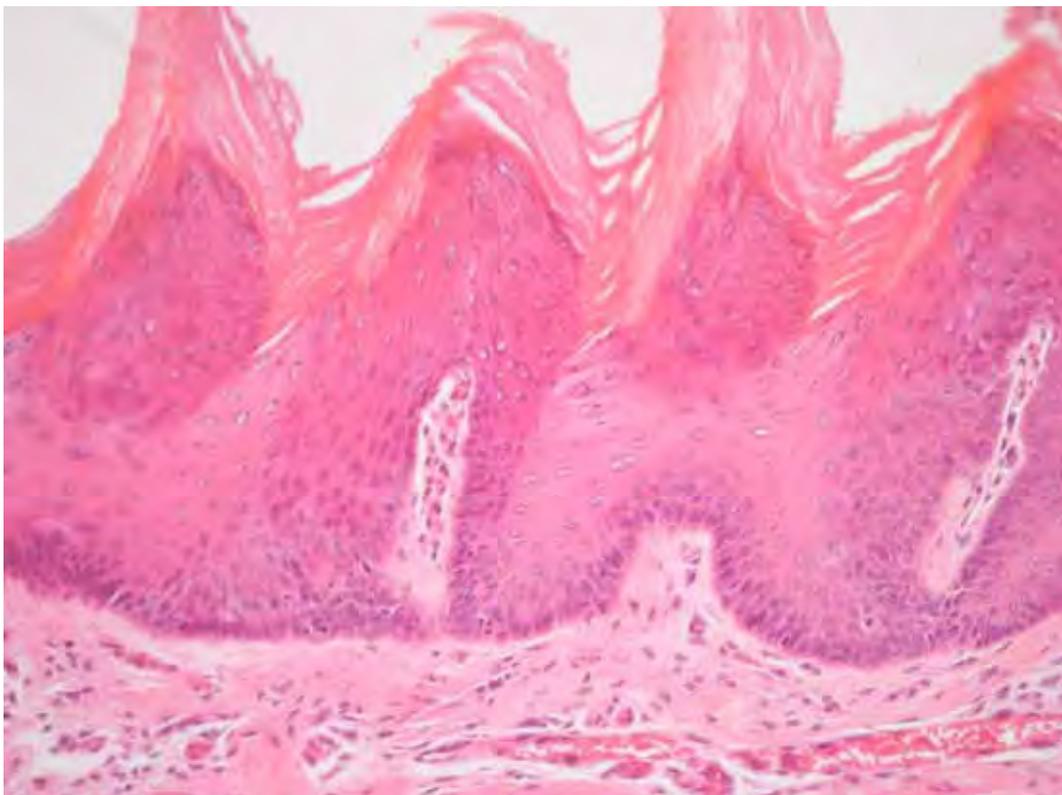


Figura 6 - Corte sagital do dorso da língua de rato do grupo L+F-: lesão tecidual representada por hiperplasia epitelial com focos de duplicação da camada basal e exocitose. Na lâmina própria, pode ser observado vasos sanguíneos dilatados e congestionados, além do infiltrado inflamatório discreto. HE; aumento 200X.

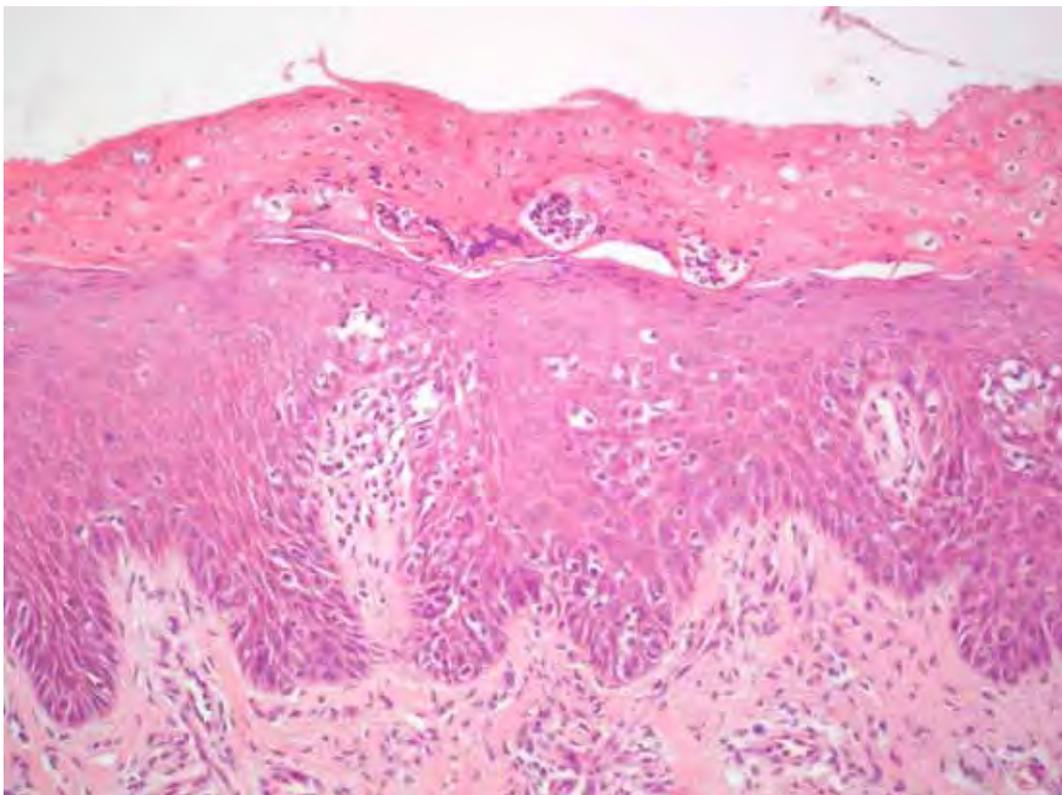


Figura 7 - Corte sagital do dorso da língua de rato do grupo L-F+: observa-se a presença de microabscesso epitelial, hiperplasia epitelial com focos de duplicação da camada basal e exocitose. Na lâmina própria infiltrado inflamatório moderado. HE; aumento 200X.

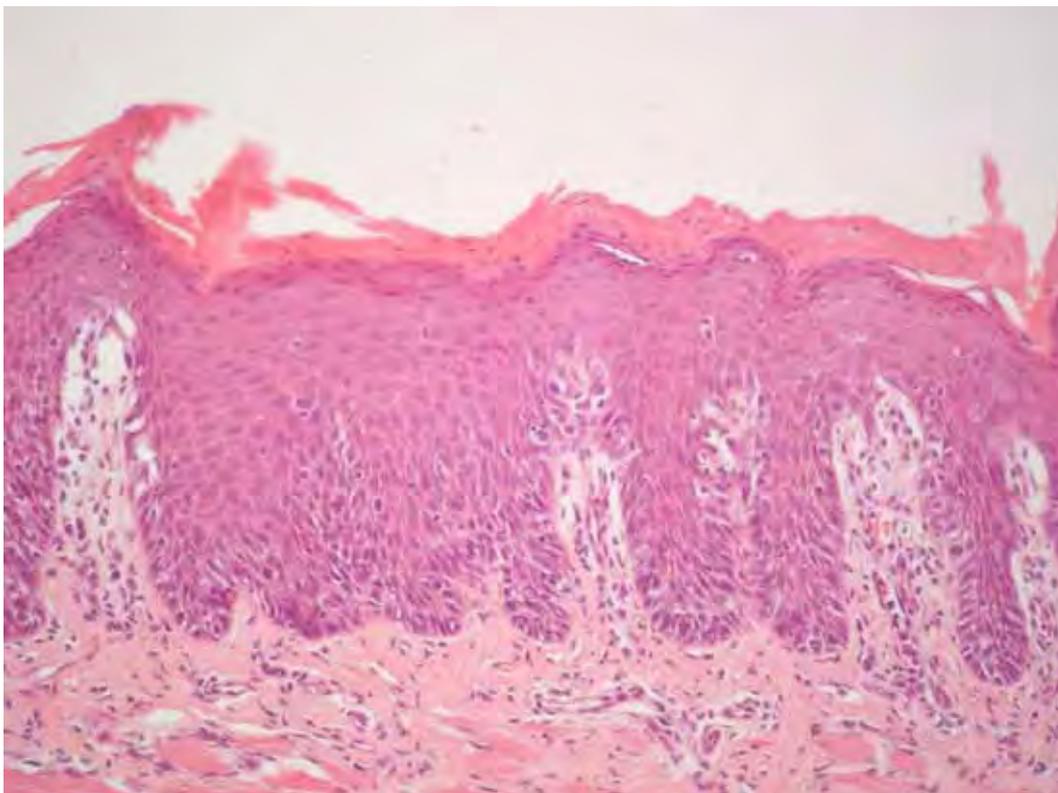


Figura 8 - Corte sagital do dorso da língua de rato do grupo L-F-: lesão tecidual caracterizada por perda das papilas filiformes, hiperplasia epitelial com focos de duplicação da camada basal, hiperparaqueratose e hiperplasia do epitélio. HE; aumento 200X.

5.4 Análise microscópica de *C. dubliniensis* no dorso da língua

Devido ao período de eutanásia de 8 dias após a indução da candidose experimental, todos os animais não apresentavam mais colonização por hifas de *Candida* no dorso da língua.

Foram encontradas apenas discretas lesões teciduais, incluindo alterações epiteliais, como exocitose e desorganização da camada basal. Na lâmina própria observou-se discreto infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos congestionados (Figuras 10 - 13). Essas alterações teciduais foram localizadas e restritas à região de transição entre as papilas cônicas simples e gigantes.

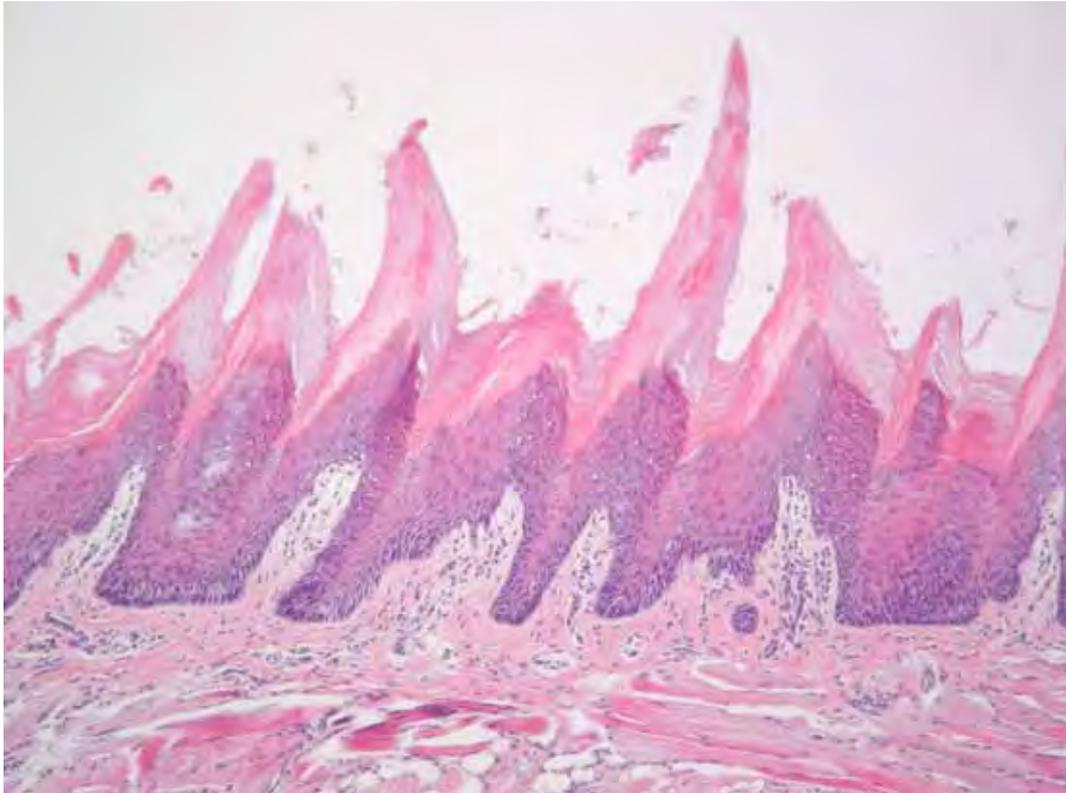


Figura 10 - Corte sagital do dorso da língua de rato do grupo L+F+: observa-se exocitose no epitélio, desorganização da camada basal e discreto infiltrado inflamatório na lâmina própria. HE; aumento 100X.



Figura 11 - Corte sagital do dorso da língua de rato do grupo L+F-: verifica-se desorganização da camada basal do epitélio e lâmina própria com discreto infiltrado inflamatório e vasos sangüíneos congestos. HE; aumento 200X.

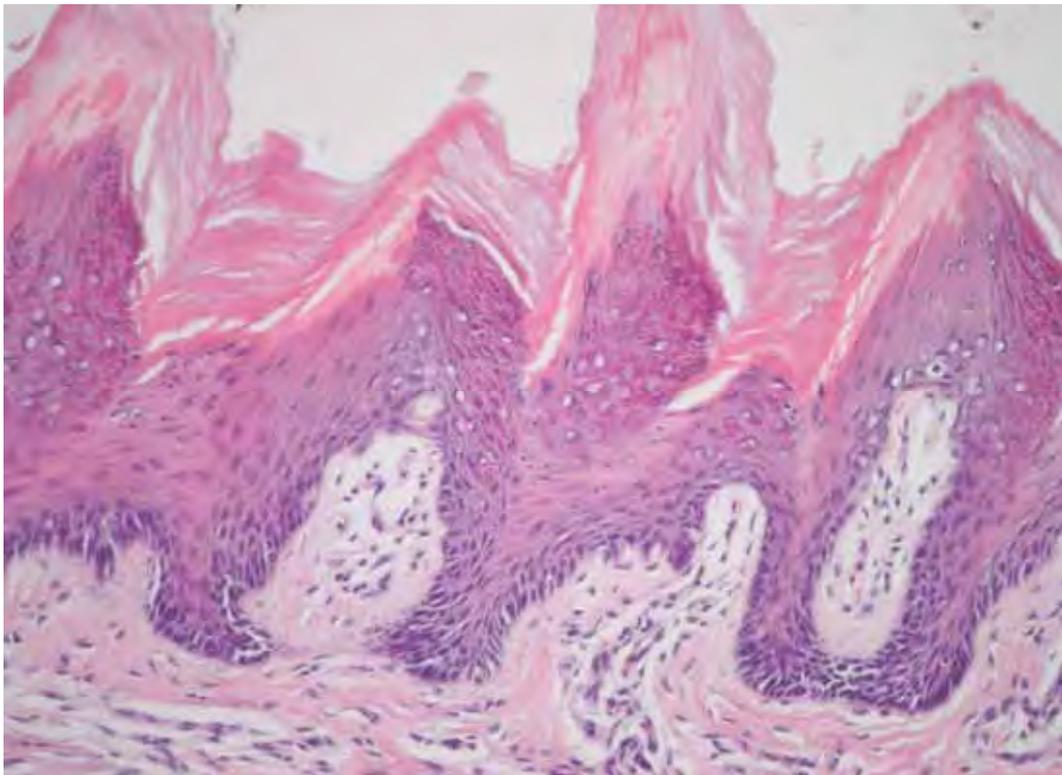


Figura 12 - Corte sagital do dorso da língua de rato do grupo L-F+: o epitélio apresenta excitação e lâmina própria demonstra discreto infiltrado inflamatório. HE; aumento 200X.

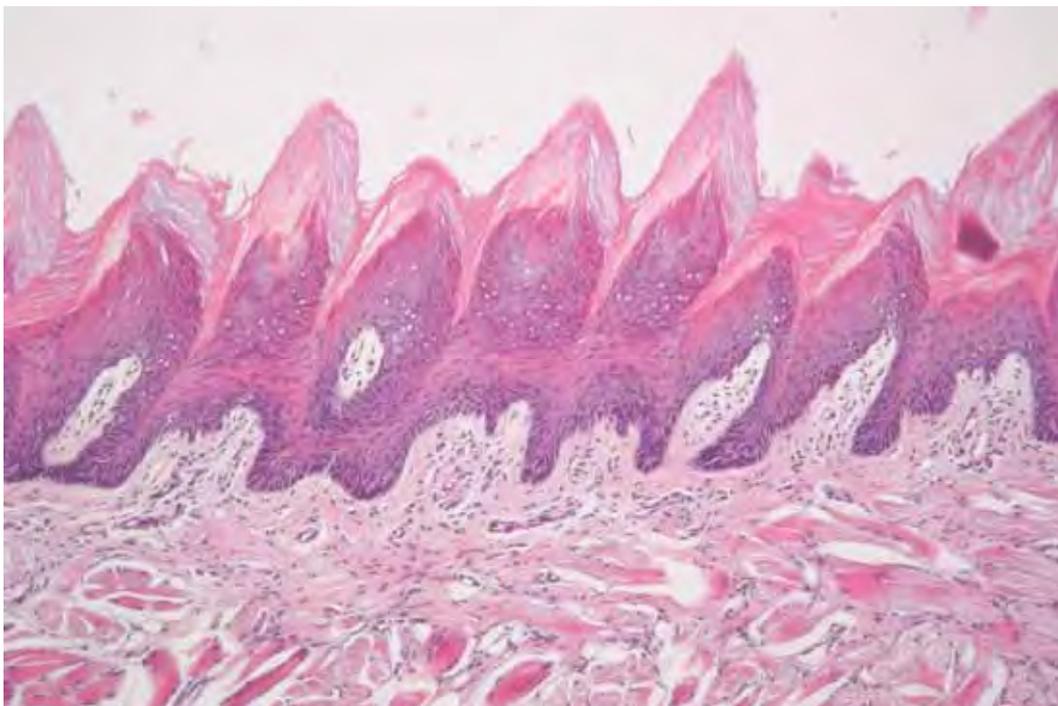


Figura 13 - Corte sagital do dorso da língua de rato do grupo L-F-: observa-se desorganização da camada basal e infiltrado inflamatório na lâmina própria. HE; aumento 100X.

5.5 Análise microscópica dos ratos sem inoculações de *Candida*

Nos 16 ratos utilizados para o estudo da terapia fotodinâmica sem inoculação de *Candida*, foram observadas características histológicas normais do dorso da língua conforme descrito por Junqueira (2003). Nenhum animal exibiu alteração do tecido que pudesse ser relacionada com o uso do laser ou fotossensibilizador conforme demonstra a Figura 14.

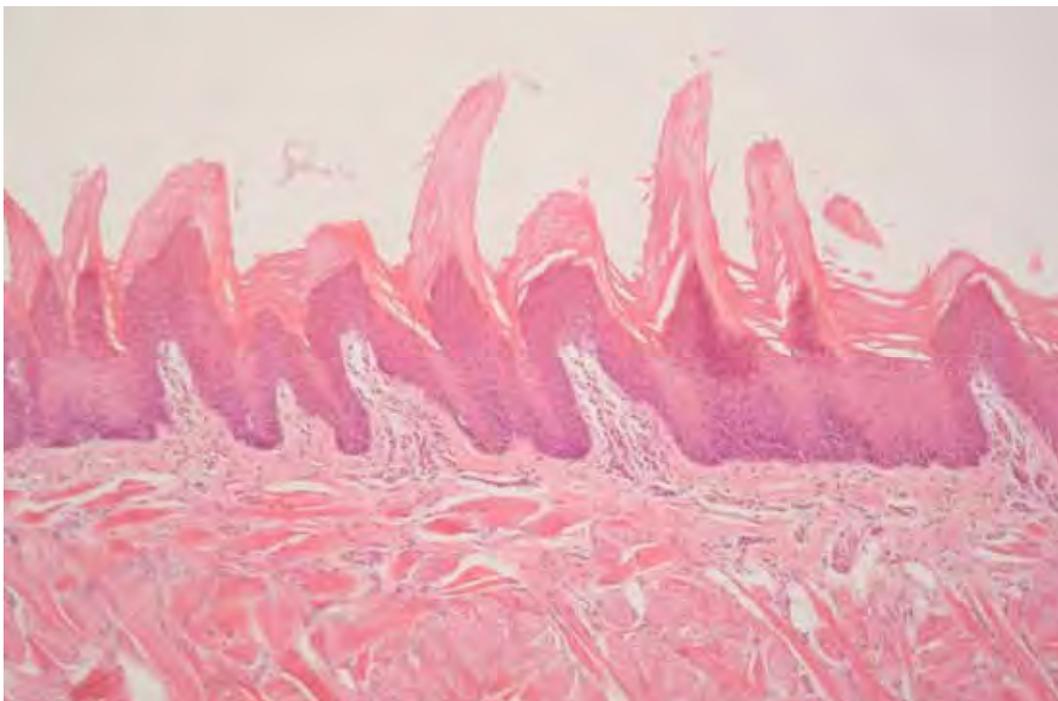


Figura 14 - Corte sagital do dorso da língua de rato do grupo controle na região das papilas gigantes, demonstrando o aspecto de normalidade do tecido. HE; aumento 100X.

5.6 Fatores de patogenicidade de *C. albicans*

Os resultados das atividades enzimáticas da fosfolipase estão apresentados na Tabela 6, na qual verifica-se que o grupo L+F+ apresentou maior valor de Pz, portanto menor atividade enzimática, em relação aos outros grupos. Essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Em relação à produção de proteinase, o grupo L+F+ também apresentou menor atividade enzimática em relação aos demais grupos (Tabela 7 e Figura 17), porém com diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos L+F+ e L-F+ (Tabela 8).

Os resultados das médias e Desvios-padrão da fosfolipase e proteinase podem ser visualizados na Figura 15.

Tabela 6 - Valores de Pz e código atribuído à atividade enzimática da fosfolipase para *C. albicans*

Rato	L+F+		L+F-		L-F+		L-F-	
	Pz	Código	Pz	Código	Pz	Código	Pz	Código
1	0,90	2	0,56	3	0,61	3	0,69	2
2	0,61	2	0,55	3	0,53	3	0,57	3
3	0,66	3	0,62	3	0,61	3	0,62	3
4	0,53	2	0,53	2	0,57	3	0,53	3
5	0,54	3	0,66	3	0,60	3	0,56	3
6	0,61	3	0,66	2	0,57	3	0,60	3
7	0,62	3	0,64	2	0,69	2	0,59	3
8	0,62	2	0,61	3	0,58	3	0,68	2
9	0,84	2	0,60	3	0,66	2	0,53	2
10	0,65	2	0,60	3	0,64	3	0,68	2
Média	0,65	-	0,60	-	0,60	-	0,60	-

Não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p = 0,298$)

Tabela 7 - Valores de Pz e código atribuído à atividade enzimática da proteinase para *Candida albicans*

Rato	L+F+		L+F-		L-F+		L-F-	
	Pz	Código	Pz	Código	Pz	Código	Pz	Código
1	0,33	3	0,45	3	0,33	3	0,38	3
2	0,42	3	0,45	3	0,36	3	0,42	3
3	0,42	3	0,42	3	0,30	3	0,41	3
4	0,37	3	0,35	3	0,29	3	0,29	3
5	0,55	3	0,36	3	0,31	3	0,45	3
6	0,44	3	0,33	3	0,37	3	0,31	3
7	0,50	3	0,33	3	0,29	3	0,45	3
8	0,55	3	0,35	3	0,37	3	0,33	3
9	0,37	3	0,31	3	0,33	3	0,25	3
10	0,30	3	0,37	3	0,41	3	0,36	3
Média	0,42	-	0,37	-	0,33	-	0,36	-

Existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p = 0,030$)

Tabela 8 – Valore de p para os grupos experimentais estudados em relação à atividade da proteinase (Teste de Tukey)

	L+F+	L+F-	L-F+	L-F-
L+F+	-	-	-	-
L+F-	0,2690	-	-	-
L-F+	0,0187*	0,5973	-	-
L-F-	0,1756	0,9948	0,7445	-

*Diferença estatisticamente significativa

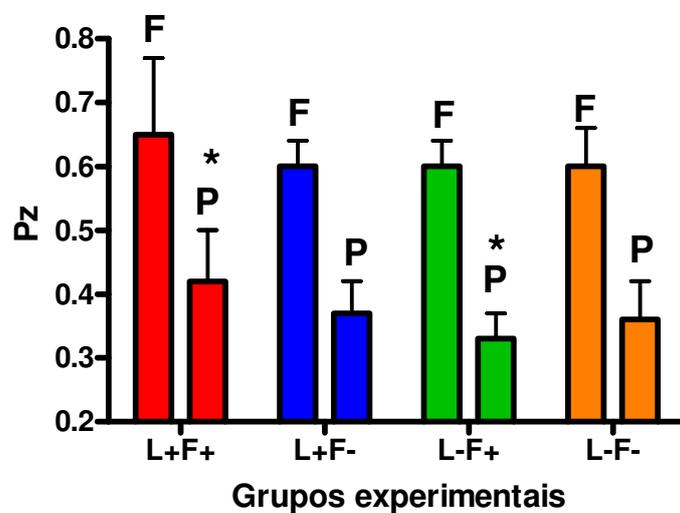


Figura 15 - Médias e Desvio-padrão dos valores de Pz para a atividade enzimática de fosfolipase (F) e proteinase (P). *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A produção de fosfolipase e proteinase por *C. albicans* podem ser visualizadas respectivamente nas Figuras 16 e 17.

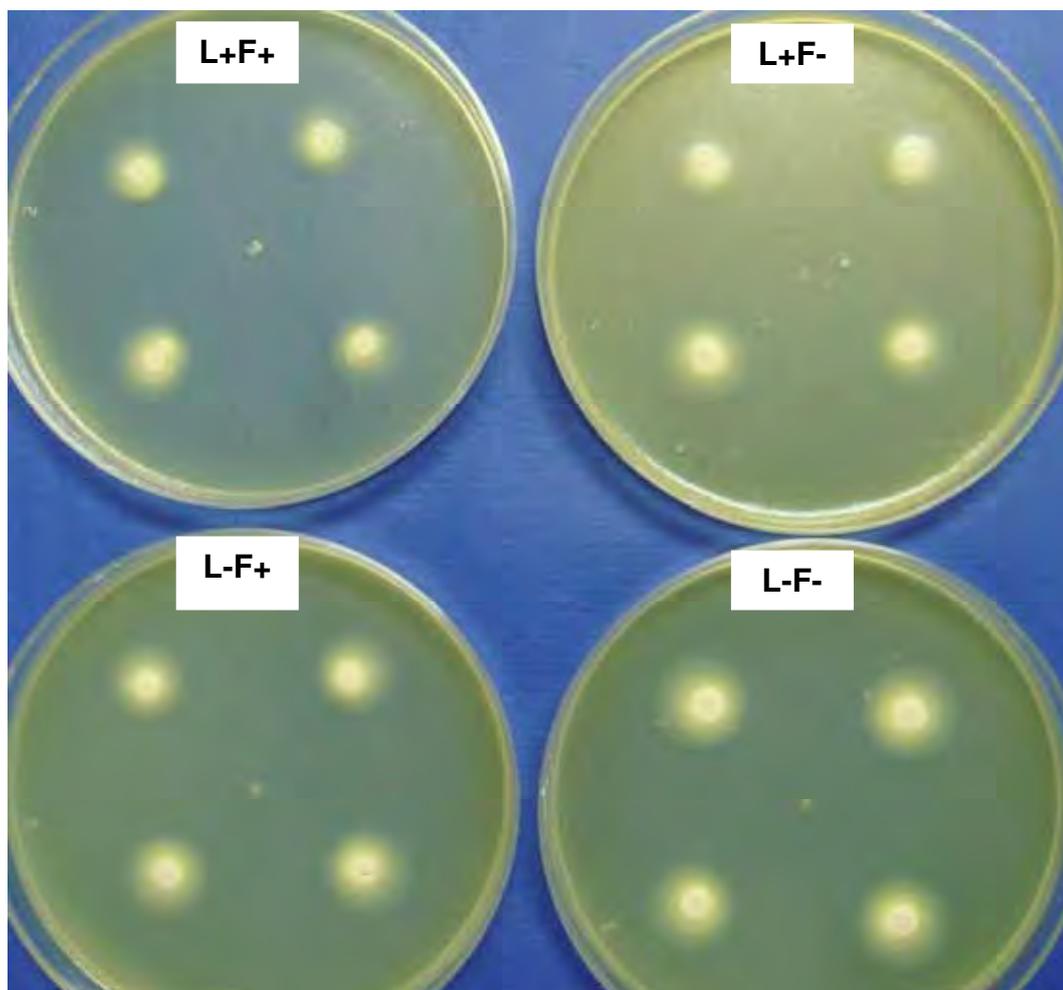


Figura 16 - Colônias de *C. albicans* em meio ágar fosfolipase nos seguintes grupos experimentais: L+F+ (Laser+fotossensibilizador), L+F- (Laser), L-F+ (Fotossensibilizador) e L-F- (Solução fisiológica).

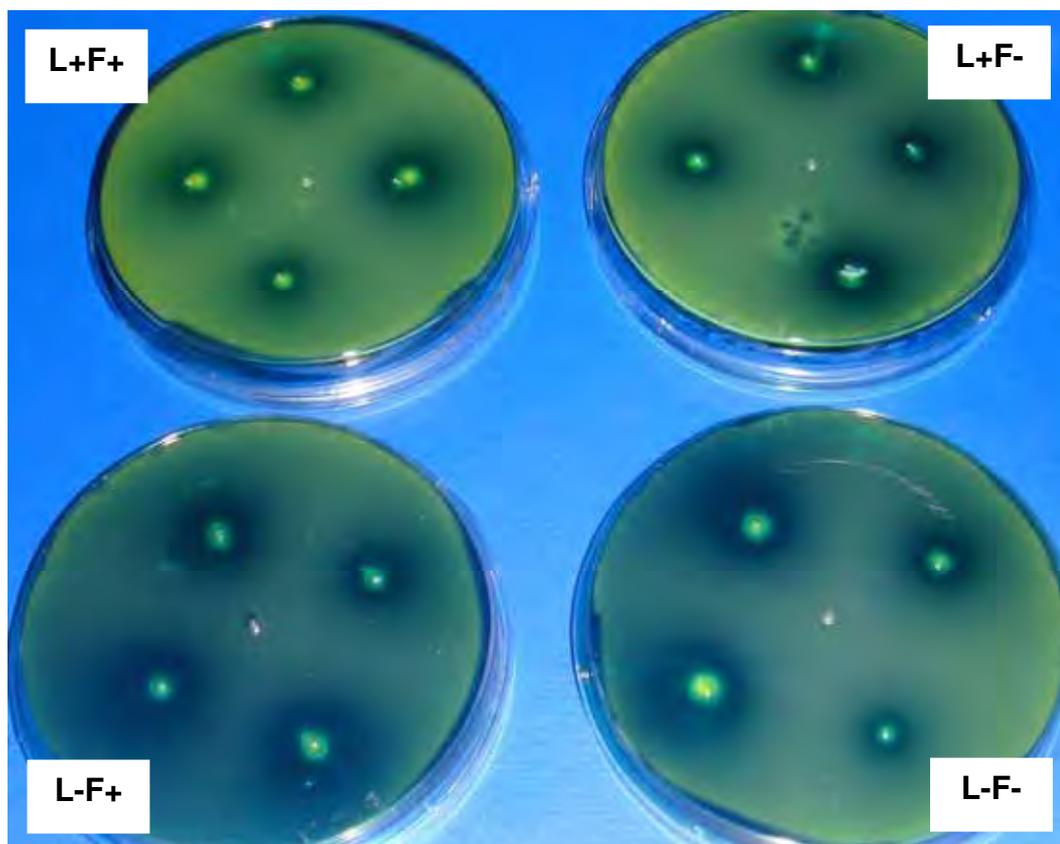


Figura 17 - Colônias de *C. albicans* em meio ágar proteinase nos seguintes grupos experimentais: L+F+ (Laser + fotossensibilizador), L+F- (Laser), L-F+ (Fotossensibilizador) e L-F- (Solução Fisiológica).

5.7 Fatores de patogenicidade de *C. dubliniensis*

5.7.1 Fotossensibilização *in vitro* de *C. dubliniensis*

O grupo L+F+ apresentou média de UFC/mL inferior aos demais grupos, sugerindo que a terapia fotodinâmica foi eficaz na redução de *C. dubliniensis*. O grupos L+F- e L-F+ apresentaram médias de UFC/mL semelhantes ao grupo L-F-, indicando que o uso isolado do

laser ou do fotossensibilizador não apresentou efeito sobre o microrganismo estudado (Figuras 18 - 19).

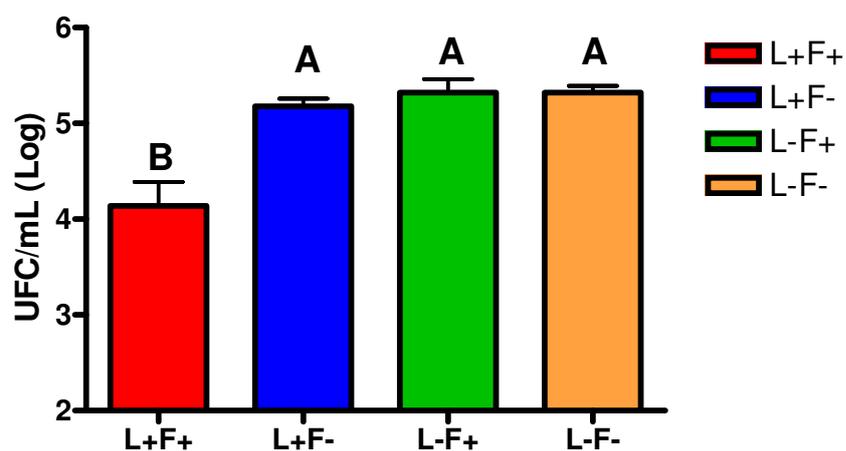


Figura 18 - Médias e desvios-padrão obtidas nos seguintes grupos experimentais: tratado com laser e fotossensibilizador (L+F+), tratado com laser (L+F-), tratado com fotossensibilizador (L-F+) e tratado apenas com solução fisiológica (L-F-). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

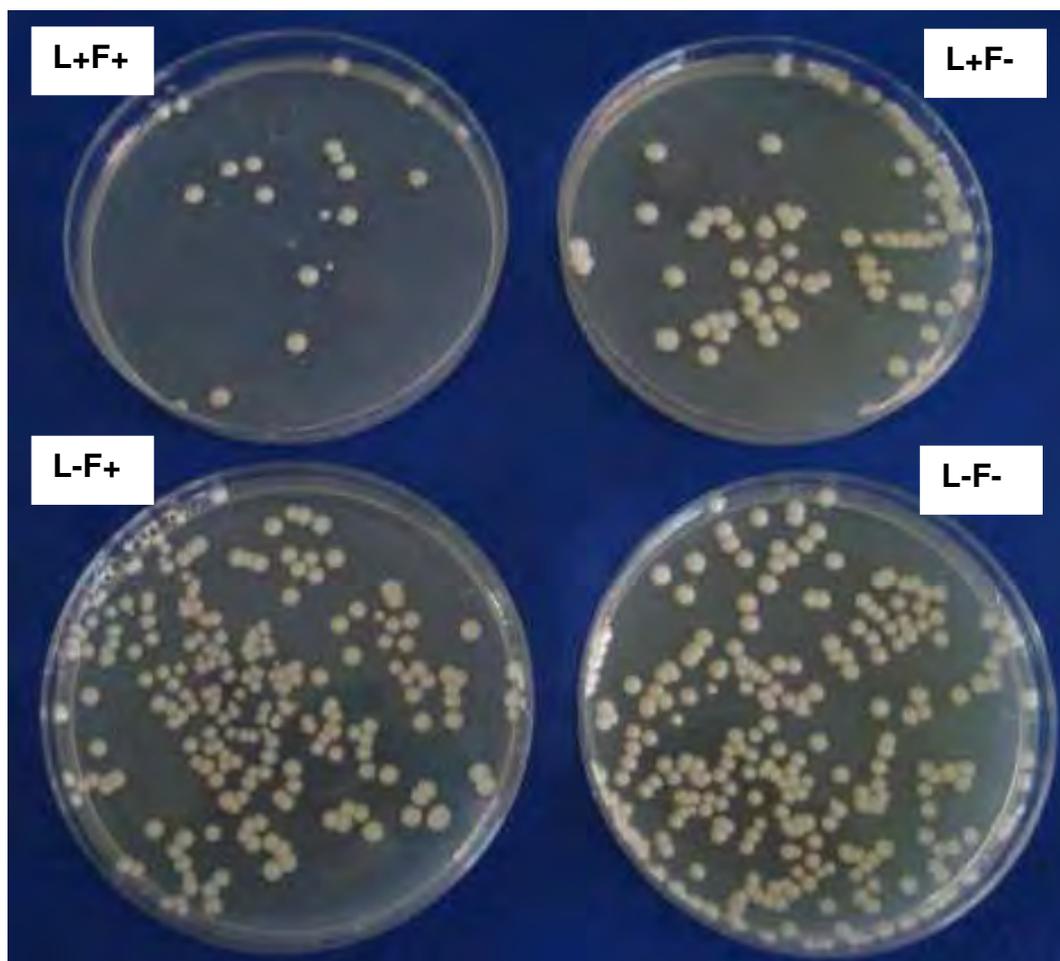


Figura 19 - Colônias de *C. dubliniensis* em ágar Sabouraud nos diferentes grupos experimentais: tratado com laser e fotossensibilizador (L+F+), tratado com laser (L+F-), tratado com fotossensibilizador (L-F+) e tratado apenas com solução fisiológica (L-F-).

5.7.2 Atividade enzimática de *C. dubliniensis*

As colônias de *C. dubliniensis* isoladas após os diferentes tratamentos experimentais realizados *in vitro* não foram capazes de produzir a enzima fosfolipase.

Os resultados da atividade enzimática da proteinase estão apresentados na Tabela 9, na qual verifica-se que as médias para o valor de Pz foram semelhantes entre os quatro grupos estudados ($p = 0,146$).

Os valores de Pz obtidos por *C. dubliniensis* foram maiores do que os valores de Pz de *C. albicans*, indicando portanto que *C. dubliniensis* apresentou menor atividade enzimática de proteinase em relação à *C. albicans*. Na Figura 20 observa-se os halos de produção de proteinase.

Tabela 9 - Valores de Pz atribuído à atividade enzimática da proteinase nos diversos grupos experimentais

Ensaio	L+F+		L+F-		L-F+		L-F-	
	Pz	Código	Pz	Código	Pz	Código	Pz	Código
1	0,62	3	0,52	3	0,56	3	0,69	2
2	0,58	3	0,60	3	0,63	3	0,67	2
3	0,60	3	0,67	2	0,58	3	0,66	2
4	0,69	2	0,61	3	0,68	2	0,71	2
5	0,55	3	0,58	3	0,74	2	0,62	3
6	0,63	3	0,68	2	0,69	2	0,64	2
7	0,68	2	0,62	3	0,76	2	0,62	3
8	0,70	2	0,68	2	0,74	2	0,73	2
Média								
± DP	0,63 ± 0,05		0,62 ± 0,05		0,67 ± 0,07		0,66 ± 0,04	

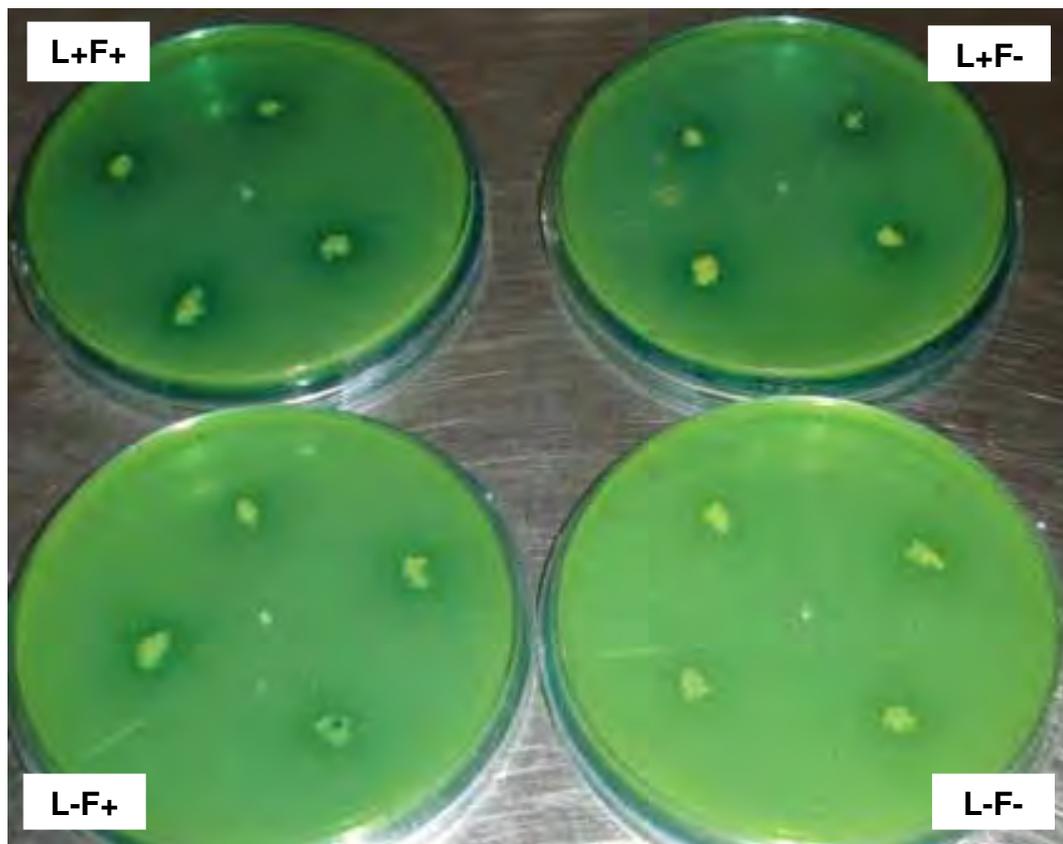


Figura 20 - Produção de proteinase por *C. dubliniensis* nos diferentes grupos experimentais: tratado com laser e fotossensibilizador (L+F+), tratado com laser (L+F-), tratado com fotossensibilizador (L-F+) e tratado apenas com solução fisiológica (L-F-).

6 DISCUSSÃO

Na tentativa de se mimetizar doenças, bem como estudar o seu comportamento e possíveis tratamentos, os pesquisadores tentaram utilizar inicialmente seres invertebrados, entretanto devido a suas inúmeras limitações passou-se a utilizar os vertebrados. A princípio macacos, e posteriormente em número crescente, ratos e camundongos, principalmente pelos aspectos éticos, econômicos e por apresentarem anatomia e sistema imunológico relativamente semelhantes aos seres humanos. O modelo animal de candidose experimental é muito importante para a análise molecular e celular das interações dos fungos com o hospedeiro, uma vez que as condições ambientais do organismo animal podem ser precisamente controladas e manipuladas, permitindo estudos sobre a patogenicidade e imunidade das leveduras do gênero *Candida* (Chamilos et al., 2007; Naglik et al., 2008).

Vários autores relataram que a instalação da candidose experimental em roedores requer o uso de agentes imunossupressores, antibióticos de amplo espectro ou redução do fluxo salivar através da sialoadenectomia (Allen et al., 1982; Jorge et al., 1993; Samaranayake; Samaranayake, 2001; De Repentigny, 2004). Neste trabalho a candidose experimental foi induzida pela administração de tetraciclina e inoculações de *C. albicans* ou *C. dubliniensis* na cavidade bucal dos ratos durante 3 dias consecutivos. No quinto e sexto dia após a última inoculação de *Candida*, os ratos foram submetidos aos seguintes tratamentos: terapia fotodinâmica (L+F+), laser (L+F-), fotossensibilizador (L-F+) e solução fisiológica (L-F-). No 7º dia, todos os ratos foram submetidos à eutanásia.

Foram realizadas coletas de amostras do dorso da língua antes e após o tratamento experimental para cálculo de UFC/mL, que

corresponderam respectivamente a 5 e 7 dias após a inoculação de *C. albicans*. Verificou-se que o número de UFC/mL recuperadas da cavidade bucal dos animais antes e depois do tratamento experimental apresentou redução em Log de 0,35 (L+F+), 0,88 (L+F-), 0,53 (L-F+) e 0,56 (L-F-). Observou-se que essas reduções não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos experimentais, demonstrando não estarem relacionadas com a aplicação da terapia fotodinâmica, mas sim com o modelo de candidose experimental estudado. Segundo, Samaranayake e Samaranayake (2001), *C. albicans* vai sendo naturalmente eliminada da cavidade bucal do animal.

O número decrescente de células recuperadas da cavidade bucal dos ratos com o passar dos dias também foi observado por Santos (1999), que realizou recuperações de *C. albicans* na superfície da língua de animais normais e xerostômicos tratados com tetraciclina. A recuperação foi realizada nos períodos de 4, 12, 24 e 48 h, mostrando diminuição dos valores encontrados, sugerindo que a diminuição gradativa pode indicar simplesmente a eliminação mecânica das células de *Candida* pela saliva.

O modelo de indução de candidose experimental usado neste trabalho, possibilitou a recuperação de 4 a 5 UFC/mL (Log) de *C. albicans* após 5 e 7 dias da última inoculação de leveduras. Junqueira al. (2003), utilizando a mesma metodologia deste trabalho, recuperaram apenas 2,5 UFC/mL (Log) de *C. albicans* após 7 dias da indução de candidose, provavelmente porque não foi utilizada administração de tetraciclina ou qualquer outro fator predisponente.

Para o estudo da candidose experimental induzida por *C. dubliniensis* no dorso da língua dos ratos seguiu-se a mesma metodologia utilizada para *C. albicans*. Entretanto, diferentemente de *C. albicans*, após 5 dias da última inoculação de *C. dubliniensis*, não foi possível recuperar leveduras da cavidade bucal dos 40 animais para fazer a contagem de UFC/mL. Além disso, na análise macroscópica do dorso da língua não

foram observadas lesões clínicas de candidose após inoculações de *C. dubliniensis* e nos cortes histológicos verificou-se a presença de discretas lesões de candidose, caracterizadas por hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal e discreto infiltrado inflamatório na lâmina própria.

Esses dados demonstram que *C. dubliniensis* apresenta menor patogenicidade em animais em relação à *C. albicans*. De acordo com Sullivan et al. (2004), *C. dubliniensis* produz menor quantidade de proteinase e fosfolipase e é menos tolerante a concentrações de H₂O₂ em relação a *C. albicans*. Assim, estes fatores podem justificar a menor capacidade de colonização aos tecidos por *C. dubliniensis*.

Segundo Barros et al. (2008), a atividade enzimática tem um papel essencial na capacidade do fungo em colonizar e infectar os tecidos hospedeiros. As exoenzimas, proteinases e fosfolipases, degradam imunoglobulinas e proteínas da matriz celular, inibem a fagocitose por neutrófilos polimorfonucleares e induzem reações inflamatórias.

No desenvolvimento de candidose experimental por *C. albicans* verificou-se na análise macroscópica a presença de lesões clínicas de candidose caracterizadas por áreas de atrofia papilar localizadas principalmente na região de papilas gigantes. Essas mesmas lesões já foram descritas por Allen et al. (1994), Junqueira et al. (2005), Yujra et al. (2006) e Faria et al. (2007).

Na análise histológica, observou-se que as leveduras e hifas de *C. albicans* não estavam mais presentes na superfície do dorso da língua. As lesões de candidose foram representadas por alterações no tecido epitelial e lâmina própria na região de transição entre papilas cônicas simples e papilas gigantes. Essas lesões teciduais são características do período de eutanásia de 8 dias após indução de candidose experimental e já foram descritas em trabalhos anteriores, como Allen et al. (1989) e Junqueira et al. (2005).

As alterações epiteliais e infiltrado inflamatório da lâmina própria presentes na lesão de candidose por *C. albicans* foram quantificadas, demonstrando que as lesões epiteliais do grupo L+F+ foram menos expressivas em relação aos grupos L+F-, L-F+ e L-F-, sugerindo que a terapia fotodinâmica foi eficaz no tratamento da candidose bucal induzida em ratos. Teichert et al. (2002) também verificaram redução da candidose bucal em camundongos imunossuprimidos quando foi utilizado um diodo laser associado ao fotossensibilizador azul de metileno. Segundo Maisch et al. (2006), a PDT além de ser tóxica para o fungo, induz a sinalização inflamatória que ativa as células competentes do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos, os quais estão envolvidos no processo de morte celular de *Candida*.

Neste trabalho, também foi avaliado os efeitos da terapia fotodinâmica, laser e fotossensibilizador sobre o tecido bucal sadio em 16 ratos que não receberam inoculações de *C. albicans*. Nenhuma alteração histológica decorrente do uso do laser ou fotossensibilizador foi observada. Luan et al. (2009) também não encontraram alterações necróticas ou inflamatórias na gengiva, dentina, polpa dental e osso alveolar de camundongos que receberam terapia fotodinâmica nos tecidos periodontais.

Além dos trabalhos realizados *in vivo*, vários estudos *in vitro* também demonstraram que a terapia fotodinâmica apresenta efeitos antifúngicos sobre as leveduras do gênero *Candida* (Wilson & Mia et al., 1993; Souza et al., 2006; Donnelly et al. 2007). Entretanto, poucos trabalhos foram desenvolvidos para analisar o efeito da PDT sobre os mecanismos de virulência desses microrganismos (Munin et al. 2007). Sendo assim, neste trabalho foi analisado o efeito da terapia fotodinâmica sobre os fatores de patogenicidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, incluindo a capacidade de produção enzimática.

Para avaliar os efeitos da PDT sobre os fatores de patogenicidade de *C. albicans*, as leveduras recuperadas da cavidade bucal dos ratos foram submetidas aos testes de produção de proteinase e fosfolipase. Ao analisar os valores de Pz observou-se que o grupo L+F+ exibiu menor produção de proteinase e fosfolipase em relação aos demais grupos estudados. Esses dados sugerem que a terapia fotodinâmica apresentou redução na atividade enzimática de *C. albicans*. Munin et al. (2007) verificaram que a PDT inibiu a formação de tubo germinativo por *C. albicans* em estudo realizado *in vitro* e sugeriram que essa terapia apresenta eficácia sobre os fatores de patogenicidade desta espécie.

Kömerik et al. (2000) também verificaram que a terapia fotodinâmica com azul de toluidina foi eficaz na redução da atividade do LPS de *Escherichia coli* e na atividade de protease de *Pseudomonas aeruginosa*, que representam fatores de virulência importantes em bactérias Gram-negativas.

Devido à dificuldade encontrada na indução de candidose experimental por *C. dubliniensis* em ratos, não foi possível avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre os fatores de patogenicidade desse microrganismo *in vivo*. Sendo assim, foi realizada terapia fotodinâmica sobre *C. dubliniensis in vitro* e avaliação dos seus efeitos sobre os fatores de patogenicidade.

Na fotossensibilização *in vitro* de *C. dubliniensis*, verificou-se que a contagem de UFC/mL (Log) do grupo L+F+ apresentou média inferior aos demais grupos, sugerindo que a terapia fotodinâmica foi eficaz na redução de *C. dubliniensis*. A redução observada no grupo L+F+ em relação ao grupo controle (L-F-) foi de 1,18 log₁₀. Souza et al. (2006) também verificaram redução de 1,01 log₁₀ de *C. albicans* e 1,03 log₁₀ de *C. dubliniensis* após tratamento *in vitro* com laser de baixa potência e azul de metileno. Esses dados indicam que *C. dubliniensis* responde à terapia fotodinâmica de modo semelhante ao da espécie *C. albicans*.

Os fatores de patogenicidade de *C. dubliniensis* estudados foram produção de fosfolipase e proteinase. Entretanto, verificou-se que *C. dubliniensis* não apresentou capacidade de produzir fosfolipase nas condições da metodologia utilizada. Além disso, a capacidade de produzir proteinase por *C. dubliniensis* (Pz de 0,62 a 0,66) foi menor em relação à *C. albicans* (Pz de 0,36 a 0,42). Segundo Sullivan et al. (2004), a produção de proteinase e fosfolipase é facilmente observada em cepas de *C. albicans*, entretanto apresentam resultados contraditórios em cepas de *C. dubliniensis*.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com o estudo de Hannula et al. (2000), que analisaram isolados bucais de *C. albicans* e *C. dubliniensis* quanto aos fatores de virulência e relataram menor produção de proteinase e fosfolipase por isolados de *C. dubliniensis* em relação aos isolados de *C. albicans*. Fotedar & Al-Hedaithy (2005) também compararam a produção de fosfolipase e proteinase entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* e observaram ausência da produção ou menor expressão destas enzimas pela espécie *C. dubliniensis*. Entretanto, Barros et al. (2008) verificaram alta atividade de proteinase por *C. dubliniensis*, com Pz variando de 0,23 a 0,57, e baixa atividade de fosfolipase, com valores de Pz entre 0,75 a 0,90.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a PDT foi efetiva no tratamento da candidose bucal em ratos induzida por *C. albicans* e apresentou efeitos inibitórios sobre a capacidade de *C. albicans* em produzir proteinase e fosfolipase. Entretanto, os efeitos da PDT sobre a candidose bucal em ratos induzida por *C. dubliniensis* não pôde ser adequadamente estudado devido às dificuldades no estabelecimento do modelo de candidose experimental e à reduzida capacidade de produção enzimática por *C. dubliniensis*.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

- a) o desenvolvimento de candidose experimental por *C. dubliniensis* na língua de ratos foi inferior à candidose induzida por *C. albicans*;
- b) a terapia fotodinâmica foi eficaz no tratamento da candidose do dorso da língua induzida por *C. albicans*;
- c) a terapia fotodinâmica inibiu a produção de fosfolipase e proteinase por *C. albicans*.

8 REFERÊNCIAS*

Ahmad S, Khan Z, Mokaddas E, Khan ZU. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus infected patients in Kuwait. J Med Microbiol. 2004;53(Pt7):633-7.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002;78(922):455-9.

Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh ACW, McCullough MJ, Jorge J, Scully C et al. Characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. Oral Microbiol Immunol. 2002; 7(1):44-9.

Allen CM, Blozis GG, Rosen S, Bright JS. Chronic candidiasis of the rat tongue: a possible model for human Median Rhomboid Glossitis. J Dent Res. 1982; 61(11):287-91.

Allen CM, Paulson R, Duncan R. Clinical, histologic and scanning electron microscopic study of the development of chronic candidiasis of the rat tongue. J Oral Pathol Med. 1989; 18(6):352-9.

Allen CM. Animal models of oral candidiasis: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994; 78(2):216-21.

Almeida NQ. Influência da produção de hialuronidase, proteinase, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de *Candida* sobre a patogenicidade para camundongos [Livre-Docência]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. "Júlio de Mesquita Filho", Universidade Estadual Paulista, 1991.

* Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em : http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2007;78(3):566-75.

Barros LM, Boriollo MF, Alves AC, Klein MI, Gonçalves RB, Höfling JF. Genetic diversity and exoenzymes activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. *Arch Oral Biol*. 2008;Dec;53(12):1172-8.

Brandt ME, Harrison LH, Pass M, Sofair AN, Huie S, Li RK et al. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. *Emerg Infect Dis*. 2000;6(1):46-9.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001;9(7):327-35.

Candido RC, Azevedo RV, Komesu MC. Enzymes typing of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;Sep-Oct,33(5):437-42.

Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res*. 1995; 74(5):152-61.

Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(1):42-55.

Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB et al. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS*. 1997;11(5):557-67.

De Backer MD, Magee PT, Pla J. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 2000;(54):463-98.

De Repentigny L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbio*. 2004;7(4):324-29.

Donnelly RF, Mcarrin PA, Tunney MM, Woolfson AD. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B: Bio.* 2007;86:59-69.

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

Dubus JC, Marguet C, Deschildre A, Mely L, Le Roux P, Brouard J et al. Local side-effects of inhaled corticosteroids in asthmatics childrens: influence of drug, dose, age and device. *Allergy.* 2001;56(10):944-8.

Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral Candidosis. *Clin Dermatol.* 2000;18(5):553-62.

Faria RL, Martins JS, Colombo CED, Junqueira JC, Jorge AOC. Terapia fotodinâmica para o tratamento da candidose bucal em ratos. *Anais do III Congresso de Ex-alunos e Jornada Odontológica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.* 2007. (Resumo).

Fotedar R , Al-Hedaithy SS Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses.* 2005;48(1):62-7.

Garcez AS, Souza SR, Nunez SC, Kather JM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2003;57(3):223-6.

Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. Targeting Virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today.* 2009;Feb;14(3-4):214-22.

Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:122-43.

Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2001;Dec;9(12):591-6.

Hamal P, Dosntál J, Raclavsky V, Krylová M, Pichová I, Hrusková-Heidingsfeldová. Secreted aspartate proteinases, a virulence factor of *Candida* spp.: occurrence among clinical isolates. *Folia Microbiol.* 2004;49(4):491-6.

Hannula J, Saarela M, Alaluusua S, Slots J, Asikainen S. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. *Oral Microbiol Immunol.* 1997;12(6):358-65.

Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S et al. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;5(4):238-44.

Hasenoehrl A, Galic T, Ergovic G, Marsic N, Skerlev M, Mittendorf J et al. In vitro activity and in vivo efficacy of icofungipen (PLD-118), a novel oral antifungal agent, against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006;50(9):3011-8.

Höfling JF, Rosa EAR. Main techniques employed in the molecular epidemiology of *Candida* species. *Alpe Adria Microbiol J.* 1999;8(1):5-23.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiol* 2001;147:1997-2005.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, Baqui AA, Kelley JI, Meiller TF. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from immunodeficiency virus (HIV) infected and non-HIV-infected individuals. *J Clin Microbiol.* 2000; 389(6):2423-6.

Jabra-Rizk MA, Ferreira SMS, Sabet M, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesions. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4520-2.

Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms

in vivo. Oral Dis. 2004;10(2):106-12.

Jorge AO, Totti MA, Almeida OP, Scully C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomized rat. J Oral Pathol Med. 1993; 22(2):54-6.

Jorge AOC, Koga-Ito CY, Gonçalves CR, Fantinato V, Unterkircher CS. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. Rev Odontol Univ São Paulo. 1997;11(4):279-85.

Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D et al. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbiol Infections: Basic Principles and Perspective Applications. Lasers Surg. 2006;38(5):468-81.

Junqueira JC. Candidose experimental e recuperação de *C. albicans* na cavidade bucal de ratas ovariectomizadas [Tese]. São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho";2003.

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

Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I et al. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. Infect Immunol. 1995;63(3):984-8.

Kim JO, Garofalo L, Blecker-Shelly D, McGowan KL. *Candida dubliniensis* infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2003;41:3354-7.

Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun. 1980;May;;28(2):464-8.

Komerick N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000;72(5):676-80.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007;86(11):1126.

Lacaz CS. Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier; 1998.

Leung WK, Dassanayake RS, Yau JYY, Jin LJ, Yam WC, Samaranayake LP. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6): 2219-26.

Liu H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4(6):728-35.

Luan XL, Qin YL, Bi LJ, Hu CY, Zhang ZG et al. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensibilization to periodontal tissue. *Lasers Med sci.* 2009 Mar;24(2):162-6.

Mähnß B, Stehr F, Schäfer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. *Mycoses.* 2005;48(1):55-61.

Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? 2006;22(2):83-91.

McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1996 Apr;25(2):136-44.

Montour L, Tey R, Xu J. Isolation of *Candida dubliniensis* in an aboriginal community in Ontario, Canada. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3423-6.

Mosca CO, Moragues MD, Brena S, Rosa AC, Ponton J. Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 Jan./Feb.;10(1):25-31.

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

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(3):400-28.

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

Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* 2001;44(9-10):361-7

Nobile CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA, Mitchell AP. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiol*. 2003; 149(Pt 2):3629-37.

Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, et al. Phospholipase and Proteinases Activities in Different *Candida* Species Isolated from Anatomically Distinct Sites of Healthy Adults. *Jpn J Infect Dis*. 2007;60(5):280-3.

Penha JL, Birman EG, Silveira FRX, Paula CR. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. *Pesqui Odontol Bras*. 2000;14(2):119-22.

Perry JL, Miller GR. Umbelliferyl-labelled galactosamine as an aid in identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 1987;25(12):2424-5.

Pichová I, Pavlicková L, Dostál J, Dolejši E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Eur J Biochem. 2001;268(9):2669-77.

Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. J Infect Dis. 1993;168:463-6.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia. 1982;20(1):15-20.

Ruchell R, Tegeller R, Trost MA. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia. 1982;20(3):233-244.

Samaranayake LP, MacFarlane TW. Oral candidosis. London: Wright. 1990:25.

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

Santos E.B. Efeitos da xerostomia e do tratamento com 4NQO no desenvolvimento de candidose na língua de rato [Tese]. Faculdade de Piracicaba. Universidade de Campinas; 1999.

Schmid J, Herd S, Hunter PR, Cannon RD, Yasin MSM, Samad S et al. Evidence for a general-purpose genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographical regions, patients types and types of infection. Microbiol. 1999; 145(Pt 9):2405-13.

Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Mühlischlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. Crit Rev Microbiol. 2000;26(1):59-68.

Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses* 1996; 39(5-6):161-7.

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

Somogyvari F, Doczi I, Serly J, Ahmad S, Nagy E. Rapid discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 July; 58(3):367-9.

Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AO. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B*. 2006;83(1):34-8.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov. phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. *Microbiol*. 1995; 141(Pt7):1507-21.

Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(2):329-34.

Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2004;4(4-5):369-76.

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.

Tan AL, Wang GCY, Chiu YW. *Candida dubliniensis* infection, Singapore. [Letter]. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(4):445-6.

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 Feb;93(2):155-60.

Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S. *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. *Mycoses.* 2004;47(7):315-8.

Totti MA, Jorge AO, dos Santos EB, de Almeida OP, Scully C. Implantation of *Candida albicans* and other *Candida* species in the oral cavity of rats. *J Oral Pathol Med.* 1996 July;25(6):308-10.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. *Aust Dent J.* 1998 Aug;43(1): 45-50.

Whittaker RH, Margulis L. Protist classification and the Kingdoms of organisms. *Biosystems.* 1978;10(1/2): 3-18.

Williams DW, Lewis MAO. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* 2000;6(1):3-11.

Willis AM, Coulter WA, Sullivan DJ, Coleman DC, Hayes JR, Bell PM et al. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. *J Oral Pathol Med.* 2000;29(2):86-90.

Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ et al. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(3):327-31.

Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993 Sept;22(8):354-7.
Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol.* 1996;44(4):311-6.

Yujra QV, Scherma AP, Junqueira JC, Jorge AOC, Rocha RF. The role of metronidazole on the establishment and persistence of oral candidosis. *Braz J Oral Sci.* 2006;5(17):1041-7.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa - Local

  **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 / ainotti@fosjo.unesp.br / Guodes@fosjo.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **035/2007-PA/CEP**, sobre **“Efeitos da terapia fotodinâmica sobre a patogenicidade de C.albicans e C.dubliniensis na candidose bucal em ratos”** sob responsabilidade de **JOYCE DA SILVA MARTINS**, 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, 10 de setembro de 2007.


Prof. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora do CEP/ANIMAIS/FOSJC

ANEXO B – Constituintes do Meio ágar proteinase:Meio A

Dextrose (Difco).....	20 g
Fosfato de potássio monobásico (Labsynth).....	1,0 g
Sulfato de magnésio (Reagen).....	0,5 g
Ágar nobre (Difco).....	15 g
Água destilada.....	1000 mL

Meio B

Albumina bovina fração V (Sigma).....	2 mg/mL
Riboflavina (Sigma).....	0,2 mg/mL
Ácido nicotínico (Sigma)	0,4 mg/mL
Hidrocloreto de tiamina (Sigma).....	0,4 mg/mL

Solução corante:

Negro amido (Labsynth).....	1,0 g
Ácido acético (Merck).....	198,8 mL
Água destilada.....	801,2 mL

Solução reveladora:

Ácido acético (Merck).....	67,9 mL
Água destilada.....	932,1 mL

Martins JS. Effects of photodynamic therapy on the pathogenicity of *C. albicans* and *C. dubliniensis* in oral rats candidosis [dissertation] São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effects of photodynamic therapy on the pathogenicity of C. albicans and C. dubliniensis in oral rats candidosis. Were evaluated 96 rats, while 80 were subjected to candidosis experimental induction on the tongue dorsum by C. albicans or C. dubliniensis and 16 rats were not infected. After 5 days of induction candidosis, different treatments were performed: laser and methylene blue as photosensitizers (Group L+F+), laser only (Group L+F-), only photosensitizers (Group L-F+) and without laser neither photosensitizers group (Group L-F). After 1 day, samples of the tongue dorsum were collected and sown on Sabouraud agar for counts of UFC/mL recovered from the oral cavity. The animals were submitted to euthanasia for microscopic analysis. It also evaluated the production capacity of a proteinase and phospholipase C. albicans and C. dubliniensis. The results showed that the amount of C. albicans recovered from rats oral cavity were similar among the four groups. To recover C. dubliniensis of the oral cavity from studied rats was not possible. In microscopic examination of tongue dorsum, was seen the presence of multiple tissue lesions induced by C. albicans, whereas in group L+ F+ these lesions were smaller than in other groups. C. dubliniensis showed slight tissue lesions with no statistic difference between groups. Regarding the factors of pathogenicity of C. albicans, the group L+F+ produced smaller amounts of phospholipase and proteinase compared to other groups. C. dubliniensis produced fewer quantity of phospholipase related to C. albicans, without difference between the 4 (four) groups studied. However, C. dubliniensis was not able to produce proteinase. It was concluded that the development of experimental candidosis by C. dubliniensis was less than that induced by C. albicans. Photodynamic therapy was effective on treatment of oral candidosis induced by C. albicans and inhibited the production of phospholipase and proteinase for this species.

Keywords: Photodynamic therapy. Candidosis experimental. *Candida albicans*. *Candida dubliniensis*. Virulence factors.