

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/02/2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



FERNANDA ALVES

**EFICÁCIA DAS TERAPIAS FOTODINÂMICA E SONODINÂMICA COMO
MÉTODOS PARA INATIVAÇÃO DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*. ESTUDO IN VITRO
E CLÍNICO.**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



FERNANDA ALVES

**EFICÁCIA DAS TERAPIAS FOTODINÂMICA E SONODINÂMICA COMO
MÉTODOS PARA INATIVAÇÃO DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*. ESTUDO IN VITRO
E CLÍNICO.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Doutor em Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

Araraquara

2017

Alves, Fernanda

Eficácia das terapias fotodinâmica e sonodinâmica como métodos para inativação de espécies de Candida. Estudo in vitro e clínico / Fernanda Alves.-- Araraquara: [s.n.], 2017

106 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

1. Fotoquimioterapia 2. Terapia por Ultrassom 3. Candida
4. Resistência a medicamentos 5. Estomatite sob prótese I. Título

FERNANDA ALVES

EFICÁCIA DAS TERAPIAS FOTODINÂMICA E SONODINÂMICA
COMO MÉTODOS PARA INATIVAÇÃO DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*.
ESTUDO IN VITRO E CLÍNICO.

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor

Presidente e orientador Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador Prof^a Dr^a Fernanda de Freitas Anibal

3º Examinador Prof^o Dr^o Gilberto Ubida Leite Braga

4º Examinador Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero Vizoto

5º Examinador Prof^o Dr^o Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara, 02 de Agosto de 2017.

DADOS CURRICULARES

FERNANDA ALVES

NASCIMENTO: 28/10/1987 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Selma Salum Alves
José Vitor Roncada Alves

2006/2010 Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2007/2010 Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Prótese Parcial Removível.

2011/2013 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

2012/2016 Estágio de docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2015/2015 Estágio de docência nas Disciplinas de Prótese Total II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2016/2016 Doutorado Sanduíche na Faculdade de Farmácia da Ulster University – Reino Unido.

2013/2017 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho. ***Em especial agradeço...***

A **Deus**, por nunca me desamparar e sempre ser tão bom para mim, mesmo com tantas imperfeições.

Aos meus pais, **Selma e Vitor**, por todo investimento, ensino de vida, apoio, dedicação e amor por mim. Agradeço também ao meu irmão, **Renan**, pela amizade e companheirismo.

Ao meu marido, **Danilo**, por ser meu companheiro, melhor amigo, acreditar no meu potencial, sempre me incentivar positivamente, me apoiar e, principalmente, por me amar incondicionalmente.

À minha orientadora **Profª Drª Ana Cláudia Pavarina** por todo ensinamento em todos estes anos de convivência. Há dez anos que sou orientada por você e o ensinamento transmitido é imensurável. Com você aprendi a escrever artigos, a amar a pesquisa e ensino, a realizar pedidos de bolsa e auxílio à pesquisa, a orientar alunos de iniciação científica, a escrever projetos de pesquisa, a ter postura profissional, dentre outras coisas. Sem dúvida te levarei eternamente como um exemplo de Professora, Orientadora e Pesquisadora.

Ao **Profº Drº Ewerton Garcia de Oliveira Mima** por ser um pilar em todas as etapas da minha vida profissional: iniciação científica, mestrado, doutorado sanduíche e doutorado. Com você aprendi desde pipetar soluções a escrever artigos. Também te levarei eternamente como um exemplo de Professor, Orientador e Pesquisador.

Às minhas amigas de pós-graduação e de vida **Juliana Cabrini Carmello** e **Gabriela Caroline Alonso**. Obrigada pelo tempo dedicado a este trabalho, vocês foram peças fundamentais para que esta pesquisa fosse possível. Além disso, agradeço pela amizade e carinho durante todos estes anos de convivência.

Ao **Profº Drº Vanderlei Salvador Bagnato** pela confecção dos aparelhos de luz LED e fornecimento do Photodithazine.

Aos **65 pacientes** que participaram do estudo clínico. Vocês contribuíram para a minha vida profissional e, mais ainda, para a comunidade científica em pesquisa com Terapia Fotodinâmica.

Aos **Professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível**: Dr^a Janaína Habib Jorge, Dr^a Ana Lúcia Machado, Dr^o Carlos Eduardo Vergani e Eunice Giampaolo.

Aos **Professores da Disciplina de Prótese Total**: Dr^a Ana Carolina Pero Vizoto, Dr^o João Neudenir Arioli Júnior, Dr^o Francisco de Assis Mollo Júnior, Dr^o Sérgio Sualdini Nogueira e Dr^o Marco Antônio Compagnoni pelos ensinamentos, por indicar pacientes para a pesquisa clínica e por abrir as portas da clínica da Graduação para o acompanhamento dos pacientes.

À **Prof^a Dr^a Marlise Inez Klein Furlan** por todo o ensinamento em Microbiologia e Biologia Molecular e pela prontidão em ajudar na realização desta pesquisa. Você contribuiu imensamente para o meu crescimento profissional.

Aos **meus queridos amigos de pós-graduação** Beatriz Helena Dias Panariello, Kássia Dias, Jefferson Trigo, Elkin Florez, Bruna Pimentel, Camila Cristina de Foggi, Carmélia Lobo, Guilherme Rocha, Jéssica Bernegossi, Lucas Portella, Vinícius Sakima, José Francisco Rocha e Midian Castillo.

À secretária da Clínica de Pesquisa do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, **Tânia**, por me ajudar com a triagem e agendamento de pacientes.

À técnica do microscópio confocal, **Dr^a Paula Aboud Barbugli**.

Às **bolsistas técnicas** do Laboratório de Microbiologia Aplicada: Geisiane Helena Gomes Bueno, Érica de Carvalho, Sarah de Annunzio, Bruna Michelli Novelli, Luana Sales e Lígia Sabino.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, por ter fornecido toda estrutura para realização do curso de pós-graduação, contribuindo para minha formação profissional. Tenho orgulho de fazer parte desta Faculdade.

A todos os **Professores do Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral**.

Aos **funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, aos **funcionários da Sessão de Pós-graduação** e da **Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES** pela bolsa de Doutorado concedida para a realização deste trabalho.

À Fundação de **Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP** pelas bolsas de Doutorado no país (Processo 2014/01262-1) e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) concedidas para a realização deste trabalho.

I would like to thank **Professor John Francis Callan** from Ulster University – Northern Ireland (Coleraine Campus) for the opportunity of being part of your group. I am proud to say that I made part of "John's group", even for 6 months. I admire your work, your experience, your responsibility with research and your students. It was a great experience for my career and my personal life.

Likewise, I also would like to thank David Costley, Dean Nicholas, Christopher O’Kane, Adam Johnston, Noorjahan Aibani, Sheng Jie, Sukanta Kamila, Heather Nesbitt, Keiran Logan, Jordan Atchison, Atul Nayak, Scarlett, Diego and Nino for being my friends and receiving me at Ulster University. All of you made this experience unforgettable!

The technicians Barry Hyland, Chris Millar, Svetlana Tretsiakova-McNally and Bernadette Doherty from Ulster University.

The Professors Dr. Bridgeen Callan, Dr. Anthony McHale, Dr. Kathryn Burnett, and Dr. Webba da Silva from Ulster University.

Finally, I would like to thank my dear friends Marie Kristine, Ellen, Vincent, Adrian, Virginia and Siobhan for being my family when I was in Coleraine. I cannot explain how important you were for me and I will be eternally grateful.

Muito obrigada!

Alves F. Eficácia das Terapias Fotodinâmica e Sonodinâmica como métodos para inativação de espécies de *Candida*. Estudo in vitro e clínico [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Resumo

Este trabalho avaliou a eficácia das Terapias Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) e Sonodinâmica (SDT) na inativação de espécies de *Candida*. O estudo 1 avaliou a efetividade da aPDT na inativação de biofilmes de *Candida albicans* susceptível e resistente ao fluconazol, bem como seus efeitos sobre os fatores de virulência das cepas. Para isso, biofilmes destas cepas foram tratados com aPDT mediada pelo Photodithazine e luz LED. Após a aPDT, as células foram recuperadas e os fatores de virulência avaliados. A capacidade de adesão foi analisada pelos testes de XTT (atividade metabólica) e UFC/mL (viabilidade celular). A capacidade de formar biofilme foi avaliada pelos testes de XTT, UFC/mL e biomassa total. A síntese de exoenzimas foi avaliada por testes fluorimétricos. Os dados foram analisados por ANOVA a 2 ou 3 critérios ($p \leq 0,05$). Verificou-se que a aPDT reduziu a viabilidade das cepas, entretanto não alterou os fatores de virulência. No estudo 2, foi avaliada a efetividade da aPDT no tratamento de pacientes com estomatite protética em comparação com a Nistatina (NIS). Os pacientes do grupo aPDT ($n=30$) foram submetidos a 6 sessões de aPDT (3 vezes/semana, 15 dias) e os pacientes do grupo NIS ($n=35$) utilizaram o antifúngico 4 vezes/dia, durante 15 dias. Coletas microbiológicas das próteses e palatos foram realizadas e cultivadas em ágar sangue e chromagar (UFC/mL). Fotografias dos palatos foram tomadas para avaliação clínica da lesão. Os dados foram analisados pelo Modelo Linear de Medidas Repetida ($p \leq 0,05$). Foi observado que a aPDT foi mais efetiva em reduzir a microbiota total do que a NIS. A aPDT foi tão eficaz quanto a NIS em reduzir *Candida* spp. do palato. A aPDT e a NIS apresentaram percentual de melhora clínica da lesão similar. O estudo 3 avaliou a eficácia da aPDT, SDT e a combinação de ambos os tratamentos na inativação de *C. albicans*. Suspensões foram tratadas com aPDT e SDT e a efetividade foi determinada por UFC/mL. Os biofilmes foram tratados com aPDT, SDT e a combinação de ambos os tratamentos (aPDT+SDT). Os tratamentos foram avaliados por UFC/mL, biomassa total e microscopia. Os dados foram analisados por ANOVA ($p \leq 0,05$). Embora a aPDT e SDT tenham erradicado suspensões, estes tratamentos tiveram pouco efeito sobre os biofilmes. A associação da aPDT+SDT reduziu a viabilidade celular e a biomassa total.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia. Terapia por Ultrassom. *Candida*. Resistência a medicamentos. Estomatite sob prótese.

Alves F. Efficacy of Antimicrobial Photodynamic and Sonodynamic Therapies for the inactivation of *Candida* species. In vitro and clinical study. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Abstract

This work evaluated the efficacy of Antimicrobial Photodynamic (aPDT) and Sonodynamics (SDT) Therapies in the inactivation of *Candida* species. The study 1 evaluated the efficacy of aPDT in the inactivation of susceptible and fluconazole resistant *Candida albicans* biofilms, as well as its effect on the virulence factors of the strains. For this, biofilms were treated with aPDT mediated by Photodithazine and LED light. After aPDT, cells were recovered and the virulence factors were evaluated. The adhesion capacity was assessed by XTT assay (metabolic activity) and CFU/mL (cell viability). The ability to form biofilm was evaluated by XTT, CFU/mL and total biomass. The synthesis of exoenzymes was evaluated by fluorimetric tests. Data were analyzed by ANOVA-2 or 3 way ($p \leq 0.05$). It was found that aPDT reduced the viability of the strains, however aPDT did not alter the virulence factors. The study 2, evaluated the effectiveness of aPDT in the treatment of patients with denture stomatitis in comparison with Nystatin (NYS). Patients of the aPDT group ($n=30$) underwent 6 sessions of aPDT (3 times/week, 15 days). Patients of the NYS group ($n=35$) rinsed the antifungal, 4 times/day, for 15 days. Microbiological collections of dentures and palates were performed and cultured on blood agar and chromagar (CFU/mL). Photographs of the palates were taken for clinical evaluation. Data were analyzed by the Linear Model of Repeated Measures ($p \leq 0.05$). It was observed that aPDT was more effective in reducing the total microbiota than NYS. The aPDT was as effective as NYS to reduce *Candida* spp. of the palate. aPDT and NYS showed similar clinical improvement percentage. The study 3 evaluated the efficacy of aPDT, SDT and the combination of both treatments in the inactivation *C. albicans*. Planktonic cultures were treated with aPDT and SDT. Cell survival was determined by CFU/mL. Biofilms were treated with aPDT, SDT and the combination of both treatments (aPDT+SDT). Efficacy in treating biofilms was evaluated by CFU/mL, total biomass and microscopy. Data were analyzed by ANOVA ($p \leq 0.05$). Although aPDT and SDT completely eradicated planktonic cultures, these treatments had no effect on biofilms. However, the combined treatment (aPDT+SDT) reduced the cell viability and total biomass.

Key words: Photochemotherapy. Ultrasonic Therapy. *Candida*. Drug Resistance. Denture Stomatitis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PROPOSIÇÃO	17
3	PUBLICAÇÕES	18
3.1	Publicação 1	18
3.2	Publicação 2	38
3.3	Publicação 3	58
4	DISCUSSÃO	84
5	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE A	95
	APÊNDICE B.....	99
	ANEXO A.....	103
	ANEXO B.....	104

1 INTRODUÇÃO

Muitas espécies de *Candida* são isoladas da cavidade oral dos seres humanos em relação de comensalismo (Soll⁵³, 2002). Porém, sob determinadas situações, como por exemplo quando o indivíduo possui imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), faz uso de medicamentos imunossupressores, antibióticos de amplo espectro, terapias antineoplásicas ou quando o indivíduo é diabético, estes fungos são responsáveis pelo desenvolvimento de infecções, tais como a candidose oral (Iacopino, Wathen²⁷, 1992). A *Candida albicans* é o principal agente etiológico desta infecção (Nikawa et al.⁴⁰, 1998), no entanto, outras espécies do mesmo gênero também têm sido isoladas e são frequentemente associadas ao desenvolvimento de infecções, tais como a *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondii* (Samaranayake, Samaranayake⁴⁹, 2001).

A expressão de fatores de virulência pela *C. albicans* auxilia na colonização do hospedeiro (Ferreira et al.¹⁷, 2010). A produção de enzimas, como as proteinases e fosfolipases, hidrolisa importantes constituintes da membrana citoplasmática da célula hospedeira, como os fosfolipídios e proteínas. Esse processo resulta na ruptura da membrana celular e consequente invasão do microrganismo (Hube, Naglik²⁶, 2001; Niewerth, Korting³⁹, 2001). A habilidade de formar biofilmes tem sido intimamente associada à capacidade de causar infecções, e pode ser considerada um importante fator de virulência (Ramage et al.⁴⁵, 2012). Os biofilmes são comunidades biológicas com um elevado grau de organização e complexidade. Estas comunidades encontram-se envoltas por matriz extracelular produzida pelas próprias células. Os biofilmes podem desenvolver-se em qualquer superfície que esteja em contato com fluidos do corpo, seja biótica ou abiótica. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorece relações simbióticas e permite a sobrevivência em ambientes hostis (Ramage et al.⁴⁵, 2012).

A utilização de próteses dentais removíveis tem sido associada à manifestação de uma forma de candidose que afeta normalmente o palato de aproximadamente 65% dos pacientes usuários de próteses (Chandra et al.⁹, 2001), conhecida como estomatite protética. Como as espécies de *Candida* são capazes de aderir à resina acrílica, a superfície interna das próteses torna-se um reservatório de microrganismos, e passa a ser colonizada por um biofilme complexo e consistente (Salermo et al.⁴⁸, 2011), com capacidade de armazenar e proteger os microrganismos que, por sua vez, podem colonizar outras regiões da cavidade bucal (Monroy et al.³⁵, 2005). Outros fatores locais associados à prótese, como trauma local, xerostomia, uso

contínuo da prótese e alteração do pH da saliva, também são frequentemente relacionados ao desenvolvimento da estomatite protética (Figueiral et al.¹⁹, 2007). Essa infecção caracteriza-se pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos na mucosa subjacente às próteses removíveis dos pacientes, e, em casos mais avançados, também podem ser observadas áreas eritematosas difusas e hiperplasia papilar do palato (Telles et al.⁵⁴, 2017). Apesar de muitas vezes ser assintomática, a infecção pode causar prurido, ardência, dor, sabor desagradável, desconforto, hemorragia na mucosa bucal, alteração no paladar, halitose, xerostomia e lesões associadas, como queilite angular e glossite rombóide mediana (Hoshi et al.²⁵, 2011; Scully⁵¹, 2013).

Os tratamentos direcionados à estomatite protética são variados, podendo ser terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica e procedimentos de higienização e desinfecção das próteses (Banting, Hill³, 2001; Goldman et al.²², 2004). O grau de infecção, condições de saúde geral e bucal, idade e gênero do paciente e idade da prótese são aspectos que devem ser avaliados na escolha do tratamento (Yarborough et al.⁵⁷, 2016). Em qualquer situação clínica, é necessário orientar devidamente os pacientes quanto à higienização das próteses e à sua remoção durante o período noturno (Hoshi et al.²⁵, 2011). Além disso, é indicado que as próteses com mais de cinco anos de uso ou em condições inadequadas sejam substituídas (Hoshi et al.²⁵, 2011).

Para o tratamento da estomatite protética a prescrição de agentes antifúngicos tópicos, como a Nistatina tem sido indicada (Pappas et al.⁴¹, 2009). Para pacientes imunocomprometidos ou em risco de candidemia, a terapia antifúngica sistêmica, como por exemplo os azoles, tem sido usada (Akpan, Morgan², 2002). No entanto, o aumento na utilização dos medicamentos azoles, combinado com vários casos de recorrência da infecção, tem tornado estes fungos resistentes aos tratamentos antifúngicos convencionais (Goldman et al.²², 2004). A resistência aos medicamentos antifúngicos é definida como a falha de um tratamento antifúngico, que resulta na persistência ou progressão da infecção (White et al.⁵⁶, 1998).

Diante das dificuldades relacionadas a resistência fúngica, uma modalidade terapêutica alternativa vem sendo sugerida como promissora para inativação microbiana (Donnelly et al.¹³, 2008). A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês, Antimicrobial Photodynamic Therapy, aPDT) baseia-se na administração de um composto químico, um fotossensibilizador (Fs), que submetido a irradiação com luz visível, na presença de oxigênio, produz danos celulares específicos que inativam os microrganismos. Na área médica, esta terapia também tem sido amplamente estudada para o tratamento de câncer bucal, pulmão e pele (Agostinis et al.¹, 2011). Dois diferentes mecanismos oxidativos parecem ocorrer após a

fotoativação do fotossensibilizador. No primeiro, ocorre uma reação fotoquímica, na qual o fotossensibilizador interage com uma biomolécula produzindo radicais livres, já no segundo mecanismo, há produção do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Estas moléculas que são produzidas (radicais livres e oxigênio singlete) são responsáveis pela inativação celular (Donnelly et al.¹³, 2008).

Atualmente, FSs de segunda geração vem sendo amplamente empregados na aPDT. Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região vermelha do espectro fotomagnético. O Photodithazine® (PDZ) é uma clorina e6 preparada na Rússia, obtida a partir da cianobactéria *Spirulina platensis*. Esse FS vem sendo aplicado atualmente com sucesso na PDT contra o câncer, devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (Ferreira et al.¹⁸, 2008). A efetividade da aPDT mediada pelo PDZ na inativação in vitro de espécies de *Candida* têm sido relatada (Dovigo et al.¹⁴, 2013; Quishida et al.⁴⁴, 2013). Dovigo et al.¹⁴ (2013), observaram que a aPDT associada ao PDZ e luz LED promoveu redução no número de colônias e no metabolismo celular dos biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* em aproximadamente 62,1%, 76,9% e 76% respectivamente (Dovigo et al.¹⁴, 2013). Quando um biofilme misto formado por *C. albicans*, *C. glabrata*, e *Streptococcus mutans* foi submetido a aPDT mediada pelo PDZ foi observada uma redução significativa na viabilidade das três espécies avaliadas, além disso, foi observada uma redução significativa na atividade metabólica dos biofilmes (Quishida et al.⁴⁴, 2015).

Apesar de o tratamento da estomatite protética por meio da aPDT mediada pelo PDZ ainda não ter sido avaliado, estudos in vivo mostraram a eficácia da aPDT no tratamento de candidose oral induzida em camundongos. Carmello et al.⁸ (2015) observaram que a aplicação de 100 mg/L de PDZ e 37,5 J/cm² de luz LED foi capaz de reduzir 4,36 log₁₀ na viabilidade de *C. albicans* presentes na língua de camundongos com candidose oral. Em outro estudo, cinco aplicações sucessivas de aPDT mediada pelo PDZ foram tão efetivas quanto a Nistatina para o tratamento de candidose oral experimental em camundongos (Carmello et al.⁷, 2016). Ambos os estudos concluíram que a aPDT mediada pelo PDZ pode ser aplicada de forma segura, uma vez que não foi verificada qualquer alteração microscópica nos tecidos dos animais.

O rosa-bengala (RB) (sal dissódico 4,5,6,7-tetracloro-2,4,5,7-tetra-iodo-fluoresceínas), é um corante de xanteno hidrofóbico aniônico caracterizado por absorção em comprimentos de onda de luz na faixa de 450 a 600 nm. O RB tem várias aplicações na medicina que incluem o diagnóstico de dano ocular, a detecção de lesões pré-cancerosas orais e é usado

como agente revelador de placa dentária (Fischer et al.²⁰, 2004; Feenstra, Tseng¹⁶, 1992). Devido a sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio ao ser irradiado, este corante também tem sido investigado como FS para mediar a aPDT. Freire et al.²¹ (2014) tratou células planctônicas de *C. albicans* ATCC 18804 (10^6) com aPDT mediada pelo RB nas concentrações de 0,78 a 400 μM durante 5 min, e luz LED verde (532 nm, 42,63 J/cm²). Os autores observaram completa erradicação de *C. albicans* quando incubadas com 12,5 μM . Quando este FS foi avaliado na concentração de 40 μM na inativação suspensão de isolados clínicos de *C. albicans*, a maior redução encontrada foi de 1,97 log₁₀ (Costa et al.¹⁰, 2012). Em outro estudo, quando a aPDT foi mediada pelo RB a 200 $\mu\text{mol/L}$ por 20 min, foram observadas reduções de 4 log₁₀ e 6 log₁₀ de *C. albicans* nas densidades celulares de 10^7 e 10^6 células/mL, respectivamente, quando este FS foi iluminado nas doses de 40 e 80 J/cm² (Demidova, Hamblin¹², 2005). Desta forma, dependendo da cepa, concentração do FS, fonte e dose de luz avaliados, observam-se diferentes resultados da efetividade da aPDT mediada pelo RB.

Recentemente, a Terapia com Sonodinâmica (SDT) surgiu como uma alternativa à aPDT para o tratamento de tumores (McHale et al.³², 2016) e para a inativação de micro-organismos (Harris et al.²³, 2014). Enquanto a aPDT utiliza luz para ativar o FS, a SDT utiliza o ultrassom (US). A vantagem da utilização do US é que esse se propaga mais profundamente no tecido. Embora o mecanismo da aPDT seja bem conhecido, o mecanismo exato para a geração de oxigênio singlete na SDT ainda é controverso (Hiraoka et al.²⁴, 2006). Sabe-se que na SDT a cavitação inercial pelo ultrassom, um processo caracterizado pela formação, oscilação e colapso de bolhas gasosas no meio irradiado com o ultrassom, é a reação central para a produção de oxigênio singlete. Quando o fenômeno de cavitação é dominado por forças de inércia, as bolhas colapsam violentamente, acarretando na elevação da temperatura local e na produção de sonoluminescência. Sugere-se que, na SDT, a geração de oxigênio singlete seja resultado da foto-ativação indireta da droga sensibilizante via sonoluminescência (McHale et al.³², 2016). Uma vez excitado, o sensibilizador produz oxigênio singlete exatamente da mesma maneira que na aPDT.

O uso da SDT como tratamento antimicrobiano é uma abordagem relativamente nova, por isso as publicações relacionadas a este assunto são escassas. Alguns estudos nesta área relataram inativação de bactérias por meio do US mediado por diferentes sensibilizadores, incluindo rose-bengal (RB) (Nakonechny et al.³⁷, 2013), curcumina (Wang et al.⁵⁵, 2014) e porfirina (Zhuang et al.⁵⁸, 2014). Nakonechny et al.³⁷ (2013), observaram que a SDT, utilizando-se o US na frequência de 28 kHz, mediada pelo RB foi efetiva na erradicação das

suspensões de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Zhuang et al.⁵⁸ (2014) demonstraram que a incubação de 50 µg/L com um éster monometílico de hematoporfirina seguida de irradiação ultrassônica (1 MHz, 6 W/cm², 30 min) promoveram redução de ~ 2 log₁₀ de suspensões de *S. aureus* (Zhuang et al.⁵⁸, 2014). Em outro estudo, culturas planctônicas de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com SDT utilizando um peptídeo antimicrobiano conjugado ao RB resultou em reduções de 5 e 7 log₁₀ na viabilidade celular, respectivamente (Costley et al.¹¹, 2015). Quando uma suspensão de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) foi tratada usando SDT com curcumina, a viabilidade bacteriana foi reduzida em 5 log₁₀ (Wang et al.⁵⁵, 2014). Dessa forma, a SDT tem demonstrado ser uma abordagem promissora para a inativação de bactérias planctônicas, no entanto, ainda não há relatos que descrevam a eficácia da SDT para a inativação de suspensões ou biofilmes de *C. albicans*.

Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade da aPDT medida pelo PDZ, em inativar biofilmes de *C. albicans* susceptíveis e resistentes ao fluconazol (Publicação 1). Também foram avaliados os efeitos desta terapia sobre os fatores de virulência de *Candida* (adesão, capacidade de formação de biofilme, produção de fosfolipase e proteinase). Em outra etapa (Publicação 2), foi verificada a efetividade da aPDT, mediada pelo PDZ, no tratamento de pacientes com estomatite protética em comparação com o antifúngico tópico Nistatina. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade das Terapias Sonodiâmica, aPDT e a combinação de ambos os tratamentos, mediados pelo PDZ ou RB, em inativar suspensões e biofilmes de *C. albicans* (Publicação 3).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A aPDT mediada pelo PDZ foi capaz de reduzir a viabilidade e metabolismo celular de biofilmes de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol;
- A aPDT mediada pelo PDZ não reduziu os seguintes fatores de virulência dos biofilmes de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol: capacidade de adesão e formação de biofilme e produção de exoenzimas (proteínase e fosfolipase);
- A aPDT mediada pelo PDZ foi capaz de reduzir a microbiota-total do palato e prótese de pacientes com estomatite protética;
- A aPDT foi tão efetiva quanto a Nistatina na inativação de espécies de *Candida* do palato de pacientes com estomatite protética;
- A aPDT e a Nistatina apresentaram porcentagens similares de melhora clínica da inflamação do palato de pacientes com estomatite protética;
- Foi observada a recorrência da estomatite protética nos pacientes tratados com aPDT e Nistatina;
- A aPDT e a PDT, mediadas pelo PDZ e RB, foram capazes de erradicar suspensões de *C. albicans*;
- A combinação dos tratamentos aPDT+PDT foi efetiva mais na inativação de *C. albicans* e na redução da biomassa total de biofilmes de que a aplicação isolada das terapias.

REFERÊNCIAS*

1. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(4): 250-81.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002; 78(922): 455-9.
3. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist.* 2001; 21(1): 4-8.
4. Bao S, Thrall BD, Miller DL. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 1997; 23(6): 953-9.
5. Brandolt TM, Klafke GB, Gonçalves CV, Bitencourt LR, Martinez AM, Mendes JF, et al. Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. *Braz J Microbiol.* 2017; 48(1): 145-50.
6. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1776(1): 86-107.
7. Carmello JC, Alves F, G Basso F, et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®- mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS One.* 2016; 11(6): e0156947.
8. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; 14(7): 1319-28.
9. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183(18): 5385-94.
10. Costa AC, Rasteiro VM, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses.* 2012; 55(1): 56-63.
11. Costley D, Nesbitt H, Ternan N, Dooley J, Huang YY, Hamblin MR, et al. Sonodynamic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using a Rose Bengal-antimicrobial peptide conjugate. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 49(1): 31-6.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

12. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(6): 2329-35.
13. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008; 163(1): 1-12.
14. Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling*. 2013; 29(9): 1057-67.
15. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9): 927-34.
16. Feenstra RP, Tseng SC. What is actually stained by rose bengal? *Arch Ophthalmol*. 1992; 110(7): 984-93.
17. Ferreira C, Silva S, Faria-Oliveira F, Pinho E, Henriques M, Lucas C. *Candida albicans* virulence and drug-resistance requires the O-acyltransferase Gup1p. *BMC Microbiol*. 2010; 15: 238.
18. Ferreira J, Menezes PFC, Kurachi C, Sibata C, Allison RR, Bagnato VS. Photostability of different chlorine photossensitizers. *Laser Phys Lett*. 2008; 5(2): 156-61.
19. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil*. 2007; 34(6): 448-55.
20. Fischer BB, Krieger-Liszkay A, Eggen RL. Photosensitizers neutral red (type I) and rose bengal (type II) cause light-dependent toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii* and induce the Gpxh gene via increased singlet oxygen formation. *Environ Sci Technol*. 2004; 38(23): 6307-13.
21. Freire F, Costa AC, Pereira CA, Beltrame Junior M, Junqueira JC, Jorge AO. Comparison of the effect of rose bengal- and eosin Y-mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(3): 949-55.
22. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50(1): 25-32.

23. Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. The antimicrobial effects of ultrasound. *Nov Antimicrob Agents Strateg.* 2014; 356(1): 331–56.
24. Hiraoka W, Honda H, Feril LB Jr, Kudo N, Kondo T. Comparison between sonodynamic effect and photodynamic effect with photosensitizers on free radical formation and cell killing. *Ultrason Sonochem.* 2006; 13(6): 535-42.
25. Hoshi N, Mori H, Taguchi H, Taniguchi M, Aoki H, Sawada T, et al. Management of oral candidiasis in denture wearers. *J Prosthodont Res.* 2011; 55(1): 48-52.
26. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 2001; 147(Pt 8): 1997-2005.
27. Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc.* 1992; 123(1): 46-51.
28. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(3): 283-8.
29. Maciel CM, Piva MR, Ribeiro MA, de Santana Santos T, Ribeiro CF, Martins-Filho PR. Methylene Blue-mediated photodynamic inactivation followed by low-laser therapy versus miconazole gel in the treatment of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2016; 25(1): 28-32.
30. Mang TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010; 7(2): 98-105.
31. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2016; 30(1): 103-24.
32. McHale AP, Callan JF, Nomikou N, Fowley C, Callan B. Sonodynamic therapy: concept, mechanism and application to cancer treatment. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 880: 429-50.
33. Miller MW. Gene transfection and drug delivery. *Ultrasound Med Biol.* 2000; 26 Suppl 1: S59-62.
34. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(10): E380-8.
35. Monroy TB, Maldonado VM, Martinez FF, Barrios BA, Quindos G, Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 10(suppl 1): E27-E39.

36. Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Photochem Photobiol B. 2007; 88(1): 16-20.
37. Nakonechny F, Nisnevitch M, Nitzan Y, Nisnevitch M. Sonodynamic excitation of Rose Bengal for eradication of gram-positive and gram-negative bacteria. Biomed Res Int. 2013; 2013: 684930.
38. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. J Oral Rehabil. 2008; 35(11): 836-46.
39. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses 2001; 44(9-10): 361-7.
40. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. J Dent. 1998; 26(4): 299-304.
41. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2016; 62(4): e1-50.
42. Paz-Cristobal MP, Royo D, Rezusta A, Andrés-Ciriano E, Alejandre MC, Meis JF, et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. Mycoses. 2014; 57(1): 35-42.
43. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. Arch Oral Biol 2008; 53(8): 755–64.
44. Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. Lasers Med Sci. 2015; 30(2): 2303-12.
45. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. Int J Microbiol. 2012; 2012: 528521.
46. Rosenthal I, Sostaric JZ, Riesz P. Sonodynamic therapy--a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. Ultrason Sonochem. 2004; 11(6): 349-63.
47. Rosseti IB, Chagas LR, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. Lasers Med Sci. 2014; 29(3): 1059-64.

48. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(2): e139-43.
49. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(2): 398-429.
50. Sanita PV, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EM, Colombo AL, Vergani CE. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Int J Prosthodont*. 2012; 25(3): 232-44.
- Scully C. Oral and maxillofacial medicine: the basis of diagnosis and treatment. 3rd ed. China: Churchill Livingstone Elsevier; 2013.
51. Soares BM, da Silva DL, Sousa GR, Amorim JC, de Resende MA, Pinotti M, et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 94(1): 65-70.
52. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop*. 2002; 81(2): 101-10.
53. Telles DR, Karki N, Marshall MW. Oral fungal infections: diagnosis and management. *Dent Clin North Am*. 2017; 61(2): 319-49.
54. Wang X, Ip M, Leung AW, Xu C. Sonodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic condition by curcumin under ultrasound sonication. *Ultrasonics*. 2014; 54(8): 2109-14.
55. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(2): 382-402.
56. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw K, Stoner L. Evidence regarding the treatment of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2016; 25(4): 288-301.
57. Zhuang D, Hou C, Bi L, Han J, Hao Y, Cao W, et al. Sonodynamic effects of hematoporphyrin monomethyl ether on *Staphylococcus aureus* in vitro. *FEMS Microbiol Lett*. 2014; 361(2): 174-80.