

Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica

Renato A. Prates¹, Eriques G. da Silva², Luis C. Suzuki¹, Claudete R. Paula² e Martha S. Ribeiro¹

¹Centro de Lasers e Aplicações IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil

²Departamento de Microbiologia/ICB/USP, São Paulo, Brasil

Resumo. O objetivo deste estudo foi investigar a influência dos parâmetros de irradiação na terapia fotodinâmica em leveduras. Tem sido proposto na literatura que a terapia fotodinâmica (PDT) pode matar células microbianas e, um grande número de fotossensibilizadores e fontes de irradiação são reportados, em diferentes parâmetros e em diversas concentrações do corante. Entretanto, para que os processos fotodinâmicos sejam entendidos, mais conhecimento sobre a importância da taxa de fluência, fluência e tempo de irradiação são necessários. Para isso, suspensões de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* foram usadas. Duas taxas de fluência, 100 e 300mW/cm² foram comparadas em 3, 6 e 9 min. de irradiação, que resultaram em fluências de 0 a 162J/cm². A fonte de irradiação utilizada foi um laser emitindo em $\lambda=660\text{nm}$ com potência ajustada em 30 e 90mW. Azul de metileno na concentração de 100 μM foi utilizado como fotossensibilizador. Como resultado, observamos que a mesma fluência entregue em irradiações diferentes, gerou diferentes níveis de inativação fúngica. Além disso, maior taxa de fluência mostrou um aumento da inativação das leveduras. A PDT foi efetiva e apresentou aproximadamente 6 logs de morte celular. Por outro lado, nem o fotossensibilizador ou a irradiação separadamente promoveram morte celular. Em conclusão, o tempo de irradiação e intensidade tem um papel importante na eficiência da PDT. A fluência não deve ser utilizada como parâmetro único para comparação dos resultados de fotoinativação de leveduras.

Palavras-chave: fotoinativação antimicrobiana, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, azul de metileno, fotossensibilizador, laser vermelho.

Light parameters influence antifungal photodynamic therapy

Abstract. The aim of this study was to investigate the influence of light parameters on yeast cells. It has been proposed for many years that photodynamic therapy (PDT) can inactivate microbial cells. A number of photosensitizer and light sources are reported in different light parameters and in a range of dye concentrations. However, much more knowledge concerning the importance of fluence, fluence rate and exposure time are required for a better understanding of the photodynamic efficiency. For this purpose suspensions of *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* were used. Two fluence rates, 100 and 300mW/cm² were compared at 3, 6 and 9 min. of irradiation, resulting fluences from 0 to 162J/cm². The light source used was a laser emitting at $\lambda=660\text{nm}$ with output power adjusted at 30 and 90mW. As photosensitizer, one hundred- μM methylene blue was used. The same fluence in different fluence rates showed dissimilar levels of inactivation on yeast cells. In addition, the increase of the fluence rate showed an improvement on cell photoinactivation. PDT was efficient against yeast cells (6 log reduction), however, neither photosensitizer nor light alone presented any reduction in the cell viability. Fluence and fluence rate play a pivotal role in the PDT efficiency. Fluence per se should not be used as an isolated parameter to compare photoinactivation effects on yeast cells.

Keywords: antimicrobial photoinactivation, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, methylene blue, photosensitizer, red laser.

1. Introdução

A incidência de infecções causadas por fungos apresentou considerável crescimento nos últimos vinte anos, devido ao aumento do uso de drogas antineoplásicas e imunossupressoras, antibióticos de largo espectro e implantação de dispositivos

protéticos e enxertos. Pacientes queimados, com pancreatite, portadores de neutropenia ou AIDS também possuem uma maior predisposição para contrair infecções por fungos [1, 2]. Dentre as infecções causadas por leveduras, a forma mais expressiva é a candidíase causada por *C. albicans*, que possui prevalência de 60% dentre os isolados

clínicos provenientes de micoses. Outras espécies de *Candida sp.* apresentam menores prevalências, porém, possuem características distintas de patogenicidade, como a elevada resistência a antifúngicos demonstrada pela *C. krusei* [3-5]. Outra levedura patogênica que causa grande impacto na saúde dos pacientes imunodeficientes é representado por *Cryptococcus sp.*, que acometem principalmente pacientes imunodeprimidos, podendo levar à morte por complicações respiratórias e/ou neurológicas, se não tratadas adequadamente [6-8].

As infecções fúngicas geralmente requerem prolongada terapia antimicrobiana e estão associadas a seqüelas após tratamento e aumento no tempo de internação [2]. 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. Por isso, a busca por alternativas para o tratamento de infecções é de extrema importância [9].

A terapia fotodinâmica, do inglês *photodynamic therapy* (PDT), 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 são coradas com o fotossensibilizador e irradiadas com luz. Após a irradiação, a molécula do fotossensibilizador passa para um estado excitado, e ao voltar para o estado mais estável, transfere esta energia para o sistema propiciando um efeito fotoquímico que normalmente leva à morte celular [9]. Isoladamente, nem a droga nem a luz tem a capacidade de produzir o efeito deletério ao sistema biológico testado [10].

O corante azul de metileno (AM), pertencente à família das fenotiazinas, é um fotossensibilizador bem estabelecido na literatura. Esta molécula provou sua efetividade em uma série de estudos sobre fotoinativação microbiana [5, 11, 12]. 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 ($A_{\max}=608\text{nm}$) [13].

Após a irradiação do corante, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) leva à morte das células através da ação oxidativa de componentes lipídicos das membranas lipoproteicas [14]. 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 de EROS geradas pela terapia fotodinâmica [15].

A PDT mostra grande atividade antimicrobiana com amplo espectro de atuação sobre bactérias [9, 16] e fungos [17, 18], bem como em células eucariontes nas fototerapias anti-neoplásicas [19]. Toda esta toxicidade é atribuída à geração de grandes quantidades de EROS [20], que superam o limite de

defesa das células e iniciam os mais diversos mecanismos de morte celular.

Os estudos acerca de fotossensibilizadores desenvolveram-se muito nas últimas 2 décadas, no entanto, os parâmetros de irradiação, como potência, taxa de fluência, tempo de irradiação e fluência, necessitam de mais estudos.

Os fungos, em especial as leveduras, são microrganismos amplamente utilizados para o estudo sobre mecanismos de ação de diversas terapias e apresentam-se como um bom modelo para avaliação e comparação de efeitos fotodinâmicos. Em geral, os parâmetros de irradiação para inativar fungos são maiores que os necessários para matar bactérias. Isso possibilita uma melhor avaliação dos efeitos sub-letais da PDT.

O objetivo deste trabalho é avaliar o papel dos parâmetros de irradiação na inativação de leveduras patogênicas.

2. Material e Métodos

Para este estudo, foram selecionadas três espécies distintas de fungos. As leveduras foram cultivadas aerobicamente em agar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37°C por 24h para *Candida albicans* (ATCC90028) e *Candida krusei* (ATCC6258); e 30°C por 48h para *Cryptococcus neoformans* (ATCC90112).

2.1. Parâmetros de irradiação

Foi utilizado um laser de GaAlAs (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de emissão $\lambda = 660\text{nm}$. As amostras foram irradiadas de cima para baixo em uma placa de microtitulação de 96 poços, onde o feixe laser foi ajustado com o diâmetro de 0,3 cm².

O equipamento foi ajustado com potências em 30 e 90mW, que resultou em taxas de fluência de 100 e 300 mW/cm². Amostras foram colhidas nos tempos de 0 a 9 min., e fluências de 0 a 162J/cm² (tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros de irradiação utilizadas nos grupos PDT (L+FS+) durante o experimento

Potência (mW)	30	90
Taxa de fluência (mW/cm ²)	100	300
	0; 0	0; 0
Tempo de exposição (min.); Fluência (J/cm ²)	3; 18	3; 54
	6; 36	6; 108
	9; 54	9; 162

A fluência de 54J/cm² coincidiu nos dois regimes de irradiação utilizados e os resultados em morte microbiana foram então comparados entre si.

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 taxa de fluência de 300 mW/cm², o que resultou em uma fluência de 162J/cm². Para os testes de toxicidade no escuro (L-FS+), a suspensão de leveduras foi corada por 10 min. com AM 100µM em contato com as células. Nos grupos PDT

(L+FS+), a suspensão de leveduras coradas com AM 100µM foi devidamente irradiada nos âmbros mostrados na tabela 1. As ações das diferentes taxas de fluência, 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^{-1} a 10^{-5} vezes a concentração original. Então, alíquotas de 10µL de cada diluição foram estriadas, em triplicata, em uma placa de Petri contendo agar Sabouraud e, estas foram devidamente incubadas para formação de unidades formadoras de colônias [5, 11, 21].

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. Resultados e Discussão

Nem a irradiação com o laser, nem o corante não irradiado na presença da suspensão de leveduras mostrou qualquer efeito deletério ao crescimento das diferentes espécies (tabela 2).

Tabela 2 - Médias \pm DP dos grupos controle, irradiados com laser ou expostos ao AM na concentração de 100µM.

	UFC/mL (\log_{10})		
	L-PS-	L+PS-	L-PS+
<i>C. neoformans</i>	6,78 \pm 0,20	6,77 \pm 0,01	6,60 \pm 0,26
<i>C. albicans</i>	6,41 \pm 0,22	6,25 \pm 0,22	6,28 \pm 0,02
<i>C. krusei</i>	5,80 \pm 0,05	5,64 \pm 0,07	5,81 \pm 0,11

De uma forma geral, as células submetidas à PDT mostraram que a taxa de fluência de 100mW/cm² apresentou inativação moderada sobre as leveduras e os efeitos foram proporcionais ao tempo de irradiação. Além disso, estes efeitos letais aumentaram com o aumento da intensidade (fig. 1).

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/cm² na figura 1 A, B e C).

Após 9 min. de irradiação, *C. neoformans* reduziu pouco mais de 1 log sob 100mW/cm², contra mais de 6 logs sob 300mW/cm² (fig. 1).

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 100mW/cm², contra 1,5 logs de *C. krusei*. Além disso, sob 300 mW/cm² em 3 min., *C. albicans* apresentou 2 logs de redução contra apenas 1 log para *C. krusei*.

Estas diferenças podem ser explicadas pela característica da *C. krusei* conseguir bombear moléculas tóxicas para fora da célula, utilizando bombas ativas de efluxo [4]. O mesmo pode ser observado quando da utilização das bombas transportadoras ABC. Isto pode ser visto em relação à família de antifúngicos azóis, que são ineficientes

contra *C. krusei* devido ao seu pouco acúmulo no citoplasma [3].

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 [8]. Em PDT, a lei de reciprocidade é considerada para análise e comparação de resultados obtidos experimentalmente [22].

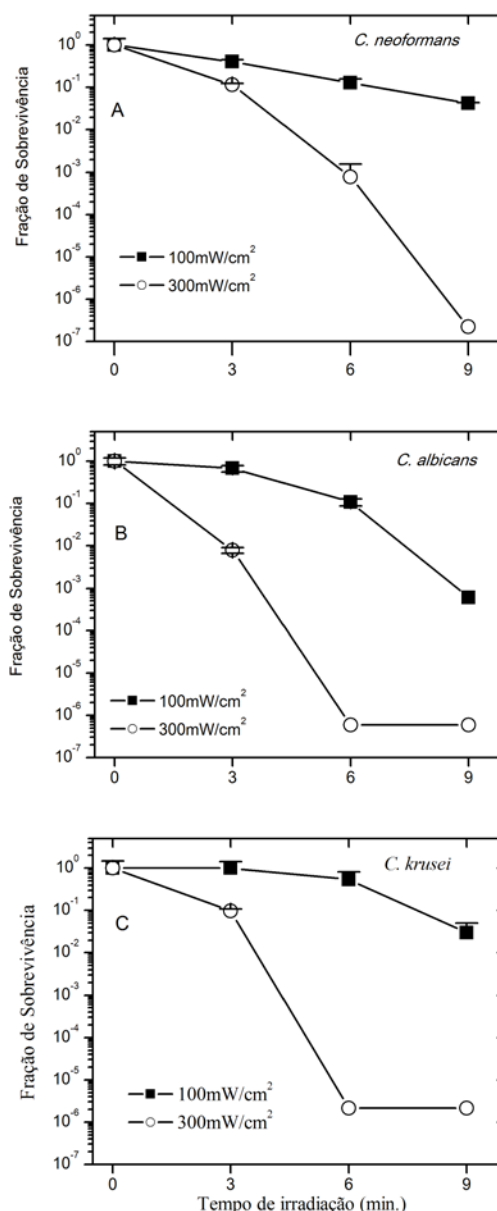


FIGURA 1 – Efeito do tempo de exposição na fração de sobrevivência de A) *C. neoformans*, B) *C. albicans* e C) *C. krusei* nas intensidades de 100 e 300 mW/cm². As barras de erro representam o desvio padrão.

Este princípio profere que, os efeitos biológicos decorrentes da irradiação dependem da fluência, independentemente do tempo de irradiação (conseqüentemente da taxa de fluência) sob o qual o sistema biológico foi irradiado. A conseqüência de

seguir a lei da reciprocidade é uma valorização na 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/cm², resultante de dois parâmetros distintos de irradiação (9 min.; 100 mW/cm²) e (3 min.; 300 mW/cm²), foi possível observar que, mesmo sob uma taxa de fluência menor, o tempo de irradiação influenciou de forma significativa os resultados de morte microbiana (fig. 2).

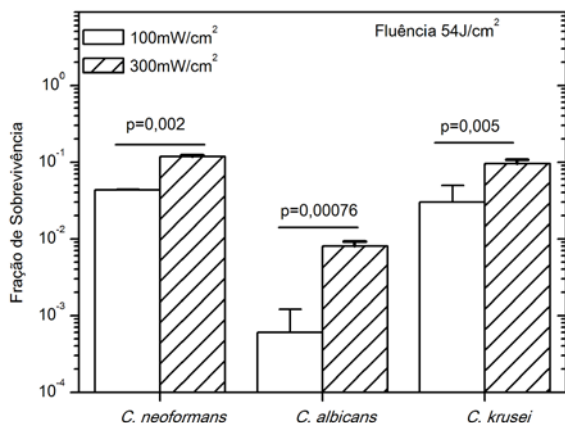


Figura 2 - Efeito da fluência de 54 J/cm² entregue sob intensidades de 100 mW/cm² (9 min.) e 300 mW/cm² (3 min.) na fração de sobrevivência de *C. neoformans*, *C. albicans*, e *C. krusei*. As barras de erro representam o desvio padrão.

O parâmetro de irradiação (54 J/cm²; 9 min.; 100 mW/cm²) foi mais letal aos microrganismos, quando comparado a um tempo menor com taxa de fluência maior (54 J/cm²; 3 min.; 300 mW/cm²).

Este comportamento foi similar para todos os microrganismos utilizados no experimento (fig. 2) e, demonstra que o tempo de irradiação deve ser levado em consideração na análise dos resultados de PDT.

4. Conclusões

A taxa de fluência deve ser considerada para aumentar a eficiência da PDT, que é maior em maiores taxas de fluência. Além disso, o tempo de irradiação também se apresenta como importante instrumento para melhorar os resultados de inativação microbiana. A fluência não deve ser utilizada como único parâmetro para comparar resultados de inativação fúngica em PDT.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento deste trabalho ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. O primeiro autor agradece a bolsa de estudos do CNPq (No. 065633/2006-7).

Referências

- Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Management of Candida species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis* 2003. 3(12):772-85.
- Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res* 2008. 163(1):1-12.
- Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995. 8(4):462-78.
- Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, Parkinson T, Falconer D, Ibrahim AS, et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998. 42(10):2645-9.
- Prates RA, Silva EGd, Yamada Jr. AM, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. in *Mechanisms for Low-Light Therapy III*. 2008: SPIE.
- Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999. 37(3):838-40.
- Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol* 2000. 3(4):354-8.
- Fuchs BB, Tegos GP, Hamblin MR, Mylonakis E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 2007. 51(8):2929-36.
- Prates RA, Yamada AM, Jr., Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B* 2007. 86(1):70-76.
- Wainwright M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. *Chem Soc Rev* 1996. 25(5):351-59.
- Prates RA, Silva EGd, Yamada Jr. 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 Phys* 2009. 19(5):1038-44.
- Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AO. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B* 2006. 83(1):34-8.
- Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B* 2003. 71(1-3):87-98.
- Girotti AW. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 2001. 63(1-3):103-13.
- Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* 2005. 70(2):231-9.
- Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 2007. 39(1):59-66.
- Monfrecola G, Procaccini EM, Bevilacqua M, Manco A, Calabro G, Santoianni P. In vitro effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci* 2004. 3(5):419-22.
- Lambrechts SA, Aalders MC, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005. 49(5):2026-34.
- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001. 74(5):656-69.
- Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2002. 66(2):89-106.
- Jett BD, Hatter KL, Huycke MM, Gilmore MS. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques* 1997. 23(4):648-50.
- Schindl A, Rosado-Schlosser B, Trautinger F. The reciprocity rule in photobiology. A review. *Hautarzt* 2001. 52(9):779-+.

Contato:

Renato Araujo Prates

E-mail: pratesra@usp.br