

EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM *CANDIDA ALBICANS*, ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*

Camila Campos Santos e Ilka Tiemy Kato
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

O fungo *C. albicans*, que vive naturalmente na flora gastrointestinal e trato reprodutivo humano, desenvolveu ao longo do tempo mecanismos de auto-defesa, conhecida como resistência antimicrobiana [1]. Quando acontece algum tipo de falha do sistema imunológico, em conjunto com outros fatores, tais como concentração hormonal ou estado (qualitativo) do substrato de crescimento do fungo, surge a oportunidade deste microorganismo se proliferar de forma exacerbada e causar infecção. O principal mecanismo de resistência deste fungo está relacionado com a presença de bombas de transporte ativo (ATP Binding Cassete ou ABC) na membrana celular. Este fator celular cria um mecanismo de expulsão dos fármacos, via consumo de ATP e confere à célula fúngica a resistência aos fármacos [2]. Devido a mecanismos deste tipo, faz-se necessário o uso de novas modalidades terapêuticas que contornem estes problemas. A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade terapêutica que combina o uso de um fármaco fotossensibilizador e de luz para causar morte celular via liberação de espécies reativas de oxigênio. Trata-se, portanto de uma alternativa que pode apresentar relevante eficácia na morte celular de microorganismos que apresentam este tipo de resistência.

OBJETIVO

Avaliar o efeito antimicrobiano da PDT em *C. albicans* que apresentam superexpressão de bombas ABC transportadoras.

METODOLOGIA

Amostras de *C. albicans* foram cultivadas em meio líquido de Sabouraud Dextrose e incubadas a 37°C por 24 h. Foram realizados ensaios de PDT em cultura planctônica e em biofilme. Os inóculos foram preparados com valores de transmitância ($\lambda=540\text{nm}$) entre 15% e 70% (concentrações de 1×10^7 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL, respectivamente). Para o preparo do biofilme, placas de 96 poços previamente tratadas com soro fetal bovino foram incubadas com o inóculo, por 90min. Após este período as células aderidas foram incubadas com meio líquido Sabouraud. A solução de azul de metileno (AM) foi preparada nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM. Na metodologia de cultura planctônica o AM foi adicionado ao pellet resultante da suspensão microbiana e, no ensaio com biofilme, o AM foi adicionado sobre a superfície do biofilme aderido à placa. Foram utilizados, como parâmetros de irradiação, potência de 100 mW, tempo de irradiação entre 3 a 9 min, e área do feixe de $0,3 \text{ cm}^2$.

A irradiação foi realizada com um laser diodo (PhotonLase III, DMC, Brasil) com comprimento de onda de emissão em $\lambda=660 \text{ nm}$. As amostras em suspensão ou biofilme foram irradiadas em poços de placas de 96 poços. Após a irradiação, as suspensões foram diluídas seriadamente em PBS e alíquotas foram plaqueadas em ágar Sabouraud e incubadas a 37°C por 24 h.

RESULTADOS

Nas figuras 1 e 2 são mostradas as curvas de morte de *C. albicans* sem suspensão e no modelo de biofilme.

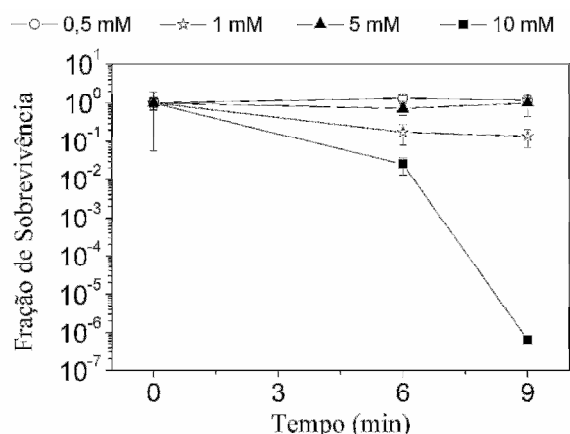


Figura 1: Curva de morte de *C. albicans* (cultura planctônica) em função do tempo de irradiação. Células foram incubadas com AM em concentrações de 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M e irradiadas. Dados representam os valores médio e as barras, os desvios padrão.

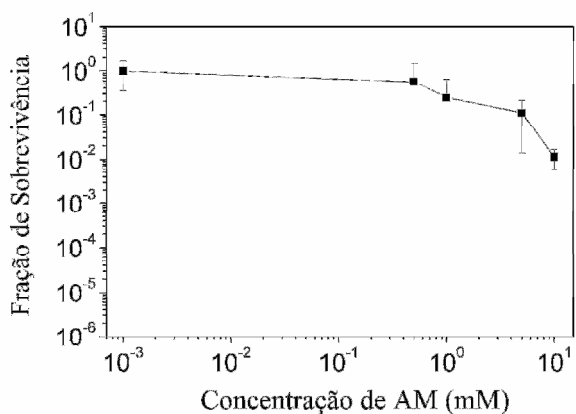


Figura 2: Curva de morte de biofilme de *C. albicans* em função da concentração de AM. Células foram incubadas com AM e irradiadas com 100 mW, por 6 min. Dados representam os valores médio e as barras, os desvios padrão.

Os resultados demonstram que tanto no experimento com células em suspensão, quanto no experimento com biofilme, as maiores concentrações de AM foram mais

eficientes para a terapia fotodinâmica nesta cepa de *C. albicans*. Observou-se que a PDT realizada com AM em concentração de 10 mM resultou na redução de aproximadamente 2 logs de células. Embora o fotossensibilizador AM seja substrato para as bombas de transporte ativo, o aumento da concentração de AM utilizada acarretou no aumento do número de células fúngicas mortas por PDT. Em nenhuma das concentrações testadas foram observados efeitos tóxicos. Os dados obtidos sugerem que a PDT mediada por AM é alternativa antifúngica eficiente mesmo em cepas de *C. albicans* que apresentam mecanismo de resistência relacionada à expressão de bombas de transporte ativo.

CONCLUSÕES

A utilização da PDT em *C. albicans* com expressão de bombas de transporte ativo mostrou-se eficiente para concentrações de AM de 10 mM. Os resultados obtidos demonstram que a adequação da concentração de fotossensibilizador e dos parâmetros de irradiação podem resultar na inativação fúngica tanto em suspensão, quanto em biofilme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FIDEL, P.L., JR.; CUTRIGHT, J.; STEELE, C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.*, v. 68, n. 2, p. 651-657, 2000.
- [2] TSAO, S.; RAHKHOODAEI, F.; RAYMOND, M. Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 53, n. 4, p. 1344-1352, 2009.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq e FAPESP.