

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA: AVALIAÇÃO DOS FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Candida albicans* NA CANDIDOSE EXPERIMENTAL

ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY: EVALUATION OF PATHOGENICITY FACTORS OF *Candida albicans* IN EXPERIMENTAL CANDIDOSIS

Naiara Fonseca Santiago, Juliana Campos Junqueira, Raquel Lourdes Faria, Joyce da Silva Martins, Antonio Olavo Cardoso Jorge, Carlos Eduardo Dias Colombo- Campus de São José dos Campos - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - Odontologia - na_santiago@hotmail.com - FAPESP 08/53307-8.

Palavras Chaves: Terapia Fotodinâmica, *Candida albicans*, candidose experimental.

Keywords: Photodynamic therapy, *Candida albicans*, experimental candidosis.

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana consiste na associação de um agente fotossensibilizador e luz visível, capaz de causar destruição seletiva das células microbianas. O fotossensibilizador é ativado pela exposição à luz de comprimento de onda específico, na presença de oxigênio. A transferência de energia do fotossensibilizador ativado para o oxigênio disponível resulta na formação de espécies tóxicas de oxigênio, como oxigênio singlete e radicais livres. Essas espécies químicas reativas causam destruição de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outros componentes celulares. A terapia fotodinâmica não apresenta efeitos genotóxicos e mutagênicos, o que impede o desenvolvimento de resistência microbiana (KONOPKA et al. 2008).

Numerosos estudos *in vitro* demonstraram que a PACT é altamente efetiva na destruição de vírus e protozoários, assim como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Resultados de pesquisas experimentais demonstraram que leveduras podem ser mortas pela ação fotodinâmica empregando fotossensibilizadores fenotiazínicos, porfirinas e fitalocianinas (DONNELLY et al. 2008).

Os fungos são importantes agentes etiológicos causadores de doenças humanas. Entre os principais patógenos fúngicos estão as leveduras do gênero *Candida*. Esses microrganismos podem causar diversas doenças, que variam de infecções mucosas superficiais, como candidose vulvovaginal e candidose orofaríngea, até infecções invasivas potencialmente fatais (SULLIVAN et al. 2004). *C. albicans* é a espécie mais patogênica e mais frequentemente isolada do organismo humano, tanto como microrganismo comensal como patógeno oportunista (CANNON et al. 1995, MCCULLOUGH et al. 1996).

Os mecanismos de patogenicidade de *C. albicans* não estão totalmente esclarecidos e são difíceis de serem definidos, pois dependem do tipo e local da infecção, estágio de invasão e resposta do hospedeiro (HAYNES 2001; HUBE & NAGLICK 2001). Vários fatores de virulência foram sugeridos, como capacidade de aderência à mucosa, capacidade em formar tubos germinativos e hifas, e produção de enzimas histolíticas (AKPAN & MORGAN 2002). Existem duas grandes famílias de enzimas histolíticas produzidas por *C. albicans*: as proteinases aspartil secretórias (SAP) e as fosfolipases (PL) (HAYNES 2001).

JUNQUEIRA et al. (2009) avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica *in vivo*, utilizando um modelo de candidose experimental em ratos. Após 7 dias da inoculação de *C. albicans*, as lesões de candidose formadas no dorso da língua foram tratadas com PDT utilizando o azul de metileno como fotossensibilizador. Os grupos que receberam terapia fotodinâmica exibiram menor alteração do epitélio e menor resposta inflamatória em relação ao grupo controle, sugerindo que a terapia fotodinâmica pode ser utilizada para tratar a candidose bucal.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da candidose bucal em ratos, avaliando seus efeitos sobre os fatores de patogenicidade de *Candida albicans*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP (035/2007). Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ UNESP. Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais com 10 ratos em cada grupo: tratado com laser e fotossensibilizador (L+F+); tratado apenas com laser (L+F-); tratado apenas com fotossensibilizador (L-F+); grupo sem laser nem fotossensibilizador (L-F-).

A indução da candidose experimental foi realizada através da administração de cloridrato de tetraciclina a 0,1% (Terramicina, Pfizer) na água de beber dos animais (ALLEN et al. 1982) e inoculações de *C. albicans* (ATCC 18804) durante três dias consecutivos.

Após 5 dias da última inoculação de *C. albicans*, os ratos foram anestesiados para realização dos tratamentos experimentais. Esse tratamento foi realizado em 2 dias consecutivos. Os animais receberam aplicação tópica de solução de azul de metileno no dorso da língua. Decorrido 5 minutos (tempo pré-irradiação), foram feitas 2 aplicações de laser, uma na porção anterior da língua e outra na região de papilas gigantes (Grupo L+F+). O efeito isolado do fotossensibilizador foi testado pela aplicação do azul de metileno pelo mesmo período do grupo anterior, porém na ausência de luz (Grupo L-F+). Para verificação do efeito isolado do laser, a aplicação de azul de metileno foi substituída por solução fisiológica (Grupo L+F-). Além disso, alguns animais receberam apenas solução fisiológica na ausência de luz (Grupo L-F-).

Foram coletadas amostras do dorso da língua dos animais, antes e após 1 dia da realização do tratamento experimental, para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol. A partir do crescimento nas placas de ágar Sabouraud de cada animal, foram isoladas duas colônias de *Candida* para avaliação dos fatores de patogenicidade desse microrganismo.

Os isolados obtidos foram submetidos aos testes de produção de proteinase e fosfolipase. As atividades enzimáticas (fosfolipase e proteinase) foram medidas de acordo com a técnica de Price et al. (1982), obtendo-se o valor de Pz, através da divisão do diâmetro da colônia em mm, pelo diâmetro mais o halo formado pela atividade enzimática. De acordo com esse sistema, quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática da amostra.

Os ratos foram submetidos à eutanásia 1 dia após o tratamento experimental e as línguas foram processadas para análise em microscopia óptica. Foi realizada uma avaliação da intensidade das lesões teciduais por meio da atribuição de escores às alterações epiteliais e à resposta inflamatória no tecido conjuntivo (Junqueira et al. 2007). Foram atribuídos escores de 0 a 7 para quantificar as alterações teciduais no dorso da língua de cada rato: hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, exocitose, espongiose, perda das papilas filiformes, hiperqueratose e formação de microabscessos intra-epiteliais. Em relação ao infiltrado inflamatório crônico do tecido conjuntivo, foram atribuídos os seguintes escores: 0 (ausência de células inflamatórias), 1 (infiltrado inflamatório discreto), 2 (infiltrado inflamatório moderado) e 3 (infiltrado inflamatório acentuado).

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

4 RESULTADOS

Na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *C. albicans* coletadas da cavidade bucal dos ratos antes e após a realização do tratamento experimental, não foram

observadas diferenças estatisticamente significante para os quatro grupos experimentais estudados (Figura 1).

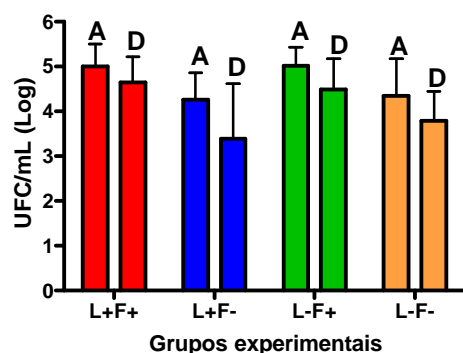


Figura 1 - Médias e Desvios-padrão de UFC/mL de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal dos ratos Antes (A) e Depois (D) do tratamento experimental.

De acordo com os resultados das atividades enzimáticas da fosfolipase verifica-se que o grupo L+F+ apresentou menor atividade enzimática, em relação aos outros grupos. Essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação à produção de proteinase, o grupo L+F+ também apresentou menor atividade enzimática em relação aos demais grupos, porém com diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos L+F+ e L-F+ (Figura 2).

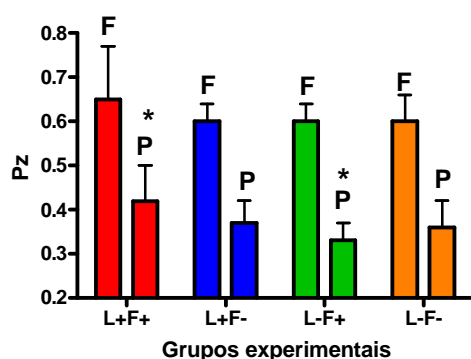


Figura 2 - Médias e Desvio-padrão dos valores de Pz para a atividade enzimática de fosfolipase (F) e proteinase (P). *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Na análise histológica do dorso da língua verificou-se que os ratos não apresentavam mais colonização por hifas de *Candida* no dorso da língua. Entretanto, foram observadas lesões teciduais de candidose, caracterizadas por alterações no tecido epitelial e infiltrado inflamatório na lâmina própria. As alterações epiteliais foram quantificadas, demonstrando que o grupo L+F+ apresentou lesões menos expressivas de candidose em relação aos demais grupos L+F-, L-F+ e L-F-, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 3).

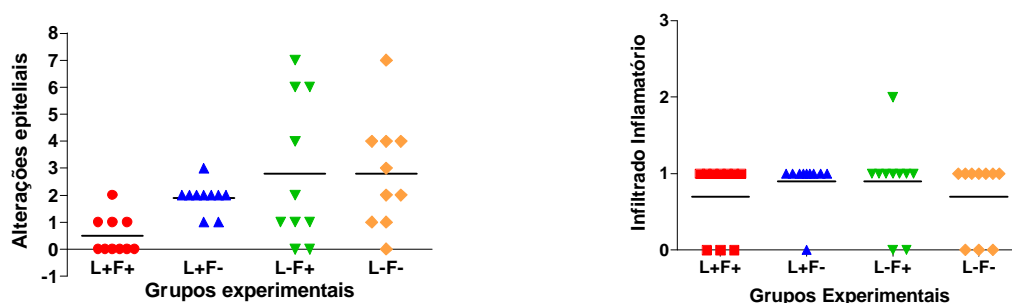


Figura 3 - Medianas e Escores atribuídos às alterações epiteliais e infiltrado inflamatório observadas nas lesões microscópicas de candidose no dorso da língua.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

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

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

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

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

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

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a PDT foi efetiva no tratamento da candidose bucal em ratos induzida por *C. albicans* e apresentou efeitos inibitórios sobre a capacidade de *C. albicans* em produzir proteinase e fosfolipase.

6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que a terapia fotodinâmica foi eficaz no tratamento da candidose do dorso da língua induzida por *Candida albicans* e inibiu a produção de fosfolipase e proteinase por *Candida albicans*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ALLEN CM, BLOZIS GG, ROSEN S, BRIGHT JS. Chronic candidiasis of the rat tongue: a possible model for human Median Rhomboid Glossitis. **J Dent Res.** 1982; 61:287-91.
- 2) AKPAN A, MORGAN R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J.** 2002; 78(922):455-9.
- Cannon RD et al. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J Dent Res.** 1995; 74(5):1152-61.
- 3) DE REPENTIGNY L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. **Curr Opin Microbio.** 2004; 7:324-329.
- 4) DONNELLY RF, MCCARRON PA, TUNNEY MM. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiol Res.** 2008; 163(1):1-12.
- 5) HUBE B, NAGLIK J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology.** 2001; 147(8):1997-2005.
- 6) JORGE AO, TOTTI MA, DE ALMEIDA OP, SCULLY C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomized rat. **J Oral Pathol Med.** 1993; 22:54-6.
- 7) JUNQUEIRA JC. Candidose experimental e recuperação de *C. albicans* na cavidade bucal de ratas ovariectomizadas. 2003. 143f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista) São José dos Campos, 2003.
- 8) JUNQUEIRA JC, MARTINS JS, FARIA RL, COLOMBO CED, JORGE AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. **Lasers Med Sci.** 2009 (DOI 10.1007/s10103-009-0673-4).
- 9) KONOPKA K, GOSLINSKI T. Photodynamic therapy in dentistry. **J Dent Res.** 2007; 86(11):1126.
- 10) MAISCH T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? 2006; 22(2):83-91.
- 11) MCCULLOUGH MJ, ROSS BC, READE PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1996; 25(2):136-44.
- 12) MUNIN E, GIROLDO LM, ALVES LP, COSTA MS. Study of tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.** 2007; 88:16-20.
- 13) SAMARANAYAKE YU, SAMARANAYAKE LP. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin Microbiol Rev.** 2001; 14(2):398-429.
- 14) SULLIVAN DJ, MORAN GP, PINJON E, AL-MOSAID A, STOKES C, VAUGHAN C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res.** 2004; 4(4-5):369-76.
- 15) TEICHERT MC, JONES JW, USACHEVA MN, BIEL MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2002; 93(2):155-60.

