UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

NATHALIA RAMOS DA SILVA

**PROTOCOLO CUSTO-EFETIVO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM
ERITROSINA E FOTOPOLIMERIZADOR ODONTOLÓGICO PARA O
TRATAMENTO DA CANDIDOSE BUCAL: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM MODELO
MURINO**

Ribeirão Preto

2015

NATHALIA RAMOS DA SILVA

**PROTOCOLO CUSTO-EFETIVO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COM
ERITROSINA E FOTOPOLIMERIZADOR ODONTOLÓGICO PARA O
TRATAMENTO DA CANDIDOSE BUCAL: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM MODELO
MURINO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Área de concentração: Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do *Campus* USP – Ribeirão Preto

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Silva, Nathalia Ramos da

Protocolo custo-efetivo de terapia fotodinâmica com eritrosina e fotopolimerizador odontológico para o tratamento da candidose bucal: estudo pré-clínico em modelo murino. Ribeirão Preto, 2015.

95p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Souza, Raphael Freitas de

1. Agentes anti-infecciosos. 2. *Candida albicans*. 3. Candidíase bucal. 4. Fotoquimioterapia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathalia Ramos da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Área de concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*A **Deus**, por ser onipresente em minha vida, por colocar perto de pessoas especiais e queridas para serem meus anjos da guarda e pelas inúmeras oportunidades oferecidas.*

*Aos meus amados e dedicados pais, **Jeane** e **Luciano**, por terem me amado incondicionalmente e me apoiado na concretização dos meus sonhos e nas dificuldades. Vocês me ensinaram quais são os verdadeiros tesouros da vida. Obrigada por sempre me iluminaram os caminhos e me ajudarem a desenvolver valores que definem a pessoa que eu sou. Vocês são o alicerce de todas as minhas conquistas.*

*À minha querida irmã, **Luciana**, por ser uma pessoa incrível e de grande sabedoria. Aprendo sempre com você e não sei como poderia ter vivido sem as nossas “análises críticas” das situações a nossa volta. Ter você como companheira na jornada da vida me faz ser uma pessoa melhor.*

*Ao meu namorado, **Daniel**, por todo amor, suporte e compreensão. A sua presença me proveu de forças para prosseguir na busca pelos meus objetivos, mesmo estando longe da minha casa. Obrigada por todo amor, companheirismo, felicidade e serenidade que você me transmite.*

Dedico este trabalho.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza**, por todo conhecimento transmitido e solicitude para conduzir a minha orientação. Considero um grande privilégio a oportunidade de ter sido sua orientanda de mestrado. Serei eternamente grata pelos aprendizados nas várias esferas da vida. Admiro profundamente o seu profissionalismo, inteligência e, principalmente, a forma humanizada como você lida com os pacientes, alunos e funcionários. Você realiza com maestria a arte de ser professor.

Às duas integrantes fundamentais do que considero a “equipe PDT”, **Daniela Garcia Ribeiro e Viviane de Cássia Oliveira**. O trabalho, dedicação e companheirismo de vocês foram essenciais para que o projeto de pesquisa culminasse nesta dissertação. Muito obrigada!

Agradecimentos

As pessoas que conhecemos nos caminhos da vida são as melhores dádivas que podemos receber. São como gotas preciosas que marcam o papel em que escrevemos a nossa história. Agradeço imensamente pela oportunidade de conviver e aprender com cada um de vocês.

À *Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP)*, na pessoa do atual diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros** e da vice-diretora **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, por ter me acolhido e proporcionado diversas oportunidades de crescer profissionalmente e pessoalmente.

À *Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo*, na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida Antunes** e do vice coordenador **Prof. Dr. Ricardo Farias Ribeiro**, pela dedicação em aprimorar a qualidade do programa e aprendizado dos alunos.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pela bolsa de estudos concedida à realização do curso de mestrado (Processo nº: 2012/22026-9).

À **Profa. Dra. Claudia Helena Lovato da Silva**, por ser um exemplo de profissional e ser humano. Você é uma grande inspiração e espero um dia poder conduzir o meu trabalho com a sua graça, gentileza e sabedoria.

Aos **professores do Departamento de Prótese e Materiais Dentários, DPMD da FORP-USP**, por contribuíram para minha formação como mestre.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), em especial **Ana Paula Macedo, Ana Paula Xavier, Eduardo Destito, Fernanda Talita de Freitas, Julio César Souza da Matta, Mary Possani Carmessano, Regiane de Cássia Tirado Damasceno**, que foram tão importantes na minha formação e alegraram ainda mais os momentos de convívios nos corredores da FORP-USP.

Aos professores, funcionários e alunos do antigo Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, em especial a **Edna Aparecida dos Santos Moraes, Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa, Prof. Dr. Jorge Esquiche Leon, Junia Ramos, Kleber Augusto Loureiro, Nilce de Oliveira Wolga e Yamba Carla Lara Pereira** por terem me acolhido no laboratório de vocês e me ensinado sempre com muita paciência técnicas e aprendizados tão novos e distintos do meu campo de atuação. Vocês foram imprescindíveis para a execução desta pesquisa.

*Aos meus amigos que compartilharam o ambiente do Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral, **Adriana B. Ribeiro, Carolina N. F. Arruda, Danilo B. Sorgini, Flávia C. T. Coimbra, Juliana B. Pinheiro, Luciana Crizostomo, Marcela M. Salles, Maria Paula Della Vecchia, Marina P. Vomero, Maurício M. Badaró, Tatiana R. Cunha e Vanessa M. F. Leite.** Vocês me receberam sempre com muita gentileza e um sorriso no rosto. Obrigada por tornarem o nosso ambiente de trabalho tão acolhedor e alegre.*

*Aos **amigos que conheci no ambiente da FORP-USP** e dividiram comigo os anseios e conquistas inerentes a trajetória de um aluno de pós-graduação. Em especial, ao meu amigo de longa data, **Raniel Fernandes Peixoto**, um modelo de vocação para docência e pesquisa, que me inspira e traz muito orgulho desde nossos tempos de convivência na graduação. Serei eternamente grata pelas incontáveis vezes que você me estendeu sua mão.*

*Às alunas da iniciação científica que trabalharam em conjunto para ampliar os conhecimentos sobre a terapia fotodinâmica no tratamento da candidose bucal, **Karla Bonfá, Michelle M. Sobreiro e Natalia Sartor.** Vocês são pessoas maravilhosas de trabalhar e me ensinaram muito. Agradeço todo empenho aplicado nos seus projetos de pesquisas e por somarem conhecimentos ao nosso campo de pesquisa.*

Resumo

SILVA, N. R. **Protocolo custo-efetivo de terapia fotodinâmica com eritrosina e fotopolimerizador odontológico para o tratamento da candidose bucal: estudo pré-clínico em modelo murino.** Ribeirão preto, 2015. 95p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral). Faculdade de odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A candidose bucal acomete grande número de pessoas mundialmente, sendo associada a condições como imunossupressão, radioterapia, tabagismo, higiene bucal, idade, xerostomia e uso de próteses removíveis. Uma importante abordagem terapêutica para essas infecções consiste nos medicamentos antifúngicos, que podem apresentar efeitos colaterais e resultar na resistência dos patógenos. Nesse contexto, a terapia fotodinâmica (PDT) faz-se interessante como alternativa capaz de minimizar essas limitações. Protocolos de PDT poderão ser mais facilmente assimilados à prática clínica se empregarem materiais já aprovados para uso odontológico. Sendo assim, este estudo propõe avaliar o uso de PDT com eritrosina como fotossensibilizador, irradiada por um LED azul, usando-se um modelo animal. Quarenta camundongos tiveram candidose induzida sobre o dorso da língua por meio de imunossupressão e inoculação com *Candida albicans*. Após estabelecimento da lesão durante cinco dias, os animais receberam um dentre quatro tratamentos possíveis: aplicação da eritrosina 5% seguida de irradiação pelo LED (E+L+); aplicação de eritrosina, somente (E+L-); salina seguida pela irradiação (E-L+); e somente salina (E-L-). A fim de distinguir possíveis efeitos colaterais, os mesmos tratamentos foram aplicados em 12 camundongos sem a indução de candidose. O número de unidades formadoras de colônia de *C. albicans* foi contado após o tratamento, e a mucosa foi submetida à análise histológica para determinar o grau de inflamação. Os dados dos grupos foram comparados por meio de ANOVA e teste de Kruskal-Wallis, ($\alpha=0,05$). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos testados quanto à contagem de colônias de *C. albicans* e o grau de inflamação. O infiltrado inflamatório foi classificado como discreto na maioria dos casos. Os animais com candidose bucal induzida e os saudáveis que foram submetidos aplicação de eritrosina 5% e irradiação pelo LED apresentaram infiltrado inflamatório mais acentuado e lesões mais evidentes na camada epitelial, sugerindo que este protocolo ocasionou danos aos tecidos orais.

Palavras-chave: Agentes anti-infecciosos, *Candida albicans*, candidíase bucal, fotoquimioterapia.

Abstract

SILVA, N. R. Cost-effective protocol of photodynamic therapy with erythrosine and dental curing light for the treatment of oral candidosis: a preclinical study in murine model. 2015. 95p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Oral candidosis affects many people worldwide and is associated with conditions such as immunosuppression, radiation, smoking, oral hygiene, age, xerostomia and use of removable prostheses. An important therapeutic approach for these infections consists of antifungal drugs, which have side effects and can result in the resistance of pathogens. In this context, photodynamic therapy (PDT) is an interesting alternative able to overcome those limitations. PDT protocols can be more easily assimilated in clinical practice if they employ materials already approved for use in dentistry. Thus, this study evaluate the PDT with the use of erythrosine as a photosensitizer, irradiated by a blue LED light, using an animal model. Forty mice had candidosis induced on the tongue by the immunosuppression and inoculation with *Candida albicans*. After five days that the lesion is established, the animals received one of four possible treatments: application of 5% erythrosine and irradiation by the LED (E+L+); erythrosine application, only (E+L-); saline followed by irradiation (E-L+); and only saline (E-L-). In order to distinguish potential side effects, the same treatments were applied in 12 mice without induced candidosis. Colony-forming units (CFU) of *C. albicans* were counted after treatment, and the mucosa was subjected to histological analysis to determine the degree of inflammation. The data of the groups were compared using ANOVA and Kruskal-Wallis test ($\alpha=0.05$). No significant difference was detected among the groups tested for the number of CFU of *C. albicans* and the degree of inflammation. The inflammatory infiltrate was classified as mild in most cases. Animals with induced oral candidosis and the healthy ones exhibited more pronounced inflammatory infiltrate and lesions in the epithelial layer following PDT by 5% erythrosine and irradiation by the LED light. Such findings suggest that this protocol resulted in damage to oral tissues.

Keywords: Anti-Infective Agents, *Candida albicans*, Candidiasis, Oral, Photochemotherapy.

Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismo de ação da PDT.....	35
Figura 2	Organograma das etapas do experimento realizado com os animais.....	46
Figura 3	Aplicação da anestesia via intramuscular.....	48
Figura 4	Aplicação subcutânea de prednisolona.....	48
Figura 5	Introdução do cloridrato de tetraciclina na água de consumo dos camundongos.....	49
Figura 6	Embebição do swab estéril na suspensão de <i>C. albicans</i>	49
Figura 7	Fricção do swab embebido na cavidade bucal durante um minuto.....	49
Figura 8	Eritrosina e fotopolimerizador odontológico utilizados no protocolo de PDT.....	50
Figura 9	Aplicação de 50 µL de eritrosina sobre o dorso da língua realizada nos grupos E+L+ e E+L-.....	51
Figura 10	Aplicação de 50 µL de solução salina sobre o dorso da língua realizada nos grupos E-L+ e E-L-.....	51
Figura 11	Irradiação da luz (LED) sobre o dorso da língua durante três minutos....	51
Figura 12	Descrição das etapas realizadas em cada grupo experimental.....	52
Figura 13	Fricção do dorso da língua com swab estéril, durante um minuto, para a coleta das colônias de <i>C. albicans</i> após a aplicação do tratamento.....	53
Figura 14	Acondicionamento das pontas dos swabs nos tubos contendo 1 mL de solução salina após as coletas.....	54
Figura 15	Diluições decimais seriadas do conteúdo do tubo e semeadas em duplicata do sobre placas com ChromAgar.....	54
Figura 16	Placas com ChromAgar 48 horas após o armazenamento para realização da contagem das colônias de <i>C. albicans</i>	54

Figura 17	Contagem média de UFC/mL (em log ₁₀) para os quatro grupos experimentais.....	58
Figura 18	Corte sagital do dorso da língua apresentando características de normalidade do tecido: epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com formação de papilas. Região subepitelial sem infiltrado inflamatório significativo. Microscopia óptica (HE).....	61
Figura 19	Corte sagital com presença de infiltrado inflamatório discreto no tecido conjuntivo e vasos congestionados. Microscopia óptica (HE).....	62
Figura 20	Corte sagital com presença de infiltrado inflamatório moderado no tecido conjuntivo, vasos congestionados e edema. Microscopia óptica (HE).....	62
Figura 21	Corte sagital com presença de infiltrado inflamatório severo no tecido conjuntivo, vasos congestionados, degradação da camada epitelial e edema abundante. Microscopia óptica (HE).....	63
Figura 22	Infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo com predomínio de células inflamatórias mononucleares. Microscopia óptica (HE).....	63
Figura 23	Área de concentração fúngica na camada de queratina. É possível verificar a hiperplasia do tecido epitelial, desorganização da camada basal, perda das papilas filiformes, hiperkeratose e espongiose. Infiltrado inflamatório discreto na lâmina própria. Microscopia óptica (HE).....	64
Figura 24	Alterações no tecido epitelial observadas em região de acúmulo de células fúngicas. Infiltrado inflamatório discreto na lâmina própria. Microscopia óptica (HE).....	64
Figura 25	Infiltrado inflamatório severo observado em um camundongo do grupo E+L+. Degradação do tecido epitelial, fibras musculares, vasos congestionados e edema abundante. Microscopia óptica (HE).....	65

Figura 26	Infiltrado inflamatório severo observado em outro camundongo do grupo E+L+. Presença de acúmulo de fungos e células inflamatórias. Microscopia óptica (HE).....	66
Figura 27	Predominância de células inflamatórias polimorfonucleares. Microscopia óptica (HE).....	66
Figura 28	Corte obtido de um camundongo saudável que recebeu a PDT e desenvolveu um infiltrado inflamatório severo com área de degradação do epitélio, edema abundante e, hiperemia Microscopia óptica (HE).....	67
Figura 29	Corte obtido de um camundongo saudável do grupo E-L+, infiltrado inflamatório ausente Microscopia óptica (HE).....	67
Figura 30	Aglomerção de hifas e leveduras de na camada de queratina, sem invasão do tecido epitelial e conjuntivo. Microscopia ótica (PAS).....	68
Figura 31	Leveduras e hifas observadas na camada de queratina, sem invasão do tecido epitelial e conjuntivo. Microscopia ótica (PAS).....	68
Figura 32	Mediana dos escores do infiltrado inflamatório dos grupos experimentais.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1	Estudos em modelo animal que pesquisaram protocolos de PDT para o tratamento da candidose bucal.....	41
Tabela 2	Contagem da UFC/mL no grupo E+L+.....	59
Tabela 3	Contagem da UFC/mL no grupo E+L-.....	59
Tabela 4	Contagem da UFC/mL no grupo E-L+.....	60
Tabela 5	Contagem da UFC/mL no grupo E-L-.....	60
Tabela 6	Classificação do infiltrado inflamatório do grupo E+L+.....	69
Tabela 7	Classificação do infiltrado inflamatório do grupo E+L-.....	69
Tabela 8	Classificação do infiltrado inflamatório do grupo E-L+.....	70
Tabela 9	Classificação do infiltrado inflamatório do grupo E-L-.....	70
Tabela 10	Classificação do infiltrado inflamatório dos animais do grupo controle negativo.....	71
Tabela 11	Classificação do infiltrado inflamatório dos grupos experimentais.....	71
Tabela 12	Classificação do infiltrado inflamatório do grupo controle negativo.....	72

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1.INTRODUÇÃO.....	24
1.1. <i>Candidose Bucal.....</i>	<i>25</i>
1.1.1. <i>Patogênese.....</i>	<i>26</i>
1.1.1.1. <i>Agentes Etiológicos.....</i>	<i>26</i>
1.1.1.2. <i>Fatores Predisponentes.....</i>	<i>28</i>
a. <i>Fatores Sistêmicos.....</i>	<i>28</i>
b. <i>Fatores Locais.....</i>	<i>29</i>
1.1.2. <i>Tratamento.....</i>	<i>30</i>
1.2. <i>Terapia Fotodinâmica – PDT.....</i>	<i>32</i>
1.2.1. <i>Mecanismo de Ação da PDT.....</i>	<i>34</i>
1.2.2. <i>Desenvolvimento de um Protocolo Custo-Efetivo.....</i>	<i>36</i>
2.PROPOSIÇÃO.....	43
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1. <i>Desenho Experimental.....</i>	<i>46</i>
3.2. <i>Anestesia dos Animais.....</i>	<i>47</i>
3.3. <i>Indução da Candidose Bucal.....</i>	<i>47</i>
3.4. <i>Protocolo de PDT.....</i>	<i>50</i>
3.5. <i>Contagem de C. albicans.....</i>	<i>53</i>
3.6. <i>Análise Estatística – Contagem de UFC/mL.....</i>	<i>55</i>
3.7. <i>Preparação das Lâminas Histológicas.....</i>	<i>55</i>
3.8. <i>Análise da Lâminas Histológicas.....</i>	<i>56</i>
4.RESULTADOS.....	57
4.1. <i>Contagem de C. albicans.....</i>	<i>58</i>
4.2. <i>Análise Histológica.....</i>	<i>61</i>
5.DISSCUSSÃO.....	73
5.1. <i>Indução da Candidose Bucal.....</i>	<i>74</i>
5.2. <i>Contagem de C. albicans.....</i>	<i>75</i>
5.3. <i>Análise Histológica.....</i>	<i>81</i>
6.CONCLUSÃO.....	84

REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO.....	94

1. Introdução

INTRODUÇÃO

1.1. Candidose Bucal

A candidose bucal pode ser definida como um grupo de alterações na cavidade bucal cujos principais agentes etiológicos são os fungos do gênero *Candida*. As espécies de *Candida* formam um grupo de patógenos oportunistas capazes de colonizar diversos ambientes dentro do corpo humano e de causar infecções localizadas ou disseminadas. Diferentes quadros podem ser encontrados, a depender da saúde geral do hospedeiro e de fatores locais, como a presença de próteses dentárias removíveis (Samaranayake e Macfarlane, 1990).

De acordo com Bhattacharyya *et al.* (2008) a candidose bucal pode ser classificada como:

A. Formas agudas:

1. Pseudomembranosa
2. Atrófica (eritematosa)
 - 2.1. Estomatite antibiótica

B. Formas crônicas

1. Atrófica
 - 1.1. Estomatite por prótese
 - 1.2. Queilite angular
 - 1.3. Glossite romboide mediana
2. Hiperplásica/hipertrófica
 - 2.1. Leucoplasia por *Candida*
 - 2.2. Hiperplasia papilar do palato (estomatite protética)
 - 2.3. Glossite romboide mediana (nodular)

3. Multifocal

C. Mucocutânea

1. Associada a síndromes
 - 1.1. Familiar +/- síndrome da candidose endócrina
 - 1.2. Miosite (associada ao timoma)
2. Localizada
3. Generalizada (difusa)

D. Associada à imunossupressão (HIV)

Epidemiologicamente, este agravo é relativamente comum. A incidência da candidose bucal demonstrou uma ascensão nos últimos anos advinda do aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, da população idosa, que usualmente é afetada por doenças sistêmicas e possuem a resposta imunológica mais debilitada; do maior número de terapias com imunossupressores e antibióticos de largos espectro; e do crescimento de pessoas com a síndrome da imunodeficiência adquirida (Farah *et al.*, 2010). Em um estudo com 4098 voluntários adultos na região de Turim (Itália), as candidoses propriamente ditas foram encontradas em 1,42% da amostra. Ainda, lesões associadas à *Candida*, como a estomatite relacionada à prótese e glossite romboide mediana, foram encontradas em 1,90% e 0,63%, respectivamente (Pentenero *et al.*, 2008). Em uma clínica de diagnóstico bucal na Turquia, pacientes com estomatite relacionada à prótese responderam por 5,7% das entradas, queilite angular por 2,6%, e candidose pseudomembranosa por 0,9% (Dundar e Ilhan Kal, 2007). Em nosso país, um dado importante provém de um estudo realizado com indivíduos idosos institucionalizados no Rio Grande do Sul. Nesse estudo, observou-se que 43,1%, dentre um grupo de 107 idosos, possuía algum tipo de candidose bucal (Silva *et al.*, 2009). De uma amostra de 1006 indivíduos adultos da região de Uberaba, encontrou-se algum tipo de candidose em 4,5% (Henrique *et al.*, 2009).

1.1.1 Patogênese

A patogênese da candidose bucal não é restrita a presença e virulência de um agente etiológico, e depende da interação deste, alterações na resposta imunológica do hospedeiro e de modificações no meio bucal que tornam o ambiente propício à colonização dos fungos e sua transmutação de micro-organismos integrantes da microbiota endógena a patógenos oportunistas (Samaranayake e Macfarlane, 1990). Portanto, o desenvolvimento da candidose bucal origina-se da presença e associação entre agentes etiológicos e fatores locais ou sistêmicos que predis põem o indivíduo à instalação desta patologia.

1.1.1.1. Agentes Etiológicos

O gênero *Candida* compreende mais de 150 espécies, das quais algumas integram a microbiota endógena dos seres humanos sem ocasionar manifestações clínicas da doença. A *Candida albicans* é a espécie mais prevalente, sendo detectada na cavidade bucal de 80% ou mais dos indivíduos saudáveis. As espécies de *Candida* associadas à candidose bucal são a *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica* (Williams e Lewis, 2011). No estudo de Kamikawa *et al.* (2014), a *C. albicans* foi detectada em 72,8% dos 112 casos de candidose bucal atendidos no Hospital Universitário Kagoshima, no período entre 2012 e 2013, seguida da *C. glabrata* (23,4%), *C. tropicalis* (1,9%), *C. parapsilosis* (1,3%) e *C. krusei* (0,6%). Os autores compararam ainda a distribuição das espécies de *Candida* a um estudo prévio, realizado no mesmo local, entre 2006-2007, e constataram um crescimento da prevalência das espécies diferentes da *C. albicans* (NCAC), principalmente da *C. glabrata*. O amplo uso de antifúngicos azólicos, como o fluconazol, é apontado na discussão como uma causa desse aumento, devido à seleção das espécies NCAC, que são mais resistentes a esses fármacos. Outro aspecto ressaltado na literatura é o uso de métodos de diagnóstico mais apurados para o reconhecimento das espécies de *Candida* (Silva *et al.*, 2011).

A associação entre fungos e bactérias também é descrita, sugerindo que muitas dessas infecções são instituídas e mantidas por um biofilme composto por diferentes micro-organismos. Segundo Jenkinson e Douglas (2002), as bactérias contribuem para a agregação dos fungos e desenvolvimento de um biofilme multiespécies. Não obstante, os micro-organismos endógenos também desempenham o controle do crescimento desses fungos devido à competição por sítios de adesão e nutrientes. No estudo de Nair *et al.* (2001), algumas bactérias induziram (*Lactobacillus casei*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*) e outras inibiram (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus. Salivaris*, *Escherichia coli*) a formação do tubo germinativo de cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV-positivo e pacientes saudáveis. A formação do tubo germinativo é considerada um dos fatores de virulência deste fungo. Thein *et al.* (2006) avaliaram a influência de oito espécies de bactérias (*Actinomyces israelii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Prevotella nigrescens*, *P. gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Streptococcus mutans*, e *Streptococcus intermedius*) na formação do biofilme da *C. albicans* em superfícies de poliestireno. Os autores concluíram que

a interação entre esse seres é modulada pela concentração e tipo de bactéria, de modo que estas podem estimular ou coibir a formação do biofilme da *C. albicans*.

Os fatores de virulência dos agentes etiológicos contribuem para patogenicidade das espécies de *Candida* e para o dano tecidual causado ao hospedeiro, na presença de condições favoráveis para o desenvolvimento da infecção (condições predisponentes). Os principais fatores mencionados na literatura são a capacidade de aderir às células epiteliais, endoteliais, a outros micro-organismos e às superfícies protéticas como um aspecto primordial para o início da doença (Shulman *et al.*, 2005; Campisi *et al.*, 2008); a produção de enzimas que auxiliam na invasão dos tecidos, tais como a aspartil proteinase e fosfolipase; a formação de hifas, que aumentam a resistência dos fungos à fagocitose e ampliam a invasão ao tecido epitelial (Sugita *et al.*, 2002); e ainda as mudanças fenotípicas que permitem a adaptação a diferentes sítios anatômicos e dificultam o reconhecimento por respostas imunes adaptativas (Calderone e Fonzi, 2001; Sugita *et al.*, 2002; Shulman *et al.*, 2005).

1.1.1.2. Fatores Predisponentes

O desenvolvimento da candidose bucal está associado à presença dos fatores predisponentes, que podem ser sistêmicos ou locais.

a. Fatores Sistêmicos

Os fatores sistêmicos estão relacionados às condições que debilitam a resposta imunológica e desempenham um importante papel, tendo em vista a ascensão do número de pacientes como a síndrome da imunodeficiência adquirida ou que fazem uso de terapia com medicamentos imunossupressores ou citotóxicos, como os pacientes transplantados, portadores de doenças autoimunes ou doenças malignas. Estima-se que mais de 90% dos portadores de HIV desenvolvem candidose bucal em algum momento de suas vidas (Ellepole e Samaranayake, 2000; Thompson *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2014) avaliaram 116 pacientes admitidos na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e constataram que 16,6% apresentavam

candidose bucal. Dos 120 pacientes diagnosticados com câncer avançado, essa patologia foi detectada em 30% destes (Davies *et al.*, 2006).

Indivíduos nos extremos de idade também estão mais suscetíveis a desenvolver essa afecção em virtude da resposta imunológica reduzida observada nessas fases. Outro fator predisponente é o uso de antibióticos de amplo espectro, tendo em vista que eles podem alterar o equilíbrio entre os seres da microbiota local, o que facilita a proliferação das espécies de *Candida* (Akpan e Morgan, 2002). O tabagismo, distúrbios metabólicos como a diabetes mellitus e deficiências nutricionais também são condições predisponentes relatadas na literatura (Krishnan, 2012).

b. Fatores Locais

O comprometimento do fluxo salivar pode tornar o indivíduo mais suscetível à candidose bucal em decorrência da redução dos efeitos protetores da saliva. Esses efeitos advêm da limpeza mecânica que a saliva promove sobre os tecidos moles e duros da cavidade bucal, bem como da ação de proteínas antimicrobiana como a lactoferrina, lisozima, histatina, sialoperoxidase e imunoglobulinas. A diminuição do fluxo salivar pode estar associada ao uso de medicamentos que geram este efeito adverso (antiadrenérgicos, antidepressivos, anticolinérgicos, anti-hipertensivos, antipsicóticos, simpaticomiméticos) e à radioterapia em cabeça e pescoço (Akpan e Morgan, 2002; Scully, 2003; Krishnan, 2012).

O uso de próteses removíveis também é um fator local que torna o indivíduo mais propenso à instalação da doença. Os estudos epidemiológicos levantados por Gendreau e Loewy (2011) demonstram que 15 a 70% dos usuários de prótese apresentam estomatite protética, sendo maior a incidência em indivíduos idosos e do sexo feminino. A estomatite protética manifesta-se como uma região de inflamação e eritema na área da mucosa coberta pela prótese e está associada à infecção por *Candida spp.* e bactérias, trauma decorrente da desadaptação protética, má higiene, próteses antigas e idade elevada dos usuários. O microambiente criado na interface entre a mucosa e a superfície protética apresenta condições favoráveis para a multiplicação de fungos e outros micro-organismos (Akpan e Morgan, 2002; Gendreau e Loewy, 2011)

Além desses fatores, a má higiene bucal e o uso de esteroides inalatórios, comuns no tratamento de asma, também são salientados como condições predisponentes locais (Akpan e Morgan, 2002).

1.1.2. Tratamento

O tratamento comum da candidose bucal envolve a identificação e eliminação dos fatores predisponentes, acompanhados da administração de medicamentos antifúngicos. A realização de uma anamnese criteriosa é fundamental para a distinção de condições que tornam o indivíduo mais passível de desenvolver essa patologia. O profissional de saúde deve esclarecer o paciente quanto à presença dessas condições e orientá-lo sobre como suprimir ou minimizar esses fatores. As estratégias de tratamento são específicas para determinados tipos de lesões e variam conforme o estado imunológico do paciente e o grau de disseminação da infecção (Farah *et al.*, 2010).

Alguns exemplos de estratégias para o manejo das condições predisponentes como parte do tratamento e prevenção são explicitados por Lalla *et al.* (2013) e elas abrangem a utilização de fármacos que estimulam o fluxo salivar, a substituição de medicamentos que induzem a hipossalivação como efeito adverso, o uso de bochechos para manter a hidratação bucal, a cessação do uso noturno das próteses dentárias, a orientação de higiene da prótese e da cavidade bucal, o uso rotineiro de soluções para desinfecção da prótese, a substituição de próteses desadaptadas em casos de estomatite protética, bochecho com água após o uso de esteroides inalatórios, exames periódicos para o controle de condições sistêmicas que debilitam o sistema imunológico, entre outros.

A terapia farmacológica com antifúngicos é frequentemente empregada pelos profissionais de saúde. Os agentes poliênicos e azólicos são as classes mais utilizadas. A anfotericina B e a nistatina compõem a classe dos poliênicos, e os agentes azólicos são representados pelo fluconazol, cetoconazol, itraconazol, clotrimazol e miconazol.

Os antifúngicos poliênicos são fungicidas e fungistáticos e atuam através da ligação com o ergosterol da membrana celular, um esterol específico da membrana das células fúngicas, ocasionando o aumento da permeabilidade da membrana, extravasamento de componentes

celulares e morte celular. Estes fármacos não são absorvidos no trato gastrointestinal e são indicados principalmente para uso tópico, através do bochecho de suspensões orais e pastilhas (Lalla *et al.*, 2013).

Já os compostos azólicos são considerados fungistáticos e o seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima lanosterol 14 alfa-desmetilase (Erg11p) do Citocromo P450, que é codificada pelo gene ERG11, e participa da biossíntese do ergosterol. A inibição da Erg11p reduz o ergosterol presente na membrana, e ainda provoca o acúmulo de intermediários tóxicos, precursores do ergosterol. Esses medicamentos são absorvidos no trato gastrointestinal, o que permite que sejam administrados de forma sistêmica, pela via oral. Os compostos azólicos mais utilizados são o fluconazol e itraconazol (Lalla *et al.*, 2013).

Embora os antifúngicos azólicos possuam melhor solubilidade e menor nefrotoxicidade do que os poliênicos, a resistência aos primeiros é mais detectada, em especial ao fluconazol. A *C. glabrata* e *C. krusei* exibem uma defesa inata a esse fármaco e a *C. albicans* é passível de adquirir mecanismos de neutralização desse medicamento. Os antifúngicos poliênicos, apesar de menos limitados nesse sentido, também podem originar cepas resistentes por meio de uso prolongado (Niimi *et al.*, 2010).

As formas de defesa dos micro-organismos aos antifúngicos são elucidadas por trabalhos científicos que demonstram algumas alterações induzidas (adquiridas) ou selecionadas (inatas) pelo uso contínuo desses fármacos. Dentre essas modificações, foi detectada a redução da concentração do ergosterol na membrana plasmática dos fungos, mutação na Erg11p, sítio de ligação dos azóis, a inativação da Erg3p, o que causa a acumulação de precursores não tóxicos do ergosterol e a superexpressão de proteínas presentes na membrana plasmática que bombeiam as moléculas dos compostos azólicos para o meio externo da célula fúngica. (Niimi *et al.*, 2010).

A sensibilidade dos fungos à ação desses fármacos é um fator preocupante, dado o desenvolvimento das formas de resistência. Hamza *et al.* (2008), averiguaram a distribuição das espécies de *Candida* em 292 pacientes infectados pelo HIV, e dividiram estes indivíduos entre os que manifestaram candidíase orofaríngea pela primeira vez ou de forma recorrente. As cepas isoladas foram testadas quanto à sensibilidade ao fluconazol, itraconazol, miconazol, clotrimazol, anfotericina B e nistatina. Os resultados evidenciaram a *C. albicans* como a espécie mais prevalente, seguida da *C. glabrata* e *C. krusei*. Não houve diferenças na distribuição das espécies entre os dois grupos. Um achado interessante foi a correlação significativa observada

entre a resistência aos agentes azólicos, a exposição prévia a esses antifúngicos, e o aparecimento da candidíase orofaríngea recorrente. Sendo assim, cepas resistentes ao itraconazol e fluconazol foram mais isoladas em pacientes que fizeram uso prévio desses fármacos e que tiveram episódios recorrentes dessa patologia.

O trabalho realizado por Kamikawa *et al.* (2014) no período de 2012-2013, mencionado anteriormente, além de analisar a prevalência dos micro-organismos em pacientes com candidose bucal, também observou a suscetibilidade destes aos antifúngicos anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, miconazol, itraconazol e micafungina, e ainda comparou os dados coletados com os resultados de um estudo realizado no mesmo local, no período de 2006-2007. Foi constatado um aumento da concentração inibitória mínima (MIC₉₀) dos agentes azólicos contra a *C. glabrata* entre os dois estudos, o que sugere um decréscimo da sensibilidade desta espécie. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Diante da ascensão de micro-organismos resistentes aos fármacos antifúngicos e da emergência da prevalência de espécies NCAC, faz-se necessária a busca por novas terapias que atuem sobre todos os agentes etiológicos que constituem o complexo biofilme envolvido na patogênese dessa afecção, inclusive sobre as cepas resistentes aos antifúngicos, sem a seleção ou indução de novos mecanismos de defesa e efeitos adversos mínimos ou ausentes.

Neste sentido, condutas de prevenção e tratamento da candidose bucal são o objeto de várias pesquisas na atualidade. Dentre elas, Kabawat *et al.* (2014) avaliaram a escovação do palato após as refeições e antes de dormir realizada por pacientes com potencial diagnóstico de estomatite protética. Foi observada a completa remissão em 10,4% e a redução dos sinais e sintomas em 70,8 % dos pacientes, bem como a diminuição significativa das colônias de *Candida*.

Uma modalidade terapêutica em evidência é a terapia fotodinâmica (PDT – *photodynamic therapy*), a qual tem ampla aplicação e atua sobre células tumorais e micro-organismos patógenos, como as espécies de *Candida*.

1.2. Terapia Fotodinâmica – PDT

A PDT desponta como uma opção de tratamento da candidose bucal devido à possibilidade de minimizar os efeitos adversos advindos da terapia convencional com medicação antifúngica, além de não induzir ou selecionar patógenos resistentes. A combinação de uma substância fotossensível e uma fonte de luz como forma de tratamento é descrita desde os antigos egípcios, os quais utilizavam a ingestão de plantas que continham substâncias fotossensíveis (psoralenos) sucedidas da exposição solar como terapia para o vitiligo. Os primeiros relatos de evidência científica da PDT ocorreram em 1900 a partir do trabalho de Oscar Rabb, o qual pesquisou a ação do corante de acridina e luz sobre o protozoário *Paramecium* e constatou que a combinação desses elementos foi capaz de inativar esses seres unicelulares (Sternberg *et al.*, 1998).

A descoberta dos antibióticos arrefeceu os estudos com a PDT no tratamento antimicrobiano em vista da expectativa de que estes medicamentos teriam a capacidade deter os agentes etiológicos das doenças infecciosas. Enquanto isso, as pesquisas com a PDT no campo da oncologia desenvolveram-se amplamente em virtude da necessidade de buscar terapias que gerassem menores efeitos colaterais e danos aos tecidos saudáveis do que as opções terapêuticas disponíveis (quimioterapia, radioterapia e cirurgia) (Sharman *et al.*, 1999).

A percepção da resistência inata ou adquirida de alguns patógenos aos antibióticos, alguns anos após a sua descoberta, acarretou na busca por tratamentos alternativos que atuassem também sobre esses seres. Além dos mecanismos de defesa utilizados pelos micro-organismos para neutralizar a ação dos antibióticos, o uso indiscriminado desse fármaco também contribuiu para a disseminação dessa resistência. A PDT é então visualizada como uma possibilidade para o tratamento de doenças infecciosas e vários estudos foram elaborados para testar distintos protocolos de PDT no tratamento antimicrobiano (Núñez *et al.*, 2013).

Na atualidade, o uso dessa terapia tem sido estabelecido por meio de ensaios clínicos aleatorizados para aplicações em tratamentos contra o câncer e doenças infecciosas. O emprego da PDT na área da odontologia é bastante interessante, tendo em vista o fácil acesso ao local afetado na cavidade bucal, facilitando a aplicação da substância fotossensível e da fonte de luz, componentes fundamentais para gerar o efeito fotodinâmico (Núñez *et al.*, 2013). A PDT pode beneficiar diversas áreas, como a periodontia e implantodontia, através da redução microbiana nas bolsas periodontais (Braun *et al.*, 2008) e peri-implantares (Dörtbudak *et al.*, 2001), a endodontia, por meio da descontaminação no sistema de canais radiculares (Fimple *et al.*, 2008), na estomatologia, a partir do tratamento de desordens potencialmente malignas e

malignas (Kübler *et al.*, 2001; Sieron *et al.*, 2001), do líquen plano oral (Aghahosseini *et al.*, 2006), da candidose bucal (Mina *et al.*, 2012), do herpes simples (Marotti *et al.*, 2009), entre outras aplicações.

1.2.1. Mecanismo de Ação da PDT

O mecanismo de ação da PDT advém da combinação de três fatores: uma substância fotossensível (FS), uma fonte de luz e moléculas de oxigênio. A interação destes componentes promove a formação de espécies reativas que agem sobre micro-organismos patógenos e células de tecidos alterados com alta taxa de reprodução, ocasionando a morte celular. Há dois mecanismos pelo qual a PDT age, de modo que o efeito fotodinâmico inicia-se quando a FS é irradiada por uma fonte de luz com um comprimento de onda apropriado. A energia luminosa é absorvida pela FS e as suas moléculas tornam-se excitadas, alternando então da forma fundamental (^0FS), considerada eletronicamente estável, para a forma singlete ($^1\text{FS}^*$), seguida da conversão para a forma triplete ($^3\text{FS}^*$), que possui maior tempo de vida que a forma anterior, são eletronicamente excitadas e agentes oxidativos e redutores mais ativos (Sharman *et al.*, 1999).

No mecanismo I, uma vez no estado triplete, as moléculas da FS vão transferir elétrons ou átomos de hidrogênio aos componentes do substrato circundante, o qual pode ser biológico, um solvente ou outra molécula da FS, formando os radicais livres. Esses radicais, por sua vez, podem reagir com as moléculas de oxigênio e gerar espécies reativas de oxigênio (EROS), como radical superóxido e radical hidroxila, ou podem causar danos biológicos pela ação direta contra estruturas celulares como a membrana plasmática (Sharman *et al.*, 1999).

Diferentemente, no mecanismo tipo II, as moléculas da FS no estado triplete vão interagir diretamente com as moléculas de oxigênio, acarretando na formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), um estado extremamente reativo, capaz de causar dano oxidativo a variadas moléculas do substrato biológico e promover a morte celular. (Sharman *et al.*, 1999). A Figura 1 ilustra esse mecanismo de ação.

Fig. 1. Mecanismo de ação da PDT: a molécula da FS no estado fundamental (^0FS) absorve energia da fonte de luz e converte-se para o estado singlete ($^1\text{FS}^*$), e em seguida para o estado tripleto ($^3\text{FS}^*$). A $^3\text{FS}^*$ é eletronicamente excitada e pode provocar danos biológicos ao transferir energia para as moléculas do substrato, as quais produzem radicais livres e EROS (mecanismo I), ou ainda através da interação com moléculas de oxigênio, gerando a formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (mecanismo II).

Para que a PDT gere resultados efetivos, a fonte de luz selecionada tem que apresentar um comprimento de onda compreendido no espectro de absorção de luz da FS, preferencialmente próximo ao pico máximo de absorbância. Esta propriedade é influenciada pela concentração e meio em que a FS está dissolvida. A FS tende a acumular-se em micro-organismos patógenos e tecidos com alta taxa de reprodução e induzir os efeitos citotóxicos sobre essas estruturas. As células que foram fotossensibilizadas não sofrem mutação, e os mecanismos antimicrobianos da PDT não dependem especificamente de um alvo e são capazes de provocar danos a diversos componentes celulares. Sendo assim, é improvável que o uso repetido desse tratamento leve a alguma forma de resistência (Sharman *et al.*, 1999; Núñez *et al.*, 2013).

Também é importante conhecer a dose da luz que está sendo aplicada durante a PDT. Para tanto, deve-se analisar a densidade de potência (ou irradiância) média da fonte de luz, a qual é expressa em W/cm^2 . O radiômetro é um aparelho comumente utilizado em pesquisas para essa finalidade. Somado a isso, o tempo em que a área afetada será exposta a luz é outro dado necessário para o cálculo da dose de luz, de modo que a multiplicação da densidade de potência (W/cm^2) pelo tempo de exposição (s) resulta no valor da dose da luz aplicada, cuja unidade de medida é em J/cm^2 (Núñez *et al.*, 2013).

1.2.2. Desenvolvimento de um Protocolo Custo-Efetivo

Dentre as características desejáveis em uma FS encontra-se a efetividade dentro de sua indicação clínica, ausência de toxicidade, efeito mutagênico/carcinogênico e outros efeitos colaterais e um custo acessível (Allison *et al.*, 2004). Nesse contexto, o uso de uma substância como a eritrosina é bastante favorável devido ao baixo custo e por já ser aprovada para uso clínico como evidenciador de biofilme (Metcalf *et al.*, 2006).

O uso da eritrosina como FS para PDT antimicrobiana tem recebido atenção recente por meio de uma série de estudos *in vitro* com culturas de *Candida* spp. e bactérias (Metcalf *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2006; Goulart *et al.*, 2010; Rossoni *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010, 2011, 2012b). No estudo de Costa *et al.* (2011), concentrações de eritrosina a partir de 3,12 μM ($\approx 2,74$ mg/L) foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* e *C. dubliniensis* na forma planctônica, quando da irradiação com um LED verde por 3 minutos (dose: 43,62 J/cm²). Já a forma de biofilme demandou uma concentração de 400 μM (≈ 352 mg/L) para uma redução de 0,74 e 0,21 log₁₀ (UFC/mL) para *C. albicans* e *C. dubliniensis*, respectivamente. Costa *et al.* (2012b) encontraram que diferentes cepas de *C. albicans* provenientes de isolados clínicos podem variar a suscetibilidade à PDT com eritrosina a 10 μM ($\approx 8,80$ mg/L), sobre forma planctônica, e a 40 μM ($\approx 35,20$ mg/L), sobre os biofilmes associada a um LED azul (dose: 95 J/cm²). O padrão previamente observado se mantém, ou seja, uma redução pronunciada para a maioria das cepas em forma planctônica e efeito discreto sobre os biofilmes de *C. albicans*.

Os resultados de outros estudos *in vitro* que usaram a eritrosina na PDT mostram efeito favorável frente a espécies bacterianas, como o *S. mutans* (Metcalf *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2010). A PDT com eritrosina e um fotopolimerizador odontológico como fonte de luz foi capaz de provocar redução considerável em contagens do periodonto patógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, tanto na forma planctônica como em biofilme (Goulart *et al.*, 2010). Em um estudo realizado por Tanaka *et al.* (2012), a PDT com eritrosina foi efetiva frente a *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, e sua citotoxicidade frente a neutrófilos murinos foi comparável a protocolos feitos com outros compostos, como rosa de bengala, cristal violeta, Photofrin e novo azul de metileno. Já contra enterobactérias, um regime baseado na eritrosina e um LED azul não mostrou efeito quando comparado a uma condição controle (Rossoni *et al.*, 2010).

Estudos em modelos animais também têm sido desenvolvidos para avaliar a PDT como uma forma de tratamento viável e segura para a candidose bucal. A maior parte destes estudos utiliza modelos murinos imunossuprimidos com candidose bucal induzida para testar a terapia em questão. Os animais são distribuídos em grupos experimentais, de forma que parte é submetida ao protocolo completo da PDT, ou seja, a aplicação de uma FS e a irradiação pela fonte de luz (L) (FS+L+), parte recebe a irradiação sem a FS (FS-L+) ou recebe a aplicação da FS sem a irradiação (FS+L-), objetivando verificar se algum destes elementos possui um efeito antimicrobiano ou gera algum dano isoladamente, e há ainda um grupo que não é submetido à FS ou irradiação (FS-L-), sendo, portanto, o grupo controle positivo. Alguns estudos também incluem um grupo de animais que não estão imunocomprometidos e não apresentam a candidose bucal para que sejam submetidos à PDT e seja analisada a presença de alguma reação adversa dos tecidos saudáveis a esta terapia (grupo controle negativo). As características dos protocolos de PDT aplicados no tratamento da candidose bucal em modelo animal são apresentadas na Tabela 1.

Sendo assim, o estudo de Costa *et al.* (2012a) utilizou a eritrosina 400 μM ($\approx 352 \text{ mg/L}$) como FS, associada a irradiação por três minutos com o LED verde (dose: $14,34 \text{ J/cm}^2$). Foi constatada uma redução da *C. albicans* de $0.78 \log_{10}$ (UFC/mL) no grupo que recebeu a PDT. A capacidade de aderências da *C. albicans* às células do tecido epitelial bucal também foi avaliada. Uma redução de 35% desta capacidade foi observada nos fungos coletados dos camundongos que receberam a PDT.

Trabalhos científicos que pesquisaram FSs diferentes da eritrosina também são reportados na literatura. Teichert *et al.* (2002) induziram a candidose bucal nos camundongos a partir de cepas de *C. albicans* azol-resistentes coletadas de pacientes. O azul de metileno foi a FS testada, nas concentrações de 250, 275, 300, 350, 400, 450 e 500 mg/L, associado ao laser (dose: 275 J/cm^2), durante 687,5s ($\approx 11 \text{ min } 27 \text{ s}$). De maneira geral, os pesquisadores observaram uma resposta dose-dependente nos resultados, de forma que as concentrações da FS entre 250 a 400 mg/L ocasionaram a redução progressiva das UFC, e as concentrações de 450 e 500 mg/L foram capazes de erradicar as colônias de *C. albicans*.

Já o estudo de Junqueira *et al.* (2009) teve como objetivo avaliar a PDT efetuada como azul de metileno (concentração: 100 mg/L) e o laser (dose: 26 J/cm^2), irradiado por 200s ($\approx 3 \text{ min } 20 \text{ s}$) na região anterior e posterior da língua, separadamente. A candidose foi induzida a partir de cepas de *C. albicans* provenientes de um paciente com estomatite associada à prótese. Em cada grupo experimental, a eutanásia dos ratos foi realizada imediatamente, um dia ou cinco

dias após a PDT. Na análise microscópica, os pesquisadores detectaram que a maioria dos animais não exibiram leveduras e hifas. Nos ratos em que essas formas foram encontradas, elas estavam limitadas à camada de queratina. Em relação aos escores atribuídos à presença de alterações epiteliais e intensidade do infiltrado inflamatório, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos que sofrem eutanásia imediatamente após a PDT. Entretanto, essas diferenças foram constatadas quando a eutanásia foi feita um dia ou cinco dias após a PDT. Desta forma, verificou-se que o grupo submetido à PDT (FS+L+) apresentou menos alterações epiteliais e infiltrado inflamatório mais brando em comparação ao grupo controle (FS-L-). Observou-se ainda uma maior presença de lesões no tecido epitelial e infiltrado inflamatório mais intenso no grupo que recebeu a irradiação não associada a FS (FS-L+), constando-se uma diferença significativa entre este e o grupo FS+L+.

O uso do Photogem® (derivado de hematoporfirina) foi averiguado por Mima *et al.* (2010) nas concentrações de 400, 500 e 1000 mg/L, combinada a irradiação por LED azul e vermelho durante 20 minutos (dose: 305 J/cm²). Todas as concentrações da FS associadas ao LED azul ou vermelho (FS+L+) foram capazes de produzir uma redução significativa das colônias de *C. albicans* quando comparada ao grupo controle (FS-L-). As concentrações de 400, 500 e 1000 mg/L promoveram uma diminuição das UFC/mL de 1.04, 1.39 e 1.41 log₁₀, respectivamente, com o LED azul, e de 1.05, 1.59 e 1.40 log₁₀, respectivamente, com o LED vermelho. Não houve diferenças significativas na contagem da UFC/mL entre as concentrações e os tipos de LED utilizados. Este estudo também comparou a penetração da luz do LED azul e vermelho, na língua. A luz azul apresentou menor dispersão e penetração nos tecidos da língua, visto que as biomoléculas absorvem mais os fótons do espectro azul, diminuindo, então, a penetração desta luz no tecido.

O efeito da PDT sobre a excreção de enzimas extracelulares (fatores de virulência) da *C. albicans* foi avaliado no estudo de Martins *et al.* (2011), os quais verificaram que os fungos coletados do grupo dos ratos que receberam a PDT com azul de metileno (100 mg/L), e irradiação por laser (dose: 245 J/cm²) teve uma redução significativa da produção de proteinases quando comparada ao grupo que não recebeu a irradiação (FS+ L-). Na análise microscópica, menos lesões no tecido epitelial foram detectadas no grupo submetido à PDT.

Uma substância também pesquisada como FS é a curcumina. No estudo de Dovigo *et al.* (2013), este composto foi aplicado nas concentrações de 20, 40 e 80 µM (≈7,37, 14,74 e 29,47 mg/L), combinadas a irradiação pelo LED azul por sete minutos (dose: 37,5 J/cm²). Todos os grupos que receberam este protocolo (FS+L+) apresentaram uma redução significativa das

colônias de *C. albicans*, quando comparados ao controle positivo (FS-L-). Esta redução foi mais acentuada no grupo que recebeu a curcumina na concentração de 80 μ M (> 4 logs UFC/ml). A análise microscópica dos grupos tratados (FS+L+) apresentou uma menor quantidade de fungos e hifas na camada de queratina. Além disso, no grupo que recebeu a concentração mais elevada de curcumina (80 μ M) observou-se que em quatro, do total de cinco camundongos que compunham este grupo, não houve evidências da presença de *C. albicans*.

Os resultados favoráveis obtidos com a PDT no tratamento da candidose bucal, em modelos murinos, direcionam os futuros trabalhos científicos para a etapa sucessiva que compreende a aplicação desta terapia em seres humanos.

No ensaio clínico randomizado desenvolvido por Mima *et al.* (2012), os 40 pacientes portadores de estomatite associada à prótese foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, de forma que parte recebeu o tratamento tópico com nistatina (quatro vezes ao dia, durante 15 dias) e parte foi submetida à PDT realizada com o spray de Photogem® (500 mg/L), aplicado na prótese e no palato dos pacientes, associado à irradiação com LED azul por 20 e 26 minutos, respectivamente (doses: 37,5 e 122 J/cm²). Este protocolo foi realizado três vezes por semana, durante 15 dias. As coletas para contagem da UFC/mL foram realizadas previamente ao início do tratamento (dia 0), ao término no tratamento (dia 15), e nos sucessivos controles (dias 30, 60 e 90). Tanto a prótese quanto o palato dos pacientes foram considerados. Os autores observaram uma associação significativa entre o tempo de uso da prótese e o grau de inflamação do palato. Na contagem da UFC/mL, não houve diferenças entre os grupos que receberam a PDT ou a terapia antifúngica convencional. A coleta realizada no dia 15 demonstrou a maior redução na contagem da *Candida* spp. em relação a contagem executada no dia 0. Nos dias 30, 60 e 90, constatou-se uma elevação da UFC/mL ao compará-las aos valores obtidos no dia 15 da pesquisa. O sucesso clínico, ou seja, a melhora ou completa cura do caso, da terapia tópica antifúngica foi de 53%, e da PDT foi de 45%. A efetividade de ambas as terapias foi considerada semelhante.

O presente projeto avalia a possibilidade de usar um agente evidenciador de biofilme dental como FS, ativado pelo mesmo equipamento empregado em clínica odontológica para a polimerização de compósitos restauradores, pode proporcionar o máximo de acessibilidade à PDT. Caso um protocolo com essas características se mostre efetivo e seguro, seu emprego pode ser realizado na maioria das clínicas odontológicas mantidas pelo Ministério da Saúde brasileiro, dispensando a aquisição de compostos ou equipamentos próprios para fototerapia. Em termos de segurança, sabe-se que a eritrosina a 1 mg/ml não mostra genotoxicidade, mesmo

quando irradiada por luz visível por 30 minutos, simulando a iluminação solar (Haveland *et al.*, 1981). Por outro lado, poucos protocolos baseados na eritrosina foram testados em modelos animais, o que seria um passo fundamental para a posterior avaliação por meio de estudos com seres humanos e posterior aplicação na prática clínica

Tabela 1. Estudos em modelo animal que pesquisaram protocolos de PDT para o tratamento da candidose bucal.

Estudo	n	Cepa de <i>C. albicans</i>	Indução da candidose bucal	UFC/mL do grupo FS-L-	[FS]	TPI	Fonte de luz e dose	Tempo de exposição
Teichert <i>et al.</i> (2002)	75 camundongos com imunodeficiência combinada severa	<i>C. albicans</i> azole-resistente isolada de um paciente	Animais já possuíam a imunodeficiência combinada severa	2-3 log ₁₀	Azul de metileno: 250, 275, 300, 350, 400, 450 e 500 mg/L	10 min	Laser diodo: 275 J/cm ²	≈11min27s
Junqueira <i>et al.</i> (2009)	72 ratos	<i>C. albicans</i> isoladas de um paciente com estomatite associada à prótese	Solução de cloridrato de tetraciclina 0,1% na água de consumo 7 dias antes da inoculação e durante todo experimento	Não foi realizada a coleta de colônias de <i>C. albicans</i>	Azul de metileno: 100 mg/L	5 min	Laser arseneto gálio-alumínio: 26 J/cm ²	200s da região anterior e posterior separadamente (≈3min20s)
Mima <i>et al.</i> (2010)	71 camundongos	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	2 injeções de prednisolona (1 dia antes e 3 dias após a inoculação). Introdução de tetraciclina na água de consumo.	4-5 log ₁₀	Photogem: 400, 500 e 1000 mg/L	30 min	LED azul e vermelho: 305 J/cm ²	20 min
Martins <i>et al.</i> (2011)	56 ratos	<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	Solução de cloridrato de tetraciclina 0,1% na água de consumo 7 dias antes da inoculação e durante todo experimento	4-5 log ₁₀	Azul de metileno: 100 mg/L	1 min	Laser arseneto gálio-alumínio: 245 J/cm ²	69s da região anterior e posterior separadamente (≈1min9s)
Costa <i>et al.</i> (2012)	56 camundongos	<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	2 injeções de prednisolona (1 dia antes e 3 dias após a inoculação). Introdução de tetraciclina na água de consumo	5-6 log ₁₀	Eritrosina: 400 µM (≈ 352 mg/L)	1 min	LED verde: 14,34 J/cm ²	3 min

Tabela 1 (cont.). Estudos em modelo animal que pesquisaram protocolos de PDT para o tratamento da candidose bucal.

Estudo	n	Cepa de <i>C. albicans</i>	Indução da candidose bucal	UFC/mL do grupo FS-L-	[FS]	TPI	Fonte de luz e dose	Tempo de exposição
Dovigo <i>et al.</i> (2013)	40 camundongos	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	2 injeções de prednisolona (1 dia antes e 3 dias após a inoculação). Introdução de tetraciclina na água de consumo	5-6 log ₁₀	Curcumina 20, 40 e 80 µM (7.4, 14.7 e 25.9 mg/L)	20 min	LED azul: 37,5 J/cm ²	7 min
Presente estudo	53 camundongos	<i>C. albicans</i> (ATCC 1023)	2 injeções de prednisolona (1 dia antes e 3 dias após a inoculação). Introdução de tetraciclina na água de consumo	2-3 log ₁₀	Eritrosina 5% (=50.000 mg/L)	1 min	LED azul: 216 J/cm ²	3 min

2. Proposição

PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desta pesquisa foi investigar a eficácia e segurança de um protocolo de PDT para o tratamento da candidose bucal baseado no uso da eritrosina irradiada por um LED azul. O estudo comparou o protocolo testado a tratamentos controle (somente o corante, somente a irradiação, e nenhum dos dois componentes), por meio de um modelo animal.

Os objetivos específicos foram:

1. Quantificar unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de *C. albicans* sobre a mucosa após cada um dos quatro tratamentos testados;
2. Determinar o grau de inflamação (análise histológica) sob a mucosa inoculada após a aplicação dos quatro tratamentos;
3. Em animais saudáveis, investigar possíveis efeitos colaterais como indução de inflamação ou alteração tecidual por meio do protocolo de PDT com eritrosina.

3. Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho Experimental

Esta proposta envolveu a avaliação pré-clínica de um protocolo de PDT, na qual 41 camundongos tiveram a candidose induzida sobre o dorso da língua por meio de imunossupressão e inoculação com *C. albicans*. Em seguida, os animais receberam um dentre quatro tratamentos: aplicação da eritrosina (E) 5% sobre a mucosa seguida de irradiação pelo LED (E+L+); aplicação de eritrosina somente (E+L-); salina seguida pela irradiação (E-L+); e apenas salina (E-L-). A princípio, foi planejada a inclusão de 40 camundongos, contudo, foi utilizado um animal a mais que foi enviado pelo Biotério Central para que ele compensasse possíveis perdas decorrentes da indução da candidose bucal. Outros 12 animais foram submetidos aos mesmos tratamentos, porém sem a prévia indução da candidose. Os camundongos empregados são da linhagem Swiss, de gênero masculino e seis semanas de idade (peso médio de 33 g). A sequência das etapas realizadas neste experimento está representada na Figura 2.

Fig. 2. Organograma das etapas do experimento realizado com os animais.

Este estudo foi conduzido somente após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Campus de Ribeirão Preto/USP (protocolo nº 12.1.1156.53.9) (Anexo A). Cuidados foram tomados para minimizar o sofrimento dos animais e acomodá-los de maneira apropriada, em biotério com água e ração à vontade, com ciclos de 12 horas de iluminação e 12 horas no escuro. Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os quatro grupos antes da execução dos experimentos, de forma que todos os grupos tivessem um volume amostral semelhante. A sequência de aleatorização foi mantida em segredo até o momento da aplicação do tratamento em cada animal.

3.2. Anestesia dos Animais

A fim de conduzir os procedimentos de inoculação com *C. albicans*, aplicação dos tratamentos e eutanásia, os camundongos foram pesados e em seguida anestesiados por meio de injeção intramuscular (Fig. 3). As doses respeitadas nesse momento foram de 10 mg/kg para xilazina a 2% (Syntec do Brasil, Hortolândia, SP) e 75 mg/kg para cloridrato de ketamina a 10% (Agibrands do Brasil, Campinas, SP). Uma gaze embebida em solução salina fisiológica foi aplicada nos olhos do animal durante os procedimentos, a fim de prevenir o ressecamento das córneas.

3.3. Indução da Candidose Bucal

A candidose foi induzida segundo os procedimentos empregados por Takakura *et al.* (2003) e Mima *et al.* (2010). Uma suspensão de *C. albicans* (ATCC 1023) foi previamente preparada para inoculação na mucosa bucal. A princípio, culturas foram reativadas por semeadura em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) a 37°C por 48h. As células foram suspensas em salina estéril e inoculadas em 5 mL de caldo TSB (TrypticSoyBroth; HiMedia, Mumbai, Índia) e incubados aerobicamente a 37°C, durante 24 horas. Cada tubo foi centrifugado a 2.000 RPM durante 10 min. e o precipitado foi lavado gentilmente com água destilada estéril. Por fim, as células foram suspensas em salina estéril

alcançando-se uma concentração de $4,5 \times 10^7$ UFC/mL, conforme a turbidez aferida no espectrofotômetro (comprimento de onda: 600 nm).

Uma injeção subcutânea de prednisolona (Depo-Medrol; Pfizer, Guarulhos, SP) foi administrada nos animais em dose de 100 mg/kg um dia antes da inoculação com *C. albicans* (Fig. 4). Desde o início da implementação do modelo, a água de consumo dos camundongos continha cloridrato de tetraciclina na concentração de 0,83 g/L (Fig. 5).

A inoculação com *C. albicans* foi realizada 24 horas após a primeira injeção de prednisolona e com um dia de consumo da tetraciclina. Cada camundongo foi anestesiado e um swab de algodão estéril embebido em suspensão de *C. albicans* foi friccionado por toda a cavidade bucal durante um minuto (Fig. 6 e 7). Três dias após a inoculação, a mesma dose de prednisolona foi aplicada novamente.

Fig. 3. Aplicação da anestesia via intramuscular.

Fig. 4. Aplicação subcutânea de prednisolona.

Fig. 5. Introdução do cloridrato de tetraciclina na água de consumo dos camundongos.

Fig. 6. Embebição do swab estéril na suspensão de *C. albicans*.

Fig. 7. Fricção do swab embebido na cavidade bucal durante um minuto

3.4. Protocolo de PDT

Quatro dias após a inoculação com *C. albicans*, uma solução de eritrosina a 5% (Imbralab, Ribeirão Preto, SP) foi utilizada como agente fotossensibilizador (Fig. 8). Essa concentração é similar àquela empregada como evidenciador de biofilme dental, também sendo utilizada em pacientes portadores de próteses removíveis (Coulthwaite e Verran, 2009; Paranhos *et al.*, 2010). Antes de seu uso, a solução foi esterilizada por meio de filtros com poros de 0,20 μm (Minisart; Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, França) e armazenada à temperatura ambiente e em recipientes estéreis protegidos da luz. Sua aplicação foi feita após a anestesia por meio de gotejamento de uma alíquota de 50 μL sobre toda a mucosa do dorso da língua (Fig. 9). Após aplicação, o tempo de pré-irradiação (TPI) de um minuto foi aguardado em ambiente escuro antes de prosseguir aos próximos passos. Nos grupos em que a aplicação da eritrosina não foi feita, um procedimento semelhante de aplicação foi realizado com solução salina estéril (Fig. 10), além do tempo de espera de um minuto.

Nos grupos em que a irradiação de luz foi planejada, um fotopolimerizador odontológico do tipo LED foi empregado (Optilight Max; Gnatus, Ribeirão Preto, SP) (Fig. 8). Nesses casos, aplicamos a luz por contato com o dorso da língua durante um período de três minutos, conforme o tempo com melhores resultados em estudo prévio de Goulart *et al.* (2010) (Fig. 11). De acordo com o fabricante, esse equipamento proporciona um comprimento de onda entre 440 e 460 nm e densidade de potência em torno de 1200 mW/cm^2 . O aparelho foi utilizado no modo “contínuo”, ou seja, potência máxima do início ao fim da emissão de luz. A partir da multiplicação dos valores da densidade de potência e tempo de aplicação, obtém-se a dose de luz de 216 J/cm^2 . As ações realizadas em cada um dos quatro grupos estão explicitadas na Figura 12.

Fig. 8. Eritrosina e fotopolimerizador odontológico utilizados no protocolo de PDT.

Fig. 9. Aplicação de 50 μ L de eritrosina sobre o dorso da língua realizada nos grupos E+L+ e E+L-

Fig. 10. Aplicação de 50 μ L de solução salina sobre o dorso da língua realizada nos grupos E-L+ e E-L-.

Fig. 11. Irradiação da luz (LED) sobre o dorso da língua durante três minutos.

<p>Grupo E+L+</p> <ul style="list-style-type: none"> -Anestesia; -Gotejamento de 50 µL de E₅% sobre o dorso da língua; -Após a aplicação, foi aguardado um min em ambiente escuro (TPI); -Irradiação com o fotopolimerizador sobre o dorso da língua durante três min; -Fricção com o swab estéril durante um min para coleta. 	<p>Grupo E+L-</p> <ul style="list-style-type: none"> -Anestesia; -Gotejamento de 50 µL de E₅% sobre o dorso da língua; - Após a aplicação, foi aguardado um min em ambiente escuro (TPI); -Fricção com o swab estéril durante um min para coleta.
<p>Grupo E-L+</p> <ul style="list-style-type: none"> -Anestesia -Gotejamento de 50 µL de solução salina sobre o dorso da língua; -Após a aplicação, foi aguardado um min em ambiente escuro (TPI); -Irradiação com o fotopolimerizador sobre o dorso da língua durante três min; -Fricção com o swab estéril durante um min para coleta. 	<p>Grupo E-L-</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anestesia; -Gotejamento de 50 µL de salina sobre o dorso da língua; -Após a aplicação, foi aguardado um min em ambiente escuro (TPI); -Fricção com o swab estéril durante um min para coleta.

Fig. 12. Descrição das etapas realizadas em cada grupo experimental.

3.5. Contagem de *C. albicans*

A coleta das colônias de *C. albicans* foi efetuada por um terceiro pesquisador sem participação nas fases anteriores e com desconhecimento dos grupos aos quais cada camundongo pertencia. Esta etapa foi feita imediatamente após a aplicação do protocolo de PDT. Para esse fim, um swab estéril foi gentilmente friccionado pelo dorso da língua durante um minuto (Fig. 13). A ponta do swab foi cortada dentro de um tubo contendo 1 mL de salina estéril, usando-se tesoura também estéril (Fig. 14). Após agitação de cada por um minuto, seu conteúdo recebeu diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) e semeadas em duplicata sobre placas com ChromAgar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) (Fig. 15). Sobre essas placas, 50 μ L da solução salina inoculada foram espalhados por meio de alça de Drigalsky. As placas foram armazenadas a 37°C por 48 horas em aerobiose.

Por fim, as colônias de cada diluição foram contadas e foi determinada a média das duplicatas de cada amostra (Fig. 16). Os valores das médias foram aplicados na seguinte fórmula para o cálculo das UFC/mL em cada amostra:

$$\text{UFC/mL} = \text{média do número de colônias} \times 10^n/q, \text{ onde:}$$

n é o valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3); q é a quantidade, em mL, pipetada para cada diluição que no estudo foi 0,050 (equivalente a 50 μ L). Os valores obtidos foram transformados em logaritmo. O resultado desta contagem e análise estatística estão expressos nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 para cada grupo experimental.

Fig. 13. Fricção do dorso da língua com swab estéril, durante um minuto, para a coleta das colônias de *C. albicans* após a aplicação do tratamento.

Fig. 14. Acondicionamento das pontas dos swabs nos tubos contendo 1 mL de solução salina após as coletas.

Fig. 15. Diluições decimais seriadas do conteúdo do tubo e semeadas em duplicata do sobre placas com ChromAgar.

Fig. 16. Placas com ChromAgar 48 horas após o armazenamento para realização da contagem das colônias de *C. albicans*.

3.6. Análise Estatística – Contagem de UFC/mL

Em termos de tamanho amostral, esta proposta foi desenhada de acordo com estudo prévio (Mima *et al.*, 2010), no caso dos animais nos quais a candidose foi induzida. No caso dos demais, optou-se pelo número mínimo de três animais, pois essa subamostra objetiva somente detectar se o protocolo de PDT leva a reações adversas, e não quantificar essa diferença.

Os dados da contagem de UFC/mL tiveram sua distribuição estudada, a fim de testar-se a hipótese nula de semelhança com a distribuição normal. Comparações foram realizadas por meio de ANOVA para um fator. A análise estatística foi executada por meio do programa versão 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), respeitando-se um nível de significância de 0,05.

3.7. Preparação das Lâminas Histológicas

Passadas 24 horas dos tratamentos de cada animal, estes foram submetidos à eutanásia por meio de anestesia seguida por decapitação em guilhotina. Em seguida, as línguas foram removidas e fixadas em solução de formaldeído a 10% durante 24 horas. O tecido foi desidratado por exposição gradual ao etanol: 70% (*overnight*), 80, 85, 90, 95, e 100% (2 horas por concentração). Em seguida, as amostras foram imersas em solução 1/1 de etanol e xilol *overnight* e depois em xilol (três passagens de 2 horas cada). Por fim, o tecido foi incluído em parafina, e cortes no sentido sagital da língua, com 5 µm de espessura, foram preparados em lâminas para receber coloração. Foram obtidos 18 cortes histológicos por cada bloco das 41 peças preparadas a partir das línguas dos camundongos inoculados com *C. albicans*. Também foram obtidos nove cortes por bloco a partir das 12 peças referentes aos dos camundongos do controle negativo. No caso dos 41 animais inoculados com *C. albicans*, realizou-se uma coloração por hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico-Schiff (PAS), este último no intuito de avaliar a presença de células fúngicas. Já para os 12 camundongos submetidos exclusivamente aos tratamentos foram feitas as colorações por HE.

3.8. Análise das Lâminas Histológicas

Um examinador cego realizou uma análise qualitativa das lâminas associada a escores. Um microscópio convencional (Axio Image Z2, Zeiss, Germany) conectado a uma câmera digital Zeiss foi usado para capturar imagens representativas, considerando-se aumento de 10, 20 e 40 vezes. No caso dos camundongos com candidose induzida, foi averiguada a presença de *C. albicans* no interior dos tecidos, bem como a presença de infiltrado inflamatório, e classificação dos tipos celulares. As alterações teciduais e escores de inflamação foram classificadas de acordo com Martins *et al.* (2011), ou seja, averiguou-se a presença de hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, edema intercelular, perda de papilas filiformes, hiperparaqueratose e a formação de microabscessos epiteliais. Em seguida, atribuiu-se um escore referente à intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo, conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Classificação ordinal para o infiltrado inflamatório.

Escore	Características
0	Ausência de células inflamatórias
1	Infiltrado inflamatório discreto
2	Infiltrado inflamatório moderado
3	Infiltrado inflamatório severo

Nos demais 12 camundongos, a análise voltou-se para presença de alterações celulares e de infiltrado inflamatório.

O escore de cada animal foi obtido a partir da média dos valores atribuídos as três lâminas de HE obtidas por camundongo, com três cortes por lâmina, totalizando nove cortes. A análise estatística dos dados histológicos foi apresentada a partir da comparação dos escores de infiltrado inflamatório dos quatro grupos por meio do teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$).

4. Resultados

RESULTADOS

4.1. Contagem de *C. albicans*

O resultado da contagem e análise estatística estão expressos na Figura 17. Observou-se que as médias apresentaram valores próximos, entre 2,3 e 2,7 $\log_{10}$ (UFC/mL), com diferenças bem inferiores à variação representada pelos desvios-padrão. A ANOVA não nos permite rejeitar a hipótese de semelhança entre os quatro grupos, já que não foi observada diferença significativa ($F=0,447$; $P=0,721$). Nos 12 animais do grupo controle não foi constatada nenhuma colônia de *C. albicans*. Os valores obtidos para cada camundongo estão descritos nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

Fig. 17. Contagem média de UFC/mL (em $\log_{10}$) para os quatro grupos experimentais. As barras de erro representam os desvios-padrão.

Tabela 2. Contagem da UFC/mL no grupo E+L+.

Grupo	Indivíduo	Contagem	UFC/mL	log10 +1
E+L+	1	4	80	1,9
	2	133,5	2670	3,4
	3	9,5	190	2,3
	4	60	1200	3,1
	5	125,5	2510	3,4
	6	132,5	2650	3,4
	7	4,5	90	2,0
	8	0	0	0,0
	9	6,5	130	2,1
	10	11,5	230	2,4
Média				2,4
Desvio-padrão				1,0

Tabela 3. Contagem da UFC/mL no grupo E+L-.

Grupo	Indivíduo	Contagem	UFC/mL	log10 +1
E+L-	1	16,5	330	2,5
	2	8	160	2,2
	3	1	20	1,3
	4	54,5	1090	3,0
	5	36,5	730	2,9
	6	45	900	3,0
	7	38	760	2,9
	8	143	2860	3,5
	9	63	1260	3,1
	10	19,5	390	2,6
Média				2,7
Desvio-padrão				0,6

Tabela 4. Contagem da UFC/mL no grupo E-L+.

Grupo	Indivíduo	Contagem	UFC/mL	log10 +1
E-L+	1	12,5	250	2,4
	2	1	20	1,3
	3	0,5	10	1,0
	4	2,5	50	1,7
	5	81,5	1630	3,2
	6	132	2640	3,4
	7	15,5	310	2,5
	8	83	1660	3,2
	9	51	1020	3,0
	10	51,5	1030	3,0
	11	49	980	3,0
Média				2,5
Desvio-padrão				0,8

Tabela 5. Contagem da UFC/mL no grupo E-L-.

Grupo	Indivíduo	Contagem	UFC/mL	log10 +1
E-L-	1	0	0	0,0
	2	73	1460	3,2
	3	1,5	30	1,5
	4	34,5	690	2,8
	5	9,5	190	2,3
	6	5,5	110	2,0
	7	7	140	2,1
	8	30	600	2,8
	9	91,5	1830	3,3
	10	17,5	350	2,5
Média				2,3
Desvio-padrão				1,0

4.2. Análise Histológica

Na análise microscópica das lâminas histológicas coradas com HE, o infiltrado inflamatório foi classificado como ausente (Fig. 18), discreto (Fig. 19), moderado (Fig. 20) e severo (Fig. 21). Constatou-se prevalência do infiltrado inflamatório discreto na lâmina própria com predomínio de células inflamatórias mononucleadas (Fig. 22). As alterações epiteliais mais descritas foram hiperplasia epitelial, hiperparaqueratose, perda de papilas filiformes, desorganização da camada basal e espongiose. Essas lesões eram mais evidentes em áreas de alta concentração de fungos na camada de queratina (Fig. 23 e 24). Em todos os cortes, a região anterior da língua foi o local que apresentou mais manifestações de inflamação e alterações no tecido epitelial.

Fig. 18. Corte sagital do dorso da língua apresentando características de normalidade do tecido: epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com formação de papilas. Região subepitelial sem infiltrado inflamatório significativo. Microscopia óptica (HE).

Fig. 19. Corte sagital com presença de infiltrado inflamatório discreto no tecido conjuntivo e vasos congestionados. Microscopia óptica (HE).

Fig. 20. Corte sagital com presença de infiltrado inflamatório moderado no tecido conjuntivo, vasos congestionados e edema. Microscopia óptica (HE).

Fig. 21. Corte sagital com presença de infiltrado inflamatório severo no tecido conjuntivo, vasos congestionados, degradação da camada epitelial e edema abundante. Microscopia óptica (HE).

Fig. 22. Infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo com predomínio de células inflamatórias mononucleares. Microscopia óptica (HE).

Fig. 23. Área de concentração fúngica na camada de queratina. É possível verificar a hiperplasia do tecido epitelial, desorganização da camada basal, perda das papilas filiformes, hiperkeratose e espongiose. Infiltrado inflamatório discreto na lâmina própria. Microscopia ótica (HE).

Fig. 24. Alterações no tecido epitelial observadas em região de acúmulo de células fúngicas. Infiltrado inflamatório discreto na lâmina própria. Microscopia ótica (HE).

Em alguns cortes observou-se o infiltrado inflamatório moderado ou severo com a presença maciça de leucócitos polimorfonucleares associados a áreas de degradação do epitélio e edema abundante (Fig. 25, 26 e 27). Dos quatro indivíduos em que esse quadro foi detectado, três pertenciam ao grupo que recebeu a PDT (E+L+). Este mesmo resultado foi observado nos três camundongos saudáveis em que a PDT foi aplicada (Fig. 28), o que demonstra que a combinação da eritrosina 5% e a dose de 216 J/cm² irradiação pelo fotopolimerizador odontológico provocou danos aos tecidos orais. Os modelos murinos saudáveis que receberam os outros tratamentos (E+L-; E-L+ e E-L-) apresentaram um infiltrado inflamatório discreto, inclusive no grupo que recebeu apenas salina, ou ausente (Fig. 29).

Fig. 25. Infiltrado inflamatório severo observado em um camundongo do grupo E+L+. Degradação do tecido epitelial, fibras musculares, vasos congestionados e edema abundante. Microscopia óptica (HE).

Fig. 26. Infiltrado inflamatório severo observado em outro camundongo do grupo E+L+. Presença de acúmulo de fungos e células inflamatórias. Microscopia óptica (HE).

Fig. 27. Predominância de células inflamatórias polimorfonucleares. Microscopia óptica (HE).

Fig. 28. Corte obtido de um camundongo saudável que recebeu a PDT e desenvolveu um infiltrado inflamatório severo com área de degradação do epitélio, edema abundante e, hiperemia. Microscopia óptica (HE).

Fig. 29. Corte obtido de um camundongo saudável do grupo E-L+, infiltrado inflamatório ausente Microscopia óptica (HE).

A coloração com ácido periódico-Schiff permitiu a visualização das formas de leveduras e hifas da *C. albicans*. Na maioria dos cortes, os fungos estão limitados à camada de queratina, sem invasão do epitélio e conjuntivo (Fig. 30 e 31). Em alguns animais que apresentaram infiltrado inflamatório severo com degradação da camada epitelial, as leveduras e hifas foram encontradas sobre o epitélio e lâmina própria subjacente.

Fig. 30. Aglomeração de hifas e leveduras de na camada de queratina, sem invasão do tecido epitelial e conjuntivo. Microscopia ótica (PAS).

Fig. 31. Leveduras e hifas observadas na camada de queratina, sem invasão do tecido epitelial e conjuntivo. Microscopia ótica (PAS).

As Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10 expressam os resultados da classificação do infiltrado inflamatório de cada camundongo dos grupos experimentais e controle.

Tabela 6. Classificação do infiltrado inflamatório do grupo E+L+.

Grupo	Indivíduo	Característica predominante do infiltrado inflamatório	Média do escore	Mediana
E+L+	1	Discreto	0,66	1,50
	2	Severo	3,00	
	3	Severo	3,00	
	4	Discreto	1,33	
	5	Discreto	1,00	
	6	Discreto	1,00	
	7	Moderado	1,66	
	8	Moderado	1,66	
	9	Severo	2,66	
	10	Discreto	1,00	

Tabela 7. Classificação do infiltrado inflamatório do grupo E+L-.

Grupo	Indivíduo	Característica predominante do infiltrado inflamatório	Média do escore	Mediana
E+L-	1	Discreto	0,66	1,00
	2	Discreto	1,00	
	3	Discreto	1,00	
	4	Discreto	0,66	
	5	Ausente	0,33	
	6	Discreto	1,00	
	7	Ausente	0,33	
	8	Discreto	1,33	
	9	Discreto	1,00	
	10	Discreto	1,33	

Tabela 8. Classificação do infiltrado inflamatório do grupo E-L+.

Grupo	Indivíduo	Característica predominante do infiltrado inflamatório	Média do escore	Mediana
E-L+	1	Discreto	1,00	1,00
	2	Severo	3,00	
	3	Moderado	1,66	
	4	Discreto	0,66	
	5	Discreto	1,00	
	6	Discreto	1,00	
	7	Moderado	1,66	
	8	Discreto	1,00	
	9	Moderado	1,66	
	10	Discreto	1,00	
	11	Discreto	1,00	

Tabela 9. Classificação do infiltrado inflamatório do grupo E-L-.

Grupo	Indivíduo	Característica predominante do infiltrado inflamatório	Média do escore	Mediana
E-L-	1	Discreto	1,00	1,33
	2	Discreto	1,33	
	3	Moderado	1,66	
	4	Moderado	2,00	
	5	Discreto	1,33	
	6	Discreto	1,33	
	7	Discreto	1,00	
	8	Discreto	0,66	
	9	Discreto	1,33	
	10	Discreto	1,00	

Tabela 10. Classificação do infiltrado inflamatório dos animais do grupo controle negativo.

Grupos controle	Indivíduo	Característica predominante do infiltrado inflamatório	Média do escore	Mediana
E+L+	1	Severo	3,00	3,00
	2	Moderado	1,70	
	3	Severo	3,00	
E+L-	1	Ausente	0	0
	2	Discreto	0	
	3	Discreto	1,00	
E-L+	1	Ausente	0	1,00
	2	Discreto	1,00	
	3	Discreto	1,00	
E-L-	1	Ausente	0	1,00
	2	Discreto	1,00	
	3	Discreto	1,00	

A Tabela 11 e 12 contém os resultados para o infiltrado inflamatório dos grupos, conforme os escores e respectiva interpretação da intensidade predominante. Observa-se que a maioria dos indivíduos apresentou infiltrado discreto, sendo a mediana de todos os animais correspondente a 1,00. O resultado da mediana de cada grupo está representado no gráfico box plot (Fig. 31). A comparação pelo teste de Kruskal-Wallis não nos permitiu rejeitar a hipótese nula de que os quatro grupos são semelhantes (KW=7,394, $p=0,060$).

Tabela 11. Classificação do infiltrado inflamatório dos grupos experimentais.

Infiltrado Inflamatório	Grupos experimentais				Total
	E+L+	E+L-	E-L+	E-L-	
Ausente	0	2	0	0	2
Discreto	5	8	7	8	27
Moderado	2	0	3	2	7
Severo	3	0	1	0	4
Total	10	10	11	10	41

Tabela 12. Classificação do infiltrado inflamatório do grupo controle negativo.

Infiltrado inflamatório	Grupo controle negativo				Total
	E+L+	E+L-	E-L+	E-L-	
Ausente	0	1	0	0	1
Discreto	0	2	3	3	8
Moderado	1	0	0	0	1
Severo	2	0	0	0	2
Total	3	3	3	3	12

Fig. 32. Mediana dos escores do infiltrado inflamatório dos grupos experimentais.

5. Discussão

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a viabilidade de um protocolo de PDT simplificado, potencialmente seguro e de baixo custo, a fim de que o mesmo pudesse ser empregado na maioria das clínicas odontológicas, sejam particulares ou mantidas pelo sistema público. As substâncias e equipamentos propostos são de uso comum e já aprovados para aplicação na prática odontológica. Sendo assim, a substância fotossensível selecionada foi a eritrosina 5%, um evidenciador de biofilme dental, e como fonte de luz o fotopolimerizador odontológico do tipo LED azul.

5.1. Indução da Candidose Bucal

Para o teste desse protocolo a candidose bucal foi induzida em modelos murinos, conforme os procedimentos desenvolvidos por Takakura *et al.* (2003), e também realizados por Mima *et al.* (2010), Costa *et al.* (2012a) e Dovigo *et al.* (2013) para a avaliação de distintos protocolos de PDT como tratamento desta patologia. A imunossupressão e a candidose bucal foram induzidas a partir de injeções de prednisolona, inclusão da tetraciclina na água de consumo e inoculação de uma suspensão de *C. albicans* de cepas padrão. Nesses estudos, a contagem das UFC dos animais que compunham os grupos controle positivo, ou seja, que foram imunossuprimidos, receberam a inoculação da *C. albicans* e foram tratados apenas com a aplicação de solução salina (FS-L-), revelou valores mais elevados (entre 4-5 e 5-6 log₁₀ UFC/mL) do que no presente trabalho (2-3 log₁₀ UFC/mL). Esta diferença pode ser ocasionada pelas características de virulência inerentes as cepas de *C. albicans* usadas em cada pesquisa.

Os trabalhos de Teichert *et al.* (2002), Junqueira *et al.* (2009) e Martins *et al.* (2011) induziram a candidose bucal em modelo animal através de procedimentos variados dos estudos mencionados anteriormente. Teichert *et al.* (2002) inocularam cepas de *C. albicans* azol-resistentes, coletadas de pacientes, em camundongos com imunodeficiência combinada grave. Durante quatro semanas, a inoculação foi executada três vezes semanais. A água de consumo foi contaminada com a suspensão desses micro-organismos. A média da UFC do grupo controle foi de 1.94×10^2 ($\approx$ 2-3 log₁₀), sendo tal valor semelhante ao obtido no presente estudo. Já

Junqueira *et al.* (2009) utilizaram modelos de ratos e cepas de *C. albicans* isoladas de um paciente com estomatite associada à prótese. Uma solução de 0,1% de cloridrato de tetraciclina foi usada como água de consumo nos sete dias precedentes a inoculação e durante todo experimento. Os autores observaram áreas de atrofia papilar nas línguas. Não foi descrita a contagem de UFC. Martins *et al.* (2011) aplicaram uma metodologia semelhante ao estudo anterior, mas a inoculação foi realizada com cepas laboratoriais de *C. albicans* (ATCC 18804). Os resultados demonstraram a presença de 4-5 log₁₀ UFC/mL coletadas do grupo controle.

Apesar dos valores discretos na contagem de UFC/mL, a indução da candidose foi efetiva e pode ser demonstrada pela presença de colônias de *C. albicans* na cavidade bucal dos camundongos, tendo em vista que estes fungos não são integrantes na microbiota endógena destes animais (Farah *et al.*, 2001; Teichert *et al.*, 2002), pela presença de lesões no tecido epitelial e infiltrado inflamatório na lâmina própria detectados nos cortes corados pela HE, além da identificação de leveduras e hifas nas lâminas coradas pelo PAS. A presença de lesões macroscópicas nas línguas dos animais não foi um achado clínico frequente e a coleta deste dado não foi prevista neste projeto.

5.2. Contagem de *C. albicans*

Com relação aos resultados desta pesquisa, os autores constataram que a aplicação da eritrosina 5 % e irradiação com o fotopolimerizador LED (E+L+) durante três minutos não acarretou em efeitos significantes sobre a microbiota de camundongos submetidos a um modelo de candidose bucal. Esse resultado foi inesperado, dada a alta concentração da eritrosina e a energia irradiada.

Esses achados divergem dos resultados do experimento *in vitro* desenvolvido pelo nosso laboratório, com o intuito de avaliar os efeitos deste protocolo de PDT sobre as formas planctônicas (Bonfá *et al.*, 2014) e de biofilme (Sobreiro *et al.*, 2014) de uma cepa padrão de *C. albicans* e *C. albicans* resistente ao fluconazol. Os pesquisadores observaram que as doses de luz de 19,2 J/cm² e 28,8 J/cm², as quais correspondem a irradiação por um dispositivo de luz LED azul durante dois e três minutos, respectivamente, ocasionou a completa inativação dos micro-organismos. Apesar da dose de luz aplicada no presente estudo ser superior, devido à alta

densidade de potência do fotopolimerizador odontológico (260 J/cm^2), esse desfecho não foi iterado no modelo animal. Ao compara estudos *in vitro* e *in vivo*, alguns aspectos podem contribuir para as diferenças entre os resultados, já que, em tecidos vivos, a difusão da FS é mais laboriosa e pode sofrer a competitividade entre sítios do hospedeiro e dos micro-organismos, o que pode acarretar na redução do efeito antimicrobiano da PDT, e ainda enfrentar maiores obstáculos para penetrar e atingir níveis significativos em biofilmes complexos formados nos tecidos irradiados (Dai *et al.*, 2010; Dovigo *et al.*, 2013).

Os resultados do presente trabalho também diferem do que foi constatado por Costa *et al.* (2012a), que realizaram procedimentos semelhante para indução da candidose bucal em camundongos e efetuaram um protocolo de PDT similar ao descrito nesta pesquisa. Desta forma, a eritrosina foi usada numa concentração de $400 \text{ } \mu\text{M/mL}$ ($\approx 352 \text{ mg/L}$), associada à irradiação por três minutos com o LED verde (dose: $14,34 \text{ J/cm}^2$). Foi notada uma redução da *C. albicans* de $0.73 \log_{10}(\text{UFC/mL})$ no grupo que recebeu a PDT, além de uma redução de 35% desta capacidade aderência dos fungos às células epiteliais.

A concentração de eritrosina do presente estudo (5%, ou seja, 50000 mg/L) foi consideravelmente superior à utilizada por Costa *et al.* (2012a) e demais trabalhos na literatura (Metcalf *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2006; Rossoni *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010, 2011, 2012b). A concentração elevada de eritrosina é associada à formação de agregados entre os monômeros dessa substância, gerando a formação de dímeros ou outras formas de oligômeros. A dimerização provoca mudanças no espectro de absorção da FS, de modo que um segundo pico de máxima absorção é detectado no gráfico da relação entre absorbância e comprimento de onda. Este novo pico tende a se direcionar para comprimentos de onda mais baixo (efeito hipsocrômico), próximos a luz azul, e correspondem ao comportamento das formas diméricas. Já o pico de absorção mais conhecido da eritrosina está localizado na região da luz verde e corresponde ao comportamento das formas monoméricas. Segundo De S *et al.* (2005), além do aparecimento de novos picos de máxima absorção, a formação de agregados interfere nas propriedades de fotossensibilização, reduzem o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete e tempo de vida no estado triplete. A formação de agregados pode ser influenciada pela estrutura molecular da FS, concentração, solvente, temperatura e presença de eletrólitos.

O estudo de Stomphorst *et al.* (2001) decetctou alterações no pico máximo de absorção da eritrosina B conforme o aumento da concentração da mesma. Desta forma, a concentração abaixo de $0,004 \text{ mg/mL}$ apresenta a máxima absorção no comprimento de onda da luz verde, correspondente a forma monomérica dessa substância. Em concentrações intermediárias, entre

0,04 e 0,4 mg/mL, a máxima absorção começa a se direcionar para a luz azul (blue shift), o que se intensifica em concentrações mais elevadas, acima de 2,64 mg/mL, em decorrência do comportamento das formas agregadas. Considerando que em nosso estudo a fonte de luz empregada possui um comprimento de onda na região da luz azul, a mesma parece ser compatível com o comportamento dos dímeros que foram provavelmente formados, dada a elevada concentração da eritrosina nesta pesquisa.

Essa tendência a formar agregados é observada tanto em corantes xantênicos, que incluem a eritrosina e rosa bengala, como em corantes fenotiazínicos, representados pelo azul de metileno e azul de toluidina. Este último foi estudado por Jackson *et al.* (1999), que verificaram que a redução de *C. albicans* foi maior em concentração intermediária de azul de toluidina (25 µg/mL para a forma de levedura e 12,5 µg/mL para a forma de hifas), em comparação a concentrações mais elevadas também investigadas (50 e 100 µg/mL). Os autores discutem que, em concentrações superiores, pode haver a saturação dos pontos alvo e que a FS livre pode absorver os fótons e diminuir a ativação da FS ligada ao micro-organismo. Um resultado similar foi encontrado por Chui *et al.* (2013), que testaram o efeito do rosa bengala nas concentrações de 0,16, 1,6, 16, e 160 µg/mL iluminada por LED azul (dose: 30J/cm²) sobre *P. gingivalis* e constataram uma redução progressiva da UFC/mL até a concentração de 16 µg/mL e uma diminuição desse efeito na concentração de 160 µg/mL. Os autores argumentaram que na concentração mais elevada, o rosa bengala pode ter bloqueado a passagem e absorvido a luz do LED, reduzindo o efeito do mesmo.

O resultado de outras pesquisas vai de encontro ao exposto anteriormente, de forma que uma resposta dose-depente é detectada. É o caso do trabalho de Costa *et al.* (2011) que avaliaram a ação antimicrobiana da eritrosina sobre as formas plactônicas de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, em dez concentrações que variaram de 0,39 a 200 µM (≈0.35mg/L e 176 mg/L). As amostras foram radiadas por LED verde, na dose de 42,63 J/cm². Foi verificado uma redução da UFC/mL dependente da concentração e a partir de 3,12 µM (≈2,74 mg/L), observou-se a eliminação de ambos os fungos. Pellossi *et al.* (2013) que realizaram um bioensaio em que o crustáceo *Artêmia salina* foi exposta a corantes xantênicos (fluoresceína, rosa bengala B, eritrosina B e eosina Y) nas concentrações de 25 µmol/L e 250 µmol/L irradiados com LED verde por 1h ou 3h. A estrutura da FS, maior concentração e tempo de irradiação foram relacionados à fotomortandade superior desse micro-organismo.

A função das formas monoméricas e diméricas na inativação de micro-organismos ainda não é clara, mas se irradiados por fonte de luz com comprimento de onda adequado, ambas as

formas podem ser fotoativadas (Usacheva *et al* 2003; Núñez, 2007). Isto foi detectado por Usacheva *et al* (2003) que pesquisaram o efeito fotodinâmico das diferentes concentrações de azul de metileno e azul de toluidina irradiados pelo laser com comprimento de onda compatível com os monômeros e dímeros, e constataram uma redução das UCF/mL nas duas situações, mostrando que ambas as formas contribuem para a inativação das bactérias testadas (*P. Aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*).

A despeito da alta concentração utilizada no presente estudo, as pesquisas laboratoriais (Bonfá *et al.*, 2014; Sobreiro *et al.*, 2014) que avaliaram o efeito desta mesma concentração, e uma fonte iluminadora (LED azul) com comprimento de onda semelhante e dose de luz inferior a nossa, foram capazes de gerar a redução da UFC/mL da *C. albicans*, o que demonstra que os agregados provavelmente formados foram fotoativados pelo LED azul e provocaram danos às espécies de *Candida*. O nosso estudo em modelo animal não reproduziu este resultado, não sendo possível averiguar, com os dados que avaliamos, o quanto a alta concentração usada em nosso protocolo pode ter influenciado neste achado. Portanto, experimentos *in vitro* e *in vivo* com este protocolo e distintas concentrações podem ser executados para investigar se os resultados podem ser aprimorados pelo aumento ou redução dessa variável.

Outro aspecto que diferiu entre o presente estudo e o de Costa *et al.* (2012a) foi o comprimento de onda da fonte iluminadora, de modo que o LED verde usado por estes (≈ 532 nm) apresenta um comprimento mais próximo ao pico da máxima absorção de luz da eritrosina (≈ 530 nm) (Costa *et al.*, 2011). Contudo, o espectro de absorção dessa substância, de 400 a 550 nm (Núñez *et al.*, 2013), abrange o comprimento de onda do LED azul (440 e 460 nm) e a associação da eritrosina e LED azul foi capaz de gerar efeitos fotodinâmicos, de acordo com visualizado em nossas pesquisas laboratoriais e outros estudos na literatura (Costa *et al.*, 2010, 2012b; Bonfá *et al.*, 2014; Sobreiro *et al.*, 2014).

Com relação as pesquisas em modelos murinos, que utilizaram métodos de indução a candidose bucal similares e que avaliaram diferentes protocolos de PDT, obtiveram uma redução significativa das colônias de *C. albicans*. Dentre eles, podem ser citados Mima *et al.* (2010), que estudaram os efeitos do Photogem®, em três concentrações (400, 500 e 1000 mg/L), combinado à irradiação por LED azul e vermelho (doses: 305 J/cm^2). Verificou-se uma redução significativa das colônias de *C. albicans* independente da concentração e comprimento de onda da fonte de luz. E Dovigo *et al.* (2013), que utilizaram a curcumina como FS nas concentrações de 7.4, 14.7 and 29.5 mg/l, e a irradiação por LED azul (Dose: $37,5 \text{ J/cm}^2$). Em

todas as concentrações, constatou-se uma redução significativa das colônias de *C. albicans*, quando comparados ao controle positivo (FS- L-), sendo mais expressiva a redução no grupo que recebeu a maior concentração. Vale salientar que o TPI em ambos os estudos foi consideravelmente maior que o presente trabalho, sendo 30 minutos em Mima *et al.* (2010) e 20 minutos em Dovigo *et al.* (2013).

O TPI é uma variável importante, pois ele é necessário para que as moléculas da FS se difundam no tecido, entrem em contato com a parede celular ou penetre nos micro-organismos e possam gerá-los danos quando a fonte de luz for aplicada. A depender das características químicas e físicas da molécula da FS, bem como do micro-organismo (Andrade *et al.*, 2013; Núñez *et al.*, 2013) e tecido aplicado, o TPI deve ser adequado para que a ação da PDT seja efetiva. Os trabalhos em modelo animal que utilizaram a eritrosina não avaliaram a influência de diferentes tempos na ação da PDT como tratamento para candidose bucal e este tempo pode necessitar de ajustes considerando as peculiaridades da difusão da FS em pesquisas *in vitro* e *in vivo*. Costa *et al.* (2012a) empregaram o mesmo TPI que nossa pesquisa, um minuto, e obtiveram reduções significativas das colônias de *C. albicans*. Nos trabalhos *in vitro* desenvolvidos em nosso laboratório (Bonfá *et al.*, 2014; Sobreiro *et al.*, 2014), o TPI foi uma das variáveis do estudo e constatou-se que no grupo que recebeu um minuto de irradiação com LED azul, os TPIs de 30 e 60 segundos influenciaram o resultado da PDT sobre as cepas padrão de *C. albicans*, sendo verificada redução maior da UFC no tempo de 60 segundo. Andrade *et al.* (2013) testaram o efeito do TPI (1, 5, 10 e 20 minutos) sobre espécies de *Candida*, na forma planctônica e de biofilme, que receberam curcumina e irradiação pelo LED azul, e encontraram uma redução superior do biofilme de *C. albicans* no maior TPI. Em outras espécies avaliadas, essa dependência não foi verificada. Os autores também executaram a microscopia de varredura confocal para avaliar a penetração da curcumina no biofilme e observaram um brilho de fluorescência mais intenso no TPI de 20 minutos em comparação a 5 minutos. No presente trabalho não foram avaliados diferentes TPIs, e o mesmo poderá ser elevado em pesquisas futura para aferir a sua influência sobre os resultados em modelo animal. Vale ressaltar que o alto peso molecular da eritrosina, em comparação a outras FSs, pode demandar de um maior TPI para que esta se distribua adequadamente.

Em relação aos estudos que aplicaram métodos de indução a candidose bucal diferente da presente pesquisa, Teichert *et al.* (2002) averiguaram os efeitos fotodinâmicos de sete concentrações do azul de metileno (250 a 500 mg/L) irradiadas pelo laser (dose: 275 J/cm²). O

TPI também foi mais elevado, sendo de 10 minutos. A coleta dos micro-organismos foi realizada antes e imediatamente após o tratamento. Os autores observaram uma resposta dose-dependente e as concentrações de 450 e 500 mg/L foram capazes de erradicar as colônias de *C. albicans*. Martins *et al.* (2011), também aplicaram o azul de metileno como FS (100 mg/L) associada ao laser arseneto gálio-alumínio (dose: 245 J/cm²). A PDT foi executada por dois dias consecutivos. A coleta dos micro-organismos também foi feita antes e um dia após os tratamentos. Ao comparar os dados de antes a após a PDT, foi verificada uma redução das UFC/mL em todos os grupos (FS+L+; FS+L-; FS-L+; FS-L-), entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos. Esse resultado é semelhante a que verificamos no presente estudo, pois também não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos. Já a comparação entre a UFC/mL antes e após o tratamento não foi um dado mensurado no presente estudo. Optamos por não realizar a coleta antes da aplicação da PDT para evitar modificações na microbiota da cavidade bucal dos camundongos e gerar possíveis alterações no número de colônias de *C. albicans* já instaladas.

Outro fator diferencial em nossa pesquisa que pode influenciar o resultado da contagem de colônias de *C. albicans* foi o emprego de uma fonte de luz com densidade de potência superior aos demais estudos em modelo animal, sendo de 1200 mW/cm². Como foi explicitado anteriormente, a proposta inicial da pesquisa é utilizar elementos já incluídos na prática clínica odontológica, e, portanto, optamos pelo uso do fotopolimerizador odontológico tipo LED azul, convencionalmente usado para a polimerização de resinas compostas. Um aspecto que deve ser observado ao utilizar fontes de alta potência é a aceleração do processo de fotodegradação, ou fotobranqueamento, da FS, que consiste na degradação da FS pelas EROS produzidas na aplicação da PDT. Este fenômeno é diretamente atrelado a parâmetros físicos da fonte de luz e um fator importante a ser investigado já que o fotobranqueamento promove a redução da absorção dos fótons e, conseqüentemente, do efeito fotodinâmico (Núñez, 2007).

Wood *et al.* (2006) verificaram o fotobranqueamento irreversível da eritrosina a 22 µM (≈19,4 mg/L), iluminada pela luz branca da lâmpada de filamentos de tungstênio (irradiância: 22,5-22,7 mW/cm²), em tempos de irradiação superiores a 15 minutos, de forma que a absorção da FS decresceu progressivamente após esse período. Num estudo posterior (Metcalf *et al.*, 2006), os autores testaram a influência da aplicação contínua ou fracionada da luz por 5 minutos e perceberam que o fracionamento resultou em decréscimos superiores da viabilidade de biofilmes de *S. mutans*, sendo mais efetivo, inclusive, do que a irradiação continuada por 30

minutos. Os autores discutem que a presença de “períodos escuros” entre as frações de luz pode ter possibilitado o reabastecimento de biomoléculas alvo (como o oxigênio), bem como maior redistribuição da eritrosina e reequilíbrio do gradiente de concentração da FS, já que o nível de eritrosina é progressivamente diminuído pela fotodegradação.

Na literatura, muitos trabalhos que avaliam a influência dos parâmetros de luz na PDT foram realizados em sistema fechado e com densidade de potência de luz consideravelmente inferior à do presente estudo. Em meio biológico, a fotodegradação pode não reproduzir o mesmo comportamento, já que a oferta de biomoléculas é elevada, aumentando a probabilidade das espécies reativas de oxigênio se ligarem a elas, e não as moléculas da FS (Núñez *et al*, 2013). Pesquisas futuras que analisem o efeito de diferentes doses de luz e variadas formas de aplicação da luz no protocolo de PDT proposto devem ser desenvolvidas. As alterações na forma de aplicação da luz poderiam ser testadas alterando-se as configurações do tipo de aplicação da luz que os aparelhos fotopolimerizadores oferecem. No modelo usado em nosso estudo (Optilight Max; Gnatus, Ribeirão Preto, SP), estão disponíveis o modo contínuo, com aplicação da potência máxima, modo rampa, em que a potência é elevada gradativamente, e o modo pulsando, que são aplicados ciclos que oscilam numa frequência fixa e potência máxima.

Por fim, algumas limitações do presente estudo que podem influenciar os resultados da contagem de colônias de *C. albicans* referem-se aos reduzidos valores de UFC/mL coletados no grupo controle positivo, que servem como parâmetro para avaliarmos a infecção pelos fungos alcançada pelo método de indução a candidose bucal. A quantidade discreta de colônias pode não refletir, estatisticamente, os efeitos do protocolo de PDT proposto, que poderiam ser notados sobre um número maior de *C. albicans*. O nosso estudo também não averiguou a influência de variações nas variáveis relacionadas à FS e à fonte de luz, como distintas concentrações de eritrosina, doses de luz e tempo de pré-irradiação. Assim como não foram realizados estudos prévios para avaliação dos aspectos químicos e físicos do protocolo apresentado. O estudo da formação de agregados, absorbância e fotodegradação podem elucidar os resultados da PDT e auxiliar no aprimoramento do protocolo pesquisado.

5.3. Análise Histológica

A análise descritiva das lâminas histológicas preparadas a partir de cortes sagitais das línguas dos camundongos revelou a presença de leveduras e hifas localizadas preferencialmente

na camada de queratina, lesões no tecido epitelial da região do dorso, principalmente da hiperplasia epitelial, hiperparaqueratose, perda de papilas filiformes, espongiose e desorganização da camada basal. No tecido conjuntivo foi observado infiltrado inflamatório discreto na maioria dos indivíduos, com prevalência de células mononucleadas. Em alguns cortes, detectaram-se áreas de concentração de leveduras e hifas na camada de queratina relacionadas a lesões no tecido epitelial subjacente e infiltrado inflamatório subepitelial. Em média, as quatro condições testadas não aparentam distinção de resultados, apesar de alguns valores discrepantes para certos indivíduos. A análise estatística demonstrou que não houve diferenças significativas entre os quatro grupos quanto à classificação do infiltrado inflamatório, confirmando a aparente similaridade entre os achados para cada condição testada.

O resultado da avaliação microscópica nas pesquisas que utilizaram métodos similares de indução da candidose bucal em modelos murinos descreveram achados semelhantes ao presente trabalho, atestando o desenvolvimento dessa patologia. O infiltrado inflamatório da maior parte dos cortes histológicos também foi classificado como discreto por Costa, *et al.* (2012a), Mima *et al.* (2010) e Dovigo *et al.* (2013). No primeiro, os autores incluíram ainda a quantificação da presença de lesões no tecido epitelial e número de leveduras e hifas. Embora tenham relatado menor quantidade de alterações epiteliais no grupo tratado pela PDT, não detectaram diferenças estatísticas em nenhuma dessas variáveis.

Outros achados distintos dos citados previamente foram referidos por Junqueira *et al.* (2009) e Martins *et al.* (2011), os quais observaram diferenças entre os grupos tratados com a PDT e os demais grupos experimentais. Junqueira *et al.* (2009) realizaram a eutanásia dos ratos tratados imediatamente, um dia e cinco dias após a PDT, a qual empregou o azul de metileno (100 mg/L) e laser arseneto gálio-alumínio (dose: 26 J/cm²). No primeiro tempo (imediatamente após), não verificaram diferenças entre os grupos. Entretanto, nos grupos em que a eutanásia foi realizada um e cinco dias após, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto à presença de lesões no tecido epitelial e intensidade do infiltrado inflamatório, de forma que o grupo que recebeu a PDT (FS+L+) apresentou menos alterações epiteliais e infiltrado inflamatório mais brando. O grupo FS-L+ demonstrou as respostas mais intensas no infiltrado inflamatório e lesões no epitélio, gerando escores diferentes dos outros grupos controles (FS+L- e FS-L-). Os autores discutiram que este efeito pode ser ocasionado pela ação moduladora da resposta inflamatória gerado pelo laser de baixa intensidade, o qual estimula a proliferação celular, angiogênese e outros efeitos associados a inflamação. Além disso, a quantidade de hifas

nos cortes também foi aferida nesse estudo, mas não foram encontradas diferenças significativas.

O protocolo de PDT tratado por Martins *et al.* (2011) assemelha-se ao citado acima, sendo utilizado o azul de metileno em igual concentração combinado com a mesma fonte de luz, numa dose superior de 245 J/cm². Os autores relataram que o grupo FS+L+ apresentou significativamente menos lesões microscópicas no tecido epitelial do que os outros grupos. Os autores discutiram que a realização da PDT dois dias consecutivos pode ter influenciado na ausência de lesões microscópicas de candidose em seis dos dez ratos do grupo FS+L+.

Um resultado importante encontrado em nosso estudo refere-se aos danos teciduais causados pelo protocolo proposto, os quais foram evidenciados tanto nos cortes histológicos do grupo experimental E+L+ dos camundongos que sofreram imunossupressão e inoculação de *C. albicans*, como nos animais saudáveis que receberam esse mesmo protocolo. Sendo assim, a eritrosina 5% e a alta densidade de potência do fotopolimerizador odontológico podem ter ocasionado uma alta produção de espécies reativas de oxigênio que podem ter acarretado injúrias às células do hospedeiro e aos micro-organismos. Esses danos compreenderam principalmente a degradação do tecido epitelial, infiltrado inflamatório severo com predomínio de células polimorfonucleares e edema abundante no tecido conjuntivo. Martins *et al.* (2011), também incluíram um grupo controle com 16 ratos que não foram submetidos a imunossupressão e inoculação e receberam a PDT. Contudo, em oposição ao presente estudo, os autores não observaram lesões nos tecidos saudáveis ocasionadas pelo protocolo testado.

6. Conclusão

CONCLUSÃO

A partir dos resultados desta pesquisa podemos concluir que a associação da eritrosina 5% e irradiação com fotopolimerizador odontológico tipo LED azul não produziu redução significativas das colônias de *C. albicans* ou diferenças na classificação do infiltrado inflamatório ao comparar o grupo que foi tratado com a PDT (E+L+) e os demais grupos controles (E+L-; E-L+; E-L-). O protocolo testado (E+L+) pareceu gerar danos aos tecidos orais dos camundongos saudáveis e dos que tiveram a candidose bucal induzida, conforme o resultado observado na análise histológica.

Referências¹

¹ De acordo com o Estilo Vancouver:

US National Library of Medicine. Bibliographic Services Division. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: sample references. Estados Unidos, 1978 [cited 2006 Oct 25].

REFERÊNCIAS

Aghahosseini F, Arbabi-Kalati F, Fashtami LA, Fateh M, Djavid GE. Treatment of oral lichen planus with photodynamic therapy mediated methylene blue: a case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 Mar;11(2):E126-9.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):455-9.

Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJ, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004 May;1(1):27-42.

Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol*. 2013 Feb;58(2):200-10.

Barasch A, Safford MM, Dapkute-Marcus I, Fine DH. Efficacy of chlorhexidine gluconate rinse for treatment and prevention of oral candidiasis in HIV-infected children: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Feb;97(2):204-7.

Bhattacharyya I, Cohen DM, Silverman S Jr. Lesões Vermelhas e Brancas da Mucosa oral. In: Greenberg MS, Glick M. *Medicina Oral de Burket*. 10. Ed. São Paulo: Santos; 2008. p. 85-125.

Bonfá K, Ribeiro DG, Silva NR, Oliveira VC, Souza RF. Eficácia de um protocolo de terapia fotodinâmica para inativação de espécies de *Candida*. *Braz Oral Res* 2014;28(Suppl. 1):22-476.

Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):877-84.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001 Jul;9(7):327-35.

Campisi G, Panzarella V, Matranga D, Calvino F, Pizzo G, Lo Muzio L, et al. Risk factors of oral candidosis: a twofold approach of study by fuzzy logic and traditional statistic. *Arch Oral Biol*. 2008 Apr;53(4):388-97.

- Chui C, Aoki A, Takeuchi Y, Sasaki Y, Hiratsuka K, Abiko Y, et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agent on *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res. 2013 Dec;48(6):696-705.
- Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araujo CF, Pereira CA, Junqueira JC, et al. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012 Jul;114(1):67-74.
- Costa AC, Chibebe Junior J, Pereira CA, Machado AK, Beltrame Junior M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. Braz Oral Res. 2010 Oct-Dec;24(4):413-8.
- Costa AC, de Campos Rasteiro VM, Pereira CA, da Silva Hashimoto ES, Beltrame M, Jr., Junqueira JC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. Arch Oral Biol. 2011 Nov;56(11):1299-305.
- Costa AC, Rasteiro VM, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. Mycoses. 2012 Jan;55(1):56-63.
- Coulthwaite L, Verran J. Evaluation of in vivo denture plaque assessment methods. Br Dent J. 2009 Sep 26;207(6):E12.
- Dai T, Tegos GP, Zhiyentayev T, Mylonakis E, Hamblin MR. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. Lasers Surg Med. 2010 Jan;42(1):38-44.
- Davies AN, Brailsford SR, Beighton D. Oral candidosis in patients with advanced cancer. Oral Oncol. 2006 Aug;42(7):698-702.
- De S, Das S, Girigoswami A. Environmental effects on the aggregation of some xanthene dyes used in lasers. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2005 Jun;61(8):1821-33.
- Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. Clin Oral Implants Res. 2001 Apr;12(2):104-8.

Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol*. 2013 Apr;51(3):243-51.

Dundar N, Ilhan Kal B. Oral mucosal conditions and risk factors among elderly in a Turkish school of dentistry. *Gerontology*. 2007;53(3):165-72.

Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(2):172-98.

Farah CS, Hong S, Wanasaengsakul S, Elahi S, Pang G, Gotjamanos T, et al. Irradiation-induced oral candidiasis in an experimental murine model. *Oral Microbiol Immunol*. 2001 Dec;16(6):358-63.

Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J*. 2010 Jun;55 Suppl 1:48-54.

Fimble JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod*. 2008 Jun;34(6):728-34.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011 Jun;20(4):251-60.

Goulart Rde C, Thedei G, Jr., Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg*. 2010 Aug;28 Suppl 1:S85-90.

Hamza OJ, Matee MI, Moshi MJ, Simon EN, Mugusi F, Mikx FH, et al. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. *BMC Microbiol*. 2008;8:135.

Haveland-Smith RB, Combes RD, Bridges BA. Studies on the genotoxicity of some fluorescein dyes. *Mutat Res*. 1981 Jan;88(1):1-15.

Henrique PR, Bazaga Júnior M, Araújo VCd, Junqueira JLC, Furuse C. Prevalência de alterações da mucosa bucal em indivíduos adultos da população de Uberaba, Minas Gerais. *RGO*. 2009;57(3):261-267.

Jackson Z, Meghji S, Macrobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med Sci.* 1999 Jun;14(2):150-7.

Jenkinson HF, Douglas LJ. Interactions between *Candida species* and bacteria in mixed infections polymicrobial diseases. Washington (DC): ASM Press; 2002.

Junqueira JC, Martins Jda S, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Nov;24(6):877-84.

Kabawat M, de Souza RF, Badaro MM, de Koninck L, Barbeau J, Rompre P, et al. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. *Int J Prosthodont.* 2014 Jul-Aug;27(4):311-9.

Kamikawa Y, Mori Y, Nagayama T, Fujisaki J, Hirabayashi D, Sakamoto R, et al. Frequency of clinically isolated strains of oral *Candida* species at Kagoshima University Hospital, Japan, and their susceptibility to antifungal drugs in 2006-2007 and 2012-2013. *BMC Oral Health.* 2014;14:14.

Krishnan PA. Fungal infections of the oral mucosa. *Indian J Dent.* 2012 Sep-Oct;23(5):650-9.

Kubler AC, de Carpentier J, Hopper C, Leonard AG, Putnam G. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Dec;30(6):504-9.

Lalla RV, Patton LL, Dongari-Bagtzoglou A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. *J Calif Dent Assoc.* 2013 Apr;41(4):263-8.

Marotti J, Aranha AC, Eduardo Cde P, Ribeiro MS. Photodynamic therapy can be effective as a treatment for herpes simplex labialis. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):357-63.

Martins Jda S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Jan;111(1):71-7.

Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *The J Antimicrob Chemother.* 2006 Jul;58(1):190-2.

Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Mar;109(3):392-401.

Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. Clin Microbiol Infect. 2012 Oct;18(10):E380-8.

Nair RG, Anil S, Samaranayake LP. The effect of oral bacteria on *Candida albicans* germ-tube formation. APMIS. 2001 Feb;109(2):147-54.

Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. Odontology. 2010 Feb;98(1):15-25.

Núñez SC, Ribeiro MS, AS G. PDT- Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.

Nunez SC. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica: São Paulo. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) - Universidade de São Paulo; 2007.

Paranhos Hde F, Lovato da Silva CH, de Souza RF, Pontes KM. Evaluation of three indices for biofilm accumulation on complete dentures. Gerodontology. 2010 Mar;27(1):33-40.

Pellosi DS, Batistela VR, Souza VR, Scarminio IS, Caetano W, Hioka N. Evaluation of the photodynamic activity of xanthene dyes on *Artemia salina* described by chemometric approaches. An Acad Bras Cienc. 2013;85(4):1267-74.

Pentenero M, Broccoletti R, Carbone M, Conrotto D, Gandolfo S. The prevalence of oral mucosal lesions in adults from the Turin area. Oral Dis. 2008 May;14(4):356-66.

Rossoni RD, Junqueira JC, Santos EL, Costa AC, Jorge AO. Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against *Enterobacteriaceae*. Lasers Med Sci. 2010 Jul;25(4):581-6.

Samaranayake LP, MacFarlane TW. Oral candidosis: John Wright; 1990.

- Scully C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis.* 2003 Jul;9(4):165-76.
- Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today.* 1999 Nov;4(11):507-17.
- Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J Oral Pathol Med.* 2005 Jul;34(6):340-6.
- Sieron A, Namyslowski G, Misiolek M, Adamek M, Kawczyk-Krupka A. Photodynamic therapy of premalignant lesions and local recurrence of laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2001 Sep;258(7):349-52.
- Silva AP, Caruso P, Jaguar GC, Carvalho PA, Alves FA. Oral evaluation and procedures performed by dentists in patients admitted to the intensive care unit of a cancer center. *Support Care Cancer.* 2014 Oct;22(10):2645-50.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2011 May;19(5):241-7.
- Silva SOd, Trentin MS, Linden MSS, Carli JPd, Silveira Neto N, Luft LR. Saúde bucal do idoso institucionalizado em dois asilos de Passo Fundo-RS. *RGO.* 2009;56(3):303-308.
- Sobreiro MM, Ribeiro DG, Silva NR, Souza RF. Efeito fotodinâmico da eritrosina sobre biofilme de *Candida albicans* (Resumo 1508). SIICUSP – Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP; 2014.
- Sternberg ED, Dolphin D, Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* 1998 4/23;54(17):4151-202.
- Stomphorst RG, van der Zwan G, van Zandvoort MA, Sieval AB, Zuilhof H, Vergeldt FJ, et al. Spectroscopic study of erythrosin B in PVA films. *J Phys Chem A.* 2001;105(17):4235-40.
- Sugita T, Kurosaka S, Yajitate M, Sato H, Nishikawa A. Extracellular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiol Immunol.* 2002;46(12):881-3.
- Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol.* 2003;47(5):321-6.

Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, et al. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. *Photochem Photobiol*. 2012 Jan-Feb;88(1):227-32.

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 Feb;93(2):155-60.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006 Aug;51(8):672-80.

Thompson GR, 3rd, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Apr;109(4):488-95.

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 Oct 15;71(1-3):87-98.

Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol*. 2011;3.

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Apr;57(4):680-4.

Anexo

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1156.53.9), intitulado "Protocolo Custo-Efetivo de Terapia Fotodinâmica para o Tratamento das Candidoses Bucais: Estudo pré-clínico", de autoria de **Raphael Freitas de Souza**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 03.10.2012.

Colaboradores: Viviane de Cássia Oliveira;
 Daniela Garcia Ribeiro;
 João Paulo Mardegan Issa

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1156.53.9), entitled: "Protocolo Custo-Efetivo de Terapia Fotodinâmica para o Tratamento das Candidoses Bucais: Estudo pré-clínico", by **Raphael Freitas de Souza** and , is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, October, 3 2012.

Ribeirão Preto, 8 de outubro de 2012.

 Presidente da CEUA
 Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

 Secretária da CEUA
 Maria Angélica Depiro