

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA  
ANTIMICROBIANA SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS**

**RENATO ARAUJO PRATES**

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para a obtenção do Grau de Doutor em  
Ciências na Área de tecnologia Nuclear –  
Materiais.

Orientadora: Dra. Martha Simões Ribeiro

SÃO PAULO

2010

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA  
ANTIMICROBIANA SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS**

**RENATO ARAUJO PRATES**

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para a obtenção do Grau de Doutor em  
Ciências na Área de tecnologia Nuclear –  
Materiais.

Orientadora: Dra. Martha Simões Ribeiro

SÃO PAULO

2010

## DEDICATÓRIA

*À Inspiração  
Divina, que abre a mente dos filhos  
crédulos. Dedico este trabalho às  
futuras gerações que se beneficiarão  
diretamente dos nossos resultados e de  
nosso empenho.*

*Dedico também à  
minha família, à Ilka e a todos que me  
chamam amigo.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Agradeço a minha preciosa amiga, dedicada cúmplice e amada orientadora, Martha Simões Ribeiro. Estendo meus agradecimentos a seus familiares Cláudio, Lucas, Saulo e Toquito.*

*Obrigado Amando Prates, Maria Conceição de Araujo Prates, Luciana Prates Horta e Ana Paula Araujo Prates.*

*Obrigado Ilka Tiemy Kato, Sezo Kato, Regina Kato, Renata Kato e Flavia Kato.*

*Obrigado a toda minha família e amigos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração aos pesquisadores do Centro de Lasers e Aplicações (CLA), Dra. Sonia Licia Baldochi, Dr. Niklaus Ursus Wetter, Dr. Gessé Eduardo Calvo Nogueira, Dr. Anderson Zanardi de Freitas, Dr. Armando Mirage, Dra. Denise Maria Zezell, Dr. Eduardo Landulfo, Dr. Ricardo Elgul Samad e Dra. Lilia C. Courrol.

Aos amigos e colaboradores do *Wellman Center for Photomedicine*, Dr. Michael Hamblin, Dr. George Tegos, Dra. Ying-Ying Huang, Aaron Chen e Dr. Tianhong Dai

Agradeço aos amigos e colegas do CLA e seus familiares, Dra. Ilka Tiemy Kato, Dr. Aécio Massayoshi Yamada Júnior, Luís Claudio Suzuki, Daiane Thaís Meneguzzo, Alessandra Baptista, Maria Cristina Eiko Hashimoto, Dr. Aguinaldo Silva Garcez Segundo, Dra. Daniela de Fátima Teixeira da Silva, Dra. Silvia Cristina Núñez e Hector Nuñez, Antonio José da Silva Santos, Priscila Ferreira Chaves, Rosa Maria Machado de Sena, Moisés Oliveira dos Santos, Claudia Bianchi Zamataro, José Quinto Júnior, Viviane Pereira Goulart, Dra. Adriana Ribeiro, Dra. Cláudia Emílio, Dra. Marcella Esteves de Oliveira, Dr. Luciano Bachmann, Dra. Patrícia Aparecida da Ana, Dr. Walter Miyakawa, Felipe Guimarães Alberio, Carolina Benetti, José da Silva Rabelo Neto, Thiago Martini Pereira, Marcus Paulo Raele, Marcello Magri Amaral, Melissa Santos Folgosi Corrêa e André Corrêa, José Pucci Caly, Jonas Jakutis Neto, Fabíola de Almeida Camargo, Marco Antonio Ferrari, Eduardo Colombo Sousa e Alessandro Melo Deana, Jose Tort Vidal.

Aos funcionários e pesquisadores Centro de Biotecnologia e ao biotério do IPEN, em especial à Neide, e à Dra. Nanci do Nascimento.

Aos funcionários Elsa Papp Pereira da Silva, Luiz Antônio Braga, Marco Antonio Andrade, Marta de Jesus Silva, Paulo César da Silva, Solange Eiko Mitani, Tito de Deus, Valdir de Oliveira, Andréa e Sueli. Aos agentes de segurança do IPEN, em especial ao Luiz e ao Rúbens.

Aos funcionários da manutenção e limpeza do CLA.

Aos amigos do ICB, Dra. Claudete Rodrigues Paula, Dr. Eriques Gonçalves da Silva, Dra. Georgea Carla Matuura de Batista, Dra. Luciana da Silva Ruiz.

## **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS**

**Renato Araujo Prates**

### **RESUMO**

Este trabalho tem por objetivo investigar o comportamento da terapia fotodinâmica (PDT) em leveduras patogênicas. Tem sido proposto que a PDT pode inativar células microbianas e, um grande número de fotossensibilizadores e fontes de irradiação são reportados em diferentes parâmetros. Para melhor entendimento dos processos fotodinâmicos, a taxa de fluência, fluência e tempo de irradiação foram estudadas, bem como fluências iguais em parâmetros diferentes foram comparadas entre si. O papel da concentração de azul de metileno e do transporte desta droga pela membrana fúngica foram investigados. Diferentes cepas de *Cryptococcus neoformans* foram comparadas frente à ação fotodinâmica com fotossensibilizadores distintos. Após esta etapa, atividades metabólicas de processo de morte microbiana e produção de melanina foram avaliadas quanto a sua interferência na inativação fúngica. Por fim, um modelo de criptococose foi desenvolvido para avaliação *in vivo* da ação fotodinâmica. Foi observado que parâmetros de irradiação influenciam substancialmente os resultados da PDT em leveduras e que, fluências iguais em diferentes tempos de irradiação podem apresentar resultados diferentes. Em conclusão, a fluência não deve ser utilizada como parâmetro único para comparação dos resultados de fotoinativação de leveduras. Além disso, o transporte de azul de metileno pela membrana fúngica pode influenciar os efeitos da PDT. A ação fotodinâmica depende do sítio de ligação do fotossensibilizador na célula e não somente da quantidade de moléculas no interior do microrganismo. É importante ressaltar que características intrínsecas de cada cepa podem influenciar diretamente os efeitos da PDT. As células morrem geralmente por processo não lítico, e quando utilizada *in vivo*, a PDT mostrou-se capaz de reduzir a recuperação de células viáveis.

## EVALUATION OF THE PHOTODYNAMIC ANTIMICROBIAL THERAPY ON PATHOGENIC YEASTS

**Renato Araujo Prates**

### ABSTRACT

This study aimed to investigate the photodynamic therapy (PDT) behavior on pathogenic yeasts. It has been proposed in literature that PDT is able to inactivate microbial cells, and a number of photosensitizer (FS) agents and irradiation sources were reported with different parameters. The role of fluence rate, as well as fluence and irradiation time was studied to achieve a deep understanding of this subject and to compare equivalent fluences under dissimilar irradiation parameters. Methylene blue concentration and its transport through yeast membrane were also focused. *Cryptococcus neoformans* strains that present particular metabolic characteristics were used to investigate photosensitizers and their ability to inactivate yeast. Furthermore, the role of PDT in microbial death process and inhibition of killing effects by melanin production were analyzed. Thereafter, an *in vivo* model of cryptococcosis was developed to evaluate photodynamic effect. The main point of our results was that light parameters play an important role on yeast inactivation and the same fluence under different irradiation parameters present dissimilar quantity of cell death. In conclusion, fluence per se should not be used as the only parameter to compare photoinactivation effects on yeast cells. In addition, MB transport through yeast membrane can change PDT effects, as well as the photosensitizer preferential bind site inside the cell. The quantity of PS uptake, under specific conditions, does not seem to present a direct relation with cell inactivation. In addition, microbial strain characteristics can directly interfere on PDT results and cells appear to be killed by an apoptotic-like effect. Finally, PDT can kill *C. neoformans* *in vivo* and reduces its recover from infected site.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
SUMÁRIO .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS .....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVO .....	22
2.1 Objetivos específicos: .....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1 Influência dos parâmetros de irradiação no efeito fotodinâmico .....	23
3.1.1 Preparação do inóculo .....	23
3.1.2 Irradiação e parâmetros.....	24
3.1.3 Preparação do fotossensibilizador .....	24
3.1.4 Divisão dos grupos .....	24
3.1.5 Análise estatística .....	25
3.2 Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	25
3.3 Avaliação da temperatura durante a irradiação .....	25
3.4 Concentração do azul de metileno e foto-inativação de <i>C. albicans</i> .....	26
3.4.1 Inativação de <i>C. albicans</i> .....	26
3.4.2 Espectroscopia de absorção óptica .....	26
3.5 Transporte do azul de metileno pela membrana.....	26
3.5.1 Avaliação por Microscopia Confocal .....	28

3.6	Acúmulo de fotossensibilizador em <i>C. neoformans</i> e sua fotoinativação .....	29
3.6.1	Fotossensibilizadores e parâmetros de irradiação .....	29
3.6.2	Incorporação de FS em <i>C. neoformans</i> .....	31
3.6.3	Avaliação da localização de FS em <i>C. neoformans</i> .....	32
3.7	Alterações morfológicas e fisiológicas em <i>C. neoformans</i> após a PDT .....	32
3.7.1	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	32
3.7.2	Apoptose de <i>C. neoformans</i> após PDT .....	33
3.7.3	Efeito da melanina na ação fotodinâmica .....	33
3.8	Indução da criptococose e fotoinativação <i>in vivo</i> .....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
4.1	Efeitos dos parâmetros de irradiação na foto-inativação de leveduras .....	36
4.2	Efeitos da concentração de AM na redução microbiana .....	44
4.3	Transporte de azul de metileno na membrana de <i>C. albicans</i> .....	47
4.4	PDT em <i>C. neoformans</i> com fs diferentes .....	52
4.4.1	Papel da cápsula no efeito fotodinâmico .....	57
4.5	Observações morfológicas e fisiológicas .....	58
4.5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	58
4.5.2	Apoptose .....	59
4.5.3	Efeito da melanização de <i>C. neoformans</i> na ação fotodinâmica .....	61
4.6	Inativação de <i>C. neoformans</i> <i>in vivo</i> .....	63
	CONCLUSÕES .....	65
	APÊNDICE A – Parecer do comitê de ética IPEN-CNEN/SP .....	66
	APÊNDICE B – Lista de produção científica no período do Doutorado .....	67
	ANEXO A – Revisão de Literatura .....	70
	ANEXO B – Microscopia confocal de <i>C. albicans</i> .....	74
	ANEXO C – Concentração de FS em <i>C. neoformans</i> .....	75

ANEXO D – Microscopia confocal em diferentes cepas de <i>C. neoformans</i> com diferentes FS .....	76
ANEXO E – Fotos do tratamento com PDT nas patas edemaciadas de camundongos com criptococose .....	81
REFERÊNCIAS .....	82

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Microrganismos utilizados para os testes de parâmetros de irradiação .....	23
TABELA 2 - Parâmetros de irradiação utilizadas nos grupos PDT (L+FS+) durante o experimento .....	24
TABELA 3- Condições de irradiação nas amostras de <i>C. albicans</i> DAY10085 .....	27
TABELA 4 – Características das cepas utilizadas no experimento .....	27
TABELA 5 – Cepas utilizadas no experimento.....	29
TABELA 6 – Parâmetros de irradiação de <i>C. neoformans</i> com 4 fotossensibilizadores....	31
TABELA 7 – Médias $\pm$ DP encontrados nos grupos controle, irradiados com laser e expostos ao AM na concentração de 100 $\mu$ M. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos .....	37
TABELA 8 – Resultado expresso em UFC/mL log <sub>10</sub> das médias $\pm$ desvio padrão (DP) encontrados nos grupos controle e irradiados com laser. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.....	37

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Fotossensibilizadores utilizados neste experimento .....	30
FIGURA 2 – As imagens ilustram os microrganismos utilizados (A e D) <i>C. neoformans</i> , (B e E) <i>C. albicans</i> e, (C e F) <i>C. krusei</i> . Nas figuras superiores (A, B e C), são mostradas placas de Petri com os microrganismos com suas características de morfologia macroscópica. Nas figuras D, E e F, são mostradas imagens da microscopia óptica para cada uma das três espécies de leveduras utilizadas no experimento. Em (D) observamos a cápsula de <i>C. neoformans</i> identificada pela seta e, a figura encontra-se sob aumento original de 1000 vezes. Em (E) podemos observar células de <i>C. albicans</i> observadas ao microscópio óptico sem coloração; e em (F) podemos observar <i>C. krusei</i> .....	36
FIGURA 3 - No gráfico são representadas as médias + DP das frações de sobrevivência encontradas para <i>C. albicans</i> , em fase de crescimento exponencial, e estacionária, submetidas à irradiação em três diferentes intensidades .....	38
FIGURA 4 – Efeito do tempo de exposição na fração de sobrevivência de <i>C. neoformans</i> nas intensidades de 100 e 300 mW/cm <sup>2</sup> . As barras de erro representam o desvio padrão ..	39
FIGURA 5 – Efeito do tempo de exposição na fração de sobrevivência de <i>C. albicans</i> nas intensidades de 100 e 300 mW/cm <sup>2</sup> . As barras de erro representam o desvio padrão .....	40
FIGURA 6 – Efeito do tempo de exposição na fração de sobrevivência de <i>C. krusei</i> nas intensidades de 100 e 300 mW/cm <sup>2</sup> . As barras de erro representam o desvio padrão .....	40
FIGURA 7 – Efeito da fluência de 54 J/cm <sup>2</sup> entregue sob intensidades de 100 mW/cm <sup>2</sup> (9 min) e 300 mW/cm <sup>2</sup> (3 min) na fração de sobrevivência de <i>C. albicans</i> em diferentes fases de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão .....	41
FIGURA 8 - Efeito da fluência de 54 J/cm <sup>2</sup> entregue sob intensidades de 100 mW/cm <sup>2</sup> (9 min) e 300 mW/cm <sup>2</sup> (3 min) na fração de sobrevivência de <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> , e <i>C. krusei</i> . As barras de erro representam o desvio padrão .....	42
FIGURA 9 – Efeito do tempo de irradiação (A) e da fluência (B) na formação de espécies reativas de oxigênio medida pela degradação do RNO ( $\lambda=440$ nm). Os pontos no gráfico representam a média de três diferentes experimentos e as barras representam o desvio padrão .....	43
FIGURA 10 – Efeito da irradiação laser (300 mW/cm <sup>2</sup> por 9 min) sobre a temperatura da suspensão de leveduras corada ou não com AM na concentração de 100µM.....	43

FIGURA 11 – Placa de micro-titulação com suspensão de <i>C. albicans</i> coradas com AM (da esquerda para direita) nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu$ M.....	44
FIGURA 12 – Médias e desvio padrão da contagem de <i>C. albicans</i> submetidas a concentrações progressivas de AM. O tempo de contato das células com o fotossensibilizador foi de 10 min e os grupos PDT foram irradiados com <i>laser</i> (300mW/cm <sup>2</sup> ; 3min; 54J/cm <sup>2</sup> ).....	45
FIGURA 13 – Espectroscopia de absorção óptica de suspensão de <i>C. albicans</i> em PBS corada com AM em diversas concentrações. Suspensão desta levedura em PBS foi utilizada como linha base de referência.....	46
FIGURA 14 – Porcentagem de redução microbiana relacionada a razão M/D para as concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 $\mu$ M de AM.....	46
FIGURA 15 - Média e erro padrão para 3 diferentes dias de experimento.....	47
FIGURA 16 – Imagens de sobreposição de fluorescência em <i>C. albicans</i> coradas com azul de metileno (canal vermelho), rodamina 1,2,3 (canal verde) e expostas ou não aos inibidores de transporte por membrana. A barra representa 8 $\mu$ m.....	48
FIGURA 17 – Valores de média e erro padrão para os comportamentos de inativação microbiana com PDT sobre <i>C. albicans</i> . A cepa YEM13 apresenta características de grande quantidade de bombas de transporte facilitado; enquanto sua parenta YEM12 é uma cepa colhida de pacientes com candidíase.....	49
FIGURA 18 - Valores de média e erro padrão para os comportamentos de inativação microbiana com PDT sobre <i>C. albicans</i> . A cepa YEM15 apresenta a característica de possuir grande quantidade da bomba ABC transportadora; enquanto sua parenta YEM14 é uma cepa colhida de pacientes com candidíase .....	50
FIGURA 19 – Imagens de sobreposição de fluorescência em <i>C. albicans</i> coradas com azul de metileno (canal vermelho), rodamina 1,2,3 (canal verde). A barra representa 8 $\mu$ m.....	51
FIGURA 20 – Médias $\pm$ DP do número de <i>pixels</i> vermelhos por célula nas imagens de microscopia confocal. A) <i>C. albicans</i> DAY e inibidores de transporte de membrana seguidos de AM; B) YEM12, YEM13, YEM14 e YEM15 apenas corados com AM.....	51
FIGURA 21- Resultados de incorporação de FS e PDT para cepas de <i>C. neoformans</i> fotossensibilizados com azul de metileno.....	53
FIGURA 22 – Imagem de microscopia confocal nas cepas de <i>C. neoformans</i> coradas com azul de metileno .....	54

FIGURA 23 - Resultados de incorporação de FS e PDT para cepas de <i>C. neoformans</i> fotossensibilizados com Rosa Bengala.....	54
FIGURA 24 – Imagem de microscopia confocal nas cepas de <i>C. neoformans</i> coradas com rosa bengala .....	55
FIGURA 25 – Resultados de incorporação de FS e PDT para cepas de <i>C. neoformans</i> fotossensibilizados com EtNBSe .....	55
FIGURA 26 - Imagem de microscopia confocal nas cepas de <i>C. neoformans</i> coradas com EtNBSe .....	56
FIGURA 27 – Resultados de incorporação de FS e PDT para cepas de <i>C. neoformans</i> fotossensibilizados com pL-ce6 .....	56
FIGURA 28 - Imagem de microscopia confocal nas cepas de <i>C. neoformans</i> coradas com pL-ce6.....	57
FIGURA 29 – Microscopia eletrônica de varredura de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112 são apresentadas na figura (A) sem tratamento e (B) após PDT. As células fúngicas são representativas daquelas observadas em cada condição. As barras representam 5µm .....	58
FIGURA 30 - No gráfico são representadas, as médias + DP das frações de sobrevivência encontradas para <i>C. neoformans</i> KN99α corados com 10µM PL-ce6, submetidas à PDT	59
FIGURA 31 – Grupos controle são mostrados na figura, e podemos observar o mesmo campo da lâmina em 3 diferentes canais do microscópio (1) transmissão; (2) verde FITC 525/50nm; (3) IP vermelho 600/30nm. (A) representa o grupo que não recebeu qualquer tratamento com corantes; (B) as células foram coradas com FITC+IP; e (C) recebeu FITC, IP e pL-ce6.....	60
FIGURA 32 - Grupos submetidos à PDT em fluências de 10 e 40 J/cm <sup>2</sup> . A cor verde na imagem corresponde ao sinal de fluorescência de FITC ligado à fosfatidilserina e a fluorescência em vermelho é proveniente do iodeto de propídio ligado à cromatina.....	61
FIGURA 33 – Tubos contendo meio mínimo de crescimento para <i>C. neoformans</i> após 10 dias de incubação, sem L-dopamina (esquerda) e com L-dopamina (direita).....	62
FIGURA 34 – Média e desvio padrão do comportamento de inativação de <i>C. neoformans</i> 208820 crescidos na presença ou ausência de L-dopamina.....	62
FIGURA 35 – Fotografia do edema na pata esquerda 3 dias após a inoculação de 10 <sup>7</sup> células. Todos os animais inoculados sob esta concentração apresentaram edema semelhante. ....	63

FIGURA 36 – Média $\pm$ DP de UFC/g recuperada da pata de camundongos infectados com <i>C. neoformans</i> (ATCC 90112).....	64
---	----

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
AM	Azul de metileno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERO	espécies reativas de oxigênio
EtNBSe	5-etilamina-9-dietilaminobenzeno [ <i>a</i> ] fenotiazina selênio
FS	Fotossensibilizador
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GaAlAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
IFIs	infecções fúngicas invasivas
PBS	solução salina fosfatada tamponada
PDT	terapia fotodinâmica
pL-ce6	Conjugado Poli-L-lisina Clorina e <sub>6</sub>
R123	Rodamina 1,2,3
RB	Rosa Bengala
RNO	$\rho$ -dimetilamina
RPM	Rotações por minuto
UFC	Unidade formadora de colônias
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultra violeta
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

nm: nanometro

mm: milímetro

g: grama

$\mu\text{m}$ : micrometro

mW: miliwatt

J: joule

cm: centímetro

$^{\circ}\text{C}$ : graus Celsius

M: molar

mM: milimolar

m: metro

s: segundo

ms: milisegundo

$\mu\text{s}$ : microsegundo

$\mu\text{L}$ : microlitro

mL: mililitro

mJ: milijoule

mmol: milimol

L: litro

T%: porcentagem de transmissão

InGaAlP: Índio Gálio Alumínio Fósforo

$\text{cm}^2$ : centímetros quadrados

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas invasivas (IFIs) e localizadas apresentou considerável crescimento nos últimos vinte anos. Diversas hipóteses foram propostas para explicar este aumento, dentre as quais podemos citar: o crescente uso de drogas antineoplásicas e imunossupressoras, massiva utilização de antibióticos de largo espectro, implantação de dispositivos protéticos e enxertos, bem como utilização de técnicas cirúrgicas mais agressivas. Pacientes queimados, com pancreatite, portadores de neutropenia, ou que apresentam síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) também possuem uma maior predisposição para contrair infecções por fungos<sup>1-3</sup>.

Dentre as infecções causadas por fungos, a forma mais expressiva é a candidíase causada por *Candida spp.*. *C. albicans* possui a maior prevalência dentre os isolados clínicos provenientes de micoses, além de representar o organismo mais frequentemente isolado em infecções hospitalares. Entretanto, *Candida* não-*albicans* apresentam menores prevalências, porém possuem características distintas de patogenicidade, como a elevada resistência ao antifúngico fluconazol demonstrada por *C. glabrata* e *C. krusei*<sup>3-5</sup>; e a resistência demonstrada por *C. lusitaniae* à anfotericina B. O diagnóstico tardio de IFIs está intimamente associado ao maior tempo de internação, ao aumento da morbidade e mortalidade de pacientes<sup>3</sup>. A identificação dos agentes etiológicos causadores das IFIs representam um poderoso desafio, pois os testes clássicos de identificação e classificação de espécies fúngicas são laboriosos e demandam grande tempo e análise por profissionais altamente qualificados. Propostas de identificação com testes metabólicos e bioquímicos rápidos são lançadas sistematicamente, no entanto o índice de acerto se mantém discreto e aquém das necessidades clínicas<sup>6</sup>. Outro problema de extrema importância é o aparecimento de espécies até então desconhecidas, ou espécies anteriormente conhecidas, que não eram encontradas em quadros infecciosos e, a partir de certo momento, passam a ser isolados de pacientes. Eles são comumente chamados patógenos emergentes. Enquanto cinco espécies do gênero *Candida sp.* eram consideradas patógenas na década de 1960, em meados da década de 1990, foram listadas dezessete espécies nesta categoria<sup>4, 7</sup>. É urgente a necessidade de buscar alternativas terapêuticas seguras, e com satisfatória previsibilidade de resultados terapêuticos.

O tratamento da candidíase, sobretudo em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) requer o uso maciço de antifúngicos. O protocolo de prescrição, especialmente de fluconazol para tratamento de candidíase em orofaringe nesses pacientes, representou uma facilidade na resolução dos quadros clínicos. Porém, recidiva da infecção geralmente ocorria algum tempo após o tratamento. Por isso, muitos portadores de AIDS receberam tratamentos prolongados com este fármaco, ou até mesmo sua prescrição profilática. As repetidas tentativas de tratamento com fluconazol provocaram múltiplas exposições em várias cepas de *Candida sp.*, e muitas delas foram naturalmente selecionadas e tornaram-se resistentes<sup>7</sup>.

A resistência fúngica de *Candida sp.* está particularmente ligada à presença de bombas com múltipla capacidade de transportar drogas para fora da célula, essas bombas estão na membrana dos microrganismos e elas podem ser divididas em duas grandes categorias: i) Bombas de transporte ativo, chamadas ABC transportadoras e; ii) Bombas de transporte passivo, ou poros de difusão facilitada. Estas bombas são codificadas, principalmente, pelos genes CDR1 e *BEM*”, respectivamente<sup>7-15</sup>.

Outra espécie de microrganismos de grande importância clínica é representada por *Cryptococcus neoformans*, que é um fungo encapsulado que pode infectar hospedeiros imunocompetentes bem como imunodeprimidos. Este fungo não faz parte da microbiota residente do ser humano e geralmente infecta o hospedeiro através das vias respiratórias pela inalação de suas formas desidratadas ou como basidiósporos. Solo contaminado com fezes de pombos e algumas espécies de árvores são os principais reservatórios naturais de *C. neoformans*. É importante ressaltar que este microrganismo encontra-se presente em importantes centros urbanos, como em árvores do parque Ibirapuera e na Aclimação, em convivência cotidiana com a cidade de São Paulo<sup>16</sup>. Após sua instalação nos pulmões, ele pode se disseminar pela corrente sanguínea e migrar para outros sítios do organismo. A criptococose é uma infecção que se manifesta com quadros clínicos variados. No que diz respeito à sua localização, ela pode acometer os pulmões, pele, sítios no sistema nervoso central, além de outras vísceras; e sua progressão pode assumir formas agudas ou crônicas<sup>10, 17</sup>. Infecção do cérebro e meninges são as manifestações clínicas mais freqüentemente encontradas nos casos de criptococose, e a causa mais comum de óbito em pacientes. Os sintomas dependem da rapidez com que ocorre o comprometimento do órgão. Parestesia e/ou paralisia podem ocorrer devido à invasão fúngica e compressão de um, ou mais nervos cranianos, ocasionada pelo edema cerebral. Conseqüentemente, essas

podem persistir como uma seqüela permanente da doença<sup>18</sup>. O segundo sítio mais envolvido é o pulmão, que pode apresentar a forma assintomática da criptococose, ou a doença pulmonar disseminada, freqüentemente associada a nódulos pulmonares. A infecção pulmonar pode ser considerada a manifestação primária da doença<sup>18, 19</sup>.

A cápsula deste microrganismo é indicada como maior responsável por sua virulência, como observado em espécies mutantes, que não desenvolveram cápsula e não tem habilidade de causar infecção no hospedeiro. A meningite criptocótica é letal quando não tratada adequadamente, e mesmo utilizando os melhores antifúngicos, pode ser letal em pacientes imunossuprimidos<sup>20</sup>. As infecções geralmente requerem prolongada terapia antifúngica e estão associadas com seqüelas neurológicas e intervenção neurocirúrgica<sup>18</sup>.

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos promove a seleção natural de cepas microbianas resistentes e deixa uma franca oportunidade para recombinação genética dos fatores de resistência e mutação. Isso pode ser interpretado como um dos maiores problemas para o século XXI, visto que, é grande a capacidade de adaptação destes seres, e para cada medicamento colocado no mercado, em pouco tempo, surge uma cepa resistente<sup>21-23</sup>.

Dentro deste cenário, surge a terapia fotodinâmica (PDT), que é uma forma de fototerapia baseada na utilização de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras nos tecidos biológicos e ativação destas pela presença da luz. As células consideradas alvo serão coradas com o fotossensibilizador e irradiadas com luz. A molécula do fotossensibilizador passará para um estado excitado, e ao voltar ao estado mais estável, irá transferir esta energia para o sistema propiciando um efeito fotoquímico que normalmente leva a morte celular<sup>24-29</sup>. Isoladamente, nem a droga nem a luz tem a capacidade de produzir o efeito deletério ao sistema biológico<sup>30-32</sup>.

Após a irradiação do corante, a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) leva à morte das células através da ação oxidativa em componentes lipídicos das membranas lipoproteicas<sup>33</sup>. No entanto, esta não é a única nem a principal via de morte celular. Sinais de dano são emitidos e sensibilizam receptores, principalmente na membrana externa da mitocôndria, que inicia o processo de falência metabólica celular. São gerados estímulos para aglutinação de citoplasma, bem como condensação de cromatina que podem ser observadas como resultado final da ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) gerada pela terapia fotodinâmica<sup>34-36</sup>.

A PDT mostra grande atividade antimicrobiana com amplo espectro de atuação sobre bactérias<sup>22, 37-40</sup> e fungos<sup>2, 41-47</sup>. Toda esta toxicidade é atribuída à geração de grandes quantidades de ERO<sup>48</sup>, que superam o limite de defesa das células e iniciam os mais diversos mecanismos de morte celular. Os sinais para apoptose são gerados pela desproporção intracelular de ERO, que disparam um mecanismo de autofagocitose das organelas, e leva a destruição celular por uma ou mais vias de morte celular programada. A mitocôndria está particularmente envolvida no início do dano. A redução incompleta do oxigênio durante o processo de oxidação da fosforilase também produz grandes danos, incluindo a peroxidação de lípidos e DNA. Uma avaria na membrana da mitocôndria leva ao dano na cadeia de transporte de elétrons. Em seguida, há liberação das moléculas de citocromo-c no citoplasma. Esta molécula está relacionada ao mecanismo de respiração celular e geração de energia em forma de ATP e danos à sua estrutura aceleram a falência do metabolismo celular<sup>35</sup>.

Estudos dos efeitos fotodinâmicos sobre leveduras ainda são pouco explorados na literatura, entretanto esta é uma promissora área, visto que os resultados até agora encontrados pelos grupos de pesquisa apontam para uma real possibilidade de inativação destes microrganismos<sup>32</sup>. Além disso, o crescimento de infecções por fungos representa um enorme desafio, principalmente em pacientes com algum grau de comprometimento imunológico<sup>6</sup>.

O campo da terapia fotodinâmica em fungos desenvolve uma possibilidade de tratamento para várias doenças de significativa importância clínica. Trabalhos *in vitro* demonstraram os positivos efeitos antimicrobianos da PDT sobre várias espécies de fungos, dentre elas *Saccharomyces cerevisiae*<sup>49, 50</sup>, *Candida sp.*<sup>32, 41, 46, 51, 52</sup>, *Trichophyton rubrum*<sup>53</sup>, *Aspergillus fumigatus*<sup>54</sup>, e *Cryptococcus neoformans*<sup>46, 55</sup>.

As pesquisas no campo dos fotossensibilizadores encontram-se adiantadas, com décadas de investigação de várias moléculas com capacidade de absorver luz e produzir efeitos foto-tóxicos em células<sup>2, 40, 43, 46, 55, 56</sup>. Dentre os mais estudados, podemos destacar o azul de metileno, pertencente à família das fenotiazinas. Ele se apresenta bem estabelecido como fotossensibilizador na literatura. Esta molécula provou sua efetividade em uma série de estudos sobre fotoinativação microbiana<sup>26, 46, 52, 56</sup>. Possui duas bandas principais de absorção na região visível do espectro eletromagnético, uma referente ao componente monomérico ( $A_{\max}=664\text{nm}$ ); e outra da sua forma dimerizada ( $A_{\max}=608\text{nm}$ )<sup>57</sup>.

Entretanto, os mecanismos metabólicos pelos quais a PDT opera em cada organismo ainda permanecem obscuros. Ainda nos falta conhecer a verdadeira dinâmica da PDT, para isso, devemos entender primeiramente os parâmetros de irradiação, para então tornar essa modalidade de tratamento mais eficiente. Os parâmetros de irradiação em PDT ainda permanecem um tema obscuro, cuja importância ainda não atentou os principais autores dessa área.

Outro fato intrigante é que, microrganismos diferentes apresentam diferentes respostas à PDT. Não é incomum uma mesma espécie se portar diferentemente frente ao desafio por ERO. Esta informação pode parecer óbvia no início, porém, este é outro ponto crucial para o entendimento da PDT. Se a mesma técnica de PDT for utilizada em diferentes alvos, as diferenças poderão ser correlacionadas aos efeitos que, sistematicamente foram provocados nas células alvo. Em suma, a principal idéia deste trabalho é utilizar leveduras patogênicas como modelos de comparação de efeitos fotodinâmicos, com a observação e análise das similaridades e diferenças entre as respostas de inativação celular.

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi estudar o comportamento da terapia fotodinâmica em fungos leveduriformes patogênicos.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar os efeitos da fluência, taxa de fluência e tempo de exposição no processo de inativação fotodinâmica de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* sorotipo A, bem como em diferentes fases de crescimento de *C. albicans* e, na produção de espécies reativas de oxigênio;
- Investigar o papel da concentração do azul de metileno na inativação de *C. albicans*;
- Investigar o papel do transporte do azul de metileno pela membrana de *C. albicans*;
- Investigar a localização intracelular do azul de metileno em *C. albicans*;
- Observar alterações morfológicas em *C. neoformans* após a PDT;
- Investigar o acúmulo de FS intracelular em *C. neoformans*;
- Investigar o papel da produção de melanina de *C. neoformans* na proteção contra os efeitos fotodinâmicos;
- Avaliar a inativação de *C. neoformans* em infecção local induzida in vivo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO NO EFEITO FOTODINÂMICO

Na terapia fotodinâmica, o princípio da reciprocidade é aceito como verdade e levado em consideração na comparação de diferentes grupos e, principalmente, para confrontar resultados de trabalhos distintos, onde muitas vezes, tempo de irradiação e intensidade não foram levados em consideração. O princípio da reciprocidade profere que os efeitos biológicos observados nas terapias com luz dependem da fluência empregada na irradiação, independente do tempo sob o qual esta fluência foi entregue ao sistema biológico<sup>58</sup>.

##### 3.1.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Diferentes microrganismos parecem responder de forma diferente às terapias, sobretudo à PDT. Por isso foram selecionadas três espécies distintas de fungos, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Leveduras Patogênicas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, para estes testes (TABELA 1).

As leveduras foram cultivadas aerobicamente em ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 30°C por 12 ou 24h para *Candida albicans*, 24h para *Candida krusei* e 48h para *C. neoformans*.

TABELA 1 - Microrganismos utilizados para os testes de parâmetros de irradiação

Microrganismo	Referência da Cepa
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	ATCC 90112

O inóculo de *Candida* sp. foi preparado com a colheita das leveduras puras crescidas em placa de Petri com ágar Sabouraud e suspensas em solução salina fosfatada tamponada (PBS) em pH 7,2. As suspensões de células foram medidas em espectrofotômetro sob irradiação  $\lambda=530$  nm e a transmitância ajustada em  $73\pm4\%$ , que

resultou em uma concentração de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL<sup>59</sup>. Para *C. neoformans*, foi utilizada câmara de Neubauer e o inóculo ajustado em  $1 \times 10^7$  UFC/mL<sup>60</sup>.

### 3.1.2 IRRADIAÇÃO E PARÂMETROS

Foi utilizado um laser diodo InGaAlP (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de emissão em  $\lambda=660$  nm. As amostras foram irradiadas de cima para baixo em uma placa de micro-titulação de 96 poços, onde o feixe laser foi ajustado com o diâmetro de  $0,3 \text{ cm}^2$ , correspondente a área de abertura de um poço da referida placa. Proveniente da variação de potência do equipamento em 30, 60 e 90 mW, intensidades de 100, 200 e  $300 \text{ mW/cm}^2$  foram alcançadas. Amostras foram colhidas nos tempos 0, 3, 6 e 9 minutos, o que resultou em fluências de 0 a  $162 \text{ J/cm}^2$  (TABELA 2).

TABELA 2 - Parâmetros de irradiação utilizados nos grupos PDT (L+FS+) durante o experimento

Potência (mW)	30	60	90
Intensidade ( $\text{mW/cm}^2$ )	100	200	300
Tempo de exposição (min.); Fluência ( $\text{J/cm}^2$ )	3; 18	3; 36	3; 54
	6; 36	6; 72	6; 108
	9; 54	9; 108	9; 162

A fluência de  $54 \text{ J/cm}^2$  coincidiu em dois regimes de irradiação utilizados e os resultados em morte microbiana foram então comparados entre si.

### 3.1.3 PREPARAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR

A solução de azul de metileno foi preparada pela diluição do pó (Sigma Ltd., Poole, UK) em água destilada na concentração de 10 mM. Este estoque foi filtrado em uma membrana estéril ( $0,22 \mu\text{m}$ , Milipore, São Paulo, Brasil). O fotossensibilizador foi adicionado à suspensão microbiana na proporção 1/100, o que resultou em uma concentração final de  $100 \mu\text{M}$ <sup>45, 46, 52</sup>.

### 3.1.4 DIVISÃO DOS GRUPOS

O grupo controle (L-FS-) não recebeu qualquer tratamento com laser ou fotossensibilizador. No grupo laser (L+FS-), a suspensão de leveduras foi irradiada na ausência do fotossensibilizador por 9 min sob intensidade de  $300 \text{ mW/cm}^2$ , o que resultou

em uma fluência de 162 J/cm<sup>2</sup>. Para os testes de toxicidade no escuro (L-FS+), a suspensão de leveduras foi corada por 10 min com AM 100 µM em contato com as células. Nos grupos PDT (L+FS+), a suspensão de leveduras coradas com AM 100 µM foi devidamente irradiada nos parâmetros mostrados na TABELA 2.

As ações das diferentes intensidades, tempos de irradiação e fluências foram avaliadas, bem como seus efeitos sob as amostras de seu grupo PDT.

Após passar pelos tratamentos propostos no estudo, as amostras foram diluídas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup> vezes a concentração original. Posteriormente, alíquotas de 10 µL de cada diluição foram estriadas, em triplicata, em placa de petri com ágar Sabouraud e estas foram devidamente incubadas para formação de unidades formadoras de colônias<sup>46, 61, 62</sup>.

### 3.1.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As unidades formadoras de colônia foram contadas e todas as amostras foram submetidas à análise estatística utilizando-se teste de variância *one-way* (ANOVA). A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey e a significância ajustada em 5%.

## 3.2 MENSURAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

A formação de ERO foi avaliada por quantificação dos valores de absorbância de RNO sob irradiação laser em  $\lambda=660$  nm, com intervalos de tempo de 0 a 9 min de irradiação, em 100 e 300 mW/cm<sup>2</sup> (TABELA 2). Uma solução de linha base foi preparada utilizando 15 mM de L-histidina (Sigma LTDA, Poole, UK) e azul de metileno diluído em água destilada<sup>63</sup>.

A molécula p-dimetilamina (RNO) foi adicionado na concentração final de 13,3 µM e a absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro óptico (Biospectro 220, WMED, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda  $\lambda_{\text{max}}=440$  nm. O RNO degrada-se na presença de ERO e sua absorção em  $\lambda=440$  nm diminui com sua degradação<sup>63-65</sup>.

## 3.3 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE A IRRADIAÇÃO

A temperatura da suspensão de leveduras e da suspensão de leveduras coradas com azul de metileno foi avaliada durante a irradiação com laser  $\lambda=660$  nm (300 mW/cm<sup>2</sup>; 9 min) por um sensor infravermelho (OS 136Series, OMEGA Engineering Inc., Stamford, USA). As amostras, em uma placa de micro-titulação, foram irradiadas de cima para baixo

e os resultados mensurados em intervalos de 30 em 30s. A temperatura ambiente foi aferida em 25°C.

### **3.4 CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE METILENO E FOTO-INATIVAÇÃO DE *C. albicans***

O efeito da concentração de AM sobre *C. albicans* foi avaliado com a utilização de testes microbiológicos e espectroscopia de absorção óptica.

#### **3.4.1 INATIVAÇÃO DE *C. albicans***

Foi preparado inóculo de *C. albicans* ( $T\%=73\pm4\%$ ) em PBS, como anteriormente descrito no item 3.1, e este foi dividido e exposto por 10 min a concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000  $\mu\text{M}$  de AM. Amostras foram removidas para diluição seriada e quantificação<sup>61</sup>, com o intuito de verificar a toxicidade de AM nestas concentrações e tempo de contato. Posteriormente, as amostras foram irradiadas com *laser* ( $\lambda=660\text{ nm}$ ) em parâmetros considerados sub-letais (300  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ; 3 min; 54  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Após a irradiação, as amostras seguiram para quantificação microbiológica conforme protocolo anteriormente descrito<sup>61</sup>.

#### **3.4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓPTICA**

O espectro de absorção óptica de todas as amostras foi mensurado em espectrofotômetro (CARY OLIS-17, On-Line Instrument Systems, Inc. USA) na faixa (200 a 700 nm) UV-visível do espectro eletromagnético com intervalos de 0,5 nm.

Suspensão de *C. albicans* ( $T\%=73\pm4\%$ ) em PBS foi depositada em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm, para leitura de uma linha base de absorção. Posteriormente, foram lidas suspensões da levedura corada com AM nas concentrações 50, 100, 250, 500, 750 e 1000  $\mu\text{M}$ .

### **3.5 TRANSPORTE DO AZUL DE METILENO PELA MEMBRANA**

Foi utilizado o laser de GaAlAs (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de emissão em  $\lambda=660\text{ nm}$ . As amostras foram irradiadas conforme descrito na sessão 3.1.2, porém, com parâmetros de irradiação diferentes (TABELA 3).

TABELA 3- Condições de irradiação nas amostras de *C. albicans* DAY10085

Tempo (s)	120	240	360
Fluência (J/cm <sup>2</sup> )	20	40	60
Energia (J)	6	12	18
Potência (mW)	50		
Taxas de fluência (mW/cm <sup>2</sup> )	165		

Foram utilizadas *C. albicans* (DAY10085) e as células foram inicialmente crescidas em caldo *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) por 24h a 30°C. Após este período de crescimento, elas foram colhidas e lavadas duas vezes em PBS pH 7,2. O inóculo de aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC/mL foi incubado com inibidores de transporte ativo (Verapamil) e passivo (INF<sub>271</sub>) por 30 min. e, posteriormente, incubado por mais 30 min com AM 100 µM. Após a exposição ao FS, o inóculo foi lavado três vezes em PBS.

As amostras foram divididas em cinco experimentos distintos, cada um deles composto por grupo controle; grupo exposto às drogas sem irradiação, para avaliação da toxicidade no escuro (momento 0); e grupo PDT com irradiações nos três tempos 2, 4 e 6 minutos (TABELA 3).

Além das drogas inibidoras das bombas de transporte, também foi utilizada cepas de *C. albicans* geneticamente modificadas para expressar exacerbadamente bombas de transporte ativo e passivo, bem como sua cepa de referência como controle. Estas cepas foram gentilmente cedidas para os nossos experimentos por *Wellman Center for Photomedicine, Department of Dermatology of Harvard Medical School*. As características de cada cepa estão dispostas na TABELA 4.

TABELA 4 – Características das cepas utilizadas no experimento

<i>C. albicans</i>	Característica da cepa
DAY	Cepa selvagem (colhida de paciente)
YEM12	Cepa selvagem parente de YEM13
YEM13	Rica em bombas de difusão facilitada <sup>12</sup>
YEM14	Cepa selvagem parente de YEM15
YEM15	Rica em bombas de transporte ativo (ABC transportadoras) <sup>8, 12</sup>

Cada experimento foi realizado em triplicata (semeados em três placas) e todos os experimentos foram realizados três vezes (em dias diferentes). Os resultados foram expressos como médias e desvio padrão da média para cada grupo, e a linha entre os dados representa o ajuste da curva que descreve o comportamento intragrupo.

### 3.5.1 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Após o crescimento das cepas de *C. albicans* em caldo YPD, as células foram colhidas por centrifugação (12000 RPM por 2 min), lavadas duas vezes em PBS e suspensas em inóculo de  $10^7$  UFC/mL. Posteriormente, este inóculo foi incubado com 10 µg/mL de rodamina 1,2,3 (R123) (R123; Eastman Kodak, Rochester, EUA) por 30 min, seguido de 100 µM de AM por mais 30 min. As células foram divididas em 4 grupos e expostas, ou não, aos inibidores de transporte de membrana. O primeiro grupo não recebeu inibidores, somente AM e R123; o segundo recebeu os corantes e verapamil; o terceiro grupo recebeu INF; e o quarto grupo recebeu verapamil e INF. Após o tempo de incubação, as células foram fixadas em formol a 2% e glicerol a 10%. A inclusão do glicerol na fixação se destinou a dificultar o bombeamento dos corantes para fora das células e diminuir possíveis deformações anatômicas causadas pela metodologia de fixação por formol. As células foram colhidas, depositadas sobre uma lâmina de vidro, cobertas por uma lamínula e levadas ao microscópio.

O microscópio confocal (Leica TCS NT, Leica Mikroskopie und System GmbH, Wetzlar, Alemanha) foi utilizado neste estudo. As células foram observadas utilizando-se uma lente objetiva de 100x imersa em óleo e imagens de resolução 512x512 pixels foram gravadas. Dois canais coletaram o sinal de fluorescência: o primeiro foi utilizado para R123, na região verde (espelho dicróico 580 nm acoplado a um filtro passa banda 525/50 nm); e o segundo em vermelho, para o AM (espelho dicróico associado a um filtro passa banda maior que 665 nm). Falsas cores, verde e vermelha, foram superpostas para formação das figuras.

Além dos canais fluorescentes, uma imagem em escala de cinza também foi formada para visualização e ajuste do ponto ótimo de foco nas células do campo estudado.

As imagens de sobreposição verde vermelho foram analisadas com a ajuda de um *software* (IMAGEJ 1.41o, *National Institute of Health, USA*) pela contagem de pixels vermelhos por célula no campo de observação. Para cada grupo, foi contado um mínimo de

30 células que não apresentava sobreposição e possuía limite bem definido. A análise estatística foi realizada utilizando teste-t *Student* com nível de significância de 5%.

### 3.6 ACÚMULO DE FOTOSSENSIBILIZADOR EM *C. neoformans* E SUA FOTOINATIVAÇÃO

Com o objetivo de observar as diferenças entre cepas de *C. neoformans*, quatro delas foram incluídas neste experimento. Elas foram incubadas com quatro fotossensibilizadores por 30 min em temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas três vezes em PBS para remoção do excesso de FS e, então, submetidas à irradiação para definição da ação fotodinâmica. Além disso, foi conduzida a avaliação quantitativa de incorporação de fotossensibilizador por esta levedura com a utilização de leitura de fluorescência específica para cada fotossensibilizador que ficou retido no citoplasma dessas células. Por fim, microscopia confocal foi realizada para observar o comportamento dos FS quando em contato com as células de *C. neoformans*.

Estas cepas foram gentilmente cedidas para os nossos experimentos pelo instituto *Wellman Center for Photomedicine, Department of Dermatology of Harvard Medical School*. Na tabela a seguir, são encontradas as cepas utilizadas neste experimento e suas principais características (TABELA 5).

TABELA 5 – Cepas utilizadas no experimento

<i>C. neoformans</i>	Característica da Cepa
KN99 $\alpha$ <sup>66</sup>	Derivado de KNA( $\alpha$ A) e H99( $\alpha$ A); Sorotipo A
CAP59 <sup>67</sup>	Não produz cápsula
ATCC 208819	Não produz melanina
ATCC 208820	Super produtor de melanina

#### 3.6.1 FOTOSSENSIBILIZADORES E PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO

As células de *C. neoformans* foram submetidas ao teste de inativação com os fotossensibilizadores Azul de Metileno, Rosa Bengala (RB), Conjugado Poli-L-lisina Clorina e<sub>6</sub> (pL-ce6)<sup>62, 68</sup> e 5-etilamina-9-dietilaminobenzeno [a] fenotiazina selênio (EtNBSe)<sup>69</sup>. Cada cepa do microrganismo foi exposta a todos os fotossensibilizadores (FIGURA 1). Embora tenham sido empregados 4 fotossensibilizadores com características

diferentes, a interpretação dos dados deve ser cuidadosa, pois, a busca no comportamento de cada cepa frente ao desafio fotodinâmico deve ser observada. Isso porque a metodologia empregada não permite diferenciar peculiaridades e discrepâncias entre diferentes moléculas fotossensibilizadoras. Os grupos foram irradiados de forma similar, porém com pequenas diferenças no comprimento de onda ótimo para cada FS, bem como parâmetros de irradiação com diferentes intensidades, principalmente para o FS RB. Além disso, as concentrações molares dos fotossensibilizadores não foram iguais para todos os casos, assim, este fato pode comprometer a simples observação de diferenças entre fotossensibilizadores.

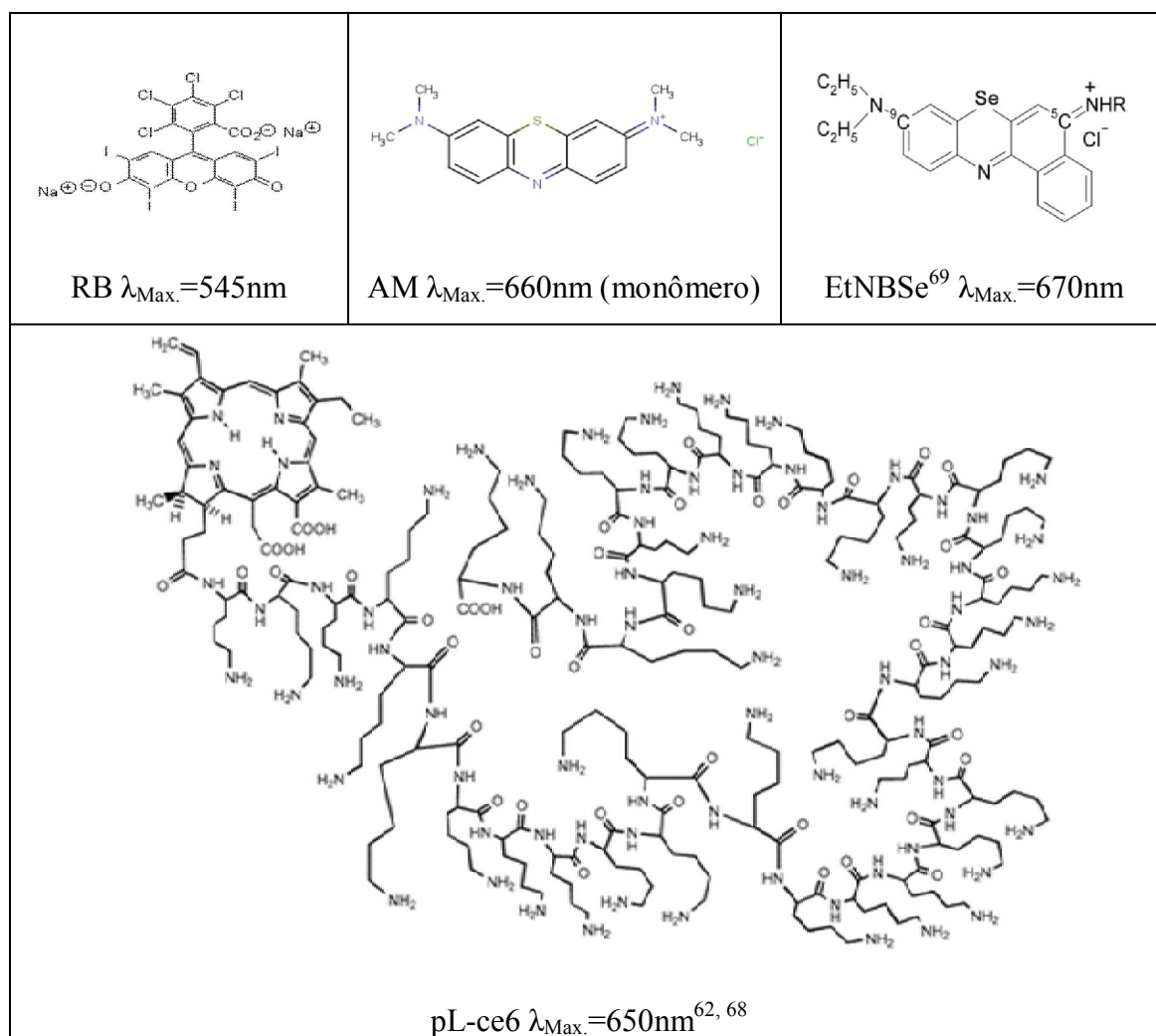


FIGURA 1- Fotossensibilizadores utilizados neste experimento

As leveduras foram crescidas em caldo YPD por 48h a 30°C. Após este período, as células foram colhidas por centrifugação (10 min; 4000 RPM) e lavadas duas

vezes em PBS para remoção do meio de cultura. Estas foram submetidas a incubação com os fotossensibilizadores por 30 min, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Decorrido o tempo de pré irradiação, as células foram lavadas três vezes em PBS e 1 mL foi transferido para uma placa de microtitulação de 24 poços, cuja área de 17 cm<sup>2</sup> de cada compartimento foi levada à irradiação; e outra parte dessa suspensão exposta aos fotossensibilizadores foi separada para dar sequência ao próximo experimento, que será descrito abaixo (3.6.2 Incorporação de FS em *C. neoformans*). Em cada experimento houve um grupo controle, que não recebeu tratamento e um grupo para avaliação da toxicidade sem irradiação.

Posteriormente, cada placa de 24 poços com células e corante foi levada para irradiação com seu comprimento de onda de ressonância (TABELA 6). Para isso foi utilizada lâmpada halógena (LumaCare LC122, MBG Technologies, UK) acoplada a filtros específicos; e a suspensão foi irradiada com fluências de 10, 20, 30 e 40 J/cm<sup>2</sup> (TABELA 6).

TABELA 6 – Parâmetros de irradiação de *C. neoformans* com 4 fotossensibilizadores

	AM	RB	PI-ce6	EtNBS
Comprimento de onda max. (nm)	665	530	652	665
Potência (mW)	700	450	700	700
Taxa de Fluência (mW/cm <sup>2</sup> )	40	30	40	40
		6	4	4
Tempo de irradiação (min.)	8	12	8	8
	16	18	12	12
	24	24	16	16

Decorrido o tempo de irradiação, as amostras foram diluídas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> vezes a concentração inicial, plaqueadas em ágar YPD e incubadas por 48h a 30°C, conforme previamente descrito no item (3.1.4).

### 3.6.2 INCORPORAÇÃO DE FS EM *C. neoformans*

A massa de células resultante do experimento anterior, que visou a inativação de *C. neoformans*, foi digerida em 0,1M de NaOH e em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% por 24h e colocada em placas de micro-titulação de 96 poços. A fluorescência foi

medida em espectrofluorímetro (SpectraMax Plus 384, MDS Analytical Technologies, EUA)<sup>55, 70</sup>. Curvas de calibragem foram traçadas para diferentes concentrações dos quatro fotossensibilizadores e o resultado de fluorescência das células foi relacionado à equação desta curva, o que gerou a concentração de FS acumulada nas células digeridas. Foi relacionado o número de moléculas de FS pelo número de células presentes na suspensão para as quatro cepas de *C. neoformans*. Maiores detalhes sobre a obtenção das equações podem ser encontrados no ANEXO C – Concentração de FS em *C. neoformans*.

### **3.6.3 AVALIAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DE FS EM *C. neoformans***

Para realização deste experimento, as células passaram pelos mesmos processos de crescimento, exposição ao FS concomitante a um marcador de mitocôndria, e os excessos foram removidos por lavagem, como já descrito nos itens 3.6.1 e 3.6.2. Posteriormente elas foram gentilmente centrifugadas para formação de uma região com maior concentração de células no fundo do tubo e 4 µL desta suspensão foi depositada sobre lâmina de vidro e coberta por lamínula. As amostras foram levadas, abrigadas da iluminação ambiente e levadas para visualização no microscópio confocal, anteriormente descrito no item 3.5.1.

## **3.7 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS EM *C. neoformans* APÓS A PDT**

### **3.7.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Microscopia eletrônica de varredura foi realizada para observação de possíveis alterações morfológicas nas células de *C. neoformans* ATCC 90112 após o tratamento com PDT e azul de metileno. Os parâmetros de irradiação utilizados neste experimento foram idênticos àqueles descritos no item 3.1.2 (TABELA 2), com potência do laser ajustada em 90 mW.

Dois grupos foram criados para observação dos efeitos: um grupo controle (sem FS e irradiação) e outro após o tempo total de irradiação. As células de ambos os grupos foram colhidas e fixadas em glutaraldeído a 2,5% por 1h a 25°C. Posteriormente, estas células foram desidratadas em concentrações progressivas de etanol (50, 60, 70, 80, 90 e 100%), colocadas sobre uma lâmina de vidro, revestida por cobertura metálica de ouro-paládio e observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Phillips XI, Eindhoven, Holanda). Duas amostras de cada grupo foram preparadas e observadas em toda sua

extensão. As figuras apresentadas representam o conjunto de características mais comumente observadas no campo de visão das lâminas.

### 3.7.2 APOPTOSE DE *C. neoformans* APÓS PDT

Os processos de apoptose nas células fúngicas foram investigados na busca de uma visão mais aprofundada sobre as formas pelas quais os fenômenos metabólicos influenciam a morte celular por PDT, além de um maior entendimento das alterações na morfologia celular após o tratamento fotodinâmico.

Para tanto, células de *C. neoformans* KN99 $\alpha$  foram crescidas em caldo YPD por 48h a 30°C. Posteriormente, as células foram tratadas com PDT utilizando uma taxa de fluência de 40mW/cm<sup>2</sup> produzida por luz não coerente acoplada a fibra óptica e filtro com transmissão entre 645-675 nm (LumaCare, Londres, Reino Unido). O fotossensibilizador empregado foi pL-ce6 utilizado na concentração final de 10 $\mu$ M. As células foram iluminadas por fluências de 10, 20, 30 e 40 J/cm<sup>2</sup> nos tempos 4, 8, 12 e 16 min de irradiação. Aliquotas foram retiradas durante a irradiação para quantificação de UFC/mL.

Células submetidas, ou não, à PDT nas fluências de 0, 10 e 40 J/cm<sup>2</sup> foram coradas com ApoAlert® (Anexin IV, Clontech Laboratories Inc., Mountain View, EUA) conforme manual de instruções fornecido pelo fabricante. O método baseia-se no fato das células que estão em processo de apoptose sofrerem uma mudança na posição das fosfatidilserinas na membrana celular. Estas moléculas passam a ocupar a parte externa da membrana celular (em contato com o meio extracelular) durante o início do processo de apoptose e podem ser coradas com FITC (canal verde)<sup>71</sup>. Outro corante utilizado neste *kit* é o iodeto de propídio (canal vermelho), que se liga à cromatina condensada pelos processos mais avançados de apoptose.

Após receber o devido tratamento de coloração, as células foram levadas ao microscópio confocal, conforme descrito no item 3.5.1, porém no canal vermelho foi utilizado um filtro passa banda 600/30 nm, para evitar a visualização da fluorescência do fotossensibilizador.

### 3.7.3 EFEITO DA MELANINA NA AÇÃO FOTODINÂMICA

*C. neoformans* ATCC 208820 (super produtor de melanina) foi cultivado em meio mínimo com ou sem L-dopamina, para dar substrato para formação de melanina pelo

fungo<sup>72</sup>. As células foram incubadas por 10 dias e em seguida submetidas à PDT em dois regimes diferentes, previamente descritos nos itens 3.1.2 e 3.7.2.

### 3.8 INDUÇÃO DA CRIPTOCOCOSE E FOTOINATIVAÇÃO *IN VIVO*

Vinte e cinco camundongos BALB/c fêmeas, com massa corpórea 24-26 g, foram utilizadas neste estudo, que recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN-CNEN/SP (Apêndice A). Todos os animais foram acondicionados sob as mesmas interferências ambientais, ficaram submetidos a um ciclo 12/12 horas claro e escuro, além de receber alimentação e hidratação *ad libitum*.

Para indução da criptococose, um inóculo de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL foi preparado com *C. neoformans* (ATCC 90112) colhidos de um placa de Petri contendo ágar Sabouraud, e suspensos em PBS pH7,2. Quinze animais foram anestesiados com uma associação de Cetamina e Xilasina, e divididos em grupos compostos por 5 animais em cada um deles. Os animais tiveram suas patas posteriores esquerdas inoculadas com 0,1 mL da suspensão fúngica com concentrações decrescentes de  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  células por pata. Estes animais foram acompanhados por 60 dias após a inoculação e este experimento teve o objetivo de observar o edema após a inoculação. As patas posteriores do lado direito foram inoculadas com o mesmo volume de suspensão salina, como controle.

O melhor grupo para indução de criptococose foi selecionado e 10 novos camundongos com as mesmas características descritas acima foram novamente inoculados com  $10^7$  células por pata. Três dias após a inoculação, 5 camundongos foram tratados com PDT. Este tratamento foi composto pela injeção de 50  $\mu$ L de solução aquosa de azul de metileno, na concentração de 150  $\mu$ M, na região subplantar da pata afetada. O grupo controle recebeu o mesmo volume de PBS. Depois de 30 min da injeção do fotossensibilizador, os animais foram irradiados com laser diodo (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil), com comprimento de onda  $\lambda=660$  nm, 100 mW de potência e os parâmetros de irradiação foram: energia de 54 J, 9 min de irradiação, fluência de 180 J/cm<sup>2</sup> e intensidade de 333 mW/cm<sup>2</sup>.

Os 10 animais foram levados à câmara de CO<sub>2</sub> para eutanásia e amostras do tecido da pata foram colhidos assepticamente, pesados, macerados em 1 mL de PBS e então diluídos serialmente nas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  vezes a concentração inicial. Aliquotas de 10  $\mu$ L de cada diluição foram estriadas em triplicata sobre placas de Petri com ágar Sabouraud acrescido cloranfenicol e incubadas por 48h a 30°C<sup>61</sup>.

As colônias foram contadas, convertidas em UFC/g e levadas à análise estatística com teste-t *Student* ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITOS DOS PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO NA FOTO-INATIVAÇÃO DE LEVEDURAS

As leveduras cresceram em ágar Sabouraud e as características morfológicas das colônias foram observadas. *C. neoformans* apresentou colônias brancas com bordas regulares e aspecto mucoso (FIGURA 2A). As colônias de *C. albicans* (FIGURA 2B) mostraram aspecto leitoso brilhante e crescimento homogêneo sob a superfície do ágar. As colônias de *C. krusei* (FIGURA 2C) apresentaram coloração branca fosco, e com sua superfície mais rugosa que as demais espécies.

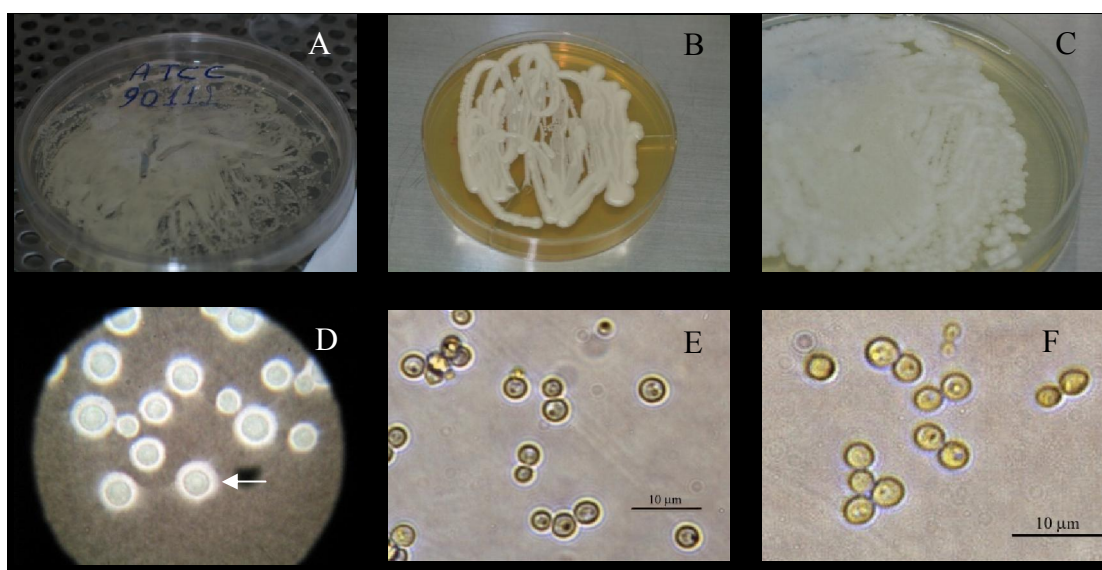


FIGURA 2 – As imagens ilustram os microrganismos utilizados (A e D) *C. neoformans*, (B e E) *C. albicans* e (C e F) *C. krusei*. Nas figuras superiores (A, B e C), são mostradas placas de Petri com os microrganismos com suas características de morfologia macroscópica. Nas figuras D, E e F, são mostradas imagens da microscopia óptica para cada uma das três espécies de leveduras utilizadas no experimento. Em (D) observamos a cápsula de *C. neoformans* identificada pela seta e a figura encontra-se sob aumento original de 1000 vezes. Em (E) podemos observar células de *C. albicans* observadas ao microscópio óptico sem coloração e em (F) podemos observar *C. krusei*

As células de cada microrganismo foram colhidas e depositadas sobre uma lâmina de microscópio, cobertas com lamínula e então, levadas para observação de suas características micro morfológicas em microscópio óptico e verificação da pureza das amostras. *C. neoformans* (FIGURA 2D) recebeu a coloração negativa com tinta nanquim

para evidênciação da cápsula externa, enquanto *C. albicans* e *C. krusei* não receberam qualquer tipo de coloração.

Nem a irradiação com o laser, nem o corante não irradiado na presença da suspensão de leveduras (TABELA 7 e TABELA 8) mostrou qualquer efeito deletério ao crescimento das diferentes espécies, bem como nas fases de crescimento exponencial (logarítmica) e na fase estacionária de *C. albicans*. Estes resultados estão de acordo com relatos descritos na literatura<sup>40, 45, 46, 52, 56, 73</sup>.

TABELA 7 – Médias  $\pm$  DP encontrados nos grupos controle, irradiados com laser e expostos ao AM na concentração de 100 $\mu$ M. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos

Microrganismos - Incubação	UFC/mL log <sub>10</sub>		
	L-PS-	L+PS-	L-PS+
<i>C. neoformans</i> (48h)	6,78 $\pm$ 0,20	6,77 $\pm$ 0,01	6,60 $\pm$ 0,26
<i>C. albicans</i> (24h)	6,41 $\pm$ 0,22	6,25 $\pm$ 0,22	6,28 $\pm$ 0,02
<i>C. krusei</i> (24h)	5,80 $\pm$ 0,05	5,64 $\pm$ 0,07	5,81 $\pm$ 0,11

TABELA 8 – Resultado expresso em UFC/mL log<sub>10</sub> das médias  $\pm$  desvio padrão (DP) encontrados nos grupos controle e irradiados com laser. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos

<i>C. albicans</i> - Incubação	L-PS-	L+PS-	L-PS+
Fase Logarítmica (12h)	6,41 $\pm$ 0,06	6,20 $\pm$ 0,13	6,22 $\pm$ 0,09
Fase Estacionária (24h)	6,00 $\pm$ 0,04	5,92 $\pm$ 0,08	5,98 $\pm$ 0,03

De uma forma geral, as células submetidas à PDT mostraram que a intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup> apresentou inativação moderada sobre as leveduras e os efeitos foram proporcionais ao tempo de irradiação. Após uma irradiação de 9 min foi alcançada uma redução de 3 logs de *C. albicans* em fase de crescimento exponencial e 2 logs na fase estacionária. Além disso, estes efeitos letais aumentaram com o aumento da intensidade.

A intensidade de 200 mW/cm<sup>2</sup> mostrou uma inativação um pouco maior na fase de crescimento exponencial após 3 min de irradiação. Neste mesmo tempo (3 min) sob intensidade de 300 mW/cm<sup>2</sup>, já foi possível observar uma redução de 2 logs de *C. albicans* em fase de crescimento e 1 log em fase estacionária. Decorridos 6 min sob irradiação de

200 e 300 mW/cm<sup>2</sup>, encontrou-se uma inativação de 6 logs para ambas as fases de crescimento (FIGURA 3).

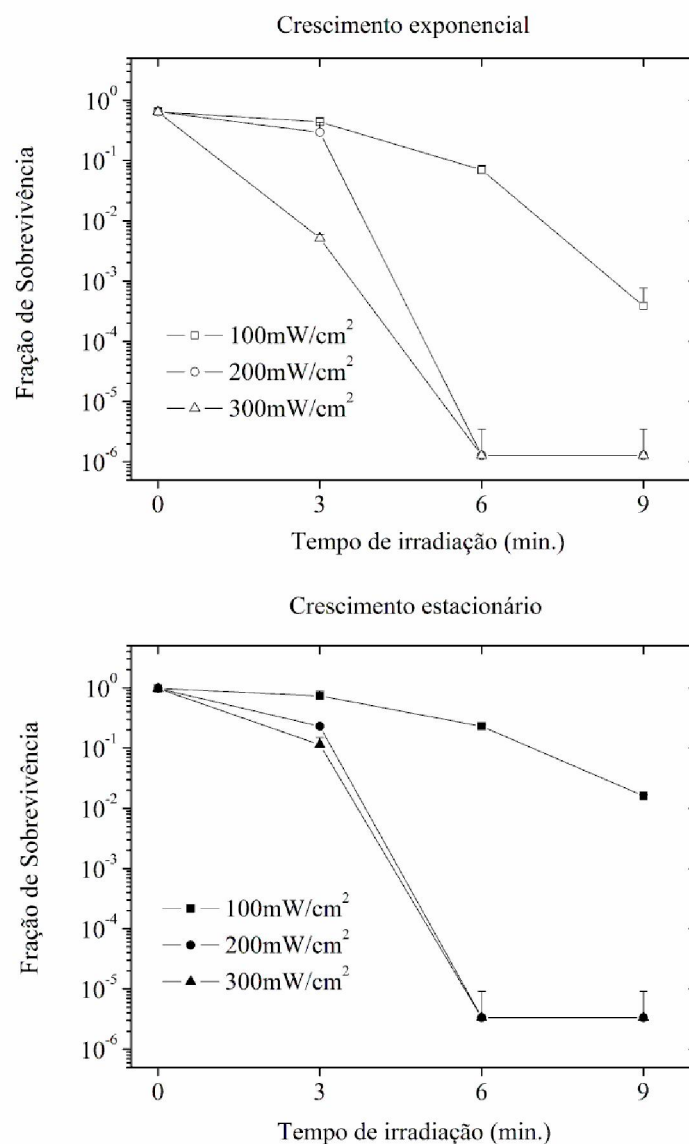


FIGURA 3 - No gráfico são representadas as médias + DP das frações de sobrevivência encontradas para *C. albicans*, em fase de crescimento exponencial, e estacionária, submetidas à irradiação em três diferentes intensidades

Comparando-se diferentes espécies de leveduras, a mesma tendência de comportamento pode ser observada no que diz respeito ao papel da intensidade. Quanto maior a intensidade de irradiação, mais rapidamente ocorreu a inativação das leveduras. No entanto, as células de *C. neoformans* mostraram-se mais resistentes à inativação quando

comparadas às espécies *C. albicans* e *C. krusei* (compare a irradiação por 6 min em 300 mW/cm<sup>2</sup> nas FIGURA 4, FIGURA 5 e FIGURA 6).

Após 9 min de irradiação, *C. neoformans* reduziu pouco mais de 1 log sob 100 mW/cm<sup>2</sup>, contra mais de 6 logs sob 300 mW/cm<sup>2</sup> (FIGURA 4).

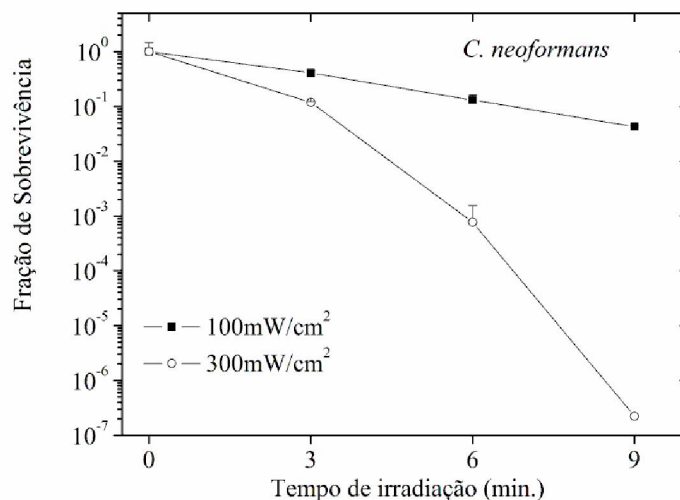


FIGURA 4 – Efeito do tempo de exposição na fração de sobrevivência de *C. neoformans* nas intensidades de 100 e 300 mW/cm<sup>2</sup>. As barras de erro representam o desvio padrão

Por outro lado, as espécies *C. albicans* e *C. krusei* apresentaram comportamentos similares na resposta à PDT, diferindo em um leve aumento da susceptibilidade (3 logs) de *C. albicans* após 9 min. de irradiação a 100 mW/cm<sup>2</sup>, contra 1,5 logs de *C. krusei*. Além disso, sob 300 mW/cm<sup>2</sup> em 3 min, *C. albicans* apresentou 2 logs de redução contra apenas 1 log para *C. krusei* (FIGURA 5 e FIGURA 6).

Estas diferenças podem ser explicadas devido à característica da *C. krusei* conseguir bombear moléculas tóxicas para fora da célula, utilizando bombas ativas de efluxo<sup>5, 7</sup>, conhecidas como bombas transportadoras ABC. Isto pode ser visto em relação à família de antifúngicos azoles, que são ineficientes contra esta espécie devido ao seu pouco acúmulo no citoplasma de *C. krusei*<sup>4</sup>.

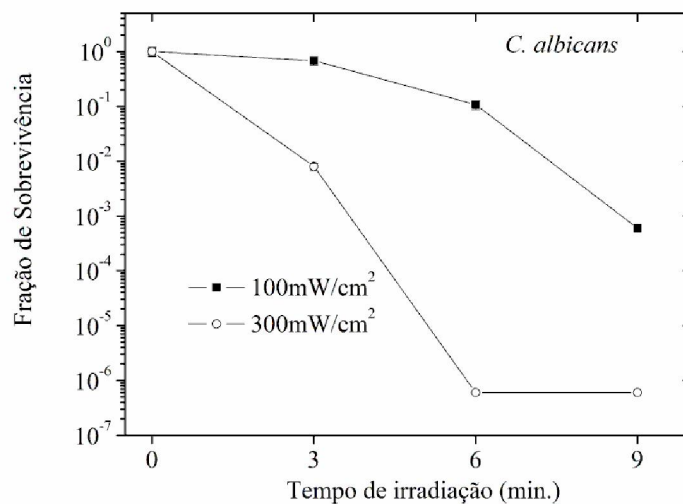


FIGURA 5 – Efeito do tempo de exposição na fração de sobrevivência de *C. albicans* nas intensidades de 100 e 300 mW/cm². As barras de erro representam o desvio padrão

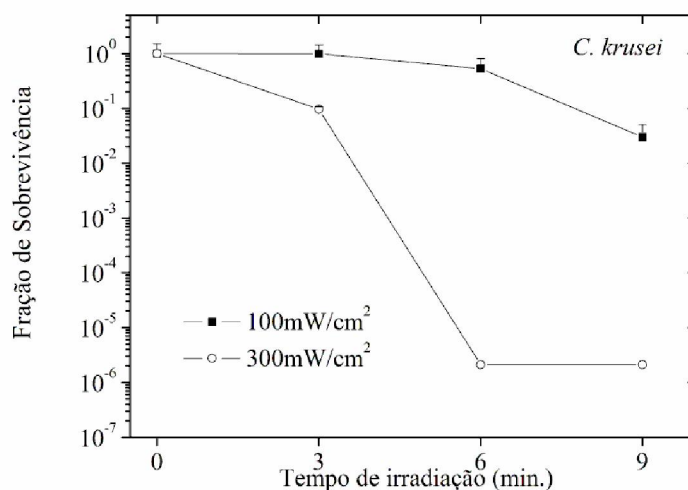


FIGURA 6 – Efeito do tempo de exposição na fração de sobrevivência de *C. krusei* nas intensidades de 100 e 300 mW/cm². As barras de erro representam o desvio padrão

Os trabalhos de PDT antimicrobiana têm mostrado avanços no estudo dos caminhos fotoquímicos e nas descobertas bioquímicas de morte celular. Entretanto, as circunstâncias e os parâmetros físicos de irradiação não são suficientemente reportados. A fluência é usada como o principal parâmetro para a comparação de grupos em trabalhos na literatura de PDT<sup>32, 55, 70</sup>. Isto é baseado na lei de reciprocidade, que em PDT é aceito como verdade<sup>58</sup>. Este princípio diz que, os efeitos biológicos decorrentes da irradiação dependem da fluência, independentemente do tempo (consequentemente da intensidade) sob o qual

esta fluência foi entregue ao sistema biológico. A consequência de seguir a lei da reciprocidade é uma super estimação da importância da fluência, o que coloca em risco, a correta interpretação dos resultados em PDT.

Na comparação dos efeitos de inativação microbiana na fluência de 54 J/cm<sup>2</sup>, resultante de dois parâmetros distintos de irradiação (9 min; 100 mW/cm<sup>2</sup>) e (3 min.; 300 mW/cm<sup>2</sup>), foi possível observar que, mesmo sob uma intensidade menor, o tempo de irradiação influenciou de forma significativa os resultados de morte microbiana.

O parâmetro de irradiação (54 J/cm<sup>2</sup>; 9 min; 100 mW/cm<sup>2</sup>) foi mais letal aos microrganismos, quando comparado a um tempo menor com intensidade maior (54 J/cm<sup>2</sup>; 3 min; 300 mW/cm<sup>2</sup>). Este comportamento foi similar para as diferentes fases de crescimento de *C. albicans* (FIGURA 7), bem como para todos os microrganismos utilizados neste experimento (FIGURA 8). Este resultado demonstra que o tempo de irradiação deve ser levado em consideração na análise dos resultados de PDT.

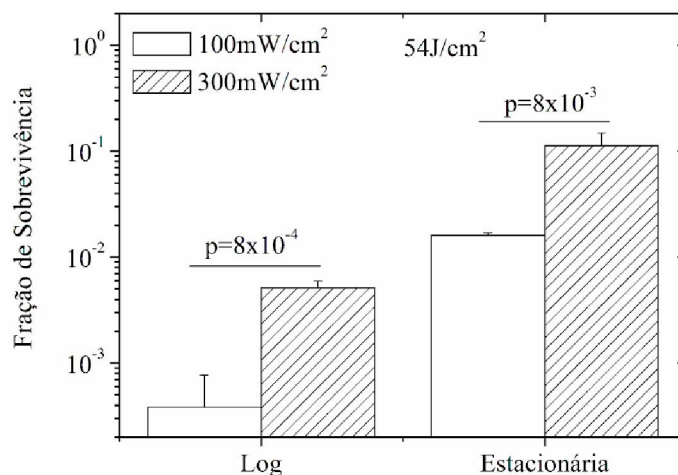


FIGURA 7 – Efeito da fluência de 54 J/cm<sup>2</sup> entregue sob intensidades de 100 mW/cm<sup>2</sup> (9 min) e 300 mW/cm<sup>2</sup> (3 min) na fração de sobrevivência de *C. albicans* em diferentes fases de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão

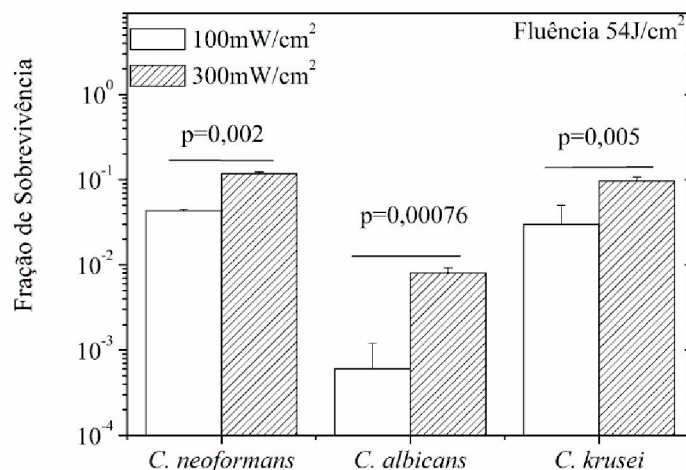


FIGURA 8 - Efeito da fluência de 54 J/cm<sup>2</sup> entregue sob intensidades de 100 mW/cm<sup>2</sup> (9 min) e 300 mW/cm<sup>2</sup> (3 min) na fração de sobrevivência de *C. neoformans*, *C. albicans*, e *C. krusei*. As barras de erro representam o desvio padrão

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é reportada como o principal fator citotóxico em PDT<sup>2, 32, 37, 40, 43, 46, 55</sup>. No entanto, a velocidade de formação de ERO pode ser afetada pelos parâmetros de irradiação, o que pode resultar em diferenças nas quantidades de morte celular. As respostas na formação de ERO foram quantificadas e mostrou-se que elas dependem também da intensidade e do tempo de irradiação (FIGURA 9). A absorvância do RNO em 440 nm diminuiu sob as duas intensidades testadas, e tempos de exposição mais longos produziram maior formação de ERO (FIGURA 9A). Por outro lado, as mesmas fluências (FIGURA 9B) determinaram quantidades diferentes de ERO nos diferentes regimes de irradiação, tendo a menor intensidade (maior tempo de irradiação) uma maior produção dessas espécies tóxicas aos microrganismos. Estes resultados convergem aos encontrados na inativação de leveduras, e explicam os comportamentos das células frente à PDT.

A irradiação com 300 mW/cm<sup>2</sup> pode gerar menos ERO, quando comparadas a 100 mW/cm<sup>2</sup> para as mesmas fluências, porém, a velocidade de sua formação parece estar fortemente relacionada aos níveis de morte celular observadas anteriormente. Devem-se encorajar mais estudos dentro destes novos achados para demonstrarem o papel da intensidade e do tempo de irradiação nos mecanismos de ação da PDT antimicrobiana.

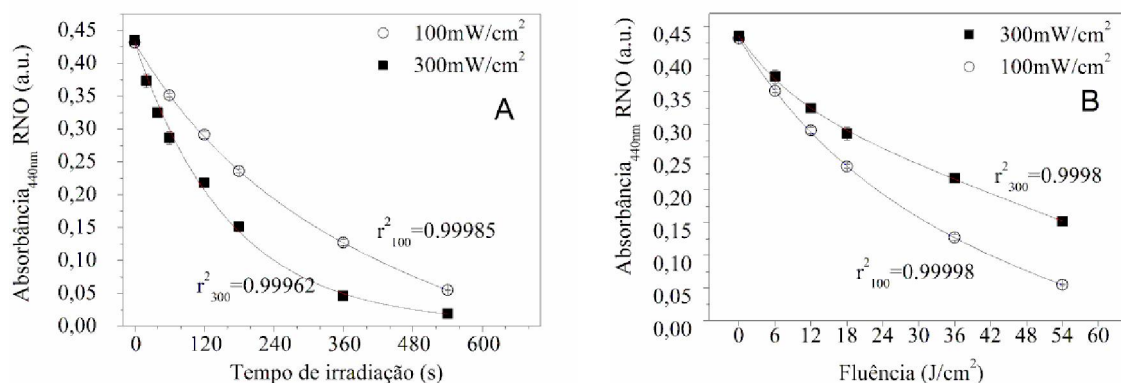


FIGURA 9 – Efeito do tempo de irradiação (A) e da fluência (B) na formação de espécies reativas de oxigênio medida pela degradação do RNO ( $\lambda=440$  nm). Os pontos no gráfico representam a média de três diferentes experimentos e as barras representam o desvio padrão

A temperatura medida na suspensão de leveduras mostrou que na ausência do fotossensibilizador não houve aumento. Na amostra corada com 100  $\mu$ M de azul de metileno, uma alteração de  $\Delta T=3^{\circ}\text{C}$  foi observada (FIGURA 10). Como é bem estabelecida na literatura, uma temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  é incapaz de causar injúrias térmicas às leveduras.

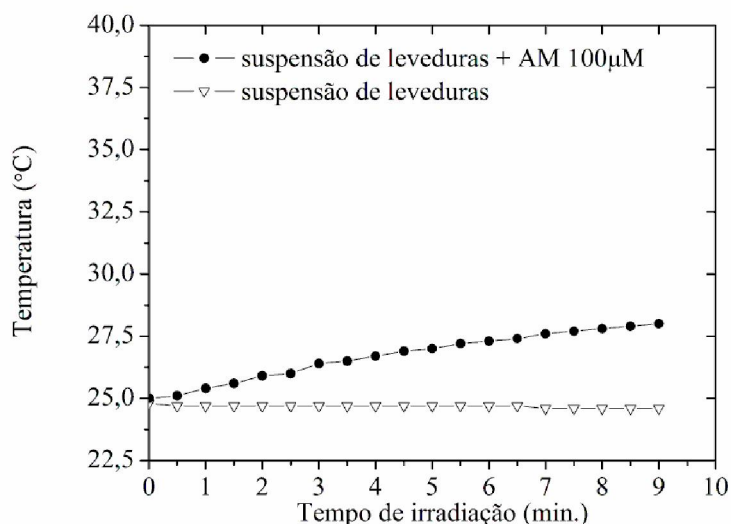


FIGURA 10 – Efeito da irradiação laser ( $300\text{ mW/cm}^2$  por 9 min) sobre a temperatura da suspensão de leveduras corada ou não com AM na concentração de  $100\mu\text{M}$

#### 4.2 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE AM NA REDUÇÃO MICROBIANA

Os efeitos da PDT foram testados na foto-inativação de *C. albicans* em relação às concentrações de AM utilizando-se parâmetros sub-letais de irradiação (300mW/cm<sup>2</sup>; 3min; 54J/cm<sup>2</sup>). As amostras microbianas foram preparadas e expostas ao fotossensibilizador nas concentrações de 50 a 1000 µM por 10 min antes da irradiação (FIGURA 11).



FIGURA 11 – Placa de micro-titulação com suspensão de *C. albicans* coradas com AM (da esquerda para direita) nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000µM

Não foi observada toxicidade sobre as amostras de *C. albicans* em nenhuma das concentrações testadas neste experimento, com o tempo de contato de 10 min com o AM. Por outro lado, a PDT apresentou seu maior efeito nas concentrações de 50 e 100 µM, que apresentaram uma redução de aproximadamente 1,5 logs. Nas concentrações de 250, 500 e 750 µM, uma pequena ação fotodinâmica pode ser observada, porém com resultados inferiores a 0,5 log. Finalmente, a concentração de 1000 µM não apresentou qualquer diferença ( $p>0,05$ ) em comparação com o grupo não irradiado (FIGURA 12).

No intuito de explicar a diminuição da inativação microbiana com aumento da concentração do fotossensibilizador, amostras de *C. albicans* coradas com AM foram examinadas em espectrofotômetro de absorção óptica e os resultados foram comparados aos achados de inativação destas leveduras.

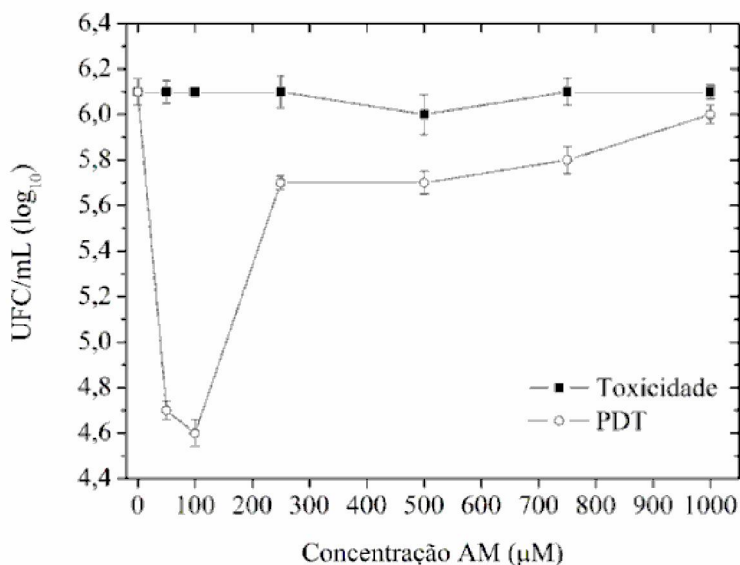


FIGURA 12 – Médias e desvio padrão da contagem de *C. albicans* submetidas a concentrações progressivas de AM. O tempo de contato das células com o fotossensibilizador foi de 10 min e os grupos PDT foram irradiados com *laser* (300mW/cm<sup>2</sup>; 3min; 54J/cm<sup>2</sup>)

O azul de metileno apresentou um processo de dimerização proporcional ao aumento de sua concentração. Foram observadas bandas de absorção na região do ultravioleta, e duas principais bandas de absorção na região do visível. A primeira relativa ao dímero (D), centrada em  $\lambda=608\text{nm}$ , e a segunda banda tem sua absorção máxima em  $\lambda=664\text{nm}$  e é característica do monômero (M) de azul de metileno. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Usacheva *et al.*<sup>57</sup>. Com o aumento da concentração de AM na suspensão de *C. albicans*, todas as bandas de absorção aumentaram, porém, não de forma proporcional. A relação de monômeros por dímeros (M/D) foi alterada com o aumento da concentração (FIGURA 13).

Foi possível observar um ruído na leitura do pico de absorção do dímero na concentração de 750 µM, porém, ainda foi possível realizar as medidas de relação entre os dois picos no visível. Na concentração de 1000 µM não foi possível obter dados precisos devido à quantidade excessiva de absorção, que superou os limites técnicos do equipamento utilizado.

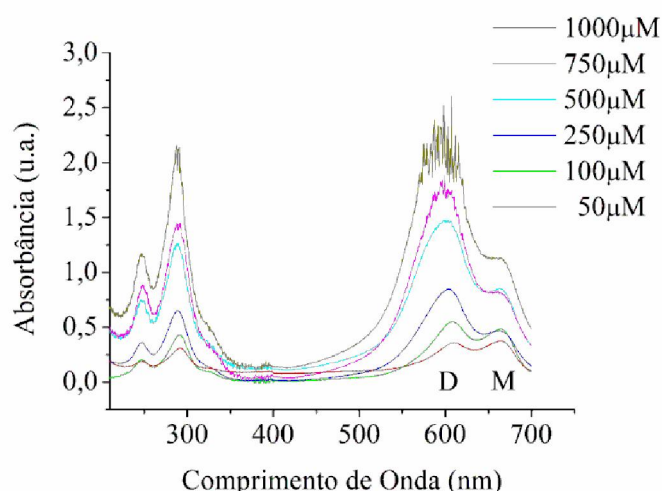


FIGURA 13 – Espectroscopia de absorção óptica de suspensão de *C. albicans* em PBS corada com AM em diversas concentrações. Suspensão desta levedura em PBS foi utilizada como linha base de referência

Os dados de morte microbiana após PDT (FIGURA 12) foram recalculados em termos de porcentagem de redução microbiana em cada concentração de AM e comparados à relação M/D. Os resultados obtidos mostraram que uma relação próxima de 1, ou seja, valor de absorção de dímero próximo ao valor do monômero, levaram a uma maior morte microbiana. Isso indica que mesmo com uma quantidade maior de moléculas presentes na suspensão, a inativação de *C. albicans* não ocorreu de forma eficiente nas maiores concentrações (FIGURA 14).

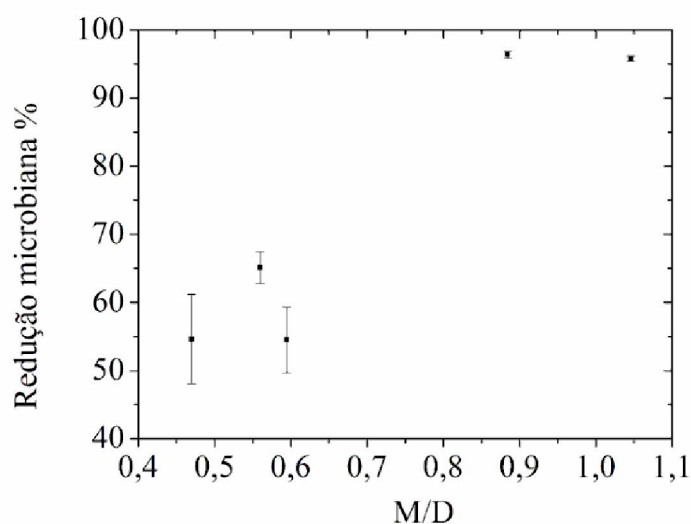


FIGURA 14 – Porcentagem de redução microbiana relacionada a razão M/D para as concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 μM de AM

#### 4.3 TRANSPORTE DE AZUL DE METILENO NA MEMBRANA DE *C. albicans*

Os resultados indicam que foram utilizados parâmetros sub-letais para todas as condições experimentais e não foi observada toxicidade a nenhum dos compostos utilizados durante os tempos de exposição deste estudo.

As células coradas apenas com azul de metileno apresentaram 1,5 logs de inativação após o tempo total de irradiação. Quando estas foram previamente expostas ao Verapamil, observaram-se três ordens de grandeza na redução microbiana. Este dado sugere que o verapamil impediu a saída do FS do citoplasma microbiano, aumentando assim o potencial de toxicidade da PDT. Ao contrário, o INF<sub>271</sub> alcançou uma inativação de apenas 0,5 ordem de grandeza. Este composto promoveu uma proteção contra os efeitos fotodinâmicos e parece ter impedido a entrada do FS no interior das células. Quando utilizado o composto verapamil, seguido de INF<sub>271</sub> e, em seguida AM, os resultados foram similares aos observados somente com AM, porém, o comportamento da curva é similar ao observado para INF<sub>271</sub> e AM. Estes dados sugerem que a entrada do FS na célula ocorre pela bomba inibida pelo INF<sub>271</sub>. Utilizando-se de uma alteração na ordem de colocação dos compostos no inóculo (Verapamil-AM-INF<sub>271</sub>), os resultados mostraram uma tendência similar ao comportamento observado no grupo verapamil e AM. Nota-se que as bombas inibidas pelo verapamil participam de maneira ativa na ação protetora celular contra o azul de metileno (FIGURA 15).

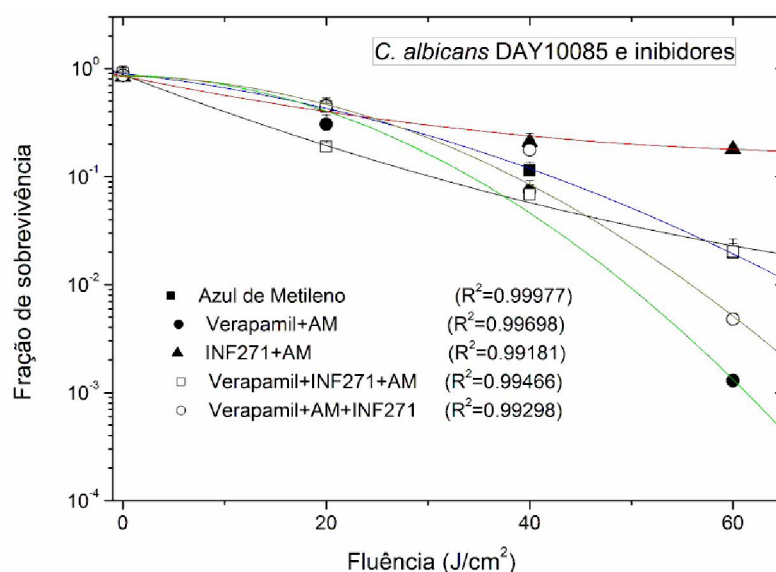


FIGURA 15 - Média e erro padrão para três diferentes dias de experimento

As imagens de fluorescência identificaram os dois corantes (AM e rodamina 1,2,3) no interior das células. De uma forma geral, foi possível notar que as colorações apresentaram uma grande porcentagem de sobreposição, o que indica um acúmulo em sítios similares. A rodamina possui a característica de se ligar à mitocôndria das células<sup>74</sup>, a sobreposição de imagens mostra que o fotossensibilizador também se liga a esta organela (FIGURA 16).

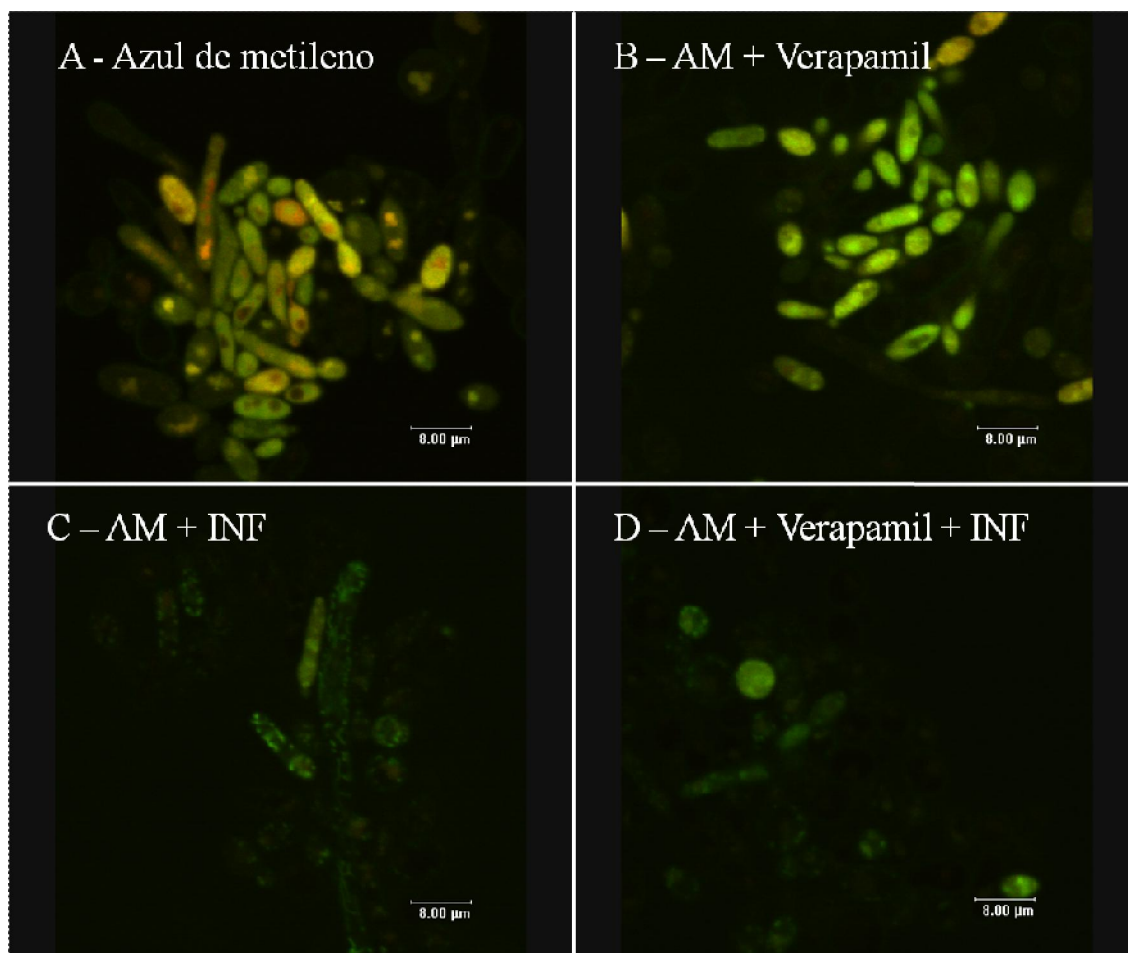


FIGURA 16 – Imagens de sobreposição de fluorescência em *C. albicans* coradas com azul de metileno (canal vermelho), rodamina 1,2,3 (canal verde) e expostas ou não aos inibidores de transporte por membrana. A barra representa 8  $\mu$ m

Visto que foram observadas diferenças de inativação e de acúmulo de fotossensibilizador pelo bloqueio seletivo das bombas de transporte ativo e passivo, decidiu-se por desenhar um novo experimento. Foram utilizadas cepas de *C. albicans* modificadas geneticamente para exacerbar a expressão das bombas ABC transportadoras, bem como das facilitadoras de transporte passivo.

*C. albicans* YEM12 apresentou uma redução de aproximadamente três ordens de grandeza após irradiação ( $60\text{J}/\text{cm}^2$ ,  $165\text{mW}/\text{cm}^2$ , 6 min), enquanto sua parente YEM13 (super produtora de bombas de transporte facilitado) mostrou uma redução de pouco mais que uma ordem de grandeza. Até quatro minutos de irradiação, as duas cepas desses microrganismos mostraram um comportamento praticamente igual frente a PDT. Os resultados indicam que as bombas de transporte facilitado desempenham um papel pequeno na interação com o fotossensibilizador (FIGURA 17).

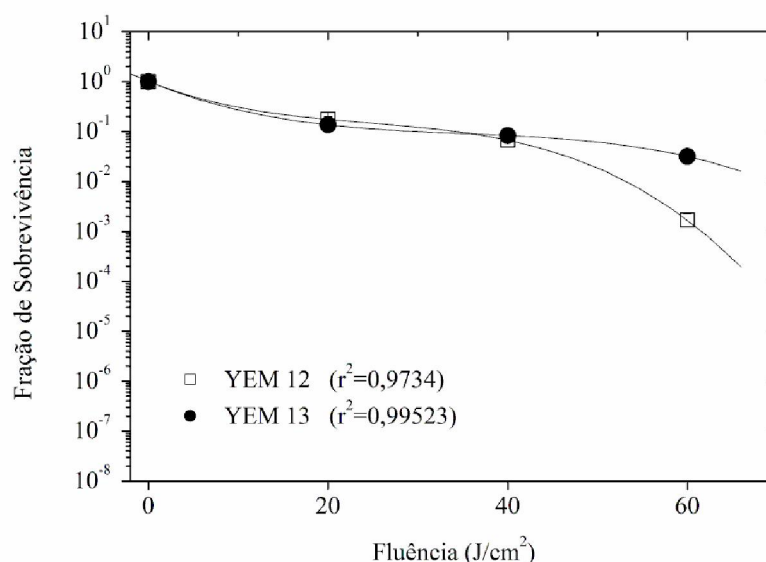


FIGURA 17 – Valores de média e erro padrão para os comportamentos de inativação microbiana com PDT sobre *C. albicans*. A cepa YEM13 apresenta características de grande quantidade de bombas de transporte facilitado; enquanto sua parenta YEM12 é uma cepa colhida de pacientes com candidíase

Utilizando-se dos mesmos parâmetros de irradiação, *C. albicans* YEM14 apresentou grande susceptibilidade à inativação por PDT e ao final de  $60\text{J}/\text{cm}^2$  mostrou aproximadamente cinco ordens de grandeza na redução microbiana. Contrariamente, YEM15, com sua expressão acentuada de bombas ABC transportadora, apresentou apenas uma ordem de grandeza após o mesmo período de irradiação (FIGURA 18). As bombas de transporte ativo parecem proteger esta cepa contra os efeitos da PDT, diminuindo assim a quantidade de morte celular.

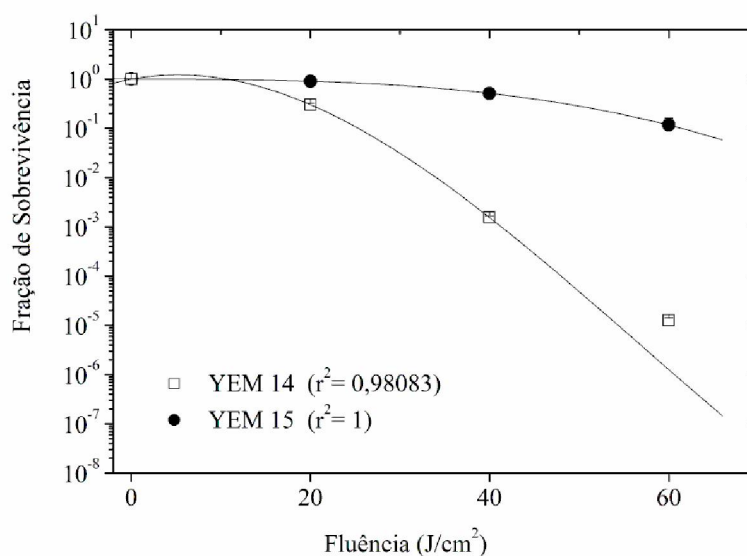


FIGURA 18 - Valores de média e erro padrão para os comportamentos de inativação microbiana com PDT sobre *C. albicans*. A cepa YEM15 apresenta a característica de possuir grande quantidade da bomba ABC transportadora; enquanto sua parenta YEM14 é uma cepa colhida de pacientes com candidíase

Microscopia confocal foi utilizada para avaliar a presença do fotossensibilizador no interior das células de *C. albicans* nas cepas YEM12, YEM13, YEM14 e YEM15, com corantes AM e rodamina 1,2,3, a exemplo do experimento similar com a cepa DAY.

Foi observada a presença de intensa fluorescência proveniente das cepas YEM12 e YEM13, relativa à presença do fotossensibilizador no interior celular. Apesar de sutil, podemos notar que a cepa YEM12 apresentou uma tonalidade mais avermelhada que sua parenta YEM13, o que indica maior presença de AM no citoplasma deste fungo (FIGURA 19).

A cepa YEM14 apresentou também uma coloração avermelhada, por sua vez indicativa da presença de AM. No entanto, sua relativa YEM15 apresentou-se sem cor, o que indica que o fotossensibilizador não se acumulou em seu interior. Podemos observar também que a cor verde (R123) não apareceu.

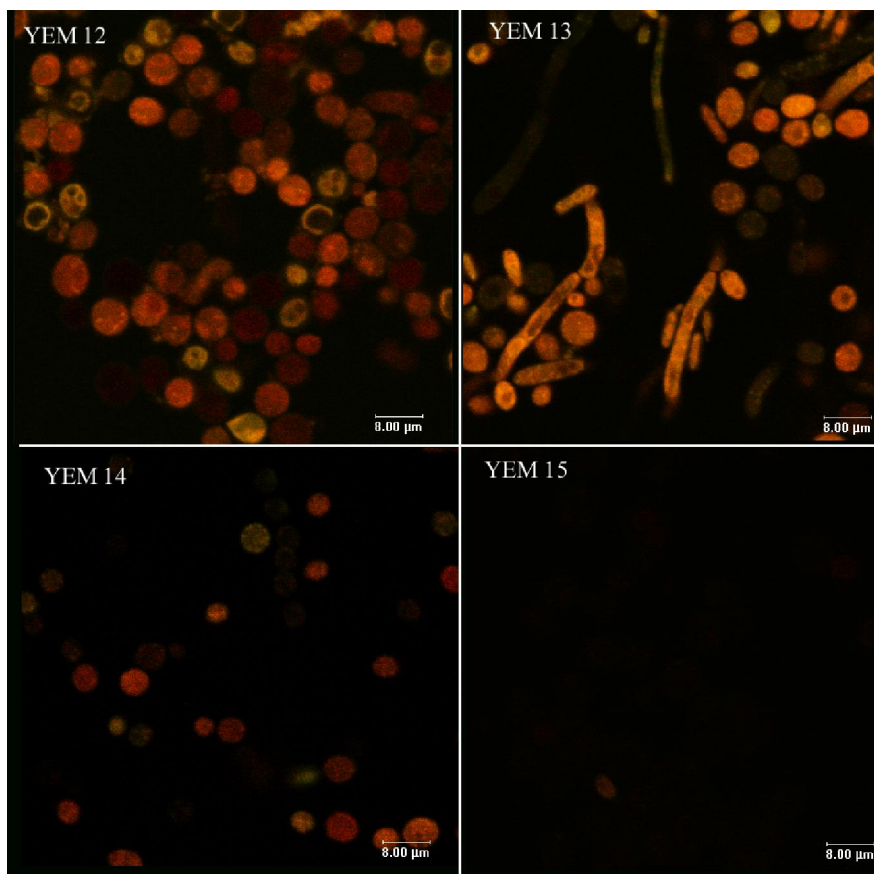


FIGURA 19 – Imagens de sobreposição de fluorescência em *C. albicans* coradas com azul de metileno (canal vermelho), rodamina 1,2,3 (canal verde). A barra representa 8μm

Levando-se em consideração a pouca precisão da simples observação de cores nas figuras provenientes da microscopia confocal, uma análise computadorizada foi proposta para diferenciar e quantificar os *pixels* vermelhos das imagens (FIGURA 20).

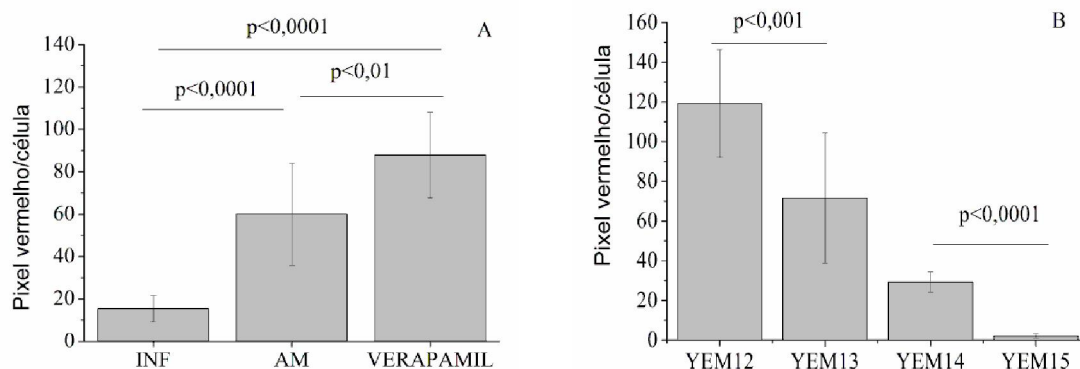


FIGURA 20 – Médias  $\pm$ DP do número de *pixels* vermelhos por célula nas imagens de microscopia confocal. A) *C. albicans* DAY e inibidores de transporte de membrana seguidos de AM; B) YEM12, YEM13, YEM14 e YEM15 apenas corados com AM

O inibidor da bomba de difusão facilitada INF diminuiu a incorporação de AM pela célula, quando comparado a este FS sem inibidores. Este fato sugere que esta bomba está diretamente relacionada à entrada de FS. Estes dados corroboram com aqueles mostrados anteriormente na FIGURA 15, onde as células fúngicas em contato com o inibidor de transporte facilitado em membrana foram protegidas da ação fotodinâmica.

Por outro lado, o inibidor da bomba de transporte ativo ABC aumentou a concentração de FS em *C. albicans*. Isto indica que esta bomba é responsável pela remoção de moléculas do azul de metileno do interior da célula. O papel das bombas na captação do FS pôde ser mais bem compreendido pelos resultados obtidos com as cepas modificadas geneticamente. A diminuição de incorporação de FS pela cepa com super expressão para bomba de difusão (YEM13) sugere que esta via serve não apenas para a entrada, mas também saída do FS, de acordo com a diferença de concentração desta molécula no meio interno e externo à célula. Estes dados justificam a menor morte celular da cepa com super expressão da bomba de difusão passiva.

Com relação às cepas YEM14 e YEM15 observou-se que as bombas de transporte ativo promovem a remoção de grande quantidade de FS da célula e estes dados corroboram com o comportamento de morte celular.

#### **4.4 PDT EM *C. neoformans* COM FS DIFERENTES**

Os resultados indicam diferenças no acúmulo de fotossensibilizadores nas diferentes cepas de *C. neoformans*. Foi possível observar que este acúmulo foi irregular, e que o comportamento de morte ocorreu em todos os casos testados também de forma irregular. De uma maneira geral, esperava-se que uma maior quantidade de fotossensibilizador no citoplasma fúngico, levaria a uma maior morte celular. Esta correlação direta, no entanto, não foi estabelecida por nossos resultados. Nesta sessão, vamos apresentar primeiramente os resultados de incorporação de FS, inativação dos microrganismos e microscopia confocal. Estes resultados estão divididos de forma a compararmos inicialmente as diferenças entre as cepas de *C. neoformans*, e as seções serão divididas conforme o fotossensibilizador utilizado. Posto isso, partiremos para as observações de padrões de inativação celular correlacionado com as características intrínsecas do metabolismo dessas cepas, bem como da ação de cada fotossensibilizador. Imagens complementares de microscopia confocal são apresentadas no ANEXO D.

### Azul de Metileno

A cepa KN99 $\alpha$  apresentou maior acúmulo de AM, com  $8,78 \pm 0,10$  moléculas por célula ( $\log_{10}$ ), enquanto as cepas CAP59, 208819 e 208820 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si, com  $8,55 \pm 0,07$ ,  $8,59 \pm 0,07$  e  $8,42 \pm 0,01$  moléculas por célula ( $\log_{10}$ ), respectivamente. Curiosamente, esta diferença na retenção de AM não refletiu diretamente na susceptibilidade à fotoinativação. As cepas KN99 $\alpha$  e 208820 foram mais resistentes do que as cepas CAP59 e 208819; observe o gráfico de fotoinativação com AM na FIGURA 21.

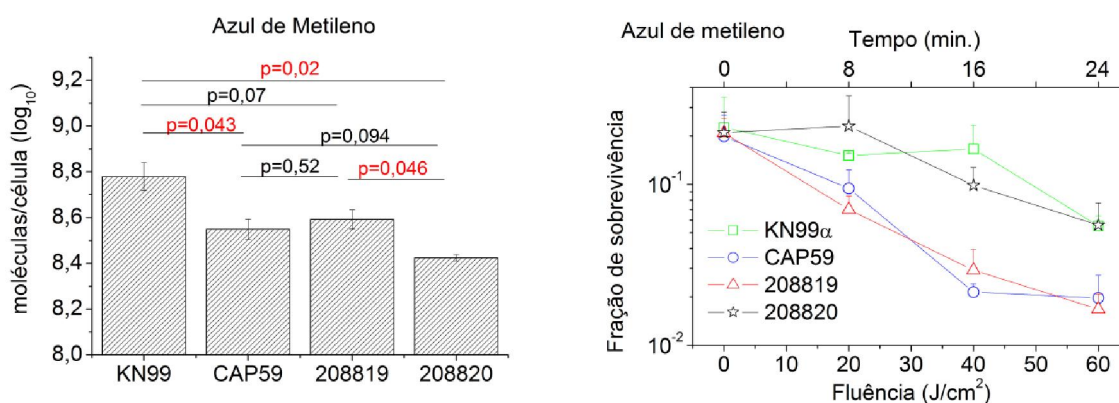


FIGURA 21- Resultados de incorporação de FS e PDT para cepas de *C. neoformans* fotossensibilizados com azul de metileno.

As moléculas de azul de metileno penetraram no citoplasma fúngico nas quatro cepas estudadas neste ensaio. Foi observado um acúmulo relativamente pequeno na membrana celular e no núcleo de *C. neoformans*. Por outro lado, o sítio preferencial de ligação intracelular de AM foi a mitocôndria, porém, este fotossensibilizador não ficou restrito a esta organela e imagem de fluorescência vermelha pode ser observada de forma difusa no citoplasma fúngico. As cepas que foram mais susceptíveis à PDT com AM (CAP59 e 208819) apresentaram qualitativamente uma maior dispersão de AM no citoplasma. Em KN99 $\alpha$  e 208820, foi possível observar um acúmulo pouco homogêneo do sinal de fluorescência vermelho, e quando observamos as imagens de transmissão nestas cepas, podemos notar que o FS não entrou em todas as células vistas no campo (FIGURA 22).

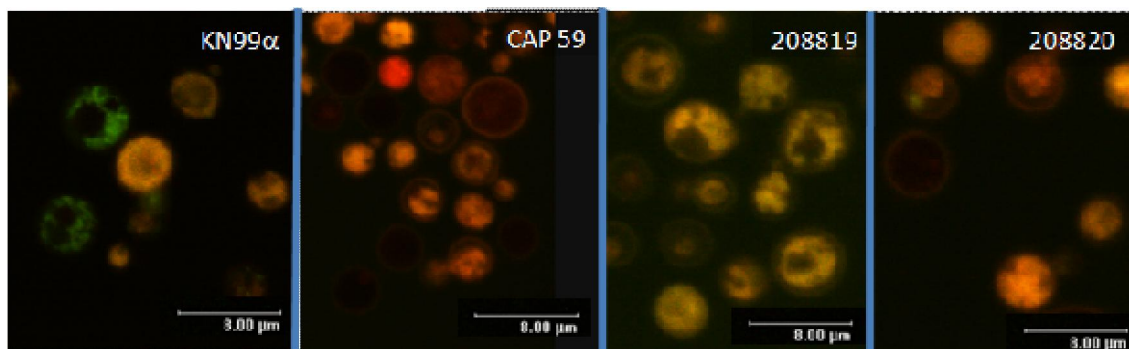


FIGURA 22 – Imagem de microscopia confocal nas cepas de *C. neoformans* coradas com azul de metileno

### Rosa Bengala

Com a utilização de RB, as cepas KN99 $\alpha$ , CAP59 e 208819 não apresentaram diferenças estatísticas na quantidade de FS acumulada no citoplasma. Por outro lado, *C. neoformans* 208820 apresentou o menor acúmulo deste fotossensibilizador, e a menor susceptibilidade nos testes de fotoinativação. A cepa CAP59 apresentou-se como a mais susceptível, com grande diferença no perfil de morte quando comparada às outras três cepas. As causas e os mecanismos envolvidos na entrada e acúmulo do FS ainda não foram totalmente explicados, porém esta cepa de *C. neoformans* não possui cápsula. Isso pode sugerir que o efeito fotodinâmico com RB ocorre de forma mais acentuada na ausência da cápsula.

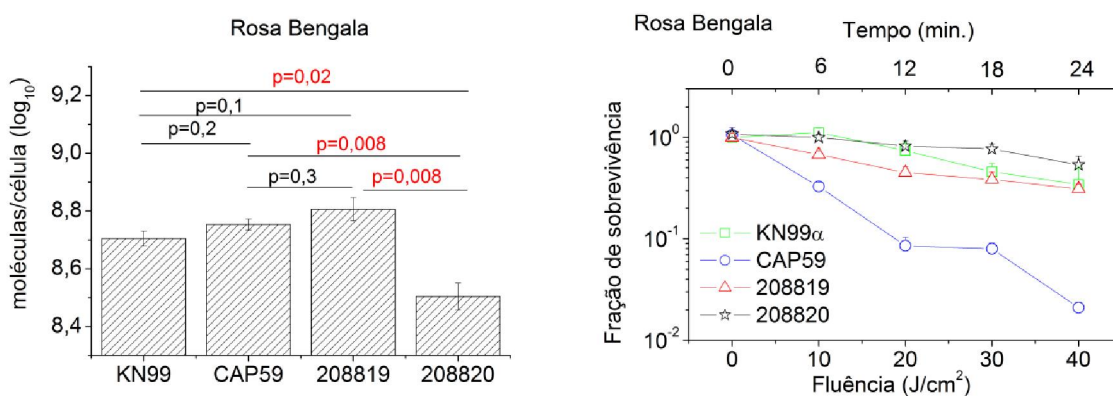


FIGURA 23 - Resultados de incorporação de FS e PDT para cepas de *C. neoformans* fotossensibilizados com Rosa Bengala

Em geral, rosa bengala apresentou uma capacidade pequena de fotoinativação, porém sua entrada na célula foi eficiente. Proporcionou grande acúmulo em mitocôndria e outros sítios no citoplasma e, pouca retenção no núcleo e membranas. Devemos lembrar

que para RB, o canal verde representa a fluorescência do FS e, canal vermelho está marcado com uma sonda de acúmulo em mitocôndria (FIGURA 24).

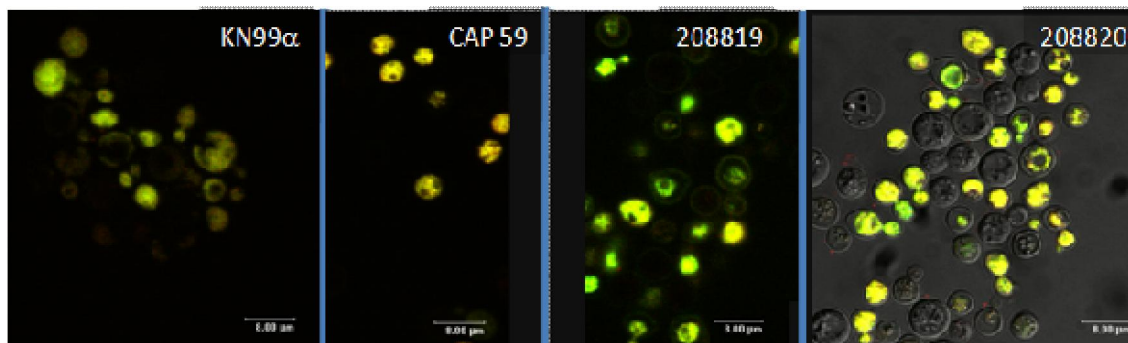


FIGURA 24 – Imagem de microscopia confocal nas cepas de *C. neoformans* coradas com rosa bengala

### EtNBSe

O fotossensibilizador EtNBSe não se mostrou limitado pela presença da cápsula de *C. neoformans*, e foi possível observar que tanto a cepa 208820 quanto a CAP59 obtiveram o mesmo perfil de inativação celular frente a irradiação. Por outro lado, a cepa 208819 (não produção de melanina) mostrou-se mais susceptível à ação deste fotossensibilizador, e contrariamente, a cepa KN99α foi a mais resistente. Se compararmos os dados de morte aos de incorporação de FS, poderemos notar que KN99α incorporou a menor quantidade de fotossensibilizador.

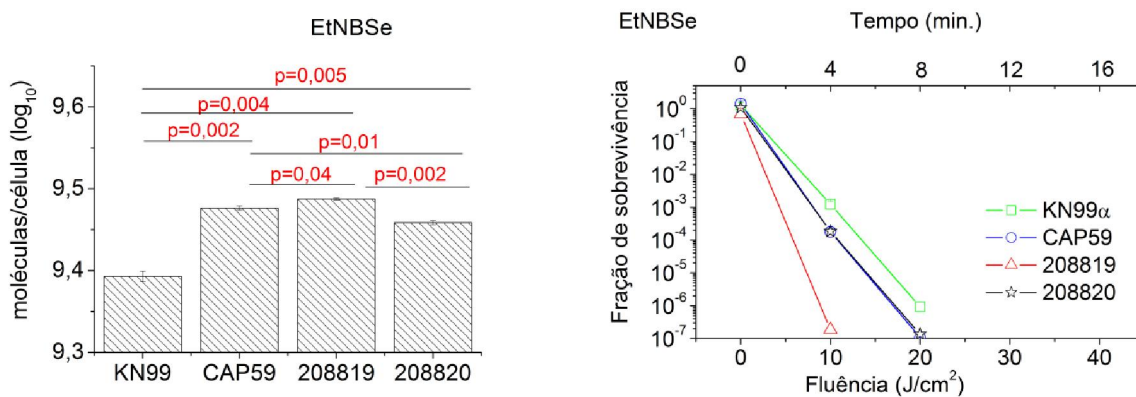


FIGURA 25 – Resultados de incorporação de FS e PDT para cepas de *C. neoformans* fotossensibilizados com EtNBSe

O FS EtNBSe foi bem incorporado por todas as cepas de *C. neoformans*, porém este fotossensibilizador não parece acumular-se no interior nuclear. Observe na FIGURA 26 que a região correspondente ao núcleo se apresenta sem sinal de fluorescência. Por outro lado, o citoplasma aparece totalmente corado, com algumas regiões, geralmente na periferia externa ao núcleo, com acúmulo de EtNBSe (indicações das setas). Em geral, o acúmulo inespecífico e disseminado de EtNBSe pode estar relacionado diretamente com sua alta capacidade de inativar células fúngicas.

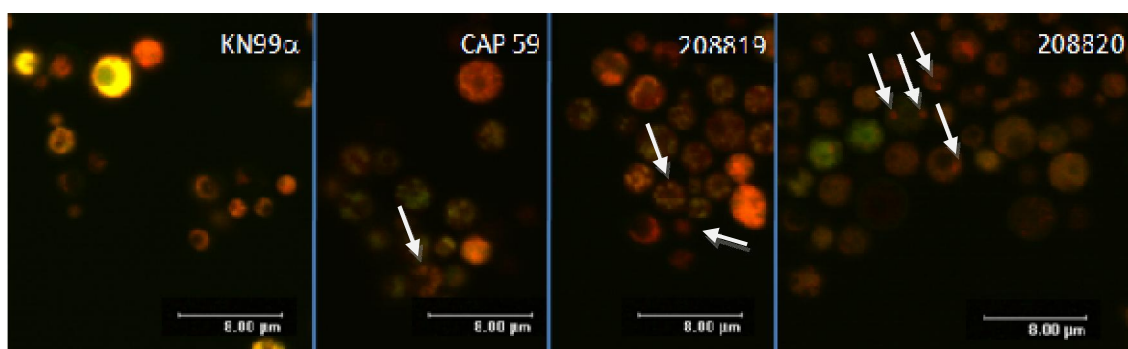


FIGURA 26 - Imagem de microscopia confocal nas cepas de *C. neoformans* coradas com EtNBSe

### pL-ce6

O conjugado ce6 mostrou grande acúmulo nas cepas KN99α e CAP59, porém as cepas 208819 e 208820 apresentaram uma menor captação de FS. Mais uma vez, estas diferenças não refletiram no perfil de inativação microbiana, onde CAP59 e 208819 mostraram maior morte quando comparadas a KN99α e 208820 (FIGURA 27).

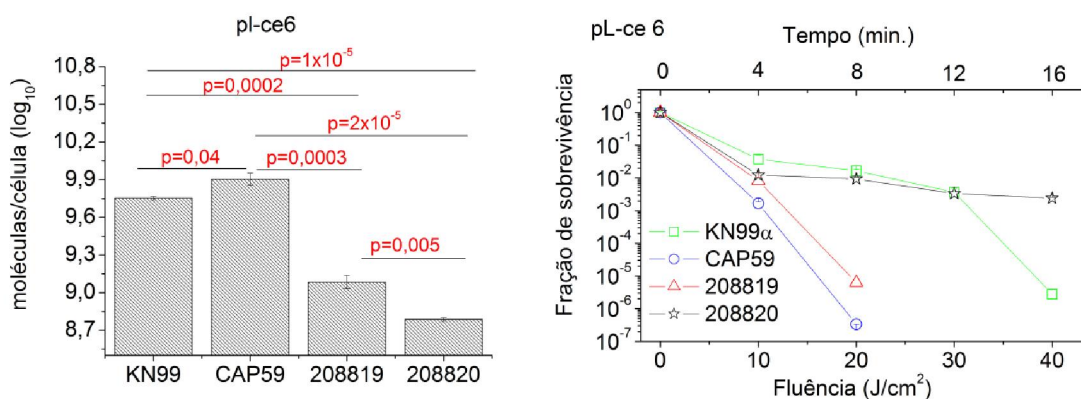


FIGURA 27 – Resultados de incorporação de FS e PDT para cepas de *C. neoformans* fotossensibilizados com pL-ce6

O fotossensibilizador pL-ce6 apresentou grande acúmulo nas regiões periféricas das cepas KN99 $\alpha$  e 208820, e foi possível observar também fluorescência vermelha proveniente do interior celular. Nas cepas CAP59 e 208819, verificou-se uma maior entrada deste FS nas células, o que pode estar relacionado com a quantidade de inativação fúngica observada nestas duas cepas (FIGURA 28).

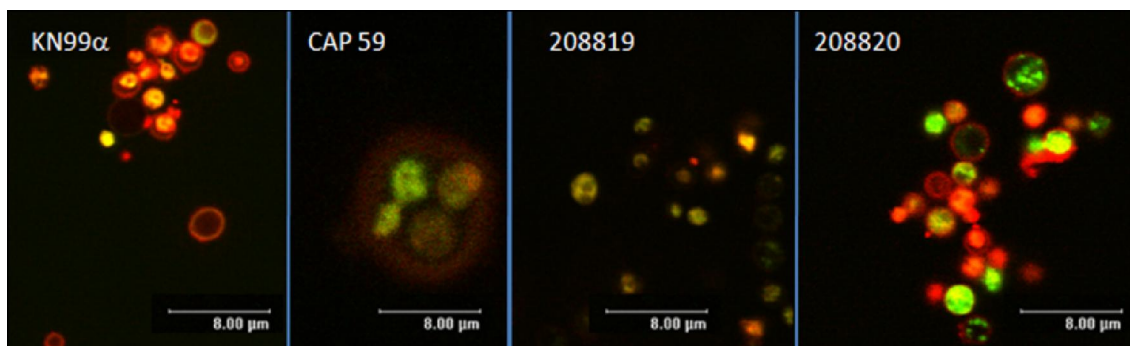


FIGURA 28 - Imagem de microscopia confocal nas cepas de *C. neoformans* coradas com pL-ce6

#### 4.4.1 PAPEL DA CÁPSULA NO EFEITO FOTODINÂMICO

O alargamento da cápsula reduz a susceptibilidade de danos por ERO ao microrganismo, e esse aumento na cápsula ocorre normalmente logo após a infecção e incorporação de *C. neoformans* por macrófagos. Ao contrário, mutantes sem cápsula apresentam alta susceptibilidade aos radicais livres. Outro fato interessante é que o alargamento da cápsula confere ao microrganismo uma maior resistência à anfotericina B, no entanto, o perfil de inativação frente aos azoles se mantém inalterado. É importante ressaltar que o aumento da cápsula também reduz o índice de fagocitose por predadores ambientais<sup>75</sup>.

Em nossos resultados, *C. neoformans* KN99 $\alpha$  apresentou foto-inativação inferior à cepa CAP59 (não produtora de cápsula). Esta habilidade de resistência às espécies reativas de oxigênio geradas por PDT pode estar diretamente relacionada à capacidade deste microrganismo em produzir cápsula. Para todos os fotossensibilizadores testados, a cepa CAP59 foi mais suscetível à fotoinativação quando comparada à KN99 $\alpha$ , destacando-se o FS rosa bengala, no qual a inativação da cepa sem cápsula foi maior do que todas as outras cepas. Devemos também observar que esta metodologia não avaliou o alargamento da cápsula. As células fúngicas não foram induzidas a produzir esta estrutura,

no entanto, foi comparada a capacidade de produzir cápsula com a inabilidade desta produção.

## 4.5 OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS

### 4.5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O exame das células do grupo controle ao microscópio eletrônico de varredura demonstrou formas tipicamente globulares. Além disso, algumas delas perderam sua integridade devido aos processos de preparação das amostras (desidratação) e pela formação de vácuo no interior da câmara do microscópio. Por outro lado, as células de *C. neoformans* colhidas do grupo PDT apresentaram alterações estruturais e morfológicas importantes quando comparadas ao grupo controle. Observou-se que as células fúngicas murcharam e suas cápsulas apresentam um aspecto rugoso.

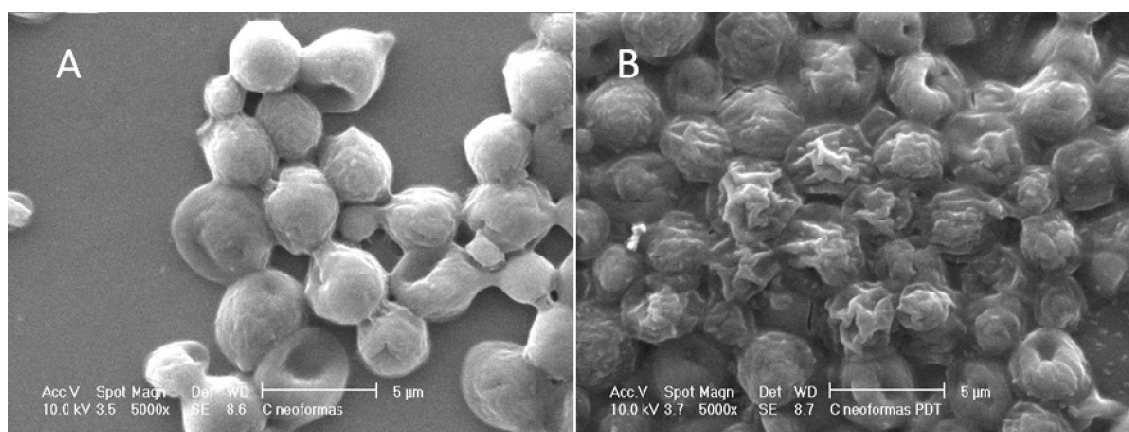


FIGURA 29 – Microscopia eletrônica de varredura de *C. neoformans* ATCC 90112 são apresentadas na figura (A) sem tratamento e (B) após PDT. As células fúngicas são representativas daquelas observadas em cada condição. As barras representam 5µm

As alterações morfológicas em *C. neoformans* imediatamente após o tratamento fotodinâmico não sugerem um rompimento ou lise da membrana. Na verdade, estas alterações sugerem um mecanismo tipo apoptose de morte celular. Apoptose por PDT mediada por azul de metileno foi descrita previamente por Ball *et al.*<sup>76</sup>.

#### 4.5.2 APOPTOSE

Os resultados dos padrões de morte celular para *C. neoformans* KN99 $\alpha$  podem ser observados na FIGURA 30. Após 10J/cm<sup>2</sup> (4min) de irradiação, foi observada uma redução de 1,5 logs. Este nível de inativação não sofreu grandes alterações até 30J/cm<sup>2</sup>, com redução de 2,2 logs. Entre 30 e 40J/cm<sup>2</sup>, foi observado um aumento acentuado do efeito fotodinâmico e a redução total chegou a 6 logs (FIGURA 30).

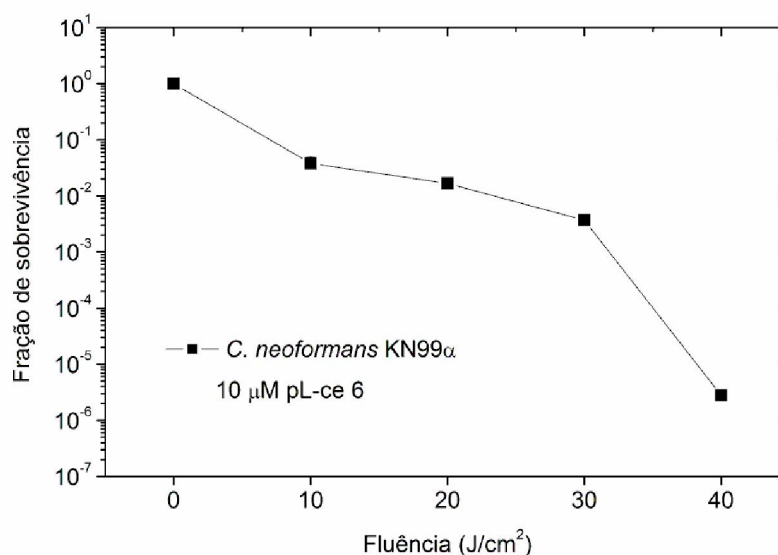


FIGURA 30 - No gráfico são representadas, as médias e desvio padrão das frações de sobrevivência encontradas para *C. neoformans* KN99 $\alpha$  corados com 10 $\mu$ M PL-ce6, submetidas à PDT

As fluências de 0, 10 e 40J/cm<sup>2</sup> foram selecionadas para análise do padrão de comportamento celular frente à apoptose. As células sem irradiação não apresentaram sinal de fluorescência indicativo de dano celular (FIGURA 31).

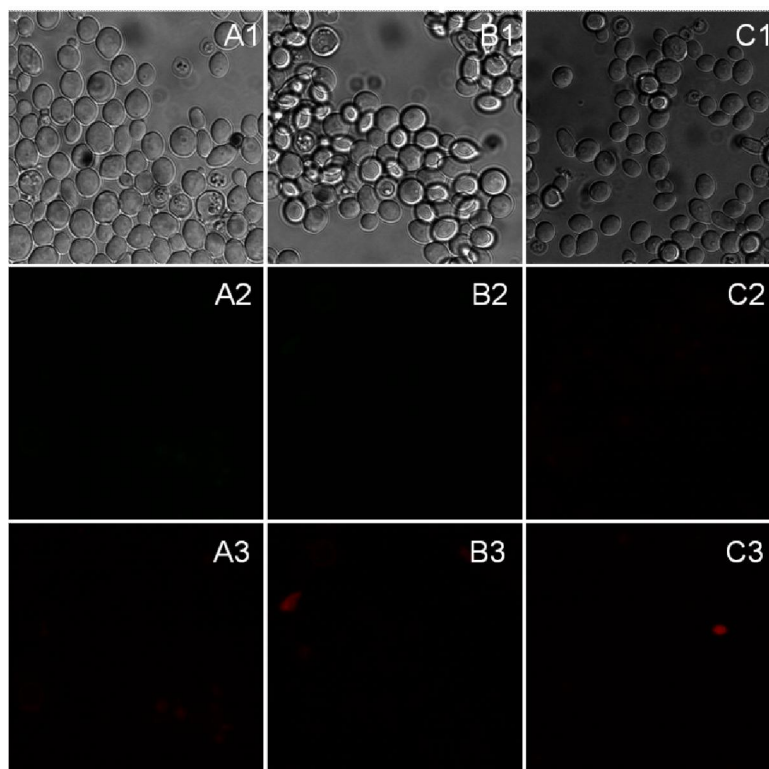


FIGURA 31 – Grupos controle são mostrados na figura e podemos observar o mesmo campo da lâmina em três diferentes canais do microscópio (1) transmissão; (2) verde FITC 525/50nm; (3) IP vermelho 600/30nm. (A) representa o grupo que não recebeu qualquer tratamento com corantes; (B) as células foram coradas com FITC+IP; e (C) recebeu FITC, IP e pL-ce6

Após a PDT, imagens de fluorescência começaram a aparecer. Com a fluência de  $10\text{J}/\text{cm}^2$  foi observada grande quantidade de fluorescência verde proveniente da ligação do FITC às fosfatidilserinas da membrana plasmática exposta ao ambiente extracelular. Na fluência de  $40\text{J}/\text{cm}^2$  foi observada uma grande quantidade de células coradas internamente em vermelho por IP (FIGURA 32).

Sinais de apoptose podem ser produzidos por um desequilíbrio intracelular de ERO, que disparam um mecanismo de autofagocitose de organelas e culminam na destruição celular por uma ou mais vias de morte celular programada. A mitocôndria está particularmente envolvida no início destes danos. A redução incompleta do oxigênio durante o processo de fosforilação oxidativa pode causar danos, incluindo oxidação de lipídeos e DNA. Injúria a membrana externa das mitocôndrias levam a complicações na cadeia de transporte de elétrons, e isto pode liberar moléculas de citocromo C no citoplasma fúngico, que irá acelerar o processo de falência metabólica<sup>35, 36</sup>.

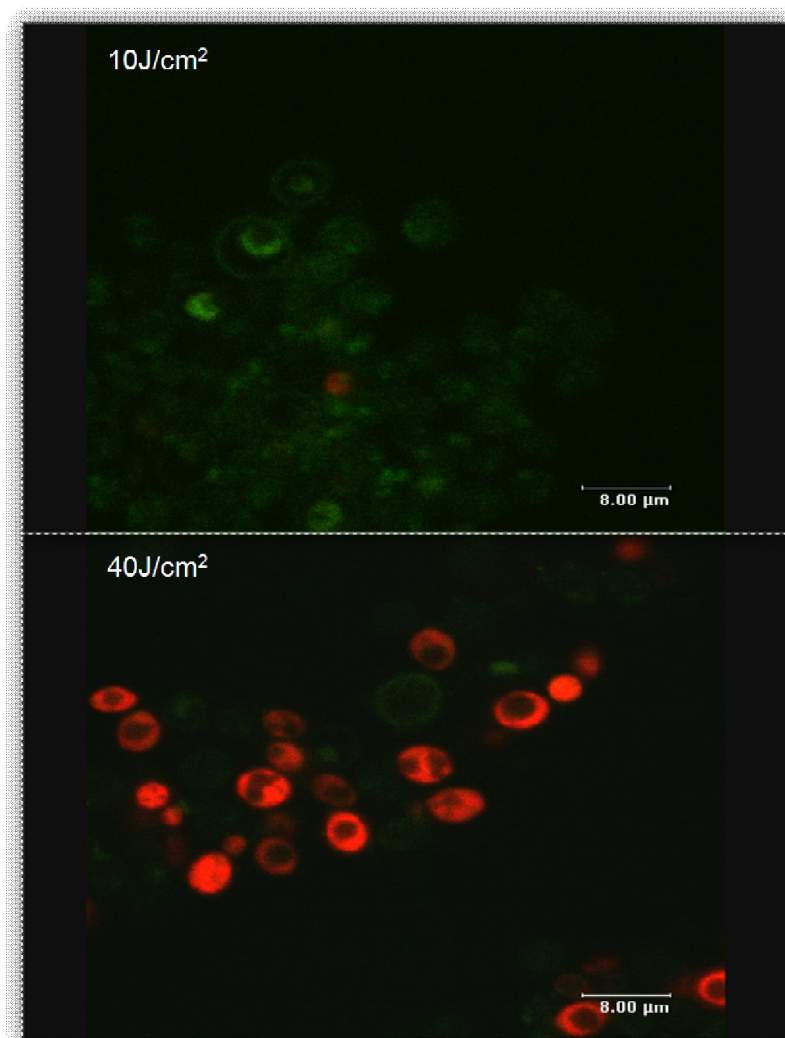


FIGURA 32 - Grupos submetidos à PDT em fluências de 10 e 40 J/cm<sup>2</sup>. A cor verde na imagem corresponde ao sinal de fluorescência de FITC ligado à fosfatidilserina e a fluorescência em vermelho é proveniente do iodeto de propídio ligado à cromatina

#### 4.5.3 EFEITO DA MELANIZAÇÃO DE *C. neoformans* NA AÇÃO FOTODINÂMICA

O fungo cultivado em meio rico em L-dopamina promoveu a formação de melanina e, após 10 dias de incubação, foi possível observar claramente a presença de pigmentação escura na cultura. Em acordo com relatos da literatura, o mesmo meio sem L-dopamina não promoveu a formação de melanina nas células (FIGURA 33), visto que a produção deste pigmento ocorre apenas na presença de um substrato exógeno<sup>72</sup>.

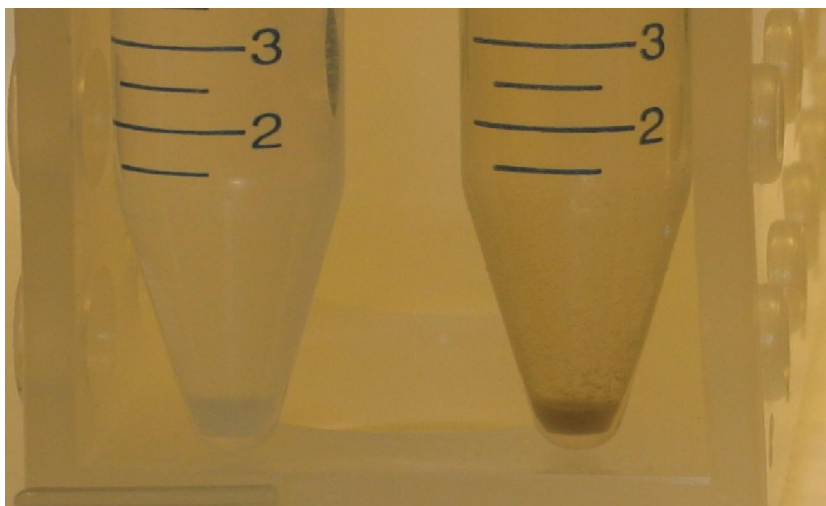


FIGURA 33 – Tubos contendo meio mínimo de crescimento para *C. neoformans* após 10 dias de incubação, sem L-dopamina (esquerda) e com L-dopamina (direita)

Apesar da diferença entre os fotossensibilizadores e os parâmetros de irradiação, o comportamento de inativação das células com e sem melanina foi similar para os dois modelos testados (pL-ce 6 e AM). A presença de melanina promoveu uma proteção do *C. neoformans* contra os efeitos fotodinâmicos (observe a FIGURA 34 A e B).

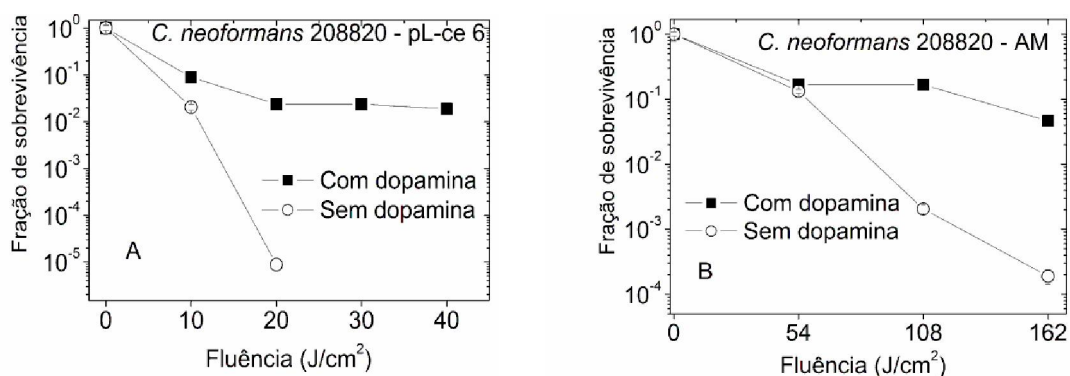


FIGURA 34 – Média e desvio padrão do comportamento de inativação de *C. neoformans* 208820 crescidos na presença ou ausência de L-dopamina

A habilidade em produzir melanina é considerada um importante fator de virulência de *C. neoformans*, e diversas evidências sugerem que a melanização ocorre no tecido durante uma infecção<sup>72</sup>. A contribuição deste pigmento à virulência do microrganismo é atribuída à função protetora exercida contra os mecanismos de defesa imunológicos<sup>77</sup>.

Os resultados obtidos neste ensaio corroboram com estudos *in vitro* que demonstraram que cepas produtoras de melanina são menos suscetíveis a morte por espécies reativas de oxigênio<sup>78, 79</sup>. Esta ação protetora observada na presença do pigmento se deve ao fato da melanina ser um eficiente neutralizador de radicais livres.

#### 4.6 INATIVAÇÃO DE *C. neoformans* *IN VIVO*

Após três dias da inoculação, os camundongos que receberam  $10^5$  e  $10^6$  células por pata não apresentaram sinais de edema ou manifestações cutâneas na pata inoculada. Durante o acompanhamento posterior a injeção de microrganismos, não foi observada alterações clínicas. Por outro lado, o grupo que recebeu  $10^7$  células apresentou edema acentuado na pata afetada. Este edema se manteve por 7 dias após a inoculação e teve remissão espontânea (FIGURA 35).



FIGURA 35 – Fotografia do edema na pata esquerda 3 dias após a inoculação de  $10^7$  células. Todos os animais inoculados sob esta concentração apresentaram edema semelhante.

Todos os animais tratados com PDT apresentaram uma menor recuperação de *C. neoformans* quando comparados ao grupo controle. O resultado principal deste experimento foi que o tecido corado com AM e seguido de irradiação resultou em morte estatisticamente significativa de leveduras patogênicas ( $p < 0,05$ ). Esta inativação de *C. neoformans* foi de aproximadamente uma ordem de grandeza (FIGURA 36).

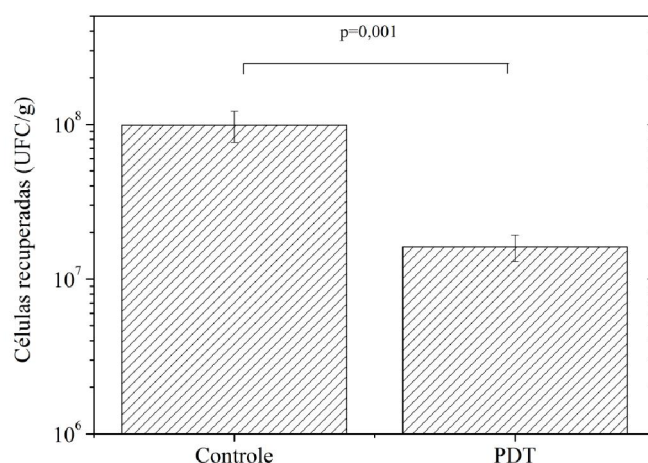


FIGURA 36 – Média  $\pm$ DP de UFC/g recuperada da pata de camundongos infectados com *C. neoformans* (ATCC 90112).

O tratamento de infecções locais por PDT, sobretudo causadas por leveduras, é pouco reportado na literatura. Uma diminuição dos sinais clínicos e histológicos foi mostrada em estudos focados em induzir e tratar candidíase em camundongos<sup>47, 80</sup>. Além disto, uma menor recuperação de microrganismos nos sítios testados, aproximadamente 1,5 ordens de grandeza, foi recentemente demonstrada<sup>81</sup>.

Apesar da profunda diferença entre os modelos de infecção fúngica *in vivo* presentes na literatura, e este apresentado aqui, existe uma confluência de resultados. Similarmente, pouca ação fotodinâmica foi observada *in vivo*<sup>44, 47, 81</sup>, quando comparamos aos resultados *in vitro* com parâmetros similares<sup>46, 56, 73</sup>. É importante ressaltar que para o tratamento de um processo infeccioso, não é necessário atingir de forma letal todos os microrganismos e devemos contar com as ações defensivas do sistema imunológico do organismo hospedeiro, porém, parâmetros eficientes de tratamento são extremamente desejáveis, pois, facilitar-se-á de forma substancial o processo terapêutico. Posto isso, podemos sugerir que a PDT pode vir a ser futuramente uma alternativa para tratamento de infecções fúngicas, porém, protocolos eficientes de irradiação, conhecimento do comportamento da luz em diversos tipos de tecidos, juntamente o maior conhecimento da farmacocinética e farmacodinâmica de fotossensibilizadores ainda são necessários para alcançar este objetivo.

## CONCLUSÕES

Os efeitos dos parâmetros de irradiação na fotoinativação microbiana mostraram que a fluência não deve ser usada como parâmetro único para comparação de resultados em terapia fotodinâmica antimicrobiana;

Uma faixa ótima de concentração de AM para PDT antifúngica situa-se entre 50 e 100 $\mu$ M, e a proporção 1:1 de dímero/monômero melhora os resultados de inativação celular;

As bombas de transporte ativo em membrana de *C. albicans* contribuem com a remoção de AM do citoplasma fúngico, por outro lado, os poros de difusão facilitada funcionam como portas de entrada de AM para o interior das células;

A inativação celular não depende unicamente da quantidade de fotossensibilizador dentro das células,

Os sítios de ligação e as características químicas de cada FS devem ser considerados no estudo da PDT;

Características intrínsecas de cada cepa microbiana podem interferir grandemente nos resultados de foto inativação;

As células fúngicas geralmente são inativadas por um mecanismo não-lítico de membrana celular, e as células parecem morrer por um mecanismo parecido com apoptose;

A cápsula de *C. neoformans* e a formação de melanina protegem as células de *C. neoformans* contra os efeitos fotodinâmicos;

Infecção fúngica induzida por *C. neoformans* em camundongo pode ser tratada com PDT dentro de parâmetros conhecidos, e resultar em diminuição da recuperação de leveduras no tecido infectado.

**APÊNDICE A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA IPEN-CNEN/SP****Parecer - Projeto Nº 9/CEPA-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS** de responsabilidade do pesquisador **MARTHA SIMÕES RIBEIRO** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEPA .

São Paulo, 06 de junho de 2006

  
**Prof. Dra. Nanci do Nascimento**  
Coordenadora do CEPA-IPEN

---

IPEN-CNEN/SP  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL**  
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP  
Telefone: (011) 3816-9229 - Fax (011) 3816-9232  
E-mail: nnascime@ipen.br

## APÊNDICE B – LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos Completos			
Autores	Título	Revista	Ano
Kato IT; Pellegrini VD; Prates RA; Wetter NU; Ribeiro MS; Sugaya NN	Low level laser therapy in burning mouth syndrome patients: a pilot study	Photomedicine and Laser Surgery	2010
Hashimoto MCE; Prates RA; Toffoli DJ; Courrol LC; Ribeiro, MS	Prevention of bloodstream infections by photodynamic inactivation of multiresistant pseudomonas aeruginosa in burn wounds	SPIE Photonics West - BIOS, Mechanisms for Low-Light Therapy V, San Francisco	2010
Prates RA; Silva EG; Chaves PF; Santos AJS; Paula CR; Ribeiro MS	Photodynamic therapy can kill Cryptococcus neoformans in in vitro and in vivo models.	Progress in Biomedical Optics and Imaging	2009
Prates RA; Silva EG.; Yamada AM; Suzuki LC; Paula CR; Ribeiro MS	Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner	Laser Physics	2009
Franca C; Franca C; Nuñez SC; Prates RA; Noborikawa E; Faria M; Ribeiro MS	Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters	Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology	2009
Toffoli DJ; Prates RA; Ribeiro MS; Vieira ND, Hashimoto MCE; Courrol LC	Effectiveness in total reduction of Candida albicans promoted by PDT with hypocrellin B:Lanthanum In: Photodynamic Therapy	Back to the Future, Proc. SPIE. SPIE-The International Society for Optical Engineering	2009
Hashimoto MCE; Toffoli DJ; Prates RA; Courrol LC; Ribeiro MS	Photodynamic inactivation of antibiotic resistant strain of Pseudomonas aeruginosa in vivo	Back to the Future, Proc. SPIE. SPIE-The International Society for Optical Engineering	2009
Prates RA; Silva EG; Suzuki LC; Paula CR; Ribeiro MS	Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica	XIV Congresso Brasileiro de Física Médica, São Paulo/SP	2009

Silveira LB; Prates RA; Novelli MD; Marigo HA; Garrocho AA; Amorim JCFa; Sousa GR; Pinotti M; Ribeiro MS	Investigation of mast cells in human gingiva following low-intensity laser radiation	Photomedicine and Laser Surgery	2008
Prates RA; Silva Gonçalves ES; Yamada AM; Suzuki LC; Paula CR.; Ribeiro MS	The Irradiation Parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells	Progress in Biomedical Optics and Imaging	2008
Yamada AM; Prates RA; Cai S; Ribeiro MS	Photosensitization of Aggregatibacter actinomycetemcomitans with methylene blue: A microbiological and spectroscopic study	Progress in Biomedical Optics and Imaging	2008
Sugayama ST; Nogueira GEC; França CM; Prates RA; Silva DFT; Núñez SC; Ribeiro MS	Angiogenesis induced by low-intensity laser therapy: comparative study between single and fractioned dose on burn healing	Progress in Biomedical Optics and Imaging	2008
Prates RA; Yamada AM; Suzuki LC; Hashimoto MCE; Cai S; Grow-Soares S; Gomes L; Ribeiro MS	Bactericidal effect of malachite green and red laser on Actinobacillus actinomycetemcomitans	Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology	2007
Amorim JCF; Sousa GR; Silveira LB; Prates RA; Pinotti M; Ribeiro MS	Clinical Study of the Gingiva Healing after Gingivectomy and Low-Level Laser Therapy	Photomedicine and Laser Surgery	2006
Prates RA; Suzuki LC; Yamada AM; Ribeiro MS	Azul de Metileno, Verde de Malaquita, Indcianina Verde e Verterporfirina: ação fotodinâmica antimicrobiana sobre Escherichia coli	Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos, e Aplicações na Área de Saúde, São Pedro/SP. PDT 2007	2007
Lucas MV; Nascimento LFL; Silveira LB; Amorim JCF; Prates RA; Sousa GR; Pinotti M	Efeito da Terapia Fotodinâmica na Cicatrização de Feridas em Pé Diabético - Relato de Caso	Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos, e Aplicações na Área de Saúde, São Pedro/SP. PDT 2007	2007
Yamada AM; Suzuki LC; Prates RA; Cai S; Ribeiro MS	Redução Microbiana em Periodontite após Terapia Fotodinâmica	Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos, e Aplicações na Área de Saúde, São Pedro/SP. PDT 2007	2007

---

Trabalhos publicados em anais de eventos (RESUMO)			
Autores	Título	Revista	Ano
Silva EG; Souza S; Viani C; Batista GCM; Perinazzo VK; Prates RA; Ribeiro MS; Paula CR	Experimental systemic cryptococcosis in immunocompetent animal model (BALB/c) and immunodeficient (BALB/c-SCID): treatment with amphotericin B and fluconazole	4th Trends in Medical Mycology, Athens. MYCOSES	2009
França CM; França CM; Prates RA; Noborikawa E; Faria MR; Ribeiro MS	Efeitos do laser em baixa intensidade na mucosite bucal induzida em “hamsters”	24° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Brazilian Oral Research	2007
Pellegrini VD; Kato IT; Prates RA; Wetter NU, Sugaya NN; Ribeiro MS	Terapia laser em baixa intensidade em pacientes portadores da síndrome de ardência bucal	24° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Brazilian Oral Research	2007
Yamada AM; Prates RA; Suzuki LC; Cai S; Villa N; Ribeiro MS	Histological analysis in ligature induced periodontitis in rats following photodynamic therapy	10th Congress of the International Society for Lasers in Dentistry (ISLD), Berlin.	2006
Yamada AM; Prates RA; Hashimoto MCE; Suzuki LC; Cai S; Ribeiro MS	Photosensitization of Actinobacillus actinomycetemcomitans with malachite green and methylene blue	10th Congress of the International Society for Lasers in Dentistry (ISLD), Berlin.	2006

## ANEXO A – REVISÃO DE LITERATURA

O campo das terapias antimicrobianas é uma das mais desafiadoras áreas da ciência atual, particularmente pela rápida evolução dos microrganismos, bem como pela sua diversidade e quantidade<sup>37</sup>.

A técnica começou a ser empregada com sistemática científica em 1900, quando Oscar Raab *apud*<sup>82</sup> descreveu a ação do corante acridina sobre uma espécie de *Paramecia*, demonstrando que este organismo unicelular pode morrer sob essas condições. A primeira aplicação na medicina é atribuída a Trappeiner em 1903 *apud*<sup>82</sup>, que utilizou a aplicação tópica do corante eosina e exposição à luz para o tratamento de um câncer de pele. Em 1913, Friedrich Meyer-Betz *apud*<sup>82</sup> fez uma auto-injeção de 200 mg do que ele acreditava ser hematoporfirina pura e não sentiu nenhum efeito, porém ao se expor à luz teve fotossensibilidade na pele por vários meses. Policard, em 1925, *apud*<sup>82</sup> estudou porfirinas para observar a produção de efeitos fototóxicos em tecidos, principalmente em tumores malignos de ratos. A história da chamada primeira geração de drogas para a terapia fotodinâmica, à base de derivados hematoporfirínicos, começou com Schwartz no início da década de 50. Ele mostrou que nos experimentos de Meyer-Betz, o princípio ativo não era a hematoporfirina, pois esse composto é facilmente eliminado do organismo. Na realidade tratava-se de uma mistura de diversas substâncias oligoméricas provenientes do método original de síntese e isolamento da mesma. Schwartz enriqueceu a mistura de oligômeros (chamou o preparado de hematoporfirina D) e Lipson, sob orientação de Schwartz na década de 60, investigou o acúmulo preferencial deles em tumores implantados em camundongos e ratos e observou que a incidência de luz proporcionava regressão da doença. Como resultado desses estudos, no final da década de 60, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher portadora de câncer de mama usando hematoporfirina D e irradiando seletivamente o tumor, marcando assim, o início da terapia fotodinâmica como terapia clínica para câncer<sup>82</sup>.

A partir da década de 70, várias preparações de derivados porfirínicos começaram a ser testadas para uso na terapia fotodinâmica, culminando com o desenvolvimento do *Photofrin*® II (refinamento do hematoporfirina D). Posteriormente, no fim da década de 80, através de purificações e otimizações do preparado anterior, por processos de liofilização, culminou no desenvolvimento do medicamento *Photofrin*®<sup>82</sup>.

A ação fotossensibilizadora de corantes em sistemas biológicos é comumente designada “ação fotodinâmica” e exerce efeito letal ou dano grave às células expostas ao corante e devidamente irradiadas por frequências do espectro eletromagnético. O fato de bactérias, bem como outros sistemas celulares sofrerem dano devido à ação fotodinâmica gerada pela irradiação do azul de metileno (AM) foi descrita no início do século XX, nos estudos de Reitz (1907) *apud* Oginsky e colaboradores<sup>83</sup>.

A partir da década de 90 do século passado, houve um aumento considerável na busca de novas alternativas antimicrobianas, sobretudo para auxiliar no tratamento de infecções localizadas. Conseqüentemente, observou-se um aumento nas publicações científicas nos trabalhos dedicados à PDT.

Wilson *et al.*<sup>29</sup> demonstraram bons resultados na redução bacteriana utilizando um *laser* associado aos fotossensibilizadores azul de toluidina (AT), AM, ftalocianina e hematoporfirinas. Foram testadas bactérias do biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica. Os autores concluíram que a combinação *laser* corante alcançou uma significativa redução bacteriana, com média de redução superior a 90%. Entretanto, esta redução não foi significativa na presença apenas do corante ou apenas do *laser*. Estes achados sugeriram que um *laser* associado ao corante apropriado pode ser efetivo no combate aos microrganismos patogênicos<sup>29</sup>.

A terapia fotodinâmica tem seu início quando a molécula do fotossensibilizador absorve a luz que a irradia e sai do seu estado fundamental migrando para um estado mais energético, porém, menos estável chamado estado singleto. Devido a grande instabilidade deste nível de energia, a molécula tem um tempo de vida muito curto e tende a voltar para um nível de energia mais baixo ou mesmo para seu estado inicial. Nesta transição, o excesso de energia pode ser transferido ao substrato por meio de fluorescência, onde o fotossensibilizador emite energia em forma de fótons, ou por conversão interna, onde esta molécula pode passar a um nível de energia intermediário. Este nível intermediário chamado estado tripleto, entre o estado fundamental e o estado singleto, apresenta um tempo de vida um pouco mais longo. Este decaimento energético pode excitar outros componentes do meio, interagindo bem com a molécula de oxigênio e gerando rapidamente formas tóxicas à célula, como peróxidos, radicais hidroxila, íons superóxidos e oxigênio singleto, este último sendo apontado como maior causador de dano celular<sup>48</sup>.

Uma estreita relação entre absorção do corante e comprimento de onda utilizado deve ser observada na utilização da terapia fotodinâmica, pois a ação fotoquímica só ocorre quando uma série de parâmetros é estabelecida. A presença do fotossensibilizador e da irradiação por fonte de luz apropriada geram o efeito iniciador da terapia fotodinâmica. A banda de absorção do fotossensibilizador deve ser ressonante com a radiação emitida, absorvendo bem o comprimento de onda emitido<sup>24</sup>.

A terapia fotodinâmica foi utilizada em suspensões da bactéria *Helicobacter pylori* juntamente com os fotossensibilizadores AT, AM, fitalocianina, derivados de hematoporfirina e ácido aminolevulínico (ALA). A fonte de luz utilizada variou o comprimento de onda para cada fotossensibilizador, de forma a ser compatível com a absorção. Para o AT, ALA e hematoporfirina foi utilizada emissão em  $\lambda=630$  nm, para o MB  $\lambda=660$  nm, e para a fitalocianina  $\lambda=675$  nm. Foi observada a fotossensibilização letal e inibição do crescimento deste microorganismo. Em contrapartida, na ausência dos corantes, a irradiação laser não se mostrou eficiente contra a bactéria estudada. A PDT com AM apresentou uma grande atividade bactericida reduzindo em 99,9% a viabilidade dos espécimes bacterianos, enquanto o AT apresentou 90% de redução destes microorganismos. Os outros fotossensibilizadores foram ineficientes com os parâmetros utilizados neste experimento<sup>26</sup>.

O *Staphylococcus aureus* pode ser eliminado *in vivo* pela PDT e foi observada uma ação antimicrobiana seletiva e sem desenvolvimento de resistência bacteriana à técnica empregada<sup>84</sup>. A sensibilidade do *S. aureus* também foi testada com terapia fotodinâmica na presença do corante isotiocianato de verde malaquita, apresentando um efeito bactericida potente frente esta modalidade de tratamento. O isotiocianato de verde malaquita é uma molécula com forma estrutural semelhante ao verde malaquita convencional, porém com um grupo  $S=C=N$  no lugar de um  $N(CH_3)_2$ . Isso leva a uma ligação tanto com a parte protéica, como com a porção lipídica da membrana celular bacteriana<sup>85</sup>.

Associando o corante AT (1  $\mu\text{g/mL}$ ) a um laser diodo com 100mW de potência e comprimento de onda em 630 nm, sobre *P. gingivalis*, microorganismo encontrado em quadros de doença periodontal, que foram inoculados em molares superiores de ratos, os autores não encontraram após o tratamento espécimes viáveis do microorganismo em todas as doses aplicadas, além de ser observado um decréscimo de perda óssea nos grupos

irradiados quando comparados ao controle não irradiado. Concluiu-se que a terapia fotodinâmica pode ser usada como procedimento alternativo na prevenção da doença periodontal<sup>25</sup>.

Estudos mostram que a terapia fotodinâmica também pode ser utilizada com fontes de luz convencionais e relataram um efeito bactericida eficiente utilizando lâmpada de xenônio associado a filtros na região do vermelho. O fotosensibilizador utilizado, azul de toluidina, atuou sobre suspensão da bactéria *Porphyromonas gingivalis*. Uma grande redução foi observada quanto se utilizou a dose de  $2,2 \text{ J/cm}^2$  e um aumento da dose para  $5,63 \text{ J/cm}^2$  elevou esta redução<sup>86</sup>.

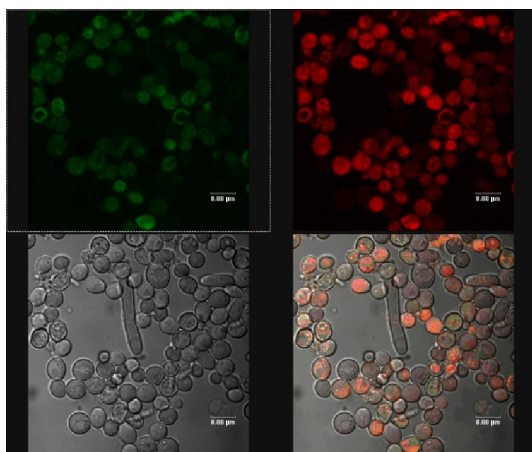
Os mecanismos de morte microbiana mais comumente reportados na literatura são atribuídos a: (i) dano em DNA e (ii) dano na membrana plasmática, principalmente por inativação de sistemas de transporte na membrana e enzimas. O tratamento de bactérias com diversos fotossensibilizadores culminou em quebras de DNA tanto em espécies Gram-positivas quanto em Gram-negativas. Resíduos de guanina são apontados como os fragmentos mais frequentemente observados após a PDT. Danos em proteínas da membrana plasmática também são reportados, bem como distúrbios da parede celular das bactérias Gram-negativas, o aparecimento de estruturas multilamelar próximas ao septo de divisão celular, bem como perda de íons potássio<sup>62</sup>.

Os fungos, em especial as leveduras, são microrganismos amplamente utilizados para o estudo de mecanismos de ação de diversas terapias, inclusive a terapia fotodinâmica. Os efeitos do pH,  $\text{N}_3$  e  $\text{D}_2\text{O}$  foram descritos e comparados utilizando-se do azul de toluidina como fotossensibilizador e a sua ação fotodinâmica sobre o fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Estes autores concluíram que a membrana plasmática foi o sítio de maior probabilidade de lesão gerada por oxigênio singlete em reação fotodinâmica para inativação de leveduras<sup>49</sup>.

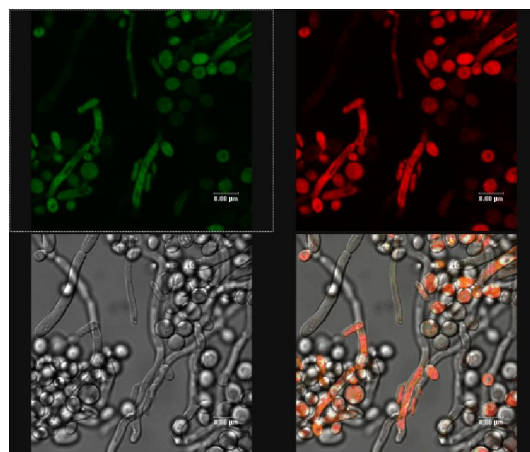
A inativação de *C. albicans* por PDT foi demonstrada por Zeina *et al.*<sup>87</sup>, que associaram luz policromática, proveniente de um projetor de diapositivos, ao azul de metileno para obtenção dos efeitos fotodinâmicos. Eles encontraram um início de inativação das leveduras após 20 min de irradiação e a quantidade de morte celular foi proporcional ao tempo de irradiação, que continuou a ser monitorado até 60 min. Adicionalmente, estes autores compararam leveduras e bactérias diante do desafio fotodinâmico e concluíram que as bactérias sucumbem mais rapidamente à ação da PDT<sup>87</sup>.

## ANEXO B – MICROSCOPIA CONFOCAL DE *C. albicans*

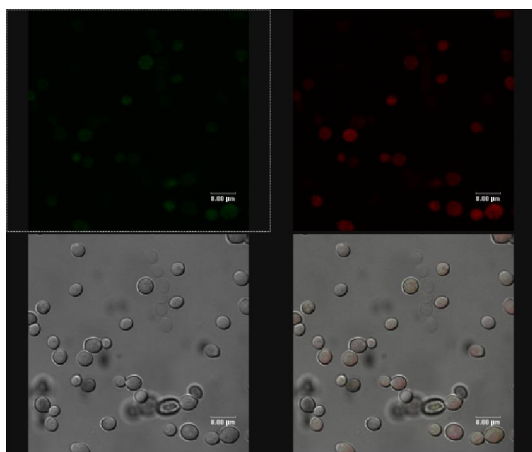
Nas figuras abaixo é apresentado o campo de observação para cada cepa YEM, visto nos três canais do microscópio confocal. O canal superior esquerdo representa o canal para ROD.; o canal superior direito é o relativo ao fotossensibilizador AM; a transmissão pode ser observada na parte inferior esquerda da imagem; e finalmente, na região inferior direita observa-se uma sobreposição dos três canais.



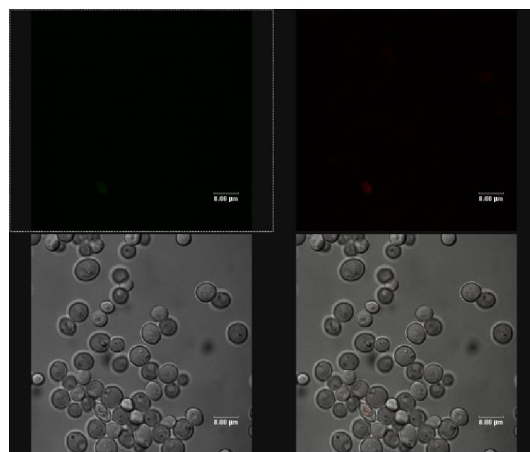
YEM12



YEM13



YEM14

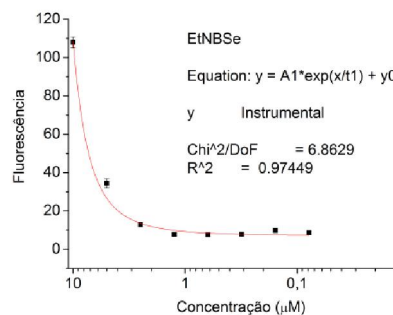
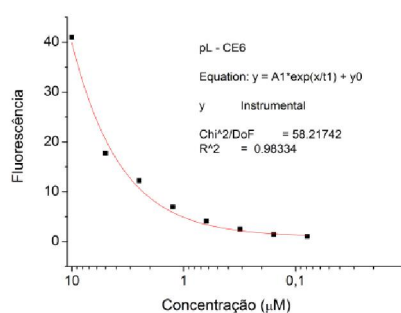
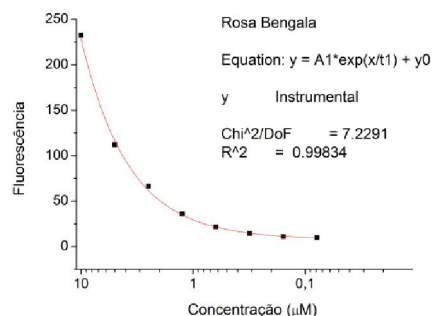
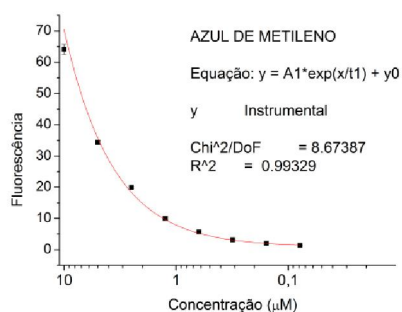


YEM15

## ANEXO C – CONCENTRAÇÃO DE FS EM *C. neoformans*



	Azul de metileno				Rosa Bengala				pl ce6				EtNBSe			
	KN99	CAP59	208819	208820	KN99	CAP59	208819	208820	KN99	CAP59	208819	208820	KN99	CAP59	208819	208820
Fluorescência/ DO	16,52	11,66	12,15	9,52	55,87	63,20	64,67	36,31	103,52	190,59	30,44	11,92	197,72	429,78	482,33	377,52
	23,89	12,14	14,56	10,48	62,90	72,31	79,04	41,06	113,40	131,26	21,76	12,96	225,24	406,41	464,38	354,34
	25,36	15,74	16,56	10,07	66,85	69,09	85,82	49,00	112,09	148,99	21,52	13,24	188,16	445,32	482,33	349,14
Média	21,92	13,18	14,42	10,02	61,87	68,20	76,51	42,12	109,67	156,95	24,57	12,70	203,71	427,17	476,35	360,33
DP	4,74	2,23	2,21	0,48	5,56	4,62	10,80	6,41	5,37	30,46	5,08	0,69	19,25	19,58	10,36	15,11
EP	2,73	1,29	1,27	0,28	3,21	2,67	6,24	3,70	3,10	17,58	2,93	0,40	11,11	11,31	5,98	8,72



## ANEXO D – MICROSCOPIA CONFOCAL EM DIFERENTES CEPAS DE *C. neoformans* COM DIFERENTES FS

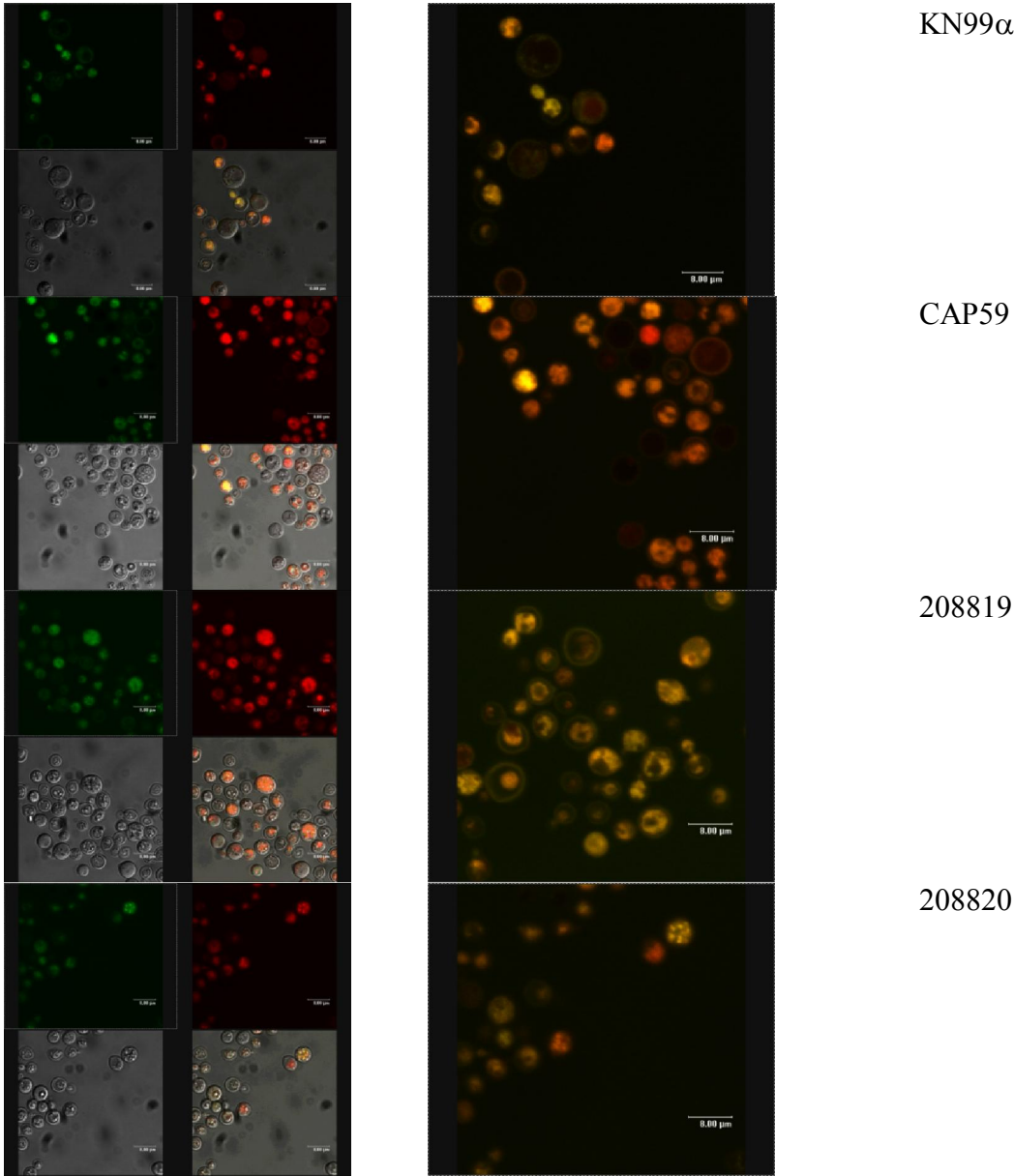
Nas figuras abaixo, são ilustrados os resultados obtidos por microscopia confocal das cepas de *C. neoformans* com quatro fotossensibilizadores para cada cepa de microrganismo. Nas figuras da coluna à esquerda, estão dispostas 4 imagens representativas de um campo do canal verde (superior esquerdo), canal vermelho (superior direito), canal de transmissão (inferior esquerdo) e canal de interpolação de imagens (inferior direito). Na coluna à direita, é apresentada a imagem de sobreposição dos canais vermelho e verde.

As cepas estão dispostas respectivamente como KN99 $\alpha$ , CAP59, ATCC 208819 e ATCC 208820, e cada linha das figuras mostra um campo representativo do comportamento geral observado em cada situação. Com esta metodologia, foi possível observar o comportamento do corante no interior da célula, porém é importante ressaltar que existem dificuldades técnicas para realizar tais imagens. A maior dificuldade foi a intensidade da excitação com laser de argônio. A irradiação laser pode produzir efeitos fototérmicos quando utilizada em potências maiores. Altas potências de excitação produziram pequeno tempo de observação, de aproximadamente 3 segundos e, podíamos observar um rompimento das organelas no interior da célula. Não foi possível observar diretamente as organelas, porém o sinal de fluorescência que vinha de um determinado ponto, se tornava difuso com o tempo de irradiação. Além deste fato, a imagem apresentava-se saturada na fotografia. Para contornar este problema, usamos uma lâmina com células de leveduras coradas com os marcadores fluorescentes para acertar a intensidade do laser, de forma que esta pudesse ser captada de forma correta, com a menor saturação possível e sem danificar as estruturas celulares.

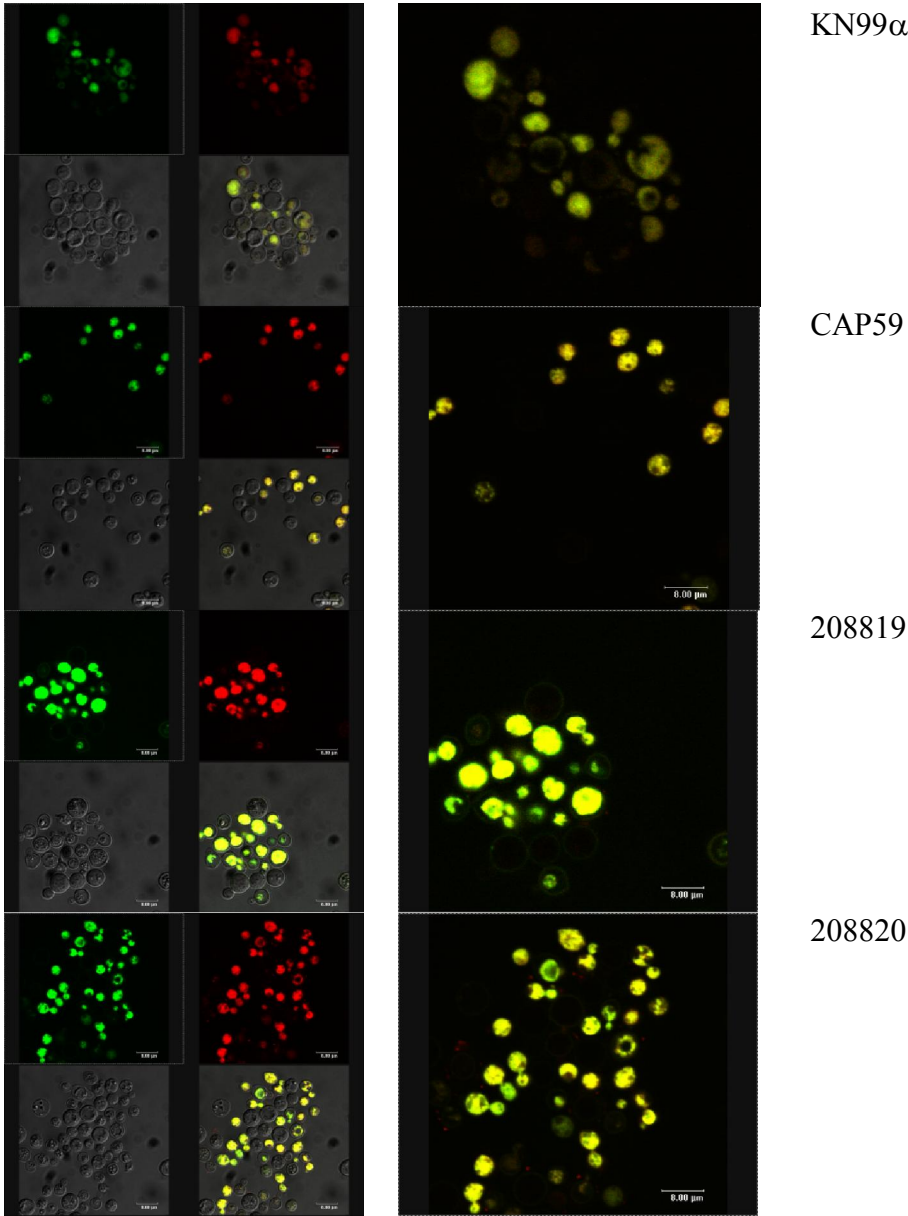


Microscópio confocal (Leica TCS NT, Leica Mikroskopie und System GmbH, Wetzlar, Alemanha)

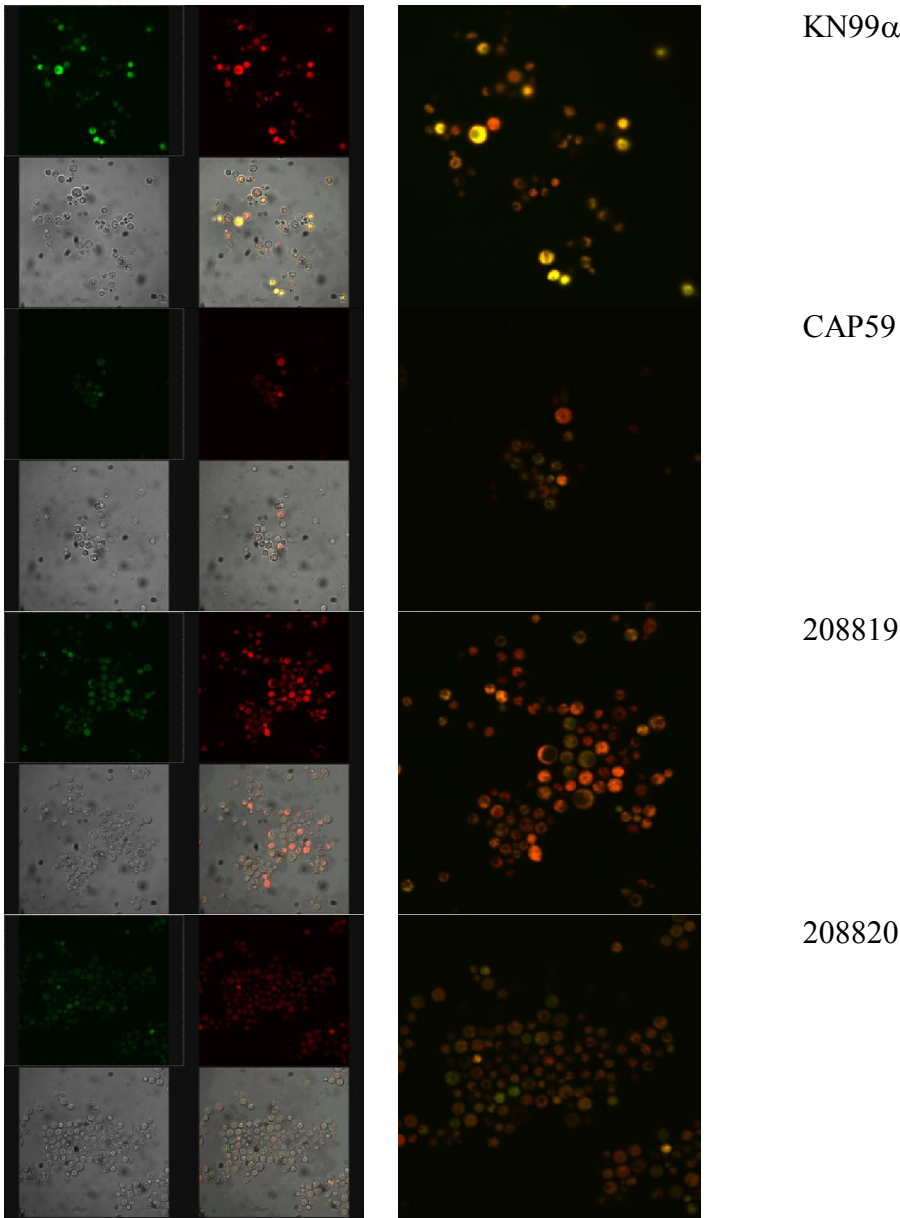
*C. neoformans* com Azul de Metileno – Canal verde (R123), Canal vermelho FS



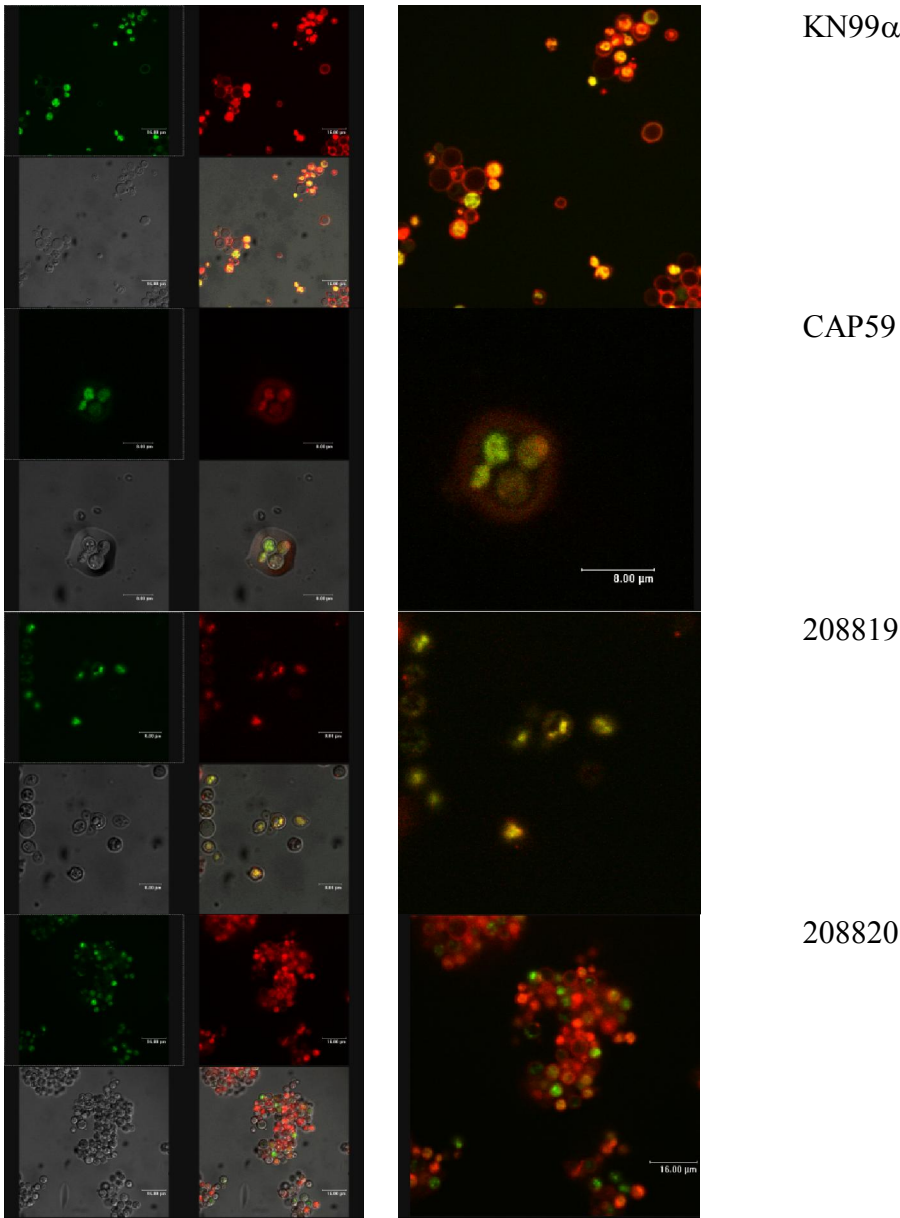
*C. neoformans* com Rosa bengala– Canal verde FS, canal vermelho (*mitotracker Green*)



*C. neoformans* com EtNBSe – Canal verde (R123), Canal vermelhoe FS



*C. neoformans* com pL-ce 6 – Canal verde (R123), Canal vermelho FS



**ANEXO E – FOTOS DO TRATAMENTO COM PDT NAS PATAS EDEMACIADAS DE CAMUNDONGOS COM CRIPTOCOCOSE**



## REFERÊNCIAS

1. EGGIMANN, P., GARBINO, J., PITTET, D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet. Infect. Dis.*, v. 3, n. 12, p. 772-785, 2003.
2. DONNELLY, R.F., MCCARRON, P.A., TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol. Res.*, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.
3. GULLO, A. Invasive fungal infections: the challenge continues. *Drugs*, v. 69 Suppl 1, n. p. 65-73, 2009.
4. HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.
5. OROZCO, A.S., HIGGINBOTHAM, L.M., HITCHCOCK, C.A., PARKINSON, T., FALCONER, D., IBRAHIM, A.S., GHANNOUM, M.A., FILLER, S.G. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 42, n. 10, p. 2645-2649, 1998.
6. FREYDIERE, A.M., GUINET, R., BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med. Mycol.*, v. 39, n. 1, p. 9-33, 2001.
7. SANGLARD, D., KUCHLER, K., ISCHER, F., PAGANI, J.L., MONOD, M., BILLE, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, n. 11, p. 2378-2386, 1995.
8. WATKINS, W.J., CHONG, L., CHO, A., HILGENKAMP, R., LUDWIKOW, M., GARIZI, N., IQBAL, N., BARNARD, J., SINGH, R., MADSEN, D., LOLANS, K., LOMOVSKAYA, O., OZA, U., KUMARASWAMY, P., BLECKEN, A., BAI, S., LOURY, D.J., GRIFFITH, D.C., DUDLEY, M.N. Quinazolinone fungal efflux

pump inhibitors. Part 3: (N-methyl)piperazine variants and pharmacokinetic optimization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 17, n. 10, p. 2802-2806, 2007.

9. PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., JONES, R.N., MESSER, S.A., HOLLIS, R.J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 3, p. 852-856, 2002.
10. HAY, R.J. Overview of the treatment of disseminated fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 28 Suppl B, p. 17-25, 1991.
11. LEMOINE, R.C., GLINKA, T.W., WATKINS, W.J., CHO, A., YANG, J., IQBAL, N., SINGH, R., MADSEN, D., LOLANS, K., LOMOVSKAYA, O., OZA, U., DUDLEY, M.N. Quinazolinone-based fungal efflux pump inhibitors. Part 1: Discovery of an (N-methylpiperazine)-containing derivative with activity in clinically relevant *Candida* spp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 14, n. 20, p. 5127-5131, 2004.
12. OTZEN, T., WEMPE, E.G., KUNZ, B., BARTELS, R., LEHWARK-YVETOT, G., HANSEL, W., SCHAPER, K.J., SEYDEL, J.K. Folate-synthesizing enzyme system as target for development of inhibitors and inhibitor combinations against *Candida albicans*-synthesis and biological activity of new 2,4-diaminopyrimidines and 4'-substituted 4-aminodiphenyl sulfones. *J. Med. Chem.*, v. 47, n. 1, p. 240-253, 2004.
13. WATKINS, W.J., LEMOINE, R.C., CHONG, L., CHO, A., RENAU, T.E., KUO, B., WONG, V., LUDWIKOW, M., GARIZI, N., IQBAL, N., BARNARD, J., JANKOWSKA, R., SINGH, R., MADSEN, D., LOLANS, K., LOMOVSKAYA, O., OZA, U., DUDLEY, M.N. Quinazolinone fungal efflux pump inhibitors. Part 2: In vitro structure-activity relationships of (N-methyl-piperazinyl)-containing derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 14, n. 20, p. 5133-5137, 2004.

14. GUALCO, L., DEBBIA, E.A., BANDETTINI, R., PESCIOTTO, L., CAVALLERO, A., OSSI, M.C., SCHITO, A.M., MARCHESE, A. Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2007.
15. CANNON, R.D., LAMPING, E., HOLMES, A.R., NIIMI, K., BARET, P.V., KENIYA, M.V., TANABE, K., NIIMI, M., GOFFEAU, A., MONK, B.C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 22, n. 2, p. 291-321, 2009.
16. MONTENEGRO, H., PAULA, C.R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of Sao Paulo, Brazil. *Med. Mycol.*, v. 38, n. 5, p. 385-390, 2000.
17. KWON-CHUNG, K.J.B., J E. *Cryptococcosis*. Philadelphia: 1992.
18. SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med. Mycol.*, v. 39, n. 2, p. 155-168, 2001.
19. CHEN, Y.C., CHANG, S.C., SHIH, C.C., HUNG, C.C., LUHBD, K.T., PAN, Y.S., HSIEH, W.C. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 36, n. 3, p. 175-183, 2000.
20. MITCHELL, T.G., PERFECT, J.R. *Cryptococcosis* in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.
21. NISHIHARA, T., KOSEKI, T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol.* **2000**, v. 36, n. p. 14-26, 2004.
22. PRATES, R.A., YAMADA-JR, A.M., SUZUKI, L.C., EIKO HASHIMOTO, M.C., CAI, S., GOUW-SOARES, S., GOMES, L., RIBEIRO, M.S. Bactericidal effect of

- malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 86, n. 1, p. 70-76, 2007.
23. SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol. 2000**, v. 28, n. p. 12-55, 2002.
  24. CHAN, Y., LAI, C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Laser Med. Sci.**, v. 18, n. 1, p. 51-55, 2003.
  25. KOMERIK, N., NAKANISHI, H., MACROBERT, A.J., HENDERSON, B., SPEIGHT, P., WILSON, M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 3, p. 932-940, 2003.
  26. MILLSON, C.E., WILSON, M., MACROBERT, A.J., BOWN, S.G. Ex-vivo treatment of gastric *Helicobacter* infection by photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 32, n. 1-2, p. 59-65, 1996.
  27. FELBER, T.D., SMITH, E.B., KNOX, J.M., WALLIS, C., MELNICK, J.L. Photodynamic Inactivation of Herpes-Simplex - Report of a Clinical Trial. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 223, n. 3, p. 289-292, 1973.
  28. WILSON, M., BURNS, T., PRATTEN, J., PEARSON, G.J. Bacteria in Supragingival Plaque Samples Can Be Killed by Low-Power Laser-Light in the Presence of a Photosensitizer. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, n. 5, p. 569-574, 1995.
  29. WILSON, M., DOBSON, J., SARKAR, S. Sensitization of Periodontopathogenic Bacteria to Killing by Light from a Low-Power Laser. **Oral Microbiol. Immun.**, v. 8, n. 3, p. 182-187, 1993.
  30. WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, v. 25, n. 5, p. 351-359, 1996.

31. SOUKOS, N.S., WILSON, M., BURNS, T., SPEIGHT, P.M. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. ***Lasers Surg. Med.***, v. 18, n. 3, p. 253-259, 1996.
32. DEMIDOVA, T.N., HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. ***Int. J. Immunopathol. Pharmacol.***, v. 17, n. 3, p. 245-254, 2004.
33. GIROTTI, A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. ***J. Photochem. Photobiol. B.***, v. 63, n. 1-3, p. 103-113, 2001.
34. GREBENOVA, D., KUZELOVA, K., SMETANA, K., PLUSKALOVA, M., CAJTHAMLOVA, H., MARINOV, I., FUCHS, O., SOUCEK, J., JAROLIM, P., HRKAL, Z. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. ***J. Photochem. Photobiol. B.***, v. 69, n. 2, p. 71-85, 2003.
35. BRAS, M., QUEENAN, B., SUSIN, S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. ***Biochemistry (Mosc)***, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.
36. MOOR, A.C. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. ***J. Photochem. Photobiol. B.***, v. 57, n. 1, p. 1-13, 2000.
37. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). ***J. Antimicrob. Chemother.***, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.
38. KOMERIK, N., WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. ***J. Appl. Microbiol.***, v. 92, n. 4, p. 618-623, 2002.
39. WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. ***Photochem. Photobiol. Sci.***, v. 3, n. 5, p. 412-418, 2004.

40. GARCEZ, A.S., RIBEIRO, M.S., TEGOS, G.P., NUNEZ, S.C., JORGE, A.O., HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg. Med.*, v. 39, n. 1, p. 59-66, 2007.
41. BLISS, J.M., BIGELOW, C.E., FOSTER, T.H., HAIDARIS, C.G. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 6, p. 2000-2006, 2004.
42. CALZAVARA-PINTON, P.G., VENTURINI, M., CAPEZZERA, R., SALA, R., ZANE, C. Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, v. 20, n. 3, p. 144-147, 2004.
43. DONNELLY, R.F., MCCARRON, P.A., TUNNEY, M.M., DAVID WOOLFSON, A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 86, n. 1, p. 59-69, 2007.
44. PRATES, R.A., DA SILVA, E.G., CHAVES, P.F., SANTOS, A.J.S., PAULA, C.R., RIBEIRO, M.S. Photodynamic therapy can kill *Cryptococcus neoformans* in in vitro and in vivo models. In: BiOS Photonics West, January 24-29, 2009, San Jose. *Proceedings*. San Jose: SPIE, 2009. p. 71650H-71651 - 71650H-71657.
45. PRATES, R.A., SILVA, E.G.D., YAMADAJR., A.M., SUZUKI, L.C., PAULA, C.R., RIBEIRO, M.S. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. In: BiOS Photonics West, January 19-24, 2008, San Jose. *Proceedings*. San Jose: SPIE, 2008. p. 684606.
46. PRATES, R.A., SILVA, E.G.D., YAMADA-JR., A.M., SUZUKI, L.C., PAULA, C.R., RIBEIRO, M.S. Light parameters influence cell viability in antifungal

- photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manne. *Laser Phys.*, v. 19, n. 5, p. 1038-1044, 2009.
47. JUNQUEIRA, J.C., MARTINS JDA, S., FARIA, R.L., COLOMBO, C.E., JORGE, A.O. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Laser Med. Sci.*, v. 24, n. 6, p. 877-884, 2009.
  48. KONAN, Y.N., GURNY, R., ALLEMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.
  49. ITO, T. Toluidine blue: the mode of photodynamic action in yeast cells. *Photochem. Photobiol.*, v. 25, n. 1, p. 47-53, 1977.
  50. ITO, T. Photodynamic action of hematoporphyrin on yeast cells--a kinetic approach. *Photochem. Photobiol.*, v. 34, n. 4, p. 521-524, 1981.
  51. CHABRIER-ROSELLO, Y., FOSTER, T.H., PEREZ-NAZARIO, N., MITRA, S., HAIDARIS, C.G. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, n. 10, p. 4288-4295, 2005.
  52. MUNIN, E., GIROLDO, L.M., ALVES, L.P., COSTA, M.S. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 88, n. 1, p. 16-20, 2007.
  53. SMIJS, T.G., SCHUITMAKER, H.J. Photodynamic inactivation of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Photochem. Photobiol.*, v. 77, n. 5, p. 556-560, 2003.
  54. FRIEDBERG, J.S., SKEMA, C., BAUM, E.D., BURDICK, J., VINOGRADOV, S.A., WILSON, D.F., HORAN, A.D., NACHAMKIN, I. In vitro effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 48, n. 1, p. 105-107, 2001.

55. FUCHS, B.B., TEGOS, G.P., HAMBLIN, M.R., MYLONAKIS, E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, n. 8, p. 2929-2936, 2007.
56. SOUZA, R.C., JUNQUEIRA, J.C., ROSSONI, R.D., PEREIRA, C.A., MUNIN, E., JORGE, A.O. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Laser Med. Sci.*, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2009.
57. USACHEVA, M.N., TEICHERT, M.C., BIEL, M.A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 71, n. 1-3, p. 87-98, 2003.
58. SCHINDL, A., ROSADO-SCHLOSSER, B., TRAUTINGER, F. The reciprocity rule in photobiology. A review. *Hautarzt*, v. 52, n. 9, p. 779+, 2001.
59. PFALLER, M.A., BURMEISTER, L., BARTLETT, M.S., RINALDI, M.G. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J. Clin. Microbiol.*, v. 26, n. 8, p. 1437-1441, 1988.
60. SILVA, E.G., BARONI FDE, A., VIANI, F.C., RUIZ LDA, S., GANDRA, R.F., AULER, M.E., DIAS, A.L., GAMBALE, W., PAULA, C.R. Virulence profile of strains of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* evaluated by experimental infection in BALB/c mice and correlation with exoenzyme activity. *J. Med. Microbiol.*, v. 55, n. Pt 2, p. 139-142, 2006.
61. JETT, B.D., HATTER, K.L., HUYCKE, M.M., GILMORE, M.S. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques*, v. 23, n. 4, p. 648-650, 1997.
62. HAMBLIN, M.R., HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

63. GARCEZ, A.S., *Mecanismos da Terapia Fotodinâmica em Presença de Peróxido de Hidrogênio*, in *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares*. 2007, Universidade de São Paulo: São Paulo. p. 80.
64. KRALJIC, I. Detection of singlet oxygen and its role in dye-sensitized photooxidation in aqueous and micellar solutions. *Biochimie*, v. 68, n. 6, p. 807-811, 1986.
65. KRALJIC, I., MOHSNI, S.E. New Method for Detection of Singlet Oxygen in Aqueous-Solutions. *Photochem. Photobiol.*, v. 28, n. 4-5, p. 577-581, 1978.
66. NIELSEN, K., COX, G.M., WANG, P., TOFFALETTI, D.L., PERFECT, J.R., HEITMAN, J. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic  $\alpha$  and  $\alpha$  isolates. *Infect. Immun.*, v. 71, n. 9, p. 4831-4841, 2003.
67. GARCIA-RIVERA, J., CHANG, Y.C., KWON-CHUNG, K.J., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot. Cell*, v. 3, n. 2, p. 385-392, 2004.
68. SOUKOS, N.S., HAMBLIN, M.R., HASAN, T. The effect of charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin(e6) conjugates. *Photochem. Photobiol.*, v. 65, n. 4, p. 723-729, 1997.
69. CINCOTTA, L., FOLEY, J.W., CINCOTTA, A.H. Phototoxicity, redox behavior, and pharmacokinetics of benzophenoxazine analogues in EMT-6 murine sarcoma cells. *Cancer Res.*, v. 53, n. 11, p. 2571-2580, 1993.
70. DEMIDOVA, T.N., GAD, F., ZAHRA, T., FRANCIS, K.P., HAMBLIN, M.R. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 81, n. 1, p. 15-25, 2005.

71. MARTIN, S.J., REUTELINGSPERGER, C.P., MCGAHON, A.J., RADER, J.A., VAN SCHIE, R.C., LAFACE, D.M., GREEN, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.*, v. 182, n. 5, p. 1545-1556, 1995.
72. CASADEVALL, A., ROSAS, A.L., NOSANCHUK, J.D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 3, n. 4, p. 354-358, 2000.
73. SOARES, B.M., DA SILVA, D.L., SOUSA, G.R., AMORIM, J.C., DE RESENDE, M.A., PINOTTI, M., CISALPINO, P.S. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 94, n. 1, p. 65-70, 2009.
74. CLARK, F.S., PARKINSON, T., HITCHCOCK, C.A., GOW, N.A. Correlation between rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in *Candida* species: possible role for drug efflux in drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 40, n. 2, p. 419-425, 1996.
75. ZARAGOZA, O., CHRISMAN, C.J., CASTELLI, M.V., FRASES, S., CUENCA-ESTRELLA, M., RODRIGUEZ-TUDELA, J.L., CASADEVALL, A. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell. Microbiol.*, v. 10, n. 10, p. 2043-2057, 2008.
76. BALL, D.J., LUO, Y., KESSEL, D., GRIFFITHS, J., BROWN, S.B., VERNON, D.I. The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 42, n. 2, p. 159-163, 1998.
77. NOSANCHUK, J.D., CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.*, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003.

78. WANG, Y., AISEN, P., CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans melanin and virulence: mechanism of action. *Infect. Immun.*, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.
79. WANG, Y., CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized Cryptococcus neoformans to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 7, p. 3004-3007, 1994.
80. TEICHERT, M.C., JONES, J.W., USACHEVA, M.N., BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 93, n. 2, p. 155-160, 2002.
81. MIMA, E.G., PAVARINA, A.C., DOVIGO, L.N., VERGANI, C.E., COSTA, C.A., KURACHI, C., BAGNATO, V.S. Susceptibility of Candida albicans to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 109, n. 3, p. 392-401, 2010.
82. ACKROYD, R., KELTY, C., BROWN, N., REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
83. OGINSKY, E.L., GREEN, G.S., GRIFFITH, D.G., FOWLKS, W.L. Lethal photosensitization of bacteria with 8-methoxypsoralen to long wave length ultraviolet radiation. *J. Bacteriol.*, v. 78, n. p. 821-833, 1959.
84. WILSON, M., PRATTEN, J. Lethal photosensitisation of Staphylococcus aureus in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg. Med.*, v. 16, n. 3, p. 272-276, 1995.
85. GOLDING, P.S., KING, T.A., MADDOCKS, L., DRUCKER, D.B., BLINKHORN, A.S. Photosensitization of Staphylococcus aureus with malachite

green isothiocyanate: inactivation efficiency and spectroscopic analysis. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 47, n. 2-3, p. 202-210, 1998.

86. MATEVSKI, D., WEERSINK, R., TENENBAUM, H.C., WILSON, B., ELLEN, R.P., LEPINE, G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. **J. Periodontal Res.**, v. 38, n. 4, p. 428-435, 2003.
87. ZEINA, B., GREENMAN, J., CORRY, D., PURCELL, W.M. Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes in vitro. **Br. J. Dermatol.**, v. 148, n. 2, p. 229-232, 2003.