

**Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento**

**LIGIA MARIA BARCHA GIROLDO SALES**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA,  
UTILIZANDO O AZUL DE METILENO COMO AGENTE  
FOTOSENSIBILIZANTE SOBRE O CRESCIMENTO  
DE *Candida albicans***

São José dos Campos - SP  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LIGIA MARIA BARÇA GIROLDO SALES**

**"Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, utilizando o azul de metileno como agente fotossensibilizante sobre o crescimento de *Candida albicans*"**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Maricília Silva Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Egberto Munin

São José dos Campos, SP

2006

S155e

Sales, Lúgia Maria Barcha Giroldo

Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, utilizando o azul de metileno como agente fotossensibilizante, sobre o crescimento de *Candida albicans*/ Lúgia Maria Barcha Giroldo Sales. São José dos Campos, 2006.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. *Candida albicans* 2. Fotoquimioterapia 3. Azul de metileno I. Costa, Maricilia Costa, Orient., II. Munin, Egberto, III. Título

CDU: 616.934

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Aluna:



Data: 19/12/2006

**“EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA, UTILIZAND O AZUL DE METILENO COMO AGENTE FOTOSSENSIBILIZANTE, SOBRE O CRESCIMENTO DE CÂNDIDA ALBICANS”**


Lígia Maria Barcha Giroldo

Banca Examinadora:

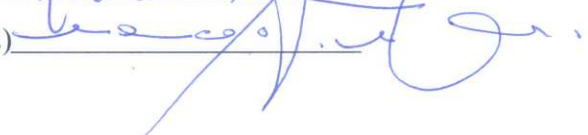
Prof. Dr. **EGBERTO MUNIN** (UNIVAP)



Prof<sup>ª</sup>. Dra. **MARICÍLIA SILVA COSTA** (UNIVAP)



Prof. Dr. **MARCELO GIOVEDI FUNKE** (UNINOVE)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

**“EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA, UTILIZANDO O AZUL DE METILENO COMO AGENTE FOTOSSENSIBILIZANTE SOBRE O CRESCIMENTO DE *Candida albicans*”**

**RESUMO**

Devido ao aumentado número de pacientes imunocomprometidos, as infecções associadas ao patógeno do gênero *Candida* têm aumentado dramaticamente nos últimos anos. Para proliferar, *C. albicans* produz o tubo germinativo, estrutura que se estende das células, essencial para a sua virulência. Neste trabalho, foi estudado o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT), sobre a formação do tubo germinativo e a sobre a permeabilidade da membrana de *Candida albicans*. PACT é um processo que combina luz e uma droga fotossensibilizante, produzindo uma resposta de fototoxicidade sobre as células tratadas, geralmente via danos oxidativos. O potencial da PACT para promover a erradicação de microrganismos tem sido progressivamente mais aceita. A formação do tubo germinativo foi induzida com soro de cabra após diferentes tratamentos com azul de metileno (AM) e Laser (684nm). Nossos resultados demonstraram que a combinação de AM e Laser (684nm) promoveu uma queda no crescimento da *Candida albicans*. A inibição foi mais pronunciada na presença de AM 0.05mg/ml, com uma densidade de energia de 28J/cm<sup>2</sup>. A terapia fotodinâmica, usando AM promoveu tanto a inibição da formação do tubo germinativo, como o aumento da permeabilidade da membrana em *C. albicans*. Assim, nossos resultados sugerem que o AM, combinado com a luz, em um comprimento de onda específico, pode inibir o crescimento da *Candida albicans*, por um mecanismo envolvendo a formação de células com membranas plasmáticas comprometidas.

Palavras Chave: Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT), *Candida albicans*, Azul de metileno, Tubo germinativo.

**“EFFECT OF PHOTODYNAMIC ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, USING METHYLENE BLUE AS A PHOTSENSITIZING DRUG ON THE *Candida albicans* GROWTH”**

**ABSTRACT**

Due to the augmented number of immunocompromised patients, the infections associated to the pathogen of the genus *Candida* have increased dramatically in the recent years. In order to proliferate, *C. albicans* can produce a germ tube formation extending from the cells, which is essential to virulence. In this work we studied the effect of the photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), a potential antimicrobial therapy against both the germ tube formation and the permeability of *Candida albicans* membrane. PACT is a process that combines light and a photosensitizing drug, promoting phototoxic response on the treated cells, in general via oxidative damage. The potential of PACT to promote microbial eradication are progressively more accepted. Germ tube formation was induced by goat serum after different treatments with Methylene blue (MB) and Laser (684nm). Our results demonstrated that the combination of MB and Laser (684nm) promoted a decrease in the *Candida* growth. The inhibition was more pronounced in the presence of 0.05mg/ml MB, using an energy density of 28J/cm<sup>2</sup>. Photodynamic therapy, using MB promoted both the inhibition of the germ tube formation and the increase in the membrane permeabilization by *C. albicans*. Thus, our results suggest that Methylene blue, combined with light in a specific wavelength, can inhibit the *Candida albicans* growth, by a mechanism involving the generation of cells with compromised plasma membranes.

Key-Words: Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT), *Candida albicans*, Methylene blue, Germ tube.

## Lista de ilustrações

Figura 1: Células da levedura <i>Candida albicans</i> .....	3
Figura 2: Células da levedura <i>Candida albicans</i> , mostrando células leveduriformes e a formação dos tubos germinativos.....	5
Figura 3: Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.....	9
Figura 4: Estrutura molecular do Azul de Metileno.....	8
Figura 5. Efeito do Azul de Metileno antes (O) e após a irradiação com laser diodo.....	10
Figura 6. Efeito do aumento da densidade de energia na ausência (O) e na presença de Azul de Metileno.....	11
Figura 7. Formação de tubo germinativo na presença de diferentes concentrações de AM.....	13
Figura 8. Formação do tubo germinativo em <i>Candida albicans</i> antes e após a irradiação, na ausência (A e B) e na presença de AM 0,05mg/ml (C e D).....	25
Figura 9. Intensidade de Fluorescência do SYTOX Green na presença de células de <i>C. albicans</i> não irradiadas.....	27
Figura 10. Intensidade de Fluorescência do SYTOX Green na presença de células de <i>C. albicans</i> irradiadas com laser diodo (684nm).....	29
Figura 11. Intensidade de Fluorescência do SYTOX Green em 530nm, em células de <i>C. albicans</i> não irradiadas (O) e irradiadas com laser diodo (684nm).....	30
Figura 12: Relação entre suspensões de <i>C. albicans</i> irradiadas e não irradiadas para medidas de Florescência.....	35



## **Lista de abreviaturas e símbolos**

- AM: Azul de Metileno
- AsGaAlP: Arseneto de Gálio Alumínio
- ATCC: American Type Culture Collection
- ATP: Adenosina trifosfato
- DE: Densidade de Energia
- DNA: Acido desoxirribonucléico
- J: Joules
- Laser: light amplification by stimulated emission of radiation
- ml: mililitro
- mW: miliWatts
- NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
- nm: nanometro
- $^1\text{O}_2$ : Oxigênio singleto
- P: Potência
- PACT: Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
- TFD: Terapia Fotodinâmica
- UFC: Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Fungos.....	1
1.2	<i>Candida albicans</i> .....	4
1.3	Terapia Fotodinâmica.....	8
1.4	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT).....	10
1.5	Laser.....	11
1.6	Azul de Metileno.....	13
2	Objetivo.....	16
3.	Material e Métodos .....	17
3.1	Microrganismos e condições de crescimento .....	17
3.2	Tratamento com Azul de Metileno (AM).....	17
3.3	Análise da formação do tubo germinativo.....	18
3.4	Determinação da fluorescência utilizando SYTOX Green como indicador da permeabilidade celular.....	19
3.5	Análise Estatística.....	20
4	Resultados .....	21
5	Discussão .....	31
6	Conclusão .....	37
7	Referências.....	38

# 1 Introdução

## 1.1 Fungos

A palavra fungo é derivada do latim *Fungum*, com origem desconhecida (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Whittaker (1969) enquadrou os fungos dentro do reino *Fungi*, observando que estes não realizam fotossíntese, não acumulam amido (substância de reserva energética em células vegetais), não apresentam celulose em sua membrana plasmática (apenas os fungos aquáticos) e não possuem tecidos verdadeiros (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Os fungos são indivíduos eucarióticos, apresentando, assim, organização celular e DNA delimitado por dupla membrana. Geralmente, apresentam parede celular quitinosa. Não possuem clorofila e plastídios. Suas células atingem diâmetro igual ou maior que 1 $\mu$ m. São seres aeróbios, ou seja, necessitam de oxigênio livre. São heterótrofos, pois retiram matéria-prima e energia da matéria orgânica e armazenam glicogênio. As formas primitivas dependem do meio aquático e, as formas mais evoluídas apresentam dependência menor (SIDRIM; MOREIRA, 1999, LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Os fungos se comunicam com o meio externo através da parede celular. Esta parede é formada por polissacarídeos associados aos polipeptídios, constituindo as glicoproteínas da parede celular. As glicoproteínas desempenham, tanto papel enzimático, como estrutural. São indispensáveis nas vias metabólicas, na manutenção da homeostase e nas inter-relações celulares, em relação ao

crescimento e a reprodução. Estruturalmente, a membrana celular dos fungos é semelhante às membranas das células animais e vegetais, apresentando duplo folheto lipídico, com proteínas e glicoproteínas dispersas (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Nos fungos a quantidade de lipídios é muito variada. Seus lipídios são constituídos de fosfolipídios, triglicerídios e esteróis. No citoplasma algumas organelas são delimitadas por membranas de constituição semelhante à membrana celular, como o retículo endoplasmático, o sistema de Golgi, as vesículas mitocondriais e os vacúolos. Já os ribossomos e os túbulos são apenas agregados de macromoléculas. O núcleo é típico de uma célula eucarionte, menor e com menor quantidade de DNA; apresentando algumas histonas e a persistência de um envoltório nuclear e do nucléolo, durante a mitose. A quantidade de DNA ribossomal é muito importante para alguns fungos. O DNA mitocondrial possui uma grande variedade de tamanhos e organizações, sendo que a quantidade varia de acordo com a fase de crescimento da célula e o número de mitocôndrias presentes em cada fase. Comparando o RNA e o DNA, nota-se que o RNA é absolutamente predominante sobre o DNA (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

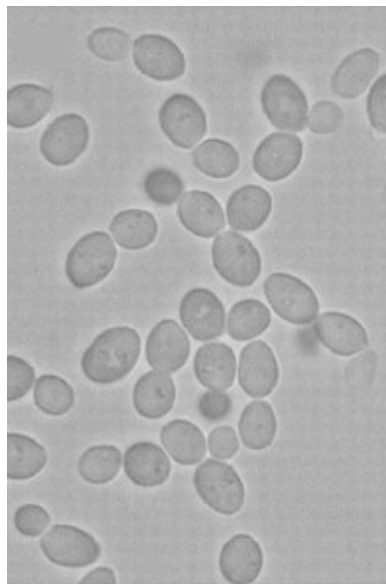
Quanto às proteínas, estas podem estar ligadas de forma covalente a carboidratos, constituindo as glicoproteínas, que fazem parte da membrana plasmática e da parede celular; ou, ainda, serem excretadas como enzimas para participarem dos processos nutricionais e da patogenicidade de cada espécie fúngica. Os polissacarídeos são os principais carboidratos fúngicos, se apresentando, tanto sob a forma de homopolímeros, como de heteropolímeros.

Podem ser excretados da célula ou fazer parte da composição da membrana plasmática (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

De acordo com a sua morfologia, os fungos podem ser classificados como leveduras ou como fungos filamentosos (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Os fungos filamentosos são constituídos por um conjunto de estruturas tubulares, denominadas hifas, podendo apresentar esporos. Individualmente, as hifas só podem ser vistas ao microscópio, entretanto quando ocorre um acúmulo de hifas, estas são visíveis a olho nu (PELCZAR, 1996).

As leveduras são fungos unicelulares com formas variadas tais como, esférica, ovóide, elipsóide ou filamentosa (Figura 1).



**Figura 1: Células da levedura *Candida albicans***  
Palmer, Cashmore e Sturtevant,( 2003).

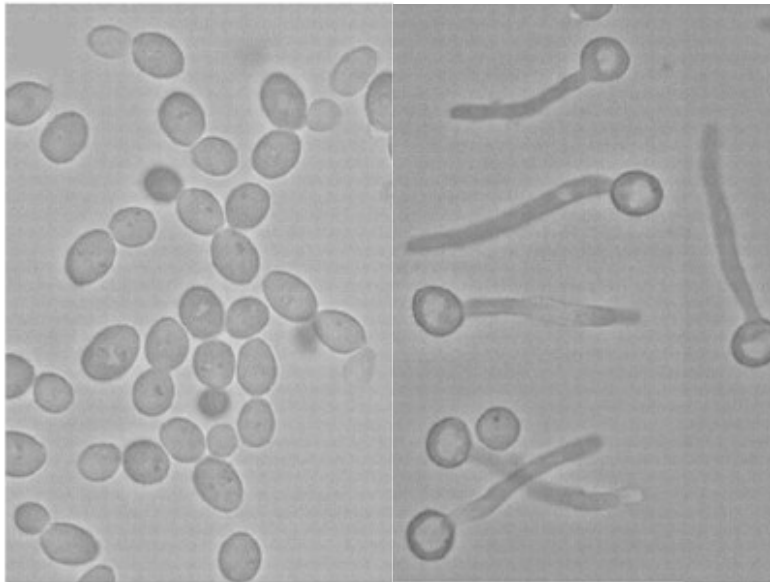
## 1.2 *Candida albicans*

Em 1839, Langenbek isolou de aftas de pacientes portadores de tifo, a levedura, hoje conhecida como *Candida albicans* (ZAITZ et al., 1998, SIDRIM; MOREIRA, 1999). Langenbeck sugeriu, erroneamente, que o fungo era o agente causador da doença, mas em 1842, David Gueby identificou o fungo como o causador da candidose oral. O estudo detalhado fez com que Berg (1846), de fato, definisse o fungo como o causador da candidose oral, sendo denominado *Oidium albicans*, por Charles Robin (1853). Por fim, Berkout (1923) transferiu o fungo para o gênero *Candida*, criando a espécie *albicans*, surgindo assim, uma nova denominação, *Candida albicans*, utilizada até os dias atuais (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

A *Candida albicans* é uma levedura com forma oval a arredondada, que em sua forma invasiva produz hifas septadas, com septos espaçados e, próximo aos septos aparecem células leveduriformes. Cultivada em ágar Sabouraud apresenta coloração creme, com aspecto cremoso. A análise microscópica permite observar a presença de células ovais ou arredondadas, podendo apresentar pseudo-hifas (TRABULSI et al., 2005).

*Candida albicans* é um microrganismo difásico, podendo apresentar-se como uma típica célula leveduriforme (blastósporo), reproduzindo-se por brotamento, septação ou fragmentação da hifa; ou, ainda, como micélio, estruturas ramificadas geradas a partir do tubo germinativo, blastósporo ou corpo hifal. Transições reversíveis são observadas entre estas diferentes formas (BARTELS

et al., 1968, JONES, 1990). Alguns autores têm demonstrado que a transição entre o crescimento por brotamento e a formação de hifas é essencial para a virulência da *Candida albicans* (LO et al., 1997, BAHN; SUNDSTROM, 2001, ROCHA et al., 2001) e, ainda, que o primeiro estágio para esta transição é a formação do tubo germinativo (figura 2).



**Figura 2: Células da levedura *Candida albicans*, mostrando células leveduriformes e a formação dos tubos germinativos (PALMER; CASHMORE; STURTEVANT, 2003).**

A capacidade da *Candida albicans* invadir tecidos saudáveis, crescer a 37°C e impedir a fagocitose está relacionada à sua virulência (SALAS; GARCÍA; MIRANDA, 2000, SIDRIM; MOREIRA, 1999). Estes eventos são causados, principalmente, pela produção de enzimas como fosfolipases, proteinases, esterases, proteases aspárticas secretoras e pela formação de tubos germinativos

(SALAS; GARCÍA; MIRANDA, 2000). A fosfolipase, que hidrolisa os fosfolipídios gerando os lisofosfolipídios é somente produzida pela espécie *albicans*. Esta enzima está localizada na superfície da levedura e nas extremidades do tubo germinativo (OLIVEIRA et al., 1998). A tendência das blastoconídias (células ovais leveduriformes) se modificarem para uma estrutura micelial filamentosa está sendo amplamente estudada. O mecanismo de controle de regulação destas mudanças, ainda está muito longe de ser elucidado (GIL; POMÉS; NOMBELA, 1990).

A formação de tubos germinativos pode ser determinada por diferentes indutores, incluindo o soro (ODDS, 1988). Este efeito foi, inicialmente descrito por REYNOLDS; BRAUDE (1956), sendo, posteriormente utilizado para o diagnóstico de infecções causadas por *Candida albicans* (TASCHDJIAN; BURCHALL; KOZINN, 1960).

Denomina-se candidose, a infecção causada por *Candida spp.* Hoje em dia, devido ao grande número de pacientes imunodeprimidos, a *Candida* é o principal agente causador de doenças micóticas no homem. Dentre todas as espécies de *Candida* descritas, a responsável pelo maior número de infecções é a *Candida albicans* (SOUZA et al., 2006, RUDENSKY et al., 2004, TZUNG et al., 2000, TRABULSI et al., 2005). Apesar de estar presente no meio ambiente, fazendo parte da microbiota do homem, esta levedura pode vir a se tornar patogênica, por ser um organismo oportunista, sendo a boca, a vagina e o esôfago, as principais regiões do corpo apresentando infecções por *Candida ssp.*

A capacidade de algumas espécies de *Candida* crescerem a 37°C, formando hifas e pseudo-hifas com mais de 200µm de comprimento dificultando a



fagocitose, são algumas características que fazem com que algumas espécies de *Candida* se tornem patogênicas (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Indivíduos em condições que imuno deprimem, tais como: pacientes submetidos a tratamentos quimioterápicos, antibacterianos; gestantes; idosos; indivíduos que sofreram cirurgia de transplante ou qualquer outro fator que debilite a imunidade do corpo, apresentam maiores chances de desenvolver a candidose.

É rara a infecção crônica por *Candida ssp* em mucosa, acometendo, na maioria das vezes, indivíduos imunodeficientes ou que tenham alguma anomalia genética ou endócrina. Entretanto, a candidose cutânea generalizada, na maioria das vezes é crônica, sendo observada em indivíduos com deficiências nutricionais ou imunodeprimidos. A *Candida albicans* é o agente mais freqüente nestas infecções (TRABULSI et al., 2005).

Aproximadamente 20-40% dos pacientes com câncer apresentam candidose sistêmica e, aproximadamente, 25% dos pacientes que receberam transplante de medula óssea também apresentam infecção por *Candida*.

O número de infecções nosocomiais causadas por leveduras do gênero *Candida* está aumentando de maneira considerável nos últimos anos. Frequentemente, estes organismos oportunistas são isolados de pacientes em unidades de terapia intensiva, como aqueles tratados com terapia antimicrobiana de amplo espectro (PFALLER et al., 1998, VINCENT et al., 1998). Nos Estados Unidos, as leveduras do gênero *Candida* ocupam a quarta posição dentre os patógenos nosocomiais encontrados em infecções da corrente sanguínea, estando a candidose associada às altas taxas de mortalidade (CORNWELL et al., 1995, HOERAUF et al., 1998, JARVIS et al., 1995, SAFRAN; DAWSON, 1997,

VOSS et al., 1997). Dentre as espécies do gênero *Candida* encontradas na prática clínica, *Candida albicans* é a de maior prevalência. Frequentemente, *Candida albicans* é susceptível aos agentes antifúngicos do grupo azol. Entretanto, o número de espécies mais tolerantes, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* têm aumentado, provavelmente devido ao aumentado uso de itraconazol e fluconazol, as drogas antifúngicas mais utilizadas em candidose (BERROUANE; HERWALDT; PFALLER, 1999, ROCCO; REINERT; SIMMS, 2000, SAFRAN; DAWSON, 1997). Assim, há uma grande necessidade de novas terapias antimicrobianas.

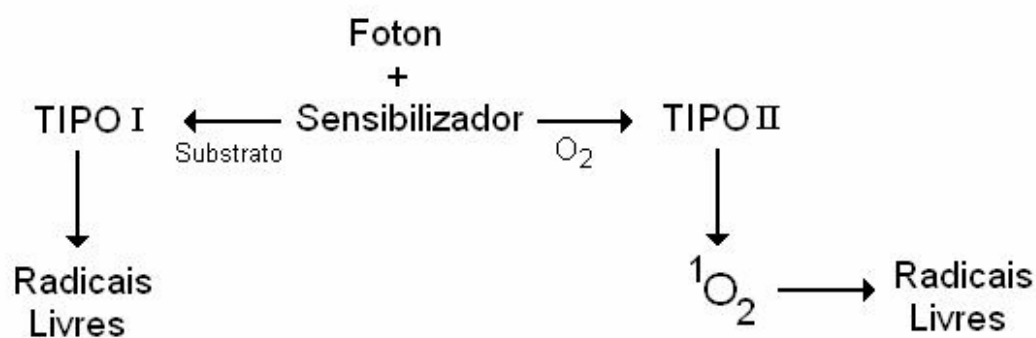
### **1.3 Terapia Fotodinâmica**

A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste na administração local ou sistêmica de uma substância fotossensível, podendo ser uma droga ou um pigmento, cuja característica é absorver a luz com elevada eficiência, em determinada região do espectro visível. Quando fotoativadas, estas moléculas são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas (MACHADO, 2000). Esta terapia apresenta grande potencial para o tratamento de doenças neoplásicas e não neoplásicas (DOUGHERTY et al., 1998, DOUGHERTY, 2002).

Na TFD, a interação da luz em um comprimento de onda adequado, um agente fotossensibilizante não-tóxico e o oxigênio, gera uma espécie reativa capaz

de inviabilizar as células. Esta espécie reativa é o oxigênio singlete (MACHADO, 2000; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

Quando o agente fotossensibilizante é excitado em um comprimento de onda apropriado, gera o estado triplete excitado; este transfere elétrons para os componentes do sistema, formando radicais livres, oxidando moléculas biológicas. Um outro mecanismo de ação ocorre quando o fotossensibilizante no estado triplete reage com o oxigênio no estado fundamental, gerando o oxigênio singlete, um agente altamente citotóxico (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001) (figura 3).



**Figura 3: Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.** As reações do tipo I envolvem a reação direta do fotossensibilizante no estado triplete sobre o substrato (biomolécula). As reações do tipo II ocorrem quando o fotossensibilizante reage com o oxigênio, produzindo <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

O oxigênio singlete é simbolizado por <sup>1</sup>?<sub>g</sub> e <sup>1</sup>Σ<sup>+</sup><sub>g</sub>. O estado <sup>1</sup>?<sub>g</sub> apresenta maior meia-vida, enquanto que o estado <sup>1</sup>Σ<sup>+</sup><sub>g</sub> decai rapidamente para o estado <sup>1</sup>?<sub>g</sub>. Devido a estas características, a forma de oxigênio singlete mais importante para os sistemas biológicos é o estado <sup>1</sup>?<sub>g</sub>, ou <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (MARTINEZ; MEDEIROS; DI MASCIO, 2000).

Como o  $^1\text{O}_2$  é muito reativo, é capaz de oxidar muitas funções orgânicas ricas em elétrons (ALMEIDA, 2004). Os principais alvos são moléculas fundamentais, tais como: os ácidos graxos insaturados, as proteínas e o DNA (MARTINEZ; MEDEIROS; DI MASCIO, 2001).

O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  em solução é relativo à natureza do solvente. Em sistemas biológicos, o oxigênio singlete apresenta tempo inferior a  $0,04\mu\text{s}$ , com uma pequena migração de  $0,02\mu\text{m}$  (DOUGHERTY et al., 1998, MACHADO, 2000).

Mesmo percorrendo uma distância pequena e com tempo de vida curto, a morte ou a inviabilização de células tumorais tem sido evidenciada de diversas maneiras. Sítios ricos em elétrons como a guanina, cadeias laterais de aminoácidos, contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídeos insaturados, são os mais facilmente modificados. Desta forma, danos à membrana plasmática, à mitocôndria e aos lisossomos, representam as maiores lesões causadas pela maioria dos agentes fotossensibilizantes, produzindo conseqüências bastante acentuadas (MACHADO, 2000, DOUGHERTY et al, 1998). Devido ao seu tempo de vida muito curto, não é de se surpreender que o tipo de resposta atingida pela ativação dos fotossensibilizantes dependa de sua localização intracelular (ALMEIDA, 2004). Assim, os danos celulares iniciais devem ocorrer em regiões muito próximas ao local de formação do oxigênio singlete.

A TFD pode induzir morte celular, tanto por meio de necrose como de apoptose (OLEINICK; EVANS, 1998).

## 1.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT)

Progressivamente, o potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) para promover a destruição de microorganismos tem sido mais aceito. Esta técnica, assim como a TFD, envolve a produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio, produzindo danos às células dos microorganismos. A primeira demonstração dos efeitos da TFD sobre microorganismos foi realizada por Raab (1900), demonstrando a toxicidade de corantes de acridina sobre *Paramecium caudatum*. Atualmente, tem sido demonstrado o efeito antimicrobiano de uma variedade de compostos fotossensibilizantes sensíveis à luz (WAINWRIGHT, 1998). A eficiência de drogas fotossensibilizantes como agentes bactericidas tem sido demonstrada, tanto *in vitro* (WAINWRIGHT et al., 1999, MAISCH et al., 2005) quanto *in vivo* (KÖMERIK et al., 2003, WONG et al., 2005). Entretanto, apesar do grande interesse por PACT, poucos estudos estão disponíveis sobre o efeito de fotossensibilizantes sobre fungos de importância médica. Recentemente, Friedberg e colaboradores (2001) demonstraram a atividade fungicida do composto Green 2W, irradiado com luz (630nm) sobre *Aspergillus fumigatus*. Os efeitos de diversas drogas fotossensibilizantes sobre *Candida albicans* foram recentemente demonstrados por diferentes autores (BLISS et al., 2004, CHABRIER-ROSELLÓ et al., 2005, DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005, LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE., 2005). Entretanto, apesar do crescente interesse por PACT, ainda não são conhecidos os mecanismos celulares específicos que participam deste evento.

## 1.5 Laser

Entre o final da década de 1940 e o início da década de 1960, a física quântica apresentou várias descobertas, entre elas o laser.

A palavra “laser” é o acrônimo de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, ou seja, “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação” (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2003, SERWAY, 1996).

A luz do laser é emitida do mesmo modo que qualquer outra fonte luminosa, ou seja, quando os elétrons de um elemento sofrem uma transição para um estado quântico de maior energia e retornam para um estado quântico de menor energia. A diferença do laser para outra fonte luminosa, está na ocorrência da emissão estimulada. Emissão estimulada ocorre quando um elétron que se encontra em um estado excitado recebe energia  $hf$  de um fóton e esta energia estimula o elétron a passar para seu estado fundamental, emitindo assim outro fóton de energia  $hf$ . Como os elétrons do laser agem em conjunto, a luz produzida apresenta características especiais (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2003).

É uma luz monocromática, produzindo linhas espectrais muito estreitas. Altamente direcional, coerente, podendo ser focalizada em uma região muito pequena com grande precisão, concentrando grande quantidade da energia luminosa (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2003).

Os comprimentos de onda dos lasers podem cobrir do infravermelho ao ultravioleta. Cada tipo de laser emite em um determinado comprimento de onda.

Os efeitos causados pelos lasers podem ser fotoquímicos, fototérmicos, fotomecânicos ou fotoelétricos, dependendo das propriedades ópticas do tecido irradiado, do comprimento de onda da radiação de excitação, da densidade de energia e da potência. Conhecendo todos os parâmetros é possível prever, através de modelos físicos e matemáticos, os possíveis efeitos causados sobre o tecido irradiado.

O efeito fotoquímico está associado a moléculas (cromóforos) que ao serem estimuladas absorvem energia e passam para um estado excitado. Estes cromóforos estão presentes nos tecidos biológicos, ou podem ser alguma substância fotossensível (ALMEIDA et al., 2004).

Os lasers podem ser divididos em dois grandes grupos, de acordo com suas características particulares: lasers de alta potência e de baixa potência (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998).

Os lasers de alta potência, ou lasers cirúrgicos, como são chamados na medicina por substituírem o bisturi do cirurgião, são utilizados com a finalidade de cortar, coagular e evaporar tecidos.

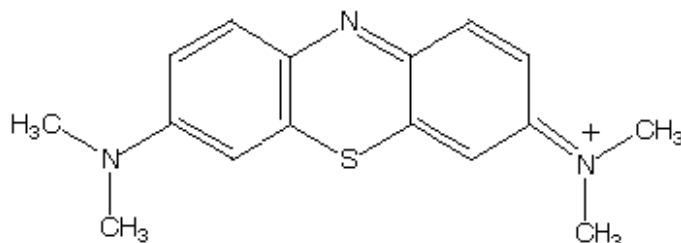
Os lasers de baixa potência, ou biomoduladores são utilizados para a excitação das funções celulares. Estes lasers, por produzirem baixos níveis de energia, provocam somente efeitos fotoquímicos, não alterando a temperatura no tecido irradiado. Seu principal efeito é o aumento do metabolismo celular (LOPES; BRUGNERA, 1998).

O laser de baixa potência age principalmente sobre a mitocôndria e a membrana plasmática, através de fotorreceptores que absorvem fótons e

desencadeiam reações químicas, como a síntese de ATP e a transcrição e a replicação do DNA (KARU, 1987).

## 1.6 Azul de Metileno

O azul de metileno (AM) é um corante catiônico da classe das fenotiazinas. É solúvel tanto em água como em álcool. Sua fórmula molecular trihidratada é  $C_{16}H_{18}N_3S \cdot 3H_2O$  e massa molar 337,51 g/mol (figura 4). Em sua forma oxidada é azul ( $MB^+$ ), sendo facilmente reduzido à forma hidrogenada (azul de leucometileno,  $LB^+$ ), incolor.



**Figura 4: Estrutura molecular do Azul de Metileno.**

[pcserver.iqm.unicamp.br/.../experimento1.html](http://pcserver.iqm.unicamp.br/.../experimento1.html)

Desde o começo do século tem-se estudado o emprego de corantes como agentes terapêuticos, como é o caso do Azul de Metileno. Raab (1900) descreveu que microorganismos morriam na presença de certos corantes e luz solar, reportando o princípio da terapia fotodinâmica (MACHADO, 2000).



O AM tem sido utilizado tanto como corante bacteriológico, como indicador. Seu estudo tem despertado interesse por apresentar propriedade eletrocatalítica em relação ao NADH, uma coenzima das enzimas da classe das desidrogenases, que tem participação em várias reações enzimáticas (SHIAVO; PEREZ; KUBOTA, 2000).

Em células de músculo liso atua como um agente químico que facilmente atravessa a membrana plasmática inibindo a iNOS (óxido nítrico sintase induzida) e a guanilato ciclase. O AM tem sido utilizado para o tratamento da metemoglobinemia, da malária e do priapismo induzido farmacologicamente, tendo se mostrado seguro para o uso em humanos (KWOK; HOWES, 2006). Recentemente, foi demonstrado o uso do azul de metileno como agente fotossensibilizante sobre *Candida albicans* (SOUZA et al., 2006).

## 2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana, utilizando o azul de metileno como agente fotossensibilizante sobre a levedura *Candida albicans*. Neste trabalho foram escolhidos como parâmetros para a avaliação da eficiência da metodologia, tanto a permeabilidade da membrana, como a capacidade de formação de tubo germinativo após diferentes tratamentos.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Microrganismos e condições de crescimento**

Neste trabalho foi utilizada a cepa *Candida albicans* ATCC 10231 de origem FIOCRUZ, gentilmente cedida pelo laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde - UNIVAP. As culturas de *Candida albicans* foram semeadas em agar Sabouraud dextrose (Merck) e incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C. Após 48 horas de incubação, uma colônia foi cuidadosamente removida e ressuspendida em solução fisiológica estéril (NaCl 0.85%) a uma densidade de  $1-5 \times 10^5$  ou  $1-5 \times 10^7$  células/ml, para as medidas de formação de tubo germinativo e fluorescência, respectivamente.

#### **3.2 Tratamentos com azul de metileno (AM)**

Suspensões de *Candida* foram aplicadas em uma placa de microtitulação (96-wells) e incubadas no escuro por 5 minutos, na presença de diferentes concentrações de AM, variando entre 0,01 a 5mg/ml, em um volume final de 0,2ml. Células incubadas apenas em solução fisiológica estéril foram utilizadas como controle. Após este período, a tampa da placa foi removida, e as placas foram irradiadas de acordo com Souza et al. (2006). A fonte de luz utilizada foi um laser diodo InGaAl (Photon Laser, DMC, São Carlos, Brazil), com potência de 35mW e comprimento de onda de 684nm.

O feixe laser iluminava uma área de  $0,38\text{cm}^2$ , resultando em uma densidade de energia de  $28\text{J}/\text{cm}^2$ . Em alguns experimentos, a densidade de energia foi alterada, variando o tempo de irradiação. Alíquotas de  $50\mu\text{l}$  foram retiradas antes e após a irradiação para determinação do número de unidades formadoras de colônias (CFU). As alíquotas foram diluídas 200 vezes em solução fisiológica estéril, e um volume de  $50\mu\text{l}$  foi semeado sobre uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose. As colônias foram crescidas a  $37^\circ\text{C}$  por 48h e o número de unidades formadoras de colônias por ml (CFU/ml) foi determinado. Todos os experimentos foram realizados no escuro em condições assépticas.

### **3.3 Análise da formação do tubo germinativo**

A formação do tubo germinativo foi induzida utilizando soro de cabra. Após os diferentes tratamentos, alíquotas de  $50\mu\text{l}$  ( $10^5$  células/ml) foram retiradas e transferidas para tubos estéreis contendo 2ml de caldo Sabouraud dextrose, tanto na ausência, quanto na presença de soro de cabra 10% (v/v). O conteúdo dos tubos foi agitado e incubado em  $37^\circ\text{C}$ , por 3 horas. O número total de células (células/ml) e tubos germinativos foi determinado em câmara de Neubauer.

A quantidade de tubos germinativos formados foi expressa como uma porcentagem do total de tubos germinativos em relação ao número total de células.

### **3.4 Determinação da fluorescência utilizando SYTOX Green como indicador da permeabilidade celular**

Após os diferentes tratamentos, alíquotas de 50 $\mu$ l ( $10^7$  células/ml) foram retiradas, diluídas em 0,950ml de solução fisiológica estéril e centrifugadas por 20 min (13.000rpm) em uma microcentrífuga. O precipitado foi lavado em salina estéril e ressuspenso em 0,2ml de solução fisiológica estéril, contendo 5 $\mu$ M SYTOX Green (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg.). Esta solução foi incubada no escuro por 1 hora, em 37°C.

Para a determinação da fluorescência, foi utilizada uma fibra óptica com núcleo de 600 $\mu$ m da Superguide G fiber SFS 600 /660T (*Fiberguide Industries*) e especificação do fabricante para se trabalhar na faixa do espectro entre 0,2 $\mu$ m e 0,7 $\mu$ m. Foi utilizada uma cubeta de quartzo, posicionada perpendicularmente ao feixe de excitação para coleta da fluorescência gerada.

A luz coletada foi acoplada a um espectrômetro de ¼ m (Oriel Instruments, modelo MS257), com grade de difração de 600 linhas/mm. Um detector tipo CCD (*Charge Coupled Device*) intensificado com 256 x 1024 pixels foi conectado à saída de detecção do monocromador. O tempo de integração do sinal foi de 30ms por aquisição, controlado por um gerador de pulsos e atrasos modelo DG535 (Stanford Research). Foram realizadas 100 aquisições por medida, sendo totalizadas 3 medidas por amostra. A amostra foi excitada com o comprimento de onda de 488nm emitido por um laser de argônio acoplado à fibra óptica.

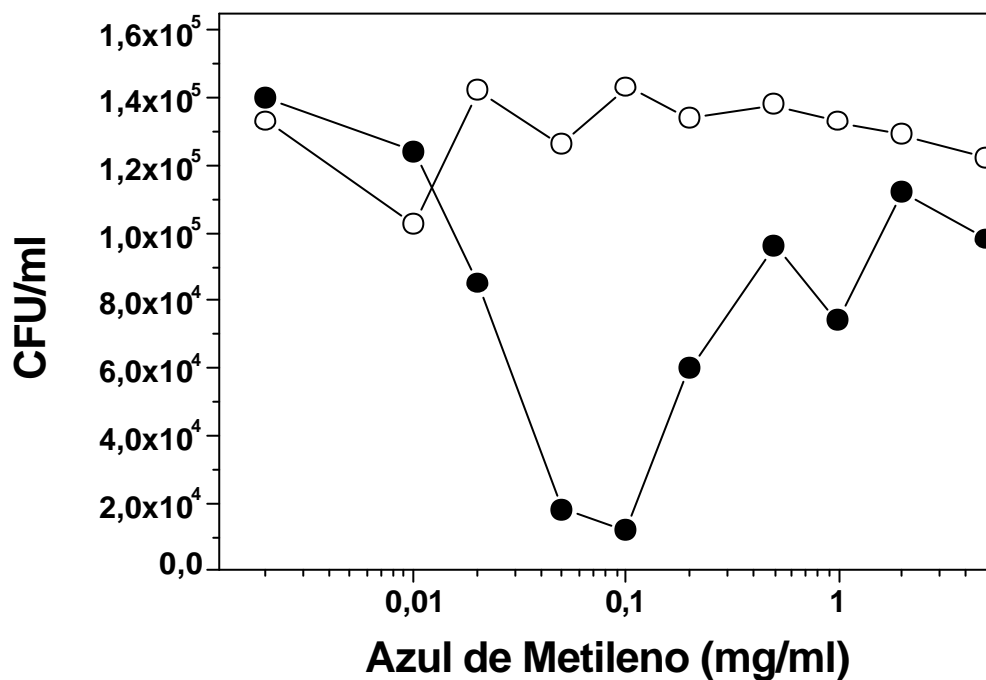
### 3.5 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para análise estatística das variáveis estudadas, foi aplicado o teste t student para comparação entre as linhagens e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo cálculo das diferenças mínimas significativas entre as médias, realizado pelo método de Tukey-Kramer. Valores de  $P < 0.01$  foram considerados significativos.

## 4 Resultados

O efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando o azul de metileno (AM), como agente fotossensibilizante sobre a levedura *Candida albicans* foi avaliado em diferentes condições experimentais.

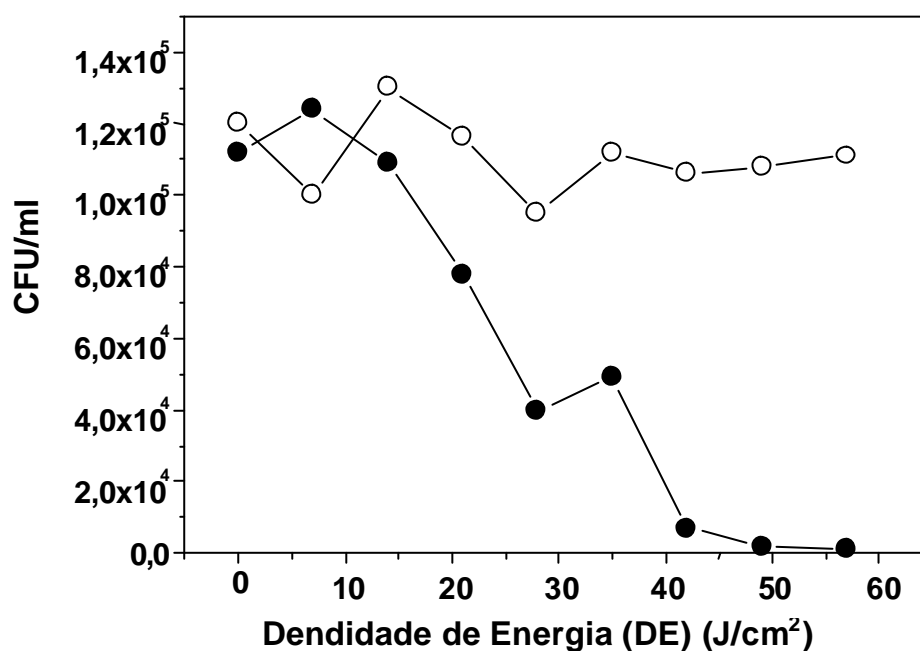
Foi observado que, na ausência da irradiação o aumento da concentração do AM não modificou o número de unidades formadoras de colônias (CFU/ml) (figura 5).



**Figura 5.** Efeito do Azul de Metileno antes (O) e após a irradiação com laser diodo (●). Suspensões de *Candida albicans* ( $1-5 \times 10^5$  células/ml) foram irradiadas com laser diodo (684nm) com uma densidade de energia de  $28\text{J}/\text{cm}^2$ . Os valores mostrados são representativos de 4 experimentos independentes.

Entretanto, após a irradiação com laser diodo (684nm) com densidade de energia de  $28\text{J}/\text{cm}^2$ , foi observada a progressiva diminuição do número de colônias. A diminuição do número de CFUs foi mais pronunciada em concentrações de AM entre 0,05 e 0,1mg/ml (figura 5), inibindo o crescimento em aproximadamente 90%. Curiosamente, na presença de AM em concentrações maiores do que 0,1mg/ml, o efeito da irradiação foi progressivamente diminuído. Este resultado pode estar relacionado ao aumento do coeficiente de extinção do meio, impedindo a radiação laser de iluminar todo o volume do meio de reação.

Quando a concentração de AM foi fixada em 0,1mg/ml, foi observado que o aumento da densidade de energia potencializou o efeito do AM (figura 6).



**Figura 6.** Efeito do aumento da densidade de energia na ausência (O) e na presença de Azul de Metileno 0,1mg/ml (●). Suspensões de *Candida albicans* ( $1-5 \times 10^5$  células/ml) foram irradiadas com laser diodo (684nm). Os valores são representativos de 4 experimentos independentes.

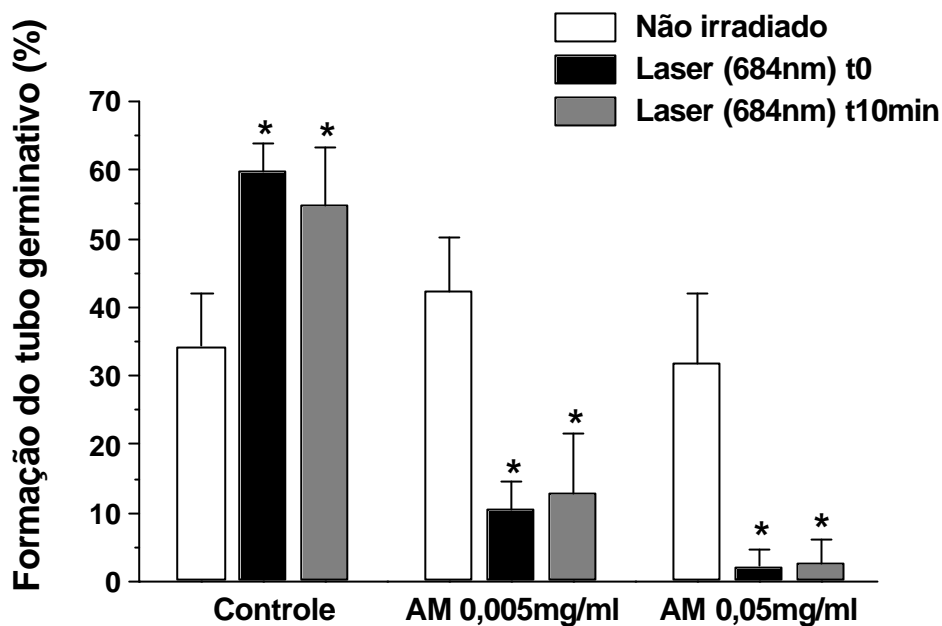


Estes resultados mostraram que a eficiência do AM como agente fotossensibilizante é dependente da concentração de AM utilizada e, ainda, da densidade de energia empregada.

*Candida albicans* é um microrganismo comensal presente na microflora, entretanto sob determinadas condições pode se tornar um patógeno oportunista, causando infecções sistêmicas. Assim, foi observado o efeito da terapia fotodinâmica antibacteriana sobre a formação do tubo germinativo, etapa fundamental para a virulência da *Candida albicans*.

Soro de cabra foi utilizado como agente indutor para a formação do tubo germinativo. Na ausência do soro de cabra, a formação do tubo germinativo não foi observada.

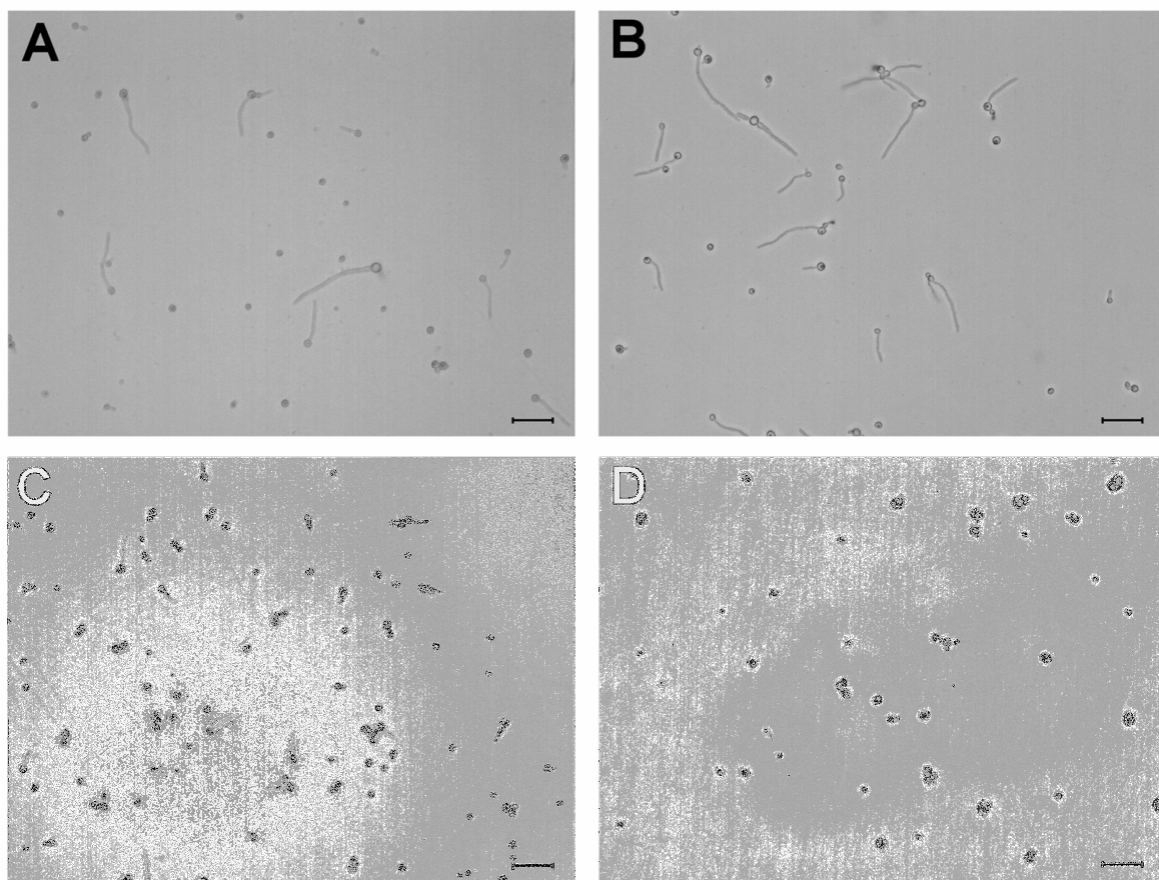
Foi observado que a presença de AM, tanto na concentração de 0,005 como 0,05mg/ml não modificou o número de células formando tubos germinativos de maneira significativa (figura 7). Entretanto, na presença de AM, a irradiação com laser diodo (684nm) promoveu uma diminuição significativa sobre o número de tubos germinativos formados. Esta diminuição foi mais expressiva na presença de AM 0,05mg/ml. Foi observado que a inibição promovida pelo AM após a irradiação não foi dependente do tempo de exposição após a irradiação. Alíquotas de 50µl retiradas imediatamente ou 10 minutos após a irradiação apresentaram o mesmo perfil de inibição sobre a formação do tubo germinativo.



**Figura 7. Formação de tubo germinativo na presença de diferentes concentrações de AM.** Suspensões de *Candida albicans* ( $1-5 \times 10^5$  células/ml) foram irradiadas com laser diodo ( $28\text{J}/\text{cm}^2$ ) na ausência e na presença de AM 0,005 e 0,05mg/ml. Antes da irradiação (não irradiado), imediatamente após (t0) e 10 minutos após (t10) a irradiação, alíquotas do meio foram incubadas na presença de soro de cabra por 3 horas. A formação do tubo germinativo foi expressa como a porcentagem de células formando tubos do número total de células. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (n= 8).

Curiosamente, na ausência de AM, apenas a irradiação com laser diodo (684nm) aumentou a porcentagem de tubos germinativos formados (figura 7). Este aumento foi verificado na mesma proporção, tanto imediatamente, como 10 minutos após a irradiação.

Após os diferentes tratamentos, foi observada a morfologia das células de *Candida albicans* utilizando microscopia.



**Figura 8. Formação do tubo germinativo em *Candida albicans* antes e após a irradiação, na ausência (A e B) e na presença de AM 0,05mg/ml (C e D).** As figuras 8A e 8C representam *C. albicans* não irradiada; e 8B e 8D *C. albicans* irradiada com laser diodo (684nm). Barra, 30 $\mu$ m.

Foi observado que as células não tratadas com AM e irradiadas apresentaram maior crescimento após 3 horas, apresentando numerosos tubos germinativos, quando comparadas às células não irradiadas (figuras 8A e 8B). Entretanto, células tratadas com AM 0,05mg/ml; e irradiadas apresentaram mínima formação de tubos germinativos (figuras 8C e 8D). Após 12 horas de incubação, um grande número de microcolônias e de longas hifas foi observado, tanto nas células não tratadas (controle), quanto naquelas tratadas com AM e não

irradiadas (resultados não mostrados). Na presença de AM 0,05mg/ml, após a irradiação foi observada a presença de células menores com aparência anormal, com reduzido número de microcolônias e mínimo crescimento de hifas.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com AM, quando combinado à irradiação promoveu a redução do crescimento da cultura de *C. albicans*; e, ainda que este tratamento foi capaz de reduzir a formação dos tubos germinativos. Estes resultados indicam que a terapia fotodinâmica antimicrobiana, utilizando AM pode ser uma eficiente metodologia para a diminuição da virulência da *C. albicans*.

Uma vez que o AM, combinado à irradiação com laser diodo promoveu a redução do crescimento da *C. albicans*, em uma etapa seguinte foi avaliada a viabilidade celular após diferentes tratamentos.

O marcador SYTOX Green foi desenvolvido para estudos de viabilidade celular, sendo um marcador de ácidos nucléicos com alta afinidade. SYTOX Green não atravessa as membranas de células vivas, entretanto é capaz de penetrar facilmente células com membranas permeáveis. Este marcador tem sido indicado como um excelente indicador para a determinação de viabilidade celular (ROTH et al., 1997, LEBARON; PARTHUISOT, 1998).

Inicialmente, foi determinada a fluorescência do marcador SYTOX em células de *C. albicans* tratadas com diferentes concentrações de AM, não irradiadas. Para minimizar as possíveis interações entre o marcador e o agente fotossensibilizante (AM), as suspensões foram centrifugadas para remover o AM em excesso no meio de reação.

Em células não irradiadas, foi observada a fluorescência do SYTOX na ausência de AM, apresentando um pico de intensidade em 530nm. Este pico deve estar relacionado à ligação do marcador aos ácidos nucléicos presentes no meio (ROTH et al., 1997). A adição de AM 0,01mg/ml não modificou o perfil da curva de fluorescência, mantendo a mesma intensidade. O aumento da concentração de AM no meio para 0,1mg/ml, não promoveu mudanças significativas sobre a intensidade da fluorescência (figura 9). Entretanto, na presença de AM 0,5mg/ml foi observada a queda na intensidade da fluorescência.

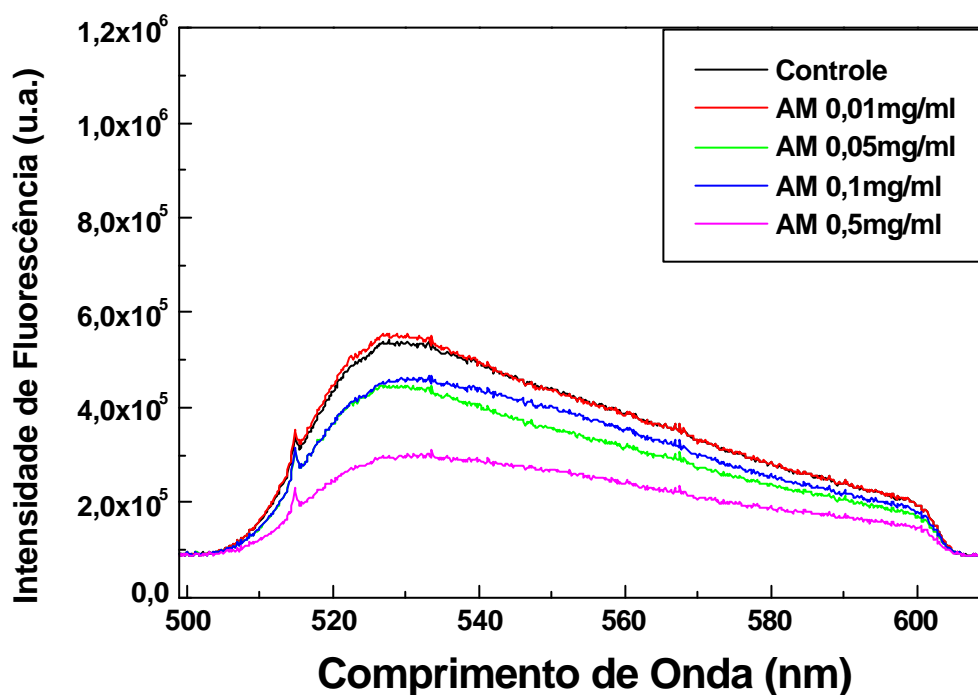
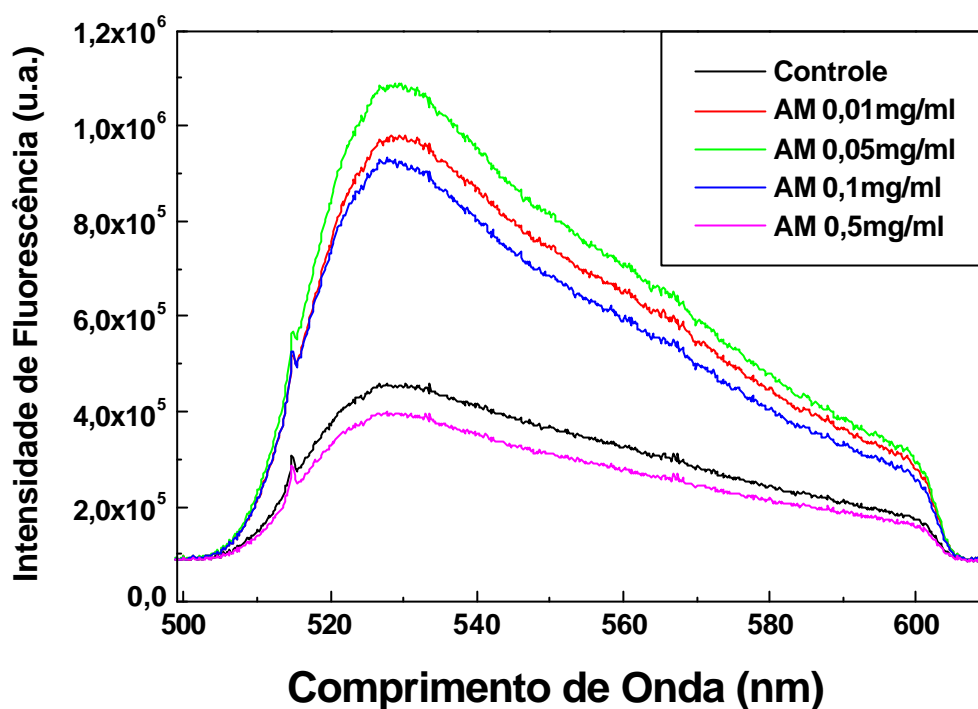


Figura 9. Intensidade de Fluorescência do SYTOX Green na presença de células de *C. albicans* não irradiadas. Os valores expressos são representativos de 4 experimentos independentes.

Estes resultados mostraram que, em células não irradiadas, a presença do AM em concentrações de até 0,1mg/ml não modifica a intensidade de fluorescência de maneira significativa, isto é, não induz a exposição dos ácidos nucléicos intracelulares.

Quando as células não tratadas com AM foram expostas à irradiação, não foram observadas diferenças significativas, quanto à intensidade de fluorescência na região de 530nm (comparar figuras 9 e 10). Entretanto, a adição de AM 0,01mg/ml promoveu um aumento bastante pronunciado sobre a intensidade de fluorescência. Quando as concentrações de AM foram aumentadas para 0,05 e 0,1mg/ml, não foram observadas alterações significativas, em relação ao meio tratado com AM 0,01mg/ml. Novamente, o aumento da concentração de AM para 0,5mg/ml promoveu a redução da fluorescência para valores inferiores aos observados na ausência de AM (controle) (figura 10). É possível que esta queda da fluorescência esteja relacionada a efeitos inespecíficos, envolvendo a interação do SYTOX com as altas concentrações de AM presentes nas células.



**Figura 10. Intensidade de Fluorescência do SYTOX Green na presença de células de *C. albicans* irradiadas com laser diodo (684nm).** Os valores expressos são representativos de 4 experimentos independentes.

Estes resultados indicam que o aumento das concentrações de AM até 0,1mg/ml promove o aumento da permeabilidade das membranas ao SYTOX, indicando o comprometimento das células após o tratamento com a combinação de AM e irradiação. Este efeito fica mais evidente, ao verificarmos a intensidade da fluorescência em 530nm sob os diferentes tratamentos (figura 11). Pode-se observar que a presença de AM (0,01; 0,05 e 0,1mg/ml) promoveu o aumento da permeabilidade da membrana, em paralelo à diminuição do crescimento da cultura de *C. albicans* (comparar figuras 5 e 11).

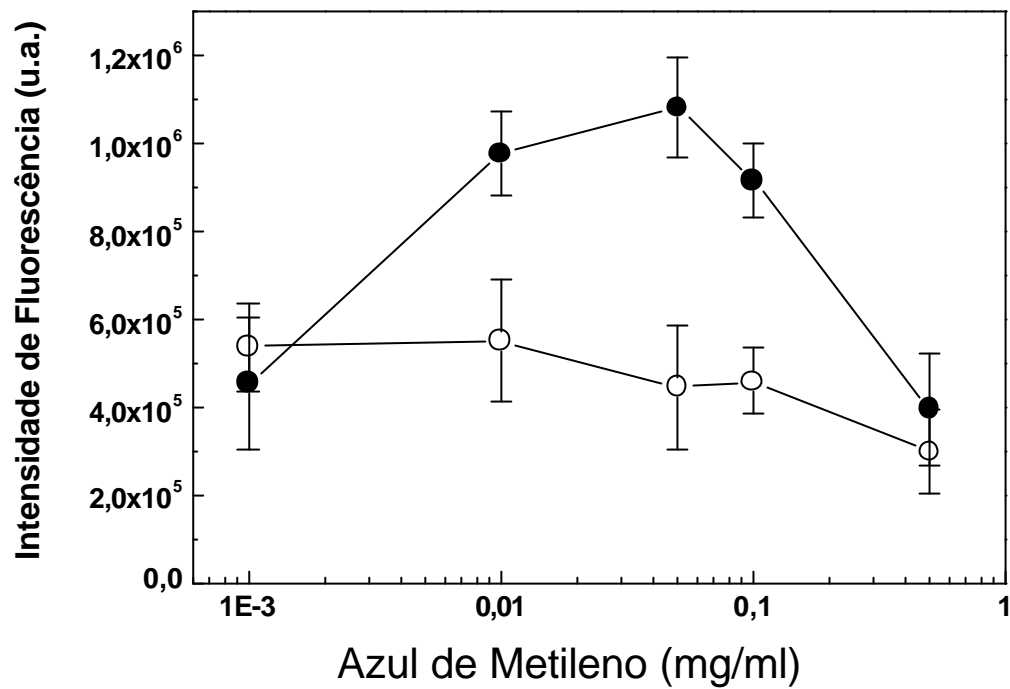


Figura 11. Intensidade de Fluorescência do SYTOX Green em 530nm, em células de *C. albicans* não irradiadas (○) e irradiadas com laser diodo (684nm) (●). Os valores expressos representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=4).

Estes resultados indicam que o aumento da concentração do AM até 0,1mg/ml, após a irradiação promoveu uma queda significativa sobre o crescimento da *C. albicans* e, que esta queda pode estar relacionada ao aumento da permeabilidade das membranas.



## 5. Discussão

Nos últimos anos, vêm aumentando a prevalência de infecções mucocutâneas e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos por espécies de *Candida* (CALDERONE, 2002). Entretanto, tem sido observada uma explosão no número de artigos relatando a resistência a todos os agentes antifúngicos disponíveis (BARCHIESI et al., 1994, BENNETT; IZUMUKAWA; MARR, 2004, HORSBURGH; KIRKPATRICK, 1983, PFALLER et al., 2002, POSTERARO et al., 2006, RUHNKE; SCHMIDT-WESTHAUSEN, 2000, SANGUINETTI et al., 2005, WINGARD et al., 1991). Assim, o desenvolvimento de terapias antifúngicas mais eficientes torna-se de grande importância. Atualmente, o potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) na promoção da erradicação de microrganismos tem sido progressivamente mais aceita. Foi demonstrado recentemente por Souza et al (2006) o efeito fototóxico da fenotiazina, azul de metileno, sobre o crescimento da levedura *Candida albicans*, após irradiação com laser diodo InGaAIP (684nm). *Candida albicans* apresenta a habilidade de produzir tubos germinativos e filamentos, sendo esta característica essencial para o desenvolvimento da virulência (BAHN; SUNDSTROM, 2001, CALDERONE; FONZI, 2001, LO et al., 1997, ROCHA et al., 2001). Em nosso estudo, foi observada a inibição da formação do tubo germinativo em *Candida albicans* após a PACT. Este resultado apresenta grande importância, uma vez que a PACT pode inibir, tanto o crescimento, como a virulência da *Candida albicans*. Os efeitos inibitórios da PACT sobre a formação do tubo germinativo parecem não estar

relacionados às modificações tardias nas células, uma vez que não foram observadas diferenças entre os tempos de incubação; imediatamente ( $t_0$ ) e 10 minutos após ( $t_{10}$ ) a irradiação. Curiosamente, na ausência de AM, a irradiação promoveu um aumento na formação dos tubos germinativos. De acordo com Karu (1988) a irradiação com laser de baixa potência seria capaz de promover um aumento na divisão celular. Este efeito tem sido relacionado ao aumento na atividade metabólica da célula. Assim, nós sugerimos que na presença do soro de cabra, como agente indutor de tubo germinativo, a irradiação poderia aumentar a taxa metabólica das células, levando, possivelmente, ao aumento da virulência.

A inibição da formação dos tubos germinativos e dos filamentos ocorre somente após a evolução dos efeitos fototóxicos, devido à combinação apropriada da luz e do fotossensibilizador. Nossos resultados sugerem a possibilidade de que o Azul de Metileno, combinado com luz em um comprimento de onda específico, possa ser utilizado como um provável e promissor agente antifúngico.

Tem sido demonstrado que os danos causados pela PACT sobre a mitocôndria induzem a uma melhor resposta apoptótica do que os danos promovidos sobre as membranas. A TFD induz mudanças na membrana plasmática e organelas celulares podendo produzir conseqüências bastante acentuadas (DOUGHERTY et al., 1998).

O uso de marcadores celulares, tais como o SYTOX Green tem sido bastante utilizado para o estudo de alguns parâmetros de viabilidade celular, como a permeabilidade da membrana plasmática (LEBARON; PARTHUISOT, 1998).

Quando ocorrem lesões na membrana celular, a sua permeabilidade fica comprometida, assim os marcadores celulares podem se difundir passivamente pela membrana e agir como indicadores da perda da integridade da membrana, podendo ser utilizados também como indicadores da viabilidade celular (JEPRAS et al., 1995, LOPEZ-AMEROS et al., 1997).

Provavelmente, com a fotossensibilização do azul de metileno ocorre a geração de dois efeitos; a formação do  $^1\text{O}_2$  e a formação de radicais livres. Ambas as formas necessitam de locais de altas concentrações de elétrons para reagirem e obterem formas mais estáveis, assim, os ácidos graxos insaturados, as proteínas e o DNA tornam-se alvos fáceis (MARTINEZ; MEDEIROS; DI MASCIO, 2000).

A perda de elétrons danifica o equilíbrio molecular, ocasionando uma nova organização da molécula. Esta organização pode ser uma reestruturação molecular gerando outra(s) espécie(s) química(s) diferente da molécula original, ou, ainda, desencadear uma reação química e gerar novos produtos que irão levar à morte celular.

A perda da integridade de membrana resulta na sua permeabilização e, conseqüentemente leva a degradação dos ácidos nucléicos (WEICHART et al., 1997).

Após a perda da integridade da membrana, o tempo de degradação da célula está relacionado às condições do meio em que se encontra o microrganismo, bem como à espécie de microrganismo. Assim, não se pode utilizar a integridade do DNA como método suficientemente seguro para se avaliar

a viabilidade de uma célula, no entanto pode ser utilizada para quantificar a quantidade de células mortas.

Roth e colaboradores (1997) sugerem que as análises feitas com SYTOX são uma alternativa efetiva aos métodos convencionais para a determinação da viabilidade bacteriana e da sua suscetibilidade aos antibióticos.

Em nossos estudos não foram observadas alterações significativas quanto ao número de colônias, bem como à intensidade de fluorescência em células não tratadas com AM e irradiadas, comparando com células não irradiadas. Estes resultados demonstraram que apenas a irradiação não foi capaz de provocar lesões sobre a membrana celular.

A figura 12 mostra que a curva de fluorescência e a curva de crescimento de *C. albicans* em suspensão de  $1-5 \times 10^7$  (células/ml) são bastante similares, mostrando um perfil semelhante. Pode-se observar que, nesta concentração de células o efeito inibitório da combinação do laser (684nm) com o AM foi mais efetivo na presença de AM 0,05mg/ml. Estes resultados sugerem que a PACT esteja diminuindo o crescimento das células por um mecanismo relacionado ao aumento da permeabilidade das membranas, assim levando à exposição do conteúdo intracelular, e conseqüentemente à morte celular.

Entretanto, na presença de menores concentrações de células ( $1-5 \times 10^5$  células/ml) pode se observar um melhor resultado com AM 0,1mg/ml e, ainda, um efeito inibitório muito mais pronunciado. Esta diferença indica que o efeito da PACT, utilizando AM seja dependente da relação entre o número de células e a concentração do agente fotossensibilizante.

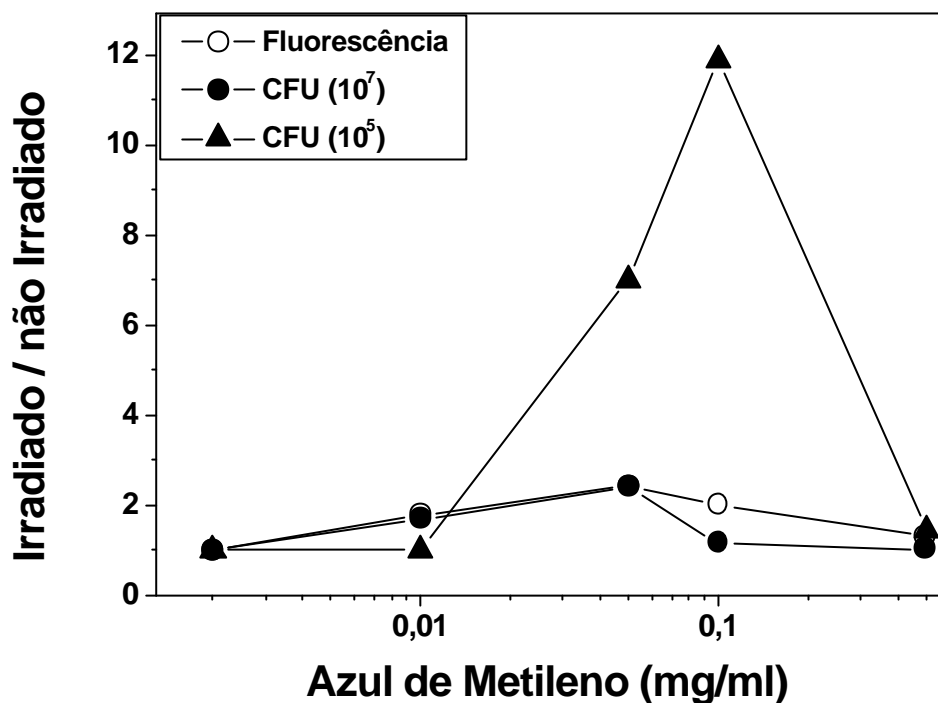


Figura 12: Relação entre suspensões de *C. albicans* irradiadas e não irradiadas para medidas de Fluorescência (?) e CFU/ml em suspensões com  $10^5$  (?) e  $10^7$  (●) células/ml.

Assim, podemos sugerir que a quantidade de células no meio durante a PACT interfira nos resultados finais. Acreditamos que devido ao curto tempo de vida e a pequena migração da espécie  $^1\text{O}_2$ , os seus efeitos sejam mais acentuados quando na presença de menor quantidade de células.

Nossos resultados demonstram o potencial do AM como uma droga fotossensibilizante em terapias antifúngicas, diminuindo não apenas o crescimento celular, mas também a formação dos tubos germinativos e hifas e, possivelmente, a virulência da *Candida albicans*.

## 6. Conclusão

A terapia fotodinâmica antimicrobiana, com o AM foi capaz de inibir o crescimento da *Candida albicans* e a formação dos tubos germinativos.

Os efeitos inibitórios foram dependentes da densidade de energia empregada, da concentração do AM e, ainda, da concentração de células utilizadas.

O mecanismo de inibição do crescimento das culturas de *C. albicans* parece estar relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana, comprometendo a viabilidade celular.

A combinação do laser diodo (684nm) e do fotossensibilizante Azul de Metileno, se apresenta como uma alternativa promissora e eficiente para o tratamento de infecções por *Candida albicans*.

## Referências

- ALMEIDA, R. D., MANADAS, B. J., CARVALHO, A. P., DUARTE, C. B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochim. Biophys. Acta.**, p. 59-86. 2004.
- BAHN, Y. S., SUNDSTROM, P. CAP1, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. **J. Bacteriol.**, v.183. p.3211-3223. 2001.
- BARCHIESI, F., et al. In vitro activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities from patients infected with the human immunodeficiency virus. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 38. p. 1530-1533.1994.
- BARTELS, H. A., COHEN, G., SCOPP, I. W. Germ-tube formation by *Candida albicans*. **J. Dent. Res.** v. 48. p. 230-235. 1968.
- BENNETT, J. E., IZUMIKAWA, K., MARR, K. A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48. p. 1773-1777. 2004.
- BERROUANE, Y. F., HERWALDT, L. A., PFALLER, M. A. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. **J. Clin. Microbiol.** v. 37. n. 3. p. 531-537. 1999.
- BLISS, J. M. et al. Susceptibility of Candida Species to Photodynamic Effects of Photofrin. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 48. p.2000-2006.2004.
- BRUGNERA, A., PINHEIRO, A. L. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast.1998
- CALDERONE, R. A., FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, v.9. p.327-335. 2001.
- CALDERONE, R.A. **Candida and Candidiasis**. Washington D.C.: ASM Press, 2002

CHABRIER-ROSELLÓ, Y. et al. Sensitivity of *Candida albicans* Germ Tubes and Biofilms to Photofrin-Mediated Phototoxicity **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49. p. 4288-4295. 2005.

CORNWELL, E. E. 3<sup>rd</sup> et al. The pattern of fungal infections in critically ill surgical patients. **Am. Surg.** v. 61. n.10. p.847-50.1995.

DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49. p. 2329-2335. 2005.

DOUGHERTY, T.J. An update on the photodynamic therapy applications. **J. Clin. Laser Med. Sug.**, v. 20. p. 3-7.2002.

DOUGHERTY, T.J. et al. Photodynamic therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90. p. 889-905.1998.

FRIEDBERG, J. S. et al In vitro effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 48. p.105-107.2001.

GIL, C., POMÉS, R., NOMBELA, C. Isolation and Characterization of *Candida albicans* Morphological Mutants Derepressed for the Formation of Filamentous Hypha-Type Structure. **Journal of Bacteriology**, v. 172 n. 5. p.2384-2391. 1990.

HALLIDAY, D., RESNICK, R., WALKER, J. **Fundamentos de Física.** 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003. p. 182-183

HOERAUF, A., et al. Intra-abdominal *Candida* infection during acute necrotizing pancreatitis has a high prevalence and is associated with increased mortality. **Crit Care Med.**, v. 26. n. 12. p. 2010-2015.1998.

HORSBURGH, C. R., KIRKPATRICK, C. H. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole: experience with twenty-one patients. **Am. J. Med.**, v. 74. p.23-29.1983.



JARVIS, W. R. et al. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida species.*: Review. **Clin. Infect Dis.** v. 20. n. 6. p.1526-30.1995.

JEPRAS, R. I., et al. Development of a robust flow cytometry assay for determining numbers of viable bacteria. **Applied Environmental Microbiol.** v.61. p.2695-2710.1995.

JONES, J M. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3. p. 32 - 45.1990.

KARU T. I. Molecular Mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Laser in Life Sciences.** v.2 p.53-74. 1988.

KARU, T. I., Photobiological fundamentals of low-power lasertherapy. **Journal Quantum Eletro.** v. 23, n. 10. 1987.

KÖMERIK, N. et al. In Vivo Killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine Blue-Mediated Photosensitization in an Animal Model. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 47. p. 932–940.2003.

KWOK, E. S. H., HOWES, D., Use of Methylene Blue in Sepsis: A Systematic Review. **Journal of Intensive Care Medicine.** v. 21, n. 6, p. 359-363. 2006.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica: Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LAMBRECHTS, S. A. G., AALDERS, M. C. G., VAN MARLE, J. Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49. p. 2026-2034.2005.

LEBARON, P. C., PARTHUISOT, N. Effectiveness of SYTOX Green Satin for bacterial Viability Assessment. **Applied and Environmental Microbiology.** v.64. n.7. p. 2697-2700. 1998.

LEMASTER, J. J., Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a target defense Against Oxidative Stress, Mitochondria Dysfunction and Aging. **Rejuvenation Research.** v. 8, n. 1, p. 3-5.2005.

LO, H.J. et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are virulent. **Cell.** v. 90. p. 939-949.1997.

LOPES, L. A., BRUGNERA, A. J., Aplicação Clínica do laser não-cirúrgico. In: BRUGNERA, A. J., PINHEIRO, A. L. B. **Laser na Odontologia Moderna.** São Paulo: Pancast. 1998. p. 100-120.

LOPEZ-AMEROS, R. et al. Assessment of *E. coli* and *Salmonera* viability and starvation by confocal laser microscopy and flor citometry using rhodamine 123, DiBAC4(3), propidium iodide and CTC. **Cytometry**, v.29. p. 1-8. 1997.

MACDONALD, I. J., DOUGHERTY, T. J., Basic principles of photodynamic therapy. **J. Phophyr. Phthal.**,v. 5 p. 105-129. 2001.

MACHADO, A. E. H.. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Química Nova.** v. 23. n. 2. 2000.

MAISCH, T. et al. Photodynamic Effects of Novel XF Porphyrin Derivatives on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49. p. 1542-1552.2005.

MARTINEZ, G.R., MEDEIROS, M.H.G., DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. **Química Nova**, v. 23 n.5 2000.

ODDS, F. C. **Candida and candidosis:** a review and bibliography. London: Bailliere Tindale, 1988.

OLEINICK, N. L., EVANS, H. H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. **Radiat. Res.** v.150. n.5 Suppl. p. 146-56.1998.

OLIVEIRA, E. E. et al. Toxinas Killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com Câncer. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31 p. 523-527. 1998.

PALMER G. E., CASHMORE, A., STURTEVANT, J. *Candida albicans* VPS11 Is Required for Vacuole Biogenesis and Germ Tube Formation Eukaryot. **Cell**, v. 2. p. 411 - 421.2003.

PELCZAR, M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1996.v. 1.

PFALLER, M. A. et al., Saiman National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. **Diagn. Microbiol Infect Dis**. v. 31. n. 1. p. 289-96.

PFALLER, M. A. et al. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida* spp. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 46. p. 1723-1727. 2002.

POSTERARO, B., M. et al Azole Resistance of *Candida glabrata* in a Case of Recurrent Fungemia. **J. Clin. Microbiol**. v. 44. p. 3046 - 3047. 2006.

REYNOLDS, R., BRAUDE, A. I. The filament inducing property of blood for *Candida albicans*; its nature and significance. **Clin. Res. Proc**. v.4, n.40. 1956

ROCCO, T. R., REINERT, S. E., SIMMS, H. H. Effects of fluconazole administration in critically ill patients: analysis of bacterial and fungal resistance. **Arch. Surg**.. v.135. n.2. p.160-165. 2000.

ROCHA, C. R. C. et al. Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Mol. Biol. Cell**. v. 12. p. 3631-3643. 2001..

ROTH, B. L. et al. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 63. p. 2421-2431. 1997.

RUDENSKY, B. et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. **J. Antimicrob. Chemother**. v. 55. n. 1. p. 106-109. 2004.

RUHNKE, M., SCHMIDT-WESTHAUSEN, A., MORSCHHÄUSER, J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida*

*dublinsiensis* in a patient with AIDS. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 46. p. 291-295. 2000.

SAFRAN, D. B., DAWSON, E. The effect of empiric and prophylactic treatment with fluconazole on yeast isolates in a surgical trauma intensive care unit. **Arch. Surg.** v.132. n.11. p.1184-8.1997.

SALAS, I., GARCÍA, J., MIRANDA, K. Factores de virulência en cepas *Candida albicans*. **Rev. Costarric. Cienc. Méd.**, v.21 n.1-2. 2000.

SANGUINETTI, M. et al. Mechanisms of Azole Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* Collected during a Hospital Survey of Antifungal Resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49. p. 668-679. 2005.

SERWAY, R. **Física 4: para Cientistas e Engenheiros, com Física Moderna.** 3. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996. p.116-119, 108-110

SHIAVO, D.A., PEREZ, E. F., KUBOTA, L. T., Estudo eletroquímico do Azul de Metileno adsorvido sobre sílica gel quimicamente modificada com óxido de Nióbio. **Química Nova**, v. 6. n.23. p. 832 – 834.2000.

SIDRIM, J. J. C., MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.172, 16-28.

SOUZA, S. C. et al. Photosensitization of different *Candida species* by low power laser light. **J. Photochem Photobiol., B.** v. 83. p. 34-38. 2006.

TASCHDJIAN, C. L., BURCHALL, J. J., KOZINN, P. J. Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. **Am. J. Dis. Child.**, v. 99. p. 212-215.1960.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia.** A. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TZUNG, K. et al. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. **PNAS.**, v. 98. n. 6. p. 3249-3253. 2000.

VINCENT, J. L. et al. Diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. **J. Epidemiology Intensive Care Med.**, v. 24. p. 206-216. 1998.

VOSS, A., et al Candidemia in intensive care unit patients: risk factors for mortality. **Infection**, v. 25. n.1. p. 8-11. 1997.

WAINWRIGHT, M. et al. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus spp.* **J. Antimicrob Chemother**, v. 44. p. 823-825.1999.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. **J. Antimicrob. Chemother**, v.42. p.13-28.1998.

WEICHART, D. et al. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testin with SYTOX Green nucleic acid stains. **Applied and Environmental Microbioloy**, v. 63. p. 2697-2758. 1997.

WINGARD, J. R. et al. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **N. Engl. J. Med.**, v. 325. p.1274-1277. 1991.

WONG, T. W. et al. Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49. p. 895-902. 2005.

ZAITZ, C. et al. **Compêndio de Micologia Médica**, Rio de Janeiro: Medsi, 1998. p.99.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)