AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Efeitos da Terapia Fotodinâmica mediada por laser de emissão vermelha e azul
de metileno em vaginite induzida por "Candida albicans"**

Rosa Maria Machado de Sena

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**São Paulo
2013**

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

**Efeitos da Terapia Fotodinâmica mediada por laser de emissão vermelha e azul
de metileno em vaginite induzida por "Candida albicans"**

Rosa Maria Machado de Sena

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2013

Dedico este trabalho à
Maria da Penha Machado Senna, minha querida
mãe, que sempre me incentivou durante mais esta
caminhada...

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e à Universidade de São Paulo (USP) pela oportunidade de realizar minha tese.

À Secretaria Estadual de Ciência e Tecnologia do Estado do Tocantins (SECT) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro por meio do Edital SECT n. 02/2009 - Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde (PPSUS 2008/2009).

À FAPESP pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

Ao Conselho Estadual de Ciência e Tecnologia do Tocantins, pela bolsa concedida por meio do Programa de Apoio à Pós-Graduação *Stricto Sensu* – PAPG.

À Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT), pelo apoio institucional no início deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia da USP pelo apoio e uso de equipamentos destinados a esta pesquisa.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins (IFTO), pelo apoio na realização desta tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir que eu estivesse aqui nesse momento;

A minha orientadora, Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, pelo exemplo de competência e sabedoria, simplicidade e força, uma profissional admirável, sem a qual eu não teria chegado até aqui;

Ao Dr. Renato de Araújo Prates e à Dra. Ilka T. Kato pelos ensinamentos e apoio inestimável no decorrer dessa tese;

Ao Dr. André Machado de Senna, meu irmão, amigo e profissional competente, pelos ensinamentos e apoio durante toda essa trajetória;

À Profa. Dra. Luciana Corrêa pelos importantes ensinamentos em histologia e patologia;

Aos professores: Dra. Nanci do Nascimento, Dra. Martha Marques Ferreira Vieira, Dra. Martha Simões Ribeiro, Dr. Afonso Rodrigues de Aquino, Dr. Rodolfo Politano, Dr. Heitor Francode Andrade Júnior, Dra. Luciana Regina Meireles, Dr. Luis Antonio Albiac Terremoto, Dr. Alberto Saburo Todo, Dra. Maria Aparecida Faustino Pires, Dr. José Carlos Bressiani, cujos ensinamentos técnicos e de vida foram fundamentais para esta caminhada;

Ao Fernando Moreira pelo apoio e aos demais funcionários do ensino;

Aos funcionários do Biotério, pelo acolhimento, em especial à Neide, Mara, Maíra e Cecília;

Aos colegas do CLA, em especial, Débora Picanço Aureliano, Camila dos Santos, Raimundes Oliveira, Antônio José da Silva Santos, Camila Ramos Silva, Caetano Padial Sabino, Tânia Mateus Yoshimura, Sílvia Cristina Nuñez, Luiz Cláudio Suzuki, Alessandra Batista, Amanda M. Afonso, Ana Cláudia Ballet de Cara, Renato Juliani Ribamar Vieira, Fábio, Lucas, Moisés Oliveira dos Santos, Tiago Martini Pereira, Letícia Bonfante Sichieri, Danilo Mariano da Silva, Arthur, Gláucia e demais colegas do CLA;

Aos pesquisadores e funcionários do CLA;

Ao Luis Rosa que sempre tinha a solução para os problemas cotidianos e pelo incentivo; à Marta pelo cafezinho que me mantinha alerta durante os dias de cansaço intenso;

À Dora da biblioteca, ao Sr. João, ao Valtinho e aos funcionários da cantina do IPEN;

Ao meu Pai, Bernardino Turíbio de Senna, que deve estar feliz neste momento e à minha mãe, sempre lutadora, Maria da Penha Machado de Senna;

Aos meus irmãos, Miguel, Carlos, Roque, Lígia, Sueli, Robinson e André;

Ao Henrique Senna, em nome de todos os meus sobrinhos;

Aos meus queridos cunhados pelo importante apoio: Mary Lucia Gomes Silveira de Senna, Maria Márcia Caldas, João Milton Leite;

À tia Olga Barreto Machado Matos;

À minha grande amiga Sílvia Augusta do Nascimento,

Às colegas de moradia em São Paulo, Viviane Danelon, Joice e Sandra

Aos colegas do IFTO de Araguaína pelo apoio nessa longa trajetória entre o Tocantins e São Paulo, em especial, Ronano, Sabrina, Elaine, Rafael, Hebert, Willy, Elvis, Cristina, Ana Cristina, Gilson, Eva, Miguel Amorim;

Aos professores patologistas José Ferreira Menezes Filho e Anelise Ribeiro Peixoto Alencar pelos importantes ensinamentos;

À Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT), nas pessoas dos Presidentes, Aparecido Osdimir Bertolin, Walfredo e Genésio Pessoa de Albuquerque Júnior, pelo apoio inestimável durante suas gestões e aos colegas da FMT, Dayany, Verissa, Douglas, Adriane, Andréa, Fábio e todos os demais amigos da FMT;

A todos aqueles que acima de tudo me incentivaram a manter minha caminhada firme.

Aos meus alunos que sempre me apoiaram, razão maior deste projeto;

Muito Obrigada!!!

Toda caminhada começa com o primeiro passo e em cada tropeço, a oportunidade de seguir outra trajetória...

.... eu escolhi continuar!

EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR LASER DE EMISSÃO VERMELHA E AZUL DE METILENO EM VAGINITE INDUZIDA POR *CANDIDA ALBICANS*

ROSA MARIA MACHADO DE SENA

RESUMO

A candidíase vaginal (CV) é uma doença causada por fungos do gênero *Candida* spp. que acomete milhares de mulheres no mundo. Estima-se que 75% das mulheres sofrerão CV pelo menos uma vez durante a vida fértil, 40 a 50% terão o segundo episódio e 5 a 8% sofrerão a forma recorrente, caracterizada pela ocorrência de quatro ou mais episódios durante um ano. O tratamento ainda permanece um desafio para as candidíases complicadas. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que utiliza substâncias fotossensibilizadoras (FS) e uma fonte de luz, que juntas, produzem espécies reativas de oxigênio, tóxicas para micro-organismos e inofensivas para a célula animal hospedeira. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antifúngicos e anti-inflamatórios da TFD mediada por azul de metileno (AM) e laser de emissão vermelha (LEV) no tratamento da CV em modelo animal. Fêmeas de camundongos BALB/c, com 6 a 10 semanas foram estrogenizadas e, 72h após, receberam via intravaginal 20µL de suspensão contendo 10^7 UFC/mL de *C. albicans* ATCC 90028. Cinco dias após, a TFD foi aplicada na vagina das fêmeas, utilizando AM 1000µM e laser (100mW, 660nm, energia de 36J por 6 min ou duas aplicações de 18J por 3min, com intervalo de 24h entre sessões). Após 0, 24 e 96h foram feitas lavagens vaginais para recuperação fúngica, cultivo microbiológico, eutanásia para remoção das vaginas e estudo histológico. Lâminas coradas por hematoxilina e eosina foram utilizadas para contagem da área de células inflamatórias (ACI), utilizando o programa ImageJ. Os resultados mostraram que TFD *in vivo* reduziu a carga fúngica em aproximadamente 1,6 log UFC/mL e, quando aplicada em duas sessões de 18J por 3min, diminuiu a ACI. A TFD mediada por LEV e AM 1000µM mostra-se como alternativa promissora para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para vaginites fúngicas.

Palavras-chave: Inflamação. Tratamento. Candidíase Vaginal. PDT. Murino.

EFFECTS OF PHOTODYNAMIC THERAPY MEDIATED BY RED LASER AND METHYLENE BLUE APLIED IN INDUCED VAGINITIS BY *CANDIDA ALBICANS*

ROSA MARIA MACHADO DE SENA

ABSTRACT

Vaginal candidiasis (VC) is a disease caused by fungi of the genus *Candida* spp. that affects thousands of women worldwide. It is estimated that 75% of women in childbearing age will have VC at least once, 40 to 50% will have a second episode and 5 to 8 % will suffer recurrent form, characterized by the occurrence of four or more episodes during one year. Treatment remains a challenge for complicated candidiasis. Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic modality that uses photosensitizing (FS) substances and a light source, which together produce reactive oxygen species, toxic to microorganisms and harmless to host animal cell. The aim of this study was to evaluate antifungal and anti - inflammatory effects of PDT mediated by methylene blue (MB) and red laser (RL) in the treatment of CV in an animal model. Female BALB/c mice 6 to 10 weeks were estrous and 72h after received intravaginally 20µL of suspension containing 10⁷ CFU/mL of *C. albicans* ATCC 90028. Five days after, PDT was applied in the vagina of females using MB 1000µM and laser (100mW, 660nm, 36J for 6 min or two applications of 18J for 3 min, with an interval of 24h between sessions). Vaginal washes for fungal recovery and microbiological culture, and euthanasia for removal of vaginas and histological study were made after 0, 24 and 96h. Glass slides stained by hematoxylin and eosin were used for counting the area of inflammatory cells (AIC) using ImageJ software. PDT *in vivo* reduced the fungal burden in approximately 1.6 log CFU/mL, and, when applied in two sessions with 18J for 3min, decreased the AIC. PDT mediated by RL and MB 1000µM shown as a promising alternative for the development of new therapeutic modalities for yeast vaginitis.

Keywords: Inflammation. Therapy. Vaginal candidiasis. PDT. Mouse.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 As infecções fúngicas	17
3.1.1 Candidíases	17
3.2 Candidíase vaginal	17
3.2.1 Prevalência das candidíases vaginais	18
3.3 Fotossensibilizadores e luz	20
3.3.1 Azul de Metileno	21
3.3.2 A terapia fotodinâmica	22
3.3.3 A Resistência à Terapia Fotodinâmica	23
3.4 Modelos animais para estudos terapêuticos	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Aspectos Éticos	25
4.1.1 Avaliação pelo Comitê de Ética	25
4.1.2 Animais e Local de Realização e Condições Gerais	27
4.2- Etapas Experimentais	27
4.2.1 Indução da Vaginite por <i>Candida albicans</i>	27
4.2.2 Estrogenização e indução das fêmeas ao estado de pseudoestro	27
4.2.3 Inoculação de <i>Candida albicans</i> no canal vaginal das fêmeas	27
4.2.4 Preparo do Inóculo e Inoculação das Fêmeas	28
4.3 Confirmação do quadro infeccioso	28
4.3.1 Verificação de aspectos macroscópicos da infecção	28

4.3.2 Análise citológica do conteúdo vaginal	29
4.3.3 Análise microbiológica do conteúdo vaginal.....	29
4.3.4 Eutanásia das Fêmeas e Remoção do Tecido Vaginal.....	30
4.3.5 Análise Histomorfológica Descritiva	30
4.3.5.1 Preparo de cortes e das lâminas.....	30
4.3.6 Microscopia eletrônica de Varredura – MEV	30
4.4 Realização da Terapia Fotodinâmica (TFD).....	31
4.4.1 Realização da TFD com Azul de Metileno 1000 µM	33
4.4.1.1 Protocolo 1	33
4.4.1.2 Protocolo 2.....	34
4.4.2 Laser utilizado	38
4.5 Análise tecidual da inflamação e da infecção produzidas	39
4.5.1 Análises Morfométricas	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Estabelecimento da Vaginite.....	42
5.1.1 Indução do Pseudoestro nas Fêmeas de Balb/C	42
5.1.2 Confirmação do quadro infeccioso.....	44
5.1.2.1 Verificação de sinais macroscópicos da doença nos animais.....	44
5.1.2.2 Análise citológica	47
5.1.2.3 Análise de aspectos histomorfológicos	48
5.1.2.4 Análise da Ultraestrutura do Epitélio Vaginal por MEV	50
5.1.3 Análise Microbiológica da Infecção Produzida e da TFD	51
5.2 Análise por MEV do tecido tratado.....	54
5.3 Realização da TFD com Laser em Sessão Única de 36 J	55
5.4 Realização da TFD com Laser em duas Sessões de 18 J.....	57
5.5 Análise da Reação Inflamatória devida à Infecção e à TFD	61
5.5.1 Análise das células inflamatórias em tecido vaginal	61
5.5.1.1 Células Inflamatórias nas Regiões Anterior e Posterior da Vagina ..	62
5.5.1.2 Células inflamatórias presentes no curso da Infecção e da TFD	68
6 PERSPECTIVAS	72

7 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE 1 Preparo da solução de estrogênio	85
ANEXO 1 Protocolo do Comitê de Ética Animal.....	87

1- INTRODUÇÃO

Candida albicans é um fungo polimórfico que compõe a microbiota do organismo humano. Habita as mucosas do trato gastrointestinal e vaginal (ZHOU et al., 2004; BAENA-MONROY, 2005), podendo causar infecções, as candidíases, normalmente de fontes endógenas, já que é considerado oportunista (SIDRIM e ROCHA, 2004).

As candidíases frequentemente acometem as mulheres. Setenta e cinco por cento delas têm pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal (CVV) durante a vida e 40 a 50% têm dois ou mais desses episódios, enquanto de 5 a 8% delas sofrem de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) (SOBEL, 2007), a forma mais importante da doença.

Apesar de a CVV exigir a presença do fungo para se estabelecer, esta doença apresenta, além da característica infecciosa, uma inflamação associada. Nesse sentido, a CVV pode ser definida como a presença de sinais e sintomas de inflamação na região da vagina e vulva, associada à presença de espécies de *Candida* (*Candida* spp.), na ausência de outras etiologias infecciosas (ACHKAR e FRIES, 2010).

Estudos brasileiros indicam que a espécie mais prevalente nas candidíases vaginais (CV) é *C. albicans*, seguida por *C. glabrata* (GALLE e GIANNINI, 2004; FERRAZA et al., 2005; SENA et al., 2007) que vêm apresentando resistência aos antifúngicos (GALLE e GIANNINI, 2004; BENNET, 2006), inclusive ao fluconazol, que é um fármaco amplamente utilizado no tratamento empírico das CVV.

Tal fato não se dá apenas com candidíases superficiais e a busca por alternativas aos tratamentos existentes tem sido constante, visto que os recursos terapêuticos disponíveis são relativamente poucos, principalmente para as espécies que apresentam resistência (FAN e LIU, 2007).

A terapia fotodinâmica (TFD), do inglês *Photodynamic Therapy* (PDT), consiste no uso de um fotossensibilizador (FS) que, ativado por luz, gera a

formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que provocam a morte de micro-organismos por dano oxidativo (DEMINOVA e HAMBLIN, 2004), e é útil, pois a atividade, que é nociva aos micro-organismos, não lesa significativamente as células humanas (SOUKOS et al., 1996). a TFD também apresenta efeito seletivo em células tumorais (DOUGHERTY et al., 1998) e vem sendo estudada para o tratamento antineoplásico (DOLMANS et al. 2003).

Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que algumas substâncias corantes, tais como o azul de metileno (AM), podem ser ativadas por luz e produzir efeito antimicrobiano contra vários tipos de micro-organismos (PRATES et al., 2008, WILSON, et al., 1992; WAINWRIGHT, 2004; MUNIN et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008).

Estudos *in vivo*, embora mais escassos, também têm sido realizados demonstrando o efeito antimicrobiano do AM e outros corantes quando estão ativados por luz. Como exemplo, roedores como camundongos e ratos foram utilizados em modelos para o tratamento de infecções induzidas por fungos e bactérias e também para cicatrização de feridas (SPERANDIO et al., 2010; DAI et al., 2011; TANAKA et al., 2013, SENNA, 2011).

O azul de metileno é um composto fenotiazínico, amplamente utilizado na histologia como corante, na microbiologia, farmacologia e como fármaco antitumoral e antimicrobiano para TFD. Nesta terapia apresenta bons efeitos sobre infecções provocadas por bactérias, vírus e fungos, com ausência de efeitos colaterais (TARDIVO et al., 2005). Um dos mecanismos propostos para explicar a ação da TFD utilizando AM como fotossensibilizador relaciona-se com a alteração da permeabilidade da membrana plasmática de *Candida albicans* (GIROLDO et al. 2009).

Este fungo, comensal e patogênico, tem sido objeto de estudos experimentais em CV que são muito importantes para o conhecimento da virulência do fungo e da compreensão de fatores relacionados à doença e à terapia apropriada. Vários modelos animais têm sido utilizados para tais fins (FIDEL et al., 1996; BLACK et al., 1999; FIDEL et al., 2000; RAHMAN et al., 2007; NAGLICK et al., 2008).

A experimentação prévia em animais, em fase pré-clínica, geralmente é utilizada antes de um procedimento poder ser utilizado em seres humanos, pois

isso garante mais segurança nos tratamentos, além de atender a demandas éticas exigidas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

O camundongo, segundo Santos (2002) é uma espécie bastante utilizada em estudos, pois é um animal de pequeno porte, que possui prole numerosa, gestação curta, fácil manuseio e baixo custo de manutenção, representando 40% do total de animais empregados em experimentação (CHORILLI et al., 2007).

Quando um animal é selecionado para a pesquisa de uma doença humana, muitas vezes são necessários tratamentos prévios para adaptação da enfermidade ao animal. No caso específico dos camundongos, estudos mostram que para CV as fêmeas devem ser infectadas durante o estro (FIDEL et al., 2000, CLEMONS et al., 2004 HAMAD et al., 2006), fase no camundongo persiste por apenas um dia.

O prolongamento do estro, denominado pseudoestro é realizado mediante o aumento dos níveis estrogênicos na circulação do animal e pode ser realizado mediante administração de estradiol às fêmeas. O tratamento hormonal prévio à inoculação do fungo proporciona condições necessárias para induzir a infecção de forma persistente (RAHMAN et al., 2007) e permitir a realização dos estudos.

Diante da necessidade de novas opções terapêuticas para o tratamento das candidíases vulvovaginais e da escassez de estudos *in vivo* de aplicação da terapia fotodinâmica antifúngica em vaginites surgiu uma lacuna no conhecimento da aplicação da TFD, que pretendemos minimizar com a realização desta pesquisa, pois, no melhor de nosso conhecimento, a literatura não reporta a existência de estudos sobre efeitos da TFD aplicada em vaginites induzidas por *Candida albicans* em fêmeas de camundongos BALB/c.

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral:

Avaliar a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por azul de metileno e laser de emissão vermelha no tratamento de vaginite fúngica, em um modelo murino.

2.2 - Objetivos específicos:

Induzir a vaginite por *Candida albicans* ATCC 90028 em fêmeas de camundongos Balb/C;

Avaliar características laboratoriais e sinais da infecção produzida;

Comparar o efeito antifúngico da terapia fotodinâmica mediada por soluções de azul de metileno sob diferentes concentrações, tendo como fonte de luz um laser de emissão vermelha;

Avaliar o efeito antifúngico da terapia fotodinâmica aplicada em sessão única e em duas sessões na vaginite induzida por *Candida albicans* em BALB/c;

Avaliar a área de células inflamatórias nos tecidos de animais tratados e não tratados, antes e após a aplicação da TFD por análise histomorfométrica.

3- REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 – Candidíase Vaginal (CV)

A vagina humana é um local que contém muitos tipos de micro-organismos, constituindo ambiente propício para a ocorrência de infecções, tais como as fúngicas, cujo principal agente etiológico é *Candida albicans*. Oportunista que é, *Candida albicans* encontra condições apropriadas no ambiente vaginal tanto para manter-se como comensal, ou manifestar-se patogênico, causando a CVV.

Essa doença é a segunda causa de leucorreia infecciosa e estima-se que a doença seja responsável por cerca de 13 milhões de vaginites documentadas anualmente em mulheres norte americanas (COLOMBO et al., 2013).

A presença de *Candida albicans* e de outros organismos ocorre não apenas quando há processos infecciosos. Várias espécies de *Candida* (*Candida* spp.), bactérias anaeróbias facultativas ou estritas e aeróbias compõem a microbiota vaginal endógena de mulheres, como os *Lactobacillus* spp., presentes neste ecossistema que metabolizam o glicogênio, produzem ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico que confere ao meio um pH caracteristicamente baixo, entre 3,8 e 4,5 (MIJAC et al., 2006). Estes bacilos, geralmente são encontrados na presença de estrogênio, seja residual da mãe, que persiste até os dois meses de vida, ou o produzido pela própria mulher, da menarca à menopausa, durante sua vida fértil (FARAGE e MAIBACH, 2006).

As vaginites causadas por *Candida* spp. provocam sintomatologia diversa, que pode incluir prurido, dor, mudanças na secreção vaginal, dispareunia, eritema vulvar, edema e fissuras (SOBEL, 1997). Tais vaginites podem ser classificadas em complicadas e não complicadas. Dentre as CVV complicadas, a forma recorrente (CVVR) é caracterizada quando ocorrem quatro ou mais episódios da doença durante o período de 12 meses, podendo ser causada por *C. albicans* e espécies não-*albicans*, porém, o tratamento em ambos os casos é

mais difícil (SOBEL, 2007). Eschenbach (2004) apresentou uma classificação didática para estas vaginites fúngicas, que se encontra transcrita na TAB.3.1.

TABELA 3.1 – Classificação das Candidíases Vaginais

Classificação da Vaginite por <i>Candida</i> spp.		
Variável	Descomplicada ¹	Complicada ²
Severidade dos sintomas	Branda ou moderada	Severa
Frequência	Esporádica ou infrequente	Recorrente
Organismo	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i> e <i>C. não-albicans</i>
Fatores do Hospedeiro:		
Função Imune	Normal	Anormal ³
Status de Gravidez	Ausente	Presente

¹. Mulher apresenta todas essas características.

². Mulher pode apresentar qualquer uma dessas características.

³. Diabetes mellitus descontrolada ou imunossupressão.

Fonte: Adaptado de ESCHENBACH, 2004.

Independente de haver infecção, várias espécies de *Candida* podem estar presentes em 10 a 55% das mulheres assintomáticas, dependendo de fatores como atividade sexual, idade, sensibilidade da metodologia analítica, presença da forma recorrente, presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e gravidez (ECKERT et al., 1998; GIRALDO et al., 2000; LEON et al., 2002).

Aliados à presença de *Candida* spp. vários fatores predispoem as mulheres à CVV, tais como: o alto teor de glicogênio nas células epiteliais da vagina, a gravidez, o uso de antibióticos de amplo espectro e de anticoncepcionais com alto teor estrogênico, a reposição estrogênica, o uso de imunossupressores e o tipo de roupa íntima usada e estresse. Nas semanas precedentes às menstruações, a CVV pode manifestar-se várias vezes (SIDRIM e ROCHA, 2004, EHRSTROM et al., 2007), tendo como agente etiológico principal *Candida albicans*, que pode estar presente também sob a forma de infecções mistas com outras espécies de *Candida*, ou com outros micro-organismos como bactérias e protozoários (SENA et al., 2007 SOBEL et al., 2013).

Estudos de prevalência de infecções vaginais por leveduras publicados no Brasil entre os anos de 2004 e 2007 mostram a maior ocorrência da espécie

C. albicans, tendo como segunda espécie, a *C. glabrata* ou *C. guilhermondii*, todas, leveduras da microbiota residente do homem (GALLE e GIANNINI, 2004; FERRAZA et al., 2005; SENA et al., 2007).

Candida albicans, se comparada com outros patógenos, possui habilidade especial de sobreviver em diferentes sítios, sob condições ambientais diversas, causando um espectro de doenças que superam outros micro-organismos comensais como *Escherichia coli* (CALDERONI e FONZI, 2001).

Tal fato não se dá apenas com candidíases superficiais e a busca por alternativas às terapias existentes tem sido constante. Os recursos terapêuticos disponíveis são relativamente poucos, principalmente para as estirpes não sensíveis de *Candida albicans* e também para espécies não-*albicans* que resistentes de forma inata, ou dependentes da dose aplicada do tratamento antifúngico (BAUTERS et al., 2002; FAN e LIU, 2007).

As candidíases vaginais não complicadas, que representam cerca de 90% dos casos, possuem tratamento relativamente simples que pode ser realizado por meio de aplicação tópica de antifúngicos como butoconazol, clotrimazol, miconazol, tioconazol, terconazol e nistatina e também em dose única de 150 mg de fluconazol por via oral, sem apresentar diferença nos tratamentos (ACHKAR e FRIES, 2010). Contudo, segundo Kothavade et al. (2010), o fluconazol, fármaco amplamente utilizado no tratamento de infecções fúngicas, não deve ter seu uso continuado em pessoas com candidíases repetitivas.

De fato, as candidíases complicadas exigem um tratamento diferenciado, geralmente durante um período maior, muitas vezes necessitando de administração do medicamento por via oral e mediante a correta identificação da espécie e do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos (ACHKAR e FRIES, 2010).

Não obstante a necessidade de correto diagnóstico para a adequada terapêutica, alguns fármacos utilizados no tratamento das vaginites por *Candida* spp. possuem venda isenta de receita médica, tanto nos Estados Unidos (ACHKAR e FRIES, 2010), quanto no Brasil (ANVISA, 2013). Esse fato é um problema, pois mesmo quando o diagnóstico é realizado por médicos, ocorrem alguns equívocos e o autodiagnóstico possui erros ainda maiores, levando a falhas importantes no tratamento (LINHARES et al., 2005).

Nesse sentido, considerando que o objetivo do tratamento da CVV é o rápido e completo alívio dos sinais e sintomas da inflamação vulvovaginal, juntamente com a prevenção de futuras recorrências (PAPPAS et al. 2009), as estratégias de tratamento dessa doença necessitam ser aperfeiçoadas.

Diante desses fatos, outros arsenais terapêuticos são procurados a fim de se estabelecer um tratamento para candidíases vulvovaginais e outras formas dessa micose, sobretudo as complicadas.

3.2- Fotossensibilizadores e luz

Oscar Raab (1900) foi responsável por uma das primeiras aplicações científicas de substâncias corantes e luz, quando utilizou acridina sobre o protozoário *Paramecium*, sob luz e oxigênio e demonstrou a morte deste organismo em tais condições.

Vários estudos foram realizados desde então, principalmente com foco na atividade fototóxica da TFD para o câncer, utilizando fotossensibilizadores derivados de porfirinas. No final do século XX, a agência reguladora de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos, o FDA (*Food and Drug Administration*), aprovou o uso da terapia fotodinâmica para tratar lesões pré-cancerígenas dermatológicas (MALIK, MANOCHA, SURESH, 2010).

3.2.1 – Azul de Metileno

O azul de metileno é um composto químico corante, cuja banda absorção se dá entre 500 e 700 nm (TARDIVO et al. 2005), e embora esta banda seja relativamente larga, apresenta picos de absorção máxima em dois pontos: 609 e 668 nm (BUDAVARI, 1996), que podem variar, dependendo, dentre outros fatores, do tipo de solvente empregado e da concentração do FS na solução (NUNEZ, 2007).

Quimicamente, o azul de metileno, também denominado cloreto de metiltionínio, é o cloreto de 3,7 bis (dimetilaminofenotiazina). Este fármaco possui massa molecular de 319,86 g/mol na forma anidra e forma dímeros na presença de vários sais inorgânicos. Laboratorialmente é usado como corante e indicador

nas reações de oxirredução; na medicina, como medicamento de uso interno para tratar a metahemoglobinemia e como antídoto nas intoxicações por cianeto e do nitrato. Enquadra-se na categoria de desinfetante e antisséptico (BUDAVARI, 1996; ANVISA, 2013) e, embora já tenha sido considerado obsoleto para este fim (GENNARO, 1985), o azul de metileno, ainda pode ser encontrado no mercado brasileiro compondo uma especialidade farmacêutica utilizada como antisséptico urinário de uso humano.

3.2.2 A terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica consiste no uso de um fotossensibilizador que, ativado por luz, gera a formação de espécies reativas de oxigênio que provocam a morte de micro-organismos por dano oxidativo (HAMBLIN e HASAN, 2004). Esta terapia vem sendo bastante utilizada, pois a atividade, que é nociva aos micro-organismos, não lesa significativamente as células humanas (SOUKOS *et al.*, 1996).

Um FS possui a capacidade de absorver a luz na presença de oxigênio e produzir espécies reativas de oxigênio. Quando o FS absorve luz, vai para um estado excitado e suas moléculas podem voltar ao estado fundamental e liberar energia sob a forma de fluorescência ou calor, ou ainda, migrar para o estado denominado tripleto. Um bom FS possui meia vida longa neste estado. Desta forma, as moléculas do FS podem sofrer reações, formar radicais livres, espécies reativas de oxigênio e também oxigênio singleto que reagem com componentes das células, provocando a morte celular (JOSEFSEN e BOYLE, 2008).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que algumas substâncias corantes, tais como o azul de metileno (AM), podem ser ativadas por luz e produzir efeito antimicrobiano (SOUZA, R. *et al.*, 2010; TANAKA *et al.*, 2010; DAI,T; De Arce *et al.*, 2011; CHIBEBE *et al.*, 2013; PRATES *et al.*, 2013) contra vários tipos de micro-organismos (WILSON, DOBSON E HARVEY, 1992; KOMERIK *et al.*, 2003, WAINWRIGHT, 2004; MUNIN *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2008, GONZALEZ e MAISH, 2012). Isoladamente, a luz ou FS não produzem efeito.

De fato, desde os últimos anos do século passado, junto às pesquisas da TFD antineoplásica, estudos sobre a terapia fotodinâmica antimicrobiana vêm sendo realizados, apresentando bons resultados de inativação microbiana, tanto em bactérias (WAINWRIGHT, 1998; DEMINOVA e HAMBLIM, 2004; PRATES et al., 2007; GARCEZ et al., 2013), como em fungos (GIROLDO et al., 2009; DOVIGO et al., 2010 e 2011) e protozoários (BARBOSA et al., 2012) usando também, outras substâncias fotossensibilizadoras além do AM, como azul de toluidina, verde malaquita, eritrosina (VILELA et al., 2012; SOUZA, R. et al, 2010, LEE et al. 2012).

A TFD pode inativar fungos como *Candida albicans* e espécies não-*albicans* (GIROLDO et al., 2009; DOVIGO et al., 2010). Entretanto, espécies fúngicas mais resistentes ao tratamento farmacológico tradicional, como *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* parecem possuir menor sensibilidade a esta terapia, e, por vezes, sua utilização apenas reduz a viabilidade celular dessas leveduras (DOVIGO et al., 2010), dependendo, sobretudo, dos parâmetros utilizados (PRATES et al., 2010).

A ausência de resistência tem sido apontada como característica diferencial na TFD em relação aos tratamentos antimicrobianos clássicos (TAVARES et al., 2010), porém, em 2013, Shih e Huang perceberam após sucessivas sessões subletais de TFD em *Pseudomonas aeruginosa* com diferentes expressões de resistência aos antimicrobianos, que a cepa mais resistente aos antimicrobianos e inicialmente mais sensível à TFD, apresentou-se resistente à terapia.

Em 2005 já se verificavam várias publicações acerca da atividade *in vitro* da TFD sobre bactérias Gram positivas e negativas, assim como sobre parasitas, protozoários, vírus e fungos, porém havia escassez necessidade de estudos clínicos e em modelos animais e com potencial aplicação em doenças localizadas como em casos de sinusites e doenças genitais femininas (O'RIORDAN, et al., 2005).

3.3 Modelos animais para estudos terapêuticos

Para um melhor entendimento das doenças, das respectivas terapias e das interações entre patógeno-hospedeiro, muitos modelos animais têm sido propostos, com vantagens e desvantagens em cada espécie empregada (KIRKPATRICK, et *al.*, 2013). Desde a era de Pasteur, modelos animais vêm sendo utilizados em pesquisas e vários avanços da medicina decorrem desses estudos (CAPPILLA et *al.*, 2007).

Segundo Fagundes e Taha (2004), um modelo animal deve permitir o estudo dos fenômenos biológicos ou de comportamento do animal; que um processo patológico, ainda que induzido, possa ser pesquisado e que existam semelhanças entre o fenômeno no animal e no homem.

A experimentação animal permitiu grande parte do conhecimento atual na área de ginecologia e obstetrícia, incluindo o entendimento do sistema reprodutor feminino. Vários modelos são criados para estudar processos fisiológicos e patológicos na mulher (SIMÕES et *al.*, 2011), mas os resultados fornecidos pelo modelo animal, não podem ser automaticamente extrapolados para o ser humano.

Estudos experimentais de CV tem se mostrado muito úteis tanto na identificação de fatores relacionados às influências hormonais na infecção, como também nos estudos de virulência dos fungos e nos fatores relacionados ao tratamento da doença (FIDEL et *al.*, 1996; BLACK et *al.*, 1999; FIDEL et *al.*, 2000; RAHMAN et *al.*, 2007; NAGLICK et *al.*, 2008, FURR et *al.*, 2009). Primatas e, principalmente, ratos e camundongos tem sido utilizados nessas pesquisas (De BERNARDIS et *al.*, 1997; STEELE et *al.*, 1999; CARRARA et *al.*, 2010, MARTINS et *al.*, 2011, MOSCI et *al.*, 2010,). Desses, o camundongo é o principal animal utilizado. No entanto, candidíase não acontece naturalmente nas fêmeas de camundongos, pois as espécies de *Candida* não compõem a microbiota vaginal desse animal.

Além disso, o ciclo reprodutivo dos camundongos, denominado ciclo estral, é de 4 a 5 dias, diferente do ciclo menstrual da mulher, cuja duração é de cerca de 28 dias (CALIGIONI, 2009). A fase do estro na fêmea do camundongo

corresponde ao período no qual os níveis estrogênicos encontram altos e haveria susceptibilidade à candidíase vaginal, mas dura cerca de um dia, período curto para os estudos.

Quando é necessário o uso de modelo murino deve ser realizada a indução de um estado de estro persistente, denominado pseudoestro, por meio da administração do estrogênio, antes da inoculação do fungo (FIDEL et al., 2000; RAHMAN et al., 2007; CARRARA et al., 2010).

O estrogênio converte o tecido epitelial colunar para um epitélio escamoso estratificado espesso, com aumento do teor de glicogênio e substratos de crescimento que aumentam a avidéz da levedura pelo tecido e promove o crescimento fúngico (KINSMAN e COLLARD, 1986).

Na ausência do pseudoestro, a infecção pode até ser estabelecida, mas declina-se totalmente em cerca de uma a duas semanas. Para o estabelecimento de uma infecção persistente é necessária a injeção semanal do hormônio (KINSMAN e COLLARD, 1986; FIDEL et al., 1993).

O estabelecimento de um modelo e o conhecimento das relações entre patógeno-hospedeiro dele decorrentes nem sempre são simples. Uma das formas de melhor compreender as interações entre os mesmos, advém do conhecimento e a visualização tanto da estrutura superficial como a ultraestrutura do tecido normal da vagina do animal, que pode ser realizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LAMB et al., 1997) e então verificar as mudanças ocorridas no tecido infectado, para o melhor entendimento no processo de patogenia das espécies de *Candida* (JAYATILAKE, 2010).

4- METODOLOGIA

A metodologia adotada abrangeu três etapas: o desenvolvimento da infecção fúngica na fêmea e a seleção da concentração do fotossensibilizador, a TFD em uma sessão e a TFD em duas sessões. A metodologia utilizada é descrita abaixo.

4.1- Aspectos Éticos

4.1.1- Avaliação pelo Comitê de Ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN-CNEN/SP, sob número 38/2009 (ANEXO I)

4.1.2- Animais e Local de Realização e Condições Gerais dos Experimentos

Os experimentos desenvolvidos neste projeto foram realizados no Laboratório de Terapia Ótica (LATO), localizado no Centro de Lasers e Aplicações (CLA) e no Biotério, ambos do Ipen. Foram utilizadas fêmeas de camundongos Balb/C, com 6 a 10 semanas de idade, e de 25 g a 30 g de massa corpórea, provenientes do mesmo biotério. A metodologia foi baseada nos estudos de Fidel (2000), Taylor (2005) e Rahman (2007).

As fêmeas foram mantidas em mini-isoladores e receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental e foram expostas a ciclos diários de 12 horas de luz e 12 no escuro, em temperatura ambiente.

FIGURA 4.1 - Gabinete contendo mini-isoladores com fêmeas de Balb/c que participaram dos experimentos

A figura apresenta as fêmeas de camundongos abrigadas em mini-isoladores no Interior de gabinete que contém dispositivos de controle de condições ambientais, como luminosidade, temperatura, umidade e conta com sistema de exaustão.

Os animais foram anestesiados com solução de quetamina associada à xilazina, por meio de injeção intraperitoneal antes da realização de todos os procedimentos experimentais, exceto a estrogenização (FIG. 4.2).

FIGURA 4.2 – Anestesia Intraperitoneal das Fêmeas

4.2- Etapas Experimentais

4.2.1- Indução da Vaginite por *Candida albicans*

A indução da CV é condição básica para o desenvolvimento dos estudos. Para tanto, os procedimentos executados foram os descritos a seguir.

4.2.2- Estrogenização e indução das fêmeas ao estado de pseudoestro

O pseudoestro foi induzido por meio da estrogenização das fêmeas. Uma solução de estrogênio com concentração de um mg/mL foi preparada a partir da solubilização de 17- valerato de β -estradiol (Sigma ®, EUA) em óleo de sésamo LIPO®, também conhecido como óleo de gergelim. Esta solução foi esterilizada através de filtração em membrana microporosa de 0,22 μ m e foi acondicionada, sob condições assépticas em recipiente estéril (APÊNDICE 1). Cada camundongo recebeu 0,1 mL da solução injetados por via subcutânea, correspondentes a uma dose de 0,1 mg/animal semanalmente, durante todo o período experimental. A estrogenização foi realizada a partir da adaptação dos trabalhos de Fidel *et al.* (2000) e Rahman *et al.* (2007).

4.2.3- Inoculação de *Candida albicans* no canal vaginal das fêmeas

Setenta e duas horas após a estrogenização, as fêmeas já desenvolvem o estado de pseudoestro e estão aptas a serem infectadas (FIDEL *et al.*, 1993). Desta forma, um inóculo contendo cerca de 10^7 UFC/mL (HAMAD *et al.*, 2006) de *C. albicans* da linhagem ATCC 90028, mantida no LATO, foi preparado para infectar as fêmeas e induzir nestas a vaginite fúngica (VF).

4.2.4- Preparo do inóculo e Inoculação das Fêmeas

O inóculo foi preparado a partir células de *C. albicans* cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) *overnight* a 37°C. Posteriormente foram suspensas em solução salina tamponada fosfatada, neste trabalho denominada salina tamponada (ST), e homogeneizadas em agitador tipo Vortex. A concentração foi estimada por meio da turbidez da suspensão que foi medida por espectrofotômetro em 540 nm, com transmitância ajustada entre 11 e 15%, correspondentes à concentração de cerca de 10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro) (PFALLER *et al.*, 1988).

O controle de cada inóculo preparado foi realizado por meio do cultivo em ASD. Posteriormente foi realizada contagem microbiológica, segundo metodologia proposta por Jett *et al.*, (1997).

A inoculação foi realizada 72h após estrogenização. Para tal, foram retirados 20 µL da suspensão de *Candida albicans* recém-preparada e inseridos no canal vaginal através de do uso de micropipetas (FIDEL *et al.*, 2000). O procedimento foi realizado sob prévia anestesia e cada camundongo foi mantido pela cauda, com a cabeça invertida por 5min para que não houvesse extravasamento do inóculo. A seguir as fêmeas foram colocadas em mini-isoladores individuais, em decúbito dorsal até o retorno do efeito do anestésico.

4.3- Confirmação do quadro infeccioso

A confirmação do estabelecimento do quadro infeccioso se deu mediante as seguintes etapas:

4.3.1 - Verificação de aspectos macroscópicos da infecção

Após a inoculação de *C. albicans*, as fêmeas foram observadas diariamente a fim de se verificar a presença de sinais macroscópicos da infecção tais como a presença de secreção e eritema, edema. Também foram observados aspectos anatômicos do aparelho reprodutor do animal a fim de serem

observadas possíveis alterações em função da doença ou do tratamento proposto.

4.3.2 - Análise citológica do conteúdo vaginal

A análise citológica direta permite, antes de se obter o resultado da cultura microbiológica, verificar se há presença da *Candida albicans* e em qual morfologia se encontra; os tipos de células epiteliais presentes e a fase do ciclo estral do camundongo, no momento da coleta.

Para esta análise, alíquotas do lavado foram dispostas sobre lâminas de vidro cobertas por lamínulas e levadas ao microscópio ótico com contraste de fase e analisadas com a objetiva de 40 vezes (CARRARA *et al.*, 2010).

4.3.3 - Análise microbiológica do conteúdo vaginal

A infecção fúngica foi confirmada mediante a recuperação e contagem dos micro-organismos, 5 dias após a inoculação das suspensões das leveduras. Inicialmente, as fêmeas foram anestesiadas com uma solução contendo quetamina associada à xilazina. Após, foi efetuada a recuperação do conteúdo fúngico presente, mediante o uso da técnica de lavagem do conteúdo vaginal. Para tanto, 50 µL de salina tamponada foram retirados de tubos Ependorff contendo 200 µL desta solução, com o auxílio de micropipetas. Esse volume foi introduzido no canal vaginal das fêmeas e aspirado repetidas vezes. Posteriormente o conteúdo obtido foi reinserido no tubo, e homogeneizado em agitador tipo vortex. O conteúdo dos lavados de cada animal foi adicionado em placas de 96 poços e foram feitas diluições seriadas até 10^{-4} . O conjunto de diluições foi disposto em gotas de 10 µL que foram escorridas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante cerca de 28h e posteriormente foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), segundo metodologia proposta por Jett *et al.* (1997).

4.3.4. - Eutanásia das Fêmeas e Remoção do Tecido Vaginal

Após a lavagem do canal vaginal, ainda sob efeito da anestesia, as fêmeas foram eutanasiadas em câmara de CO₂ (AVMA, 2013) e, mediante técnicas cirúrgicas, o canal vaginal foi retirado e armazenado em formalina tamponada a 10% para realização de análises histológicas e de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.3.5 - Análise Histomorfológica Descritiva

4.3.5.1 Preparo de cortes e das lâminas

Os tecidos vaginais armazenados em formalina foram utilizados para a confecção de lâminas. Os canais vaginais foram cortados longitudinalmente e submetidos técnicas histológicas e mantidos em blocos de parafina. Posteriormente, mediante técnicas histológicas foram realizados cortes de 5 µm que foram preparados e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e submetidos ao Ácido Periódico de Shiff (PAS), para verificação das respostas teciduais advindas da presença da infecção e/ou inflamação devidas à vaginite por *C. albicans* (BLACK *et al.*, 1998).

Nesta fase preliminar houve apenas a análise qualitativa verificando-se a presença de infiltrados inflamatórios nos tecidos (HE) e a presença de hifas e leveduras (PAS) nos tecidos coletados de dois animais doentes e dois tratados com a terapia fotodinâmica utilizando como fotossensibilizador o azul de metileno na concentração de 1000 µM.

4.3.6 – Microscopia eletrônica de Varredura – MEV

O canal vaginal foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de se confirmar a presença do fungo e observar possíveis interações deste com o tecido epitelial nos animais doentes e submetidos à TFD.

O tecido vaginal foi previamente preparado por desidratação em soluções hidroalcoólicas em concentrações crescentes de álcool etílico (Merck PA 99,5%): (40, 60, 80, 95 e 100%) e foram fixadas com ouro-paládio e observadas em microscópio eletrônico de varredura Phillips XL-30 (HARRIOT *et al.*, 2010). Para a realização deste experimento, foram utilizados tecidos vaginais de duas fêmeas do grupo controle, com infecção recuperada e duas do grupo tratado com TFD 1000 μ M.

4.4- Realização da Terapia Fotodinâmica (TFD) com diferentes concentrações do fotossensibilizador:

A TFD foi realizada em 3 etapas. Na etapa inicial 20 animais foram divididos em 4 grupos, sendo um grupo controle, com animais contaminados e não tratados, e outros 3 grupos com animais tratados com TFD, porém cada grupo recebeu concentrações diferentes de AM e foram denominados controle 0 μ M (5), TFD 100 μ M (5), TFD 500 μ M (5) e TFD 1000 μ M (5) (FIG. 4.4).

FIGURA 4.4- Solução salina tamponada e soluções com concentrações crescentes do fotossensibilizador azul de metileno.

As fêmeas foram anestesiadas e, a seguir, os animais receberam 20 μ L da solução aquosa de AM por via intravaginal (IV) em uma das seguintes concentrações: 100 μ M, 500 μ M e 1000 μ M. Um grupo controle recebeu a mesma

alíquota de solução salina tamponada. As soluções permaneceram no canal vaginal por 10 min, aguardando o tempo de pré-irradiação (FIG. 4.5) e o excesso do AM foi retirado mediante leve contato de uma tira de papel de filtro estéril.

FIGURA 4.5 – Azul de metileno no canal vaginal de fêmeas de Balb/c

A figura apresenta a fêmea de Balb/C após a inoculação do fotossensibilizador. Observa-se que o animal fica suspenso pela cauda para que o líquido atinja todo o canal vaginal.

A ponteira foi posicionada na entrada do canal vaginal e houve irradiação, com os seguintes parâmetros: laser de emissão vermelha, comprimento de onda (λ) de 660 nm, com potência regulada e aferida em 100 mW, modo contínuo e tempo de 360s.

Inicialmente, os experimentos foram conduzidos para testar o modelo de candidíase vaginal a ser utilizado, a metodologia para a aplicação da TFD e a seleção da concentração do FS a ser utilizada.

Nesta etapa, houve a indução do pseudoestro, mediante estrogenização das fêmeas, seguida pela inoculação de suspensão de *Candida albicans* 72h após, citologia e TFD cinco dias após. No 6º dia, ou seja, 24h após a TFD houve o controle do tratamento e da infecção: recuperação microbiológica e cultivo em ASD para contagem das UFC/mL um esquema do experimento pode ser visualizado na FIG 4.6.

4.4.1 - Realização da TFD com Azul de Metileno 1000 μ M com entrega de energia em uma ou duas sessões

A partir do estudo anterior, os experimentos foram conduzidos da seguinte forma: para verificar os efeitos da TFD, a indução do estro e da vaginite foram mantidas. A concentração da solução de azul de metileno utilizada foi de 1000 μ M e tempo de pré-irradiação de 10 min. Abaixo estão descritos os grupos experimentais (TAB.4.1) e os protocolos utilizados (TAB.4.2).

TABELA 4.1- Grupos Experimentais da TFD
Aplicada em Camundongos Balb/c com vaginite induzida por *C. albicans*

Grupo	Sigla
Salina Tamponada	F-L-
Laser	F-L+
AM	F+L-
TFD	F+L+

4.4.1.1 Protocolo 1

A energia entregue pelo laser foi realizada em sessão única de 36 J, e o tempo de irradiação foi de 6 min.

A recuperação microbiológica da infecção foi realizada no 5º, 6º e no 9º dia após a inoculação, correspondentes, neste trabalho aos momentos aqui denominados imediato ou 0h, 24h e 96h, ou seja, imediatamente após a TFD considerou-se o momento 0h.

Neste experimento foram incluídos mais dois grupos controle: laser e AM. Estes foram submetidos aos controles microbiológico e histológico 24h após a TFD (FIG. 4.7).

4.4.1.2 Protocolo 2

O grupo submetido ao protocolo 2 recebeu a energia fracionada, a entrega da luz ocorreu em duas sessões de 18 J durante 3 min com espaço de 24h entre os tratamentos efetuados. A recuperação microbiológica foi efetuada 24 horas após o término do tratamento, ou seja, após a última sessão de TFD.

O canal vaginal das fêmeas foi irradiado com os seguintes parâmetros: comprimento de onda 660nm, potência de 100 mW, modo contínuo, aplicação pontual, energia de 18J e tempo de aplicação de 3 min em duas sessões (FIG. 4.8).

TABELA 4.2- Parâmetros utilizados no tratamento com TFD de camundongos fêmeas com vaginite induzida por *Candida albicans*

Fonte de Luz Laser	Protocolo	Pré-irradiação (min)	λ (nm)	Tempo (s)	Potência (mW)	Energia (J)	Sessões	Tempo entre sessões
Diodo Arseneto de Gálio e Alumínio	1	10	660	360	100	36	1	
	2	10	660	180	100	18	2	24h

FIG 4.6 - Protocolo de Indução de CV em Balb/C para teste da TFD e para a seleção da concentração do fotossensibilizador

*0h sempre corresponde ao final do protocolo de tratamento

FIG. 4.7 - Protocolo de Tratamento de CV em Balb/C com uma Sessão de TFD 1000μM de AM e Controles em 0, 24 e 96h.

*0h sempre corresponde ao final do protocolo de tratamento

FIG. 4.8 - Protocolo de Tratamento de CV em Balb/C com duas sessões de Terapia Fotodinâmica

4.4.2 - Laser utilizado

O laser utilizado nos experimentos é da marca DMC, modelo Photon Lase III e apresenta as seguintes configurações: meio ativo de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs); comprimento de onda 660 nm e potência de 100 mW (FIG. 4.9). Antes de cada experimento, a potência do laser foi aferida por meio do instrumento *Laser Check Power Meter*, marca – *Coherent*® (FIG. 4.10).

FIGURA 4.9 – Equipamento Laser utilizado nos experimentos

A figura apresenta o aparelho de laser utilizado nos experimentos. Os parâmetros utilizados foram: laser de diodo (GaAlAs, Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil), $\lambda = 660$ nm, 100 mW. O tempo variou conforme o protocolo utilizado.

FIGURA 4.10 – Aparelho utilizado para aferição do Laser

Calibrador utilizado antes de cada experimento para aferição da Potência do Laser: *Laser Check Power Meter*, marca – *Coherent*®

4.5- Análise tecidual da área inflamatória e da infecção produzidas

4.5.1 Análise Morfométrica

A análise das células inflamatórias foi realizada nas lâminas coradas em HE. Foi calculada a porcentagem da área de núcleos de células inflamatórias. Para tal, o canal vaginal em corte transversal foi esquematicamente dividido em três partes: anterior (A), média (M) e posterior (P) e foram usados os terços anterior e posterior de ambos os lados da luz do canal vaginal. Em média, 12 diferentes regiões de cada animal foram selecionadas para a análise, conforme esquema mostrado na FIG 4.11.

FIGURA 4.11- Esquema utilizado na análise morfométrica de tecido vaginal de fêmeas de camundongo BALB/c

A figura apresenta imagem de corte longitudinal do canal vaginal, seccionado virtualmente em três partes: A (anterior) M (média) e P (posterior) para a análise morfométrica. Foram coletadas e digitalizadas seis imagens nas partes A e P, acima e abaixo da luz (seta) do canal vaginal, totalizando 12 imagens para cada animal. Coloração: HE. Aumento original de 100x.

Inicialmente, campos histológicos foram digitalizados utilizando-se microscópio Leica DM2500 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e sistema de digitalização composto por câmera Leica DFC 295 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e software de aquisição e morfometria LAS® (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). A intensidade de luz foi padronizada em todas as digitalizações. As imagens digitalizadas foram mantidas com formato RGB, resolução de 2048X1536 pixels e extensão jpg. Cada animal teve 12 campos analisados, sendo 6 coletados da região A e 6 da região P. Inicialmente a seleção da região foi realizada no aumento de 100x e posteriormente a leitura foi realizada no aumento de 400x.

As imagens digitalizadas foram submetidas ao processo de deconvolução da cor utilizando *plugin (Colour deconvolution)* no programa ImageJ. O método foi criado para cortes histológicos por Ruifrok e Johnston (2008) e disponibilizado sob a forma de *plugin* para o ImageJ por Landini (2010) e consiste na separação matemática de cores do espectro RGB (*red, green, blue*) em imagens com combinações de até 3 cores diferentes. Essa separação não depende da escolha dos tons de cinza no espectro (*Thresholding*) e pode ser personalizada a partir da seleção de uma região de interesse e da vetorização dessa região (ROI). O *plugin* já oferece o modo de separação “HE”, útil para a separação da eosina e da hematoxilina.

Os campos foram selecionados a partir de um corte de cada animal, elegendo a área com maior número de células inflamatórias na região. A digitalização foi realizada de forma padronizada, conforme já descrito. Essas imagens foram então abertas no software ImageJ e, a partir da escolha do método de separação “HE” no item “Deconvolução de cor”, foram geradas duas imagens diferentes, uma equivalente à coloração da hematoxilina e outra, da eosina. A imagem da hematoxilina foi utilizada para quantificação. Por intermédio do histograma (*Thresholding*), o intervalo de tons definidor dos núcleos das células inflamatórias foi selecionado. Como os núcleos das células inflamatórias exibem tons mais fortes de azul em relação àqueles definidores das demais células, como fibroblastos, células endoteliais, foi possível selecionar a grande maioria das células inflamatórias (polimorfonucleares, mononucleares e

mastócitos). Esse intervalo foi utilizado para todos os cortes, com mínimas variações. A área desses núcleos foi normalizada pela área total examinada, obtendo-se a porcentagem de núcleos selecionados.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados seguindo a ordem utilizada no capítulo metodologia e serão discutidos na medida em que forem expostos.

5.1- Estabelecimento da Vaginite

Este estudo empregou 100 animais, conforme descrito na TAB. 5.0.

TABELA 5.0- Animais utilizados nos experimentos

Efeitos da Terapia Fotodinâmica em Vaginite Induzida por <i>Candida albicans</i>								
Relação de animais utilizados								
	Controle	F-L-	F+L+	F-L+	F+L-	Sadio	Morte	n
Protocolo I	24h	5	15					20
	0h	6	6					12
Protocolo II	24h	6	6	6	6			24
	96	6	6					12
Protocolo III	24h	6	6	6	6			24
Outros						5	3	8
Total								100

O número inicial era de 100 fêmeas, distribuídas em três protocolos distintos, porém, três destas morreram durante os experimentos, devido a causas independentes da CV. Cinco animais sadios foram utilizados para controle negativo.

5.1.1- Indução do Pseudoestro nas Fêmeas de BALB/c

O estudo histológico mostrou que o estímulo estrogênico induziu o estado de pseudoestro necessário aos experimentos. Nas FIG. 5.1 e 5.2 é possível visualizar o epitélio escamoso estratificado e, junto à luz vaginal, camada córnea, ambos característicos dessa fase do ciclo reprodutivo da fêmea do camundongo.

FIGURA 5.1 - Fotomicrografia de corte de canal vaginal de fêmea de camundongo BALB/c após estrogenização.

A figura mostra a presença de camada espessa do estrato córneo (EC) e queratina (Q) na luz da vagina, ambas fortemente coradas pela eosina na cor rósea, características fase do estro do ciclo reprodutivo do camundongo. Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento original de 100x.

FIGURA 5.2 Fotomicrografia de corte tecido vaginal de fêmea de camundongo BALB/c após estrogenização.

A figura apresenta as células sobrepostas do epitélio escamoso estratificado (EEE), a camada espessa do estrato córneo (EC) fortemente corado de rosa e, à direita, a luz do canal vaginal, contendo células epiteliais cornificadas (CE), desprovidas de núcleo. O conjunto caracteriza o pseudoestro induzido. Coloração: HE. Aumento original de 400x.

Os resultados mostram que houve a formação da camada córnea, característica dessa fase do ciclo. A indução do pseudoestro permanente e o alongamento hormonal do curto tempo de estro do camundongo, obtido pela aplicação dos estrógenos, é aspecto de fundamental importância, visto que, fora desta fase do ciclo, a infecção vaginal por *Candida albicans* não se estabelece, ou não se mantém por tempo suficiente para os estudos necessários (HAMAD et al., 2006).

5.1.2– Confirmação do quadro infeccioso

A seguir, são apresentados resultados de análises que demonstram a presença do fungo na vagina dos camundongos bem como a presença de inflamação associada.

5.1.2.1 Verificação de sinais macroscópicos da doença nos animais

Durante os experimentos as fêmeas foram observadas diariamente para verificar possíveis alterações de comportamento e sinais indicativos da presença da infecção.

Não foram verificadas alterações de comportamento nos animais infectados e os mesmos não apresentaram alterações na quantidade ou volume de fezes e urina. Não houve movimentos nos membros, ou no corpo que pudessem demonstrar a presença de prurido vulvovaginal.

Alguns sinais característicos da vaginite humana foram encontrados nos animais como edema, eritema e secreção, conforme apresentam as imagens da FIG. 5.3.

FIGURA 5.3 – Região genital de fêmeas de camundongos BALB/c

A imagem A mostra a região da vulva e vagina com aspecto normal, em BALB/c sadia. O orifício vaginal aparentemente indica que a fêmea se encontra idade reprodutiva. B: a imagem mostra região genital de animal infectado, em fase de estro, conforme apresentado por BYERS et al.(2012), onde ocorre edema e ligeiro eritema; em C, animal infectado, não tratado, apresenta região eritematosa e com secreção vinda do canal vaginal.

Outra característica verificada durante os procedimentos cirúrgicos para a retirada do tecido vaginal foi a presença de edema nos cornos uterinos de alguns animais, como mostrado nas figuras 5.4 e 5.5.

FIGURA 5.4 - Cornos uterinos de fêmeas de camundongo BALB/c

A figura apresenta a cavidade abdominal da fêmea de camundongo infectado com aparência normal dos cornos uterinos (setas).

FIGURA 5.5 - Cornos uterinos de fêmeas de camundongo BALB/c

A figura apresenta a cavidade abdominal do camundongo infectado com *Candida albicans*. A fêmea apresenta edema em ambos cornos uterinos (setas).

Nenhuma fêmea sadia apresentou edema nos cornos uterinos e, embora o fenômeno tenha sido verificado em um pequeno número de animais infectados com *C. albicans*, a maioria apresentou a aparência normal e é possível que o fato não se relacione à presença da levedura, ou à infecção na cavidade vaginal das fêmeas.

5.1.2.2- Análise citológica

A análise citológica mostrou que foi possível recuperar *C. albicans* no lavado vaginal das fêmeas de BALB/c (FIG. 5.6).

FIGURA 5.6 Citologia do lavado vaginal de fêmeas de camundongos BALB/c inoculadas com *Candida albicans*

A figura apresenta imagem do lavado vaginal de fêmeas infectadas onde é possível visualizar células epiteliais (seta preta), blastoconídios (seta branca) e hifas (seta vermelha) de *Candida albicans*.

A presença de células epiteliais anucleadas junto aos blastoconídios e hifas das células fúngicas mostra que a *Candida albicans* se estabeleceu no ambiente do pseudoestro vaginal.

As formas alongadas das hifas no lavado indicam que o micro-organismo está presente em sua morfologia mais patogênica, que forma micélios e é capaz de invadir tecidos (MAYER et al., 2013).

De fato, o contato da *Candida albicans* com a superfície do hospedeiro estimula a formação de hifas e, ao mesmo tempo, induz a formação de adesinas (JACOBSEN et al., 2012). A adesão permite maior proximidade e interação da *Candida albicans* com as células vaginais. Aderido, o fungo pode invadir o tecido do hospedeiro.

O potencial invasivo da *Candida albicans* é fortemente influenciado pela mudança entre as formas de leveduras e hifas (GOW et al., 2012). Nesse sentido, a formação de hifas e o aumento da carga fúngica envolve a transição de *Candida albicans* de micro-organismo comensal para patogênico (MOYES et al., 2010).

5.1.2.3- Análise de aspectos histomorfológicos

Um requisito básico para a aplicação da TFD é o estabelecimento da infecção. A presença *Candida albicans*, nas morfologias de blastoconídios e hifas aderidas ao epitélio e em imagem ampliada, no interior da luz do canal vaginal e aderido ao estrato cornificado pode ser visualizada na FIG. 5.7.

FIGURA 5.7 - Fotomicrografias de tecido vaginal de Camundongo BALB/c fêmea
Infectada com *Candida albicans*

A figura apresenta em **A**, vagina de fêmea de Camundongo BALB/c repleta de *Candida albicans* em toda extensão, em aumento original de 100x. Em **B**, ampliada a imagem apresenta três partes do canal vaginal, da esquerda para a direita: o tecido conjuntivo, o tecido epitelial escamoso estratificado e o estrato córneo. Este contém blastoconídios (círculo) e, principalmente, hifas de *Candida albicans* (seta). Coloração: PAS. Aumento original de 400x.

Quando a candidíase vaginal tem como agente etiológico *Candida albicans*, o tecido epitelial apresenta uma resposta inflamatória à agressão sofrida, tal como a ocorrência de microabscesso, que pode ser visualizado na FIG.5.8.

FIGURA 5.8 – Epitélio e luz vaginal de BALB/c com vaginite por *Candida albicans*

A imagem do epitélio vaginal de fêmea de camundongo infectada com *Candida albicans* apresenta hifas e blastoconídios e microabscesso (MA). Coloração: PAS. Aumento original de 400x.

5.1.2.4- Análise da Ultraestrutura do Epitélio Vaginal por Microscopia Eletrônica de Varredura

Além das análises anteriores, a presença da *C. albicans* também pode ser demonstrada na FIG. 5.9, cuja imagem, obtida por microscopia eletrônica de varredura, mostra fungos aderidos ao epitélio vaginal da fêmea.

FIGURA 5.9 - Elétron-micrografia de vaginite induzida em camundongo - BALB/c por *C. albicans*.

A seta apresenta um agregado de blastoconídios de *C. albicans* aderidas ao epitélio. Animal do grupo controle – fêmea contaminada, sem tratamento. Aumento original de 1600x.

5.1.3 Análise Microbiológica da Infecção Produzida e da Terapia Fotodinâmica

Inicialmente a terapia fotodinâmica foi aplicada em 20 fêmeas de camundongos BALB/c utilizando soluções com concentrações crescentes de AM.

Os resultados desse experimento mostram que houve o estabelecimento da infecção. O grupo controle apresentou um crescimento de seis log UFC/mL, indicando que há presença do fungo infectando ou colonizando a vagina das fêmeas de camundongos. A FIG. 5.10 apresenta o animal sendo irradiado.

FIGURA 5.10 - Terapia fotodinâmica aplicada na vagina de fêmeas de BALB/c infectadas com *Candida albicans*

A terapia fotodinâmica foi realizada e 24h após, os resultados obtidos mostram que houve redução não significativa ($p>0,05$) em todos os grupos tratados, sendo a maior redução média de 0,96 log, verificada no grupo 1000 μM . No grupo PDT 500 μM , a redução foi de 0,43 log, enquanto no grupo PDT 100 μM a redução foi de 0,48 log. Esses valores estão ilustrados na FIG. 5.11.

FIGURA 5.11 Recuperação microbiana e tratamentos efetuados da vaginite por *C. albicans* ATCC 90028 (n=5). Terapia Fotodinâmica mediada por laser vermelho e AM em concentrações crescentes

As médias $\pm$ desvio padrão mostram redução não significativa entre o grupo PBS e grupos PDT $p > 0,05$.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana tem sido utilizada para o tratamento de infecções em modelos vivos. A terapia nem sempre conduz à cura completa da enfermidade, mas diminui a carga microbiana, ou promove maior sobrevivência à espécie, como no estudo de CHIBEJE Jr. et al., (2013) em que larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida albicans* e tratadas com terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno na concentração de 1000 μ M e luz vermelha não coerente, proporcionou aumento de sobrevivência da larva infectada e diminuição da carga fúngica na hemolinfa do invertebrado. No mesmo estudo, os autores trocaram a cepa de *Candida albicans* utilizada para infectar a larva por outra, resistente ao fluconazol, e efetuaram a terapia fotodinâmica combinada com este fármaco antifúngico. Os resultados mostraram aumento de

susceptibilidade ao fluconazol, demonstrando possibilidade de associação dos dois tratamentos para aumentar a eficácia terapêutica.

5.2- Análise por MEV do tecido tratado

Neste experimento foi realizada análise qualitativa por MEV de um animal do grupo 1000 μ M. Os resultados mostram as células de *C. albicans* aderidas às células epiteliais vaginais. Também podem ser visualizadas células do fungo com alteração de morfologia (FIG. 5.12).

FIGURA 5.12 Elétron-micrografia de vaginite induzida em camundongo BALB/c por *C. albicans* após TFD com azul de metileno 1000 μ M

A imagem apresenta as células de *Candida albicans* aderidas ao epitélio descamado (setas vermelhas) e alterações morfológicas nas mesmas (setas brancas) junto à presença de células do sistema imune (setas azuis). Aumento original de 1600x.

A TFD mediada por azul de metileno age sobre a membrana plasmática de *Candida albicans* alterando sua permeabilidade (GIROLDO, 2009).

Este efeito pode gerar um desequilíbrio osmótico e possibilitar a alteração de morfologia das leveduras, tais como as presentes na vagina da fêmea tratada com a TFD. Nossos resultados concordam com os de Prates (2010) que, ao utilizar MEV a fim visualizar a ultraestrutura e estudar os efeitos da TFD em leveduras patogênicas, constatou que ocorria mudança de morfologia nas células de *Cryptococcus neoformans* logo após a fototerapia, mudança esta que não fora observada nas células não tratadas e igualmente submetidas à MEV. No estudo citado, as leveduras irradiadas apresentavam-se, segundo o autor, “murchas”, com volume diminuído, enquanto as do grupo controle não apresentaram alteração na forma. O fenômeno, retratado imediatamente após a TFD, era sugestivo de morte devido à apoptose.

5.3- Realização da Terapia Fotodinâmica com Laser em Sessão Única de 36 J e acompanhamento após 24 e 96 h

Após o estabelecimento dos parâmetros iniciais obtidos no primeiro estudo, os experimentos prosseguiram e a TFD foi aplicada nas fêmeas que foram acompanhadas nos períodos 0, 24 e 96 horas após o tratamento. A inclusão de um grupo 0h teve o objetivo de avaliar *in vivo*, se a TFD já poderia apresentar resultados imediatos e como seria a evolução após o tratamento.

Os resultados do curso da infecção apresentado pelo grupo não tratado (F-L-) revelam que no momento 0h, correspondente ao final do tratamento, a infecção inicial de 5,50 log UFC/mL cresce 0,52 log UFC/mL até 24h ($p < 0,05$) e 0,86 log UFC/mL até 96h ($p < 0,05$).

Quanto à TFD (F+L+) imediatamente após a aplicação, a carga microbiana de 5,28 log não apresentou diferença em relação ao controle ($p > 0,05$). Após 24 horas, enquanto ocorreu aumento da carga fúngica do grupo não tratado para 6,02 log, o grupo tratado com TFD apresentou diminuição significativa de 1,62 log UFC/mL ($p < 0,05$). Após 96 horas o grupo tratado com TFD não apresentou diferença significativa da contagem fúngica em relação à contagem de 0h ($p > 0,05$). Os dados encontram-se resumidos na TAB.5.1.

TABELA 5.1 - Efeito antifúngico *in vivo* da terapia fotodinâmica realizada em sessão única de 36J sobre vaginite induzida por *Candida albicans* em fêmeas de camundongos BALB/c e acompanhamentos após 0, 24 e 96 horas

Tempo	(F-L-) $\pm$ DP	(F+L+) $\pm$ DP	(F-L-)-(F+L+)	<i>p</i>
0h	5,50 $\pm$ 0,28	5,28 $\pm$ 0,37	0,22	ns
24h	6,02 $\pm$ 0,45	4,40 $\pm$ 0,41	1,62	< 0,05
96h	6,36 $\pm$ 0,60	5,19 $\pm$ 0,47	1,17	< 0,05

*ANOVA com pós teste de Bonferroni

Nossos resultados mostraram que a infecção fúngica não diminuiu imediatamente após a TFD, fato que ocorreu somente 24h após e a diferença permaneceu significativa 96 horas após a TFD ($p < 0,05$), embora a carga fúngica das fêmeas tratadas tenha se igualado ao controle imediato não tratado (F-L- 0h). Esse tempo corresponde ao período de um ciclo estral completo de fêmeas de camundongo, cerca de 4 dias a 5 dias (CALIGIONI, 2010).

Além do curso da infecção e da evolução do tratamento, este estudo também procurou avaliar possíveis efeitos do AM e do laser isoladamente sobre a infecção fúngica. Os dados mostraram que não houve diferença na contagem fúngica entre o grupo não tratado e os grupos laser e AM após 24 horas de tratamento ($p > 0,05$).

Quanto à infecção, representada pelo grupo F-L- ocorreu um aumento entre 0h e 24h e entre 0 e 96h ($p > 0,05$). Com a intervenção da TFD, mesmo a infecção presente no grupo controle tendo aumentado 24 horas após o tratamento inicial, a contagem fúngica diminuiu significativamente.

Observou-se que a aplicação da TFD em única sessão reduziu a contagem fúngica de 6,02 para 4,40 log UFC/mL, porém não reverteu a infecção, que 96 horas após o tratamento fotodinâmico inicial chegou a 5,19 log UFC/mL. Esta carga fúngica, ao ser comparada com o controle inicial (Salina 0h), apresentou quantidade semelhante ao estágio inicial da infecção ($p > 0,05$).

Embora a TFD após 96h ainda apresentasse efeito antifúngico estatisticamente semelhante à TFD 24h ($p>0,05$), esses dados sugeriram a necessidade de uma nova intervenção.

Nesse sentido, a fim de verificar se os dados seguiriam o mesmo padrão, caso a mesma energia fosse fracionada em dois momentos, foi realizado outro experimento, no qual se optou por entregar a energia em duas sessões, com intervalo de 24 horas entre os tratamentos e efetuar controles 24 horas após a última sessão de TFD.

5.4- Realização da TFD com Laser em duas Sessões de 18 J e acompanhamento após 24 horas

Este experimento foi conduzido seguindo os moldes anteriores, apenas variando a entrega de energia, que nesse caso foi fracionada em duas sessões. Considerando que o padrão temporal da infecção não mostrou redução significativa do número de células fúngicas imediatamente após tratamento, neste experimento não foi realizado o controle imediato da infecção, que somente foi realizado 24 horas após o término das duas sessões a representação gráfica do tratamento fotodinâmico realizado em uma ou duas sessões encontra-se na FIG. 5.13.

FIGURA 5.13 · Efeito Antifúngico da Terapia Fotodinâmica aplicada em Sessão Única e Dupla sobre Vaginite Fúngica em Fêmeas de Camundongos BALB/c

O controle microbiológico da terapia foi realizado logo após a TFD: 0h, em 24h e 96h nos grupos tratado (F+L+) e não tratado (F-L-). Após 24 h controles adicionais foram realizados incluindo os grupos laser (F-L+) e azul de metileno (F+L-), n=6. Dados plotados com média± DP

Os resultados revelaram que o tratamento da candidíase vaginal por TFD realizada em duas sessões e intervalo de 24h entre as aplicações também diminuiu a carga fúngica no grupo tratado em relação a todos os demais grupos (TAB.5.2).

TABELA 5. Efeito Antifúngico *in vivo* da TFD realizada em duas sessões de 18J e 3 minutos em vaginite induzida por *Candida albicans* em fêmeas de camundongos BALB/c e acompanhamento após 24h

Média de UFC/mL em Duas Sessões de TFD				
	F-L-	F-L+	F+L-	F+L+
Média $\pm$ DP	6,15 $\pm$ 0,45	6,05 $\pm$ 0,45	6,11 $\pm$ 0,34	4,49 $\pm$ 0,41
(F-L-) -		0,10	0,04	1,56
<i>p</i> valor		ns	ns	< 0,05

*ANOVA com pós teste de Bonferroni

Observou-se neste ensaio que a carga fúngica após a TFD reduziu 1,56 log UFC/mL, de forma significativa ($p < 0,05$), no entanto, ao comparar a atividade antifúngica nos protocolos de tratamento, não houve diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$) e, conforme mostrado na TAB. 5.3, o efeito antifúngico entre os dois tratamentos foi estatisticamente semelhante.

TABELA 5.3 – Avaliação do Efeito Antifúngico da Terapia Fotodinâmica Aplicada em Uma ou Duas Sessões

COMPARAÇÃO	F-L-	F-L+	F+L-	F+L+
1 Sessão				
X	ns	ns	ns	ns
2 Sessões 24h				

A TFD é uma terapia promissora para o tratamento de infecções localizadas (DAI et al., 2009), nas quais podem ser incluídas as vaginites. no entanto, estudos de TFD *in vivo* ainda são escassos (DONELLY et al., 2008), especialmente em mucosas. Entre os trabalhos existentes, geralmente a TFD é aplicada em modelos de candidíase na mucosa oral que apresentam algumas semelhanças, porém várias diferenças em relação às infecções vaginais. Não

foram encontrados na literatura estudos sobre a aplicação e os efeitos da TFD em vaginites induzidas por *Candida albicans*.

Teichert et al., (2002) foram os pioneiros a aplicar a TFD em mucosa oral de murinos, utilizando AM e laser. O estudo, utilizando diversas concentrações de AM a partir de 250 µg/mL e luz laser visível (laser em $\lambda = 664$ nm, 400mW e tempo de irradiação 687,5s) mostrou redução total da carga fúngica quando utilizou concentrações de 450 e 500µg/ML e com efeito antifúngico aumentando conforme elevava a concentração do FS.

Junqueira et al. (2009) também trataram a candidíase bucal em ratos (AM 0,1mg/mL; laser $\lambda = 660$ nm, 50mW, E= 10J; densidade de energia de 26J/cm²), mas os resultados não mostraram diminuição na carga fúngica, embora os ratos tratados apresentassem menos lesões devido à candidíase do que os não tratados.

Há que se considerar, entretanto, que o desenho do estudo e os parâmetros utilizados nos dois estudos foram diferentes, a começar com o estado imunológico dos animais. No primeiro caso, os animais eram imunossuprimidos, enquanto no segundo eram normais. Além disso, a concentração do FS era cerca de quatro vezes maior (450µg/mL= 0,45mg/mL = 1406µM), além dos demais parâmetros utilizados.

Observa-se, nesses casos, que os parâmetros de luz realmente influenciam nos resultados, conforme constatado por Prates et al. (2009) em estudo abordando a inativação de leveduras *in vitro*. Em nosso trabalho utilizamos uma concentração de AM intermediária entre esses dois valores - 1000µM - e também parâmetros de irradiação intermediários e os resultados, que apontam uma diminuição significativa da contagem microbiana, sugerem que a TFD pode ser uma alternativa, ou pelo menos, uma forma complementar ao tratamento convencional da vaginite por *Candida albicans*.

Quando estudos são realizados *in vitro*, geralmente os efeitos observados são melhores, entretanto, mesmo servindo de base para utilização em modelos animais ou humanos, os resultados nem sempre podem ser integralmente repassados para as doenças humanas.

Nos tecidos vivos, muitas vezes os micro-organismos estão organizados em biofilmes, que dificultam o tratamento tradicional farmacológico

ou por TFD e *Candida albicans* forma biofilmes em candidíase vaginal (HARRIOT et al., 2010). Desta forma o tratamento em única sessão pode não ser o ideal para eliminar completamente o fungo do ambiente em que se encontra.

Quanto ao FS empregado, o azul de metileno, embora esteja classificado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como antisséptico indicado para uso tópico (ANVISA, 2013), não apresentou qualquer efeito antifúngico ou anti-inflamatório sobre a vaginite induzida por *Candida albicans* nas fêmeas de camundongos, em nenhum dos protocolos testados.

Nossos resultados mostraram também que os tratamentos feitos apenas com laser, em ambos os protocolos, também não apresentaram atividade antifúngica e concordam com Prates et al., (2009) que não encontraram efeito antifúngico *in vitro* do laser sobre *Cryptococcus neoformans*, *Candida krusei* e *Candida albicans*, enquanto a TFD mediada por AM e laser neste mesmo estudo apresentou atividade antifúngica em todas as espécies testadas. Embora a sensibilidade de cada espécie à TFD tenha sido diferente, o estudo mostra que a adequação dos parâmetros, como o tempo de irradiação, por exemplo, pode alterar os resultados do tratamento.

5.5- Análise da reação Inflamatória devida à Infecção e à TFD

Outra característica analisada neste estudo foi a reação de células inflamatórias associada à vaginite induzida por *Candida albicans*, visto que o processo inflamatório está diretamente ligado à candidíase vaginal

5.5.1- Análise das células inflamatórias em tecido vaginal de fêmeas de BALB/c submetidas à TFD

A reação inflamatória relacionada à presença de *Candida albicans* na região vaginal das fêmeas foi realizada por meio da medida da área do núcleo de células inflamatórias presentes tanto na região anterior como na posterior da vagina das fêmeas de camundongos BALB/c infectadas com *C. albicans*, tratadas

ou não tratadas com TFD. Tecidos de fêmeas sadias também foram analisados.

Ao analisar o tecido vaginal de fêmeas sadias verificou-se que a porcentagem de área de núcleo de células inflamatórias presentes no tecido vaginal das fêmeas de BALB/c sadias foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) do que o tecido de portadoras de candidíase vaginal, tratadas ou não. Os resultados mostraram que quando presente, *Candida albicans* estava associada à maior área de células inflamatórias, independente da região analisada.

5.5.1.1- Células Inflamatórias nas Regiões Anterior e Posterior da Vagina

Quanto à região do canal vaginal analisada, a área de células inflamatórias presentes no tecido apresentou diferenças significativas nas quantidades existentes na região anterior em comparação com a posterior em todos os grupos de animais infectados estudados, tratados ou não. As células inflamatórias existentes na região posterior da vagina dos animais infectados se mostrou maior do que as da região anterior de todos os grupos, excetuando-se o grupo das fêmeas do grupo (F-L+ 2x), com ($p > 0,05$) em que a porcentagem foi semelhante em ambas as porções da vagina. Por outro lado, nas fêmeas sadias não infectadas com *Candida albicans* houve maior porcentagem de células inflamatórias na região posterior, mas os dados não foram significativos ($p > 0,05$) (FIG. 5.14, 5.15 e 5.16).

FIGURA 5.14 – Tecido vaginal saudável de fêmeas sadias de camundongos BALB/c

O grupo sadio não apresentou diferenças estatisticamente significantes na área de células inflamatórias presentes nas regiões **A** e **P**. As setas indicam células inflamatórias; as estrelas, vasos sanguíneos. Coloração HE. Aumento original de 400X

FIGURA 5.15 – Células Inflamatórias presentes em vaginite de camundongos BALB/c tratados (F+L+) e controle (F-L-)

Na imagem pode-se verificar maior número de células inflamatórias região anterior dos animais controle: A, B, C. Após TFD há diminuição destas células: grupos D,E,F. O grupo TFD 2 sessões apresentou o melhor resultado.

FIGURA 5.16 - TFD aplicada em vaginite de fêmeas de camundongos BALB/c – região P grupos 0, 24 e 2 sessões.

Os cortes da região posterior da vagina de fêmeas infectadas e não tratadas **A, B, C** mostram maior número de células inflamatórias (setas).
 Observa-se que após o tratamento número de células inflamatórias é menor: **D, E F**.

A TFD, quando aplicada sessão única (F+L+ 24h) na região posterior mostrou diferença apenas em relação ao animal sadio, os demais se mostraram sem significância.

A TFD aplicada em duas sessões apresentou diminuição importante da área de células inflamatórias sobre os grupos infectados tratados e foi mais eficaz em diminuir a área de células inflamatórias (FIG.5.17, 5.18, 5.19).

FIGURA 5.17 – Área de Células Inflamatórias na Vagina Anterior após TFD

Média e desvio padrão da inflamação (%) na parte anterior (A) da vagina de camundongos BALB/c infectados com *Candida albicans* e submetidos à TFD. A Figura mostra que o animal sadio possui a menor % de área inflamada e é diferente de todos os demais ($p > 0,05$). A TFD que apresentou melhor resultado foi a TFD 2 sessões ($p < 0,05$), enquanto a TFD 24h não foi superior aos seus controles. Observou-se que o grupo laser (F-L+ 2x) foi estatisticamente igual à TFD (F+L+ 2X). Neste caso, porém, como o desvio-padrão foi alto, este resultado parece ser devido a artefato de técnica e é possível que o aumento do número de animais testados apresente outro resultado. Dados plotados em média $\pm$ DP.

FIGURA 5.18 - Inflamação na Vagina Posterior após Terapia fotodinâmica

A figura mostra a inflamação na vagina posterior que é relativamente alta, se comparada à anterior. Os números apontam que o tratamento fotodinâmico não apresentou bom efeito, pois todos os grupos se igualaram ao controle 0h, este diferindo apenas da inflamação presente no animal sadio e na TFD 2 sessões, com ($p < 0,05$). A inflamação presente no grupo laser 2 sessões foi estatisticamente semelhante à da TFD 2 sessões ($p > 0,05$). Dados plotados em média $\pm$ DP.

A análise da área de células inflamatórias nas regiões anterior e posterior da vagina mostra que a última tem maior número destas células. Da mesma forma, a análise qualitativa da presença do fungo verificada pela microscopia ótica realizada nas lâminas coradas pelo ácido periódico de Shiff também apresentou-se com padrão semelhante.

Porém, como a microscopia destas lâminas foi realizada após a lavagem do conteúdo vaginal, cogitou-se a possibilidade de a técnica aplicada na lavagem ter sido mais bem efetuada na região anterior, próxima à vulva. A região posterior apresentou maior número de fungos, com forte presença de hifas conforme ilustrado, entretanto, como foi verificado que a inflamação também é

superior nessa área, provavelmente o fato está ligado à patogenia da candidíase na vagina, pois, segundo Cummins e Doncel (2009), tanto a ativação, como o tráfico de leucócitos na mucosa genital são mediados por citocinas e quimiocinas como as interleucinas (IL) IL-1, IL-6 e IL-8 que podem estar presentes associadas a infecções e a danos epiteliais, ambos encontrados nesta pesquisa.

5.5.1.2- Células inflamatórias presentes no curso da Infecção e da TFD

A análise tecidual realizada neste estudo permitiu quantificar, de forma inespecífica, a porcentagem de área ocupada por células inflamatórias que, nos animais saudáveis, foi menor do que nos demais grupos que foram infectados por *Candida albicans*. Nestes animais que possuíam o fungo em seu organismo, as células inflamatórias apresentavam-se ocupando maior área do tecido. Mais uma vez, o grupo dos animais saudáveis apresentou área de células inflamatórias menor e diferente de todos os demais grupos testados. A TFD duas sessões também apresentou comportamento diferente dos outros grupos, contando com uma área inflamatória intermediária entre o grupo sadio e os demais, tanto tratados, como controles. A FIG. 5.19 apresenta os resultados contendo a porcentagem de área de células inflamatórias das fêmeas de camundongos BALB/c, reunindo as regiões anterior e posterior dos animais saudáveis, tratados e controles.

FIGURA 5.19 – Média e erro padrão da porcentagem de área de células inflamatórias em vaginite induzida por *C. albicans*

A figura apresenta o resultado da análise de todos os grupos tratados com TFD e os respectivos Controles, n=5 (F-L-) (F-L+) (F+L-2 x) (F+L+). O grupo (F+L-24h) foi realizado com n=4 fêmeas. Ao comparar os grupos de tratamento considerando o canal vaginal como um todo, verifica-se que apenas o grupo TFD duas vezes (F+L+ 2x) apresentou diminuição da porcentagem de núcleos de células inflamatórias ($p < 0,05$) em relação ao grupo não tratado. Em relação ao controle sadio (S), todos os grupos aumentaram significativamente a área destas células ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que a vagina não é um ambiente isento de células inflamatórias. Conforme pode ser visto no o animal sadio, sem qualquer infecção apresentou neste experimento 0,34% de núcleo de células inflamatórias, ao passo que no quinto dia após a inoculação, correspondente ao dia do término do tratamento no protocolo de uma sessão houve aumento para 0,98% (F-L- 0h) e

($p < 0,05$). A partir do no sexto dia o valor encontrado foi de 1,17% (F-L-24h), que se estabilizou 1,11% (F-L-96h) no nono dia.

Os dados mostram que mesmo as fêmeas saudáveis possuem células inflamatórias, como parte do sistema imune inato existente no tecido vaginal e o fato é favorável ao organismo, pois permite rápida defesa no caso de invasão de agentes patogênicos.

As células inflamatórias associadas à infecção fúngica presentes na região anterior foi menor do que da região posterior nos grupos estudados ($p < 0,05$)..

Analisando a TFD aplicada em sessão única após 24h observou-se uma diminuição não significativa de 0,14% ($p > 0,05$). Ao ser aplicada em duas sessões, a TFD apresentou valor de 0,70%, demonstrando que houve diminuição de 0,46%, que foi significativa da inflamação em relação ao seu controle: ($p < 0,05$), porém não se igualou ao controle sadio, cujo valor inicial era de 0,34%.

Ao reunir as regiões anterior e posterior da vagina os resultados indicam que a TFD aplicada em duas sessões teve efeito anti-inflamatório melhor do que a aplicada em uma sessão, pois houve redução significativa da área de células inflamatórias, em relação aos controles ($p < 0,05$), enquanto a terapia aplicada em uma sessão não apresentou resultados significativos.

Outra análise realizada foi sobre o curso da inflamação, considerando o animal sadio como ponto inicial. Os dados mostram que a concentração de células inflamatórias no grupo controle (F-L-) aumentou inicialmente de 0h para 24h ($p < 0,05$) e depois se manteve constante até 96h ($p > 0,05$).

Black et al. (1998) associaram a presença de neutrófilos polimorfonucleares durante o estro em vaginite por *Candida albicans* à presença de mudanças estruturais no tecido estudado. A presença dessas células estava associada à inflamação e não à depuração da levedura durante aquela fase do ciclo estral do animal.

A terapia fotodinâmica aplicada em nosso estudo mostrou atividade antifúngica em modelo de vaginite induzida em fêmeas de BALB/c. A TFD aplicada em 2 sessões de 18J, com intervalo de 24h entre as sessões apresentou o mesmo efeito antifúngico ao comparar com sessão única de 36J e controle após 24h.

Por outro lado TFD, quando aplicada em duas sessões de 18J com intervalo de 24 horas entre sessões mostrou-se capaz de diminuir a porcentagem de área de células inflamatórias associadas à infecção por *Candida albicans* ($p < 0,05$). Tal fato pode ser devido a diminuição da virulência das leveduras remanescentes no tecido infectado após a primeira sessão. Segundo KATO *et al*, 2013, doses subletais da terapia fotodinâmica podem diminuir a virulência do fungo, diminuindo a formação de tubos germinativos que são fatores importantes na patogenicidade de *Candida albicans*. SOBEL *et al*. (1984) demonstraram que a formação do tubo germinativo desempenha papel crítico na patogênese da vaginite causada por *Candida*, pois a ausência do tubo, diminui a adesão do fungo à mucosa vaginal. Além disso, a TFD pode inativar tanto o micro-organismo com também suas enzimas, diminuindo a ação lesiva destas sobre a mucosa vaginal. Durante uma segunda sessão as leveduras possivelmente estariam mais suscetíveis à TFD, produzindo melhores efeitos.

Nosso estudo mostrou ser possível estabelecer o modelo de infecção vaginal em fêmeas de camundongos BALB/c, de forma persistente e com presença de sinais inflamatórios associados e utilizar a terapia fotodinâmica para tratar a doença.

Uma limitação ao modelo de candidíase vaginal utilizado é fato de não ser possível o acompanhamento da infecção na mesma fêmea, pois o método, em princípio, não permite fazer mais de uma lavagem em um mesmo tecido vaginal, exigindo um grande número de animais para estudos mais longos, o que demanda tempo, custos e envolve questões éticas importantes.

6- PERSPECTIVAS

Este estudo, pioneiro no conhecimento dos efeitos da TFD em vaginites induzidas por *Candida albicans*, mostra que é possível diminuir a infecção fúngica da doença, assim como os sinais inflamatórios associados. Este fato é bastante importante se formos extrapolar esta terapia para os seres humanos, visto que a sintomatologia da doença na mulher decorre mais da inflamação provocada pelo fungo do que pela infecção em si. No entanto, mais estudos são necessários para utilização dessa terapia no tratamento das vaginites fúngicas ou de outra etiologia, tanto em modelos animais, como para uso na mulher.

7- CONCLUSÕES

A candidíase vaginal foi induzida com sucesso nas fêmeas de camundongos BALB/c. O pseudoestro e sinais laboratoriais da infecção foram evidenciados, com aumento da área de células inflamatórias no tecido vaginal das fêmeas doentes;

Algumas sinais da vaginite semelhantes a doença humana foram observados, porém não houve sinais ou sintomas em número significativo de animais que pudessem evidenciar macroscopicamente a vaginite por *Candida albicans* em fêmeas de Balb/c;

O FS azul de metileno, na concentração de 1000 μ M mostrou tendência maior na redução da carga fúngica após TFD comparado às concentrações de 100 e 500 μ M;

Não houve efeito antifúngico do AM ou do laser quando utilizados isoladamente; não houve efeito anti-inflamatório do AM;

A TFD em sessão única e em sessão dupla apresentaram efeito antifúngico sobre candidíase vaginal em camundongos BALB/c 24 h após o término do tratamento, reduzindo a carga fúngica respectivamente, 1,62 e 1,56 log/UFC/mL;

Houve diminuição de células inflamatórias em vaginite fúngica após a TFD apenas quando a terapia foi aplicada em duas sessões, com intervalo de 24h entre as sessões;

Como o efeito antifúngico da TFD aplicada em sessão única de 36J comparada a duas sessões de 18J foi semelhante e o efeito anti-inflamatório da terapia aplicada em sessão dupla foi mais abrangente, este protocolo possivelmente é melhor do que o primeiro, aplicado em sessão única;

A TFD é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas relativas à candidíase vaginal.

REFERÊNCIAS

ACHKAR, J.M.; FRIES, B.C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Review**, v.23, p. 253-273, April, 2010.

ALMEIDA, JM; THEODORO, LH; BOSCO AF et al. *In vivo* effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. **J Periodontol.**, v.79, n.6, p.1081-1088, 2008.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de Normas da COFID**, versão IV, p.178, Brasília, abr, 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6805ba804f5ea576920df79a71dcc661/ConsolidadoVersaoIVpublicar.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 25 de julho de 2013.

AVMA. **Guidelines for the Euthanasia of Animals**, 2013. ed., p. 48-49, 2013. Disponível em: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho de Saúde. **Resolução 466**, 2012. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>.

BAPTISTA, M.S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 1, p. 1-10, Jan, 2011.

BAENA-MONROY, T. et al. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.10 p.27-39, 2005.

BARBOSA, A. F., et al. "Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*." **Lasers in surgery and medicine**, v. 44, n.10, p. 850-855, Dec, 2012.

BAUTERS, T. G. M. et al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. **Am J Obstet Gynecol.** v. 187, n. 3 p. 569-574, Set, 2002.

BENNETT, J.E. Agentes antifúngicos In: GILMAN, A. G.; et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. Ed, c. 48, p. 1103-1118, Vários tradutores. McGraw-Hill, Rio de Janeiro: 2006. Título original: The pharmacological basis of therapeutics.

BLACK, C. A.; EYERS, F. M.; RUSSELL, A. et al. Acute Neutropenia Decreases Inflammation Associated with Murine Vaginal Candidiasis but Has No Effect on the Course of Infection. **Infection and Immunity**, v. 66 n. 3, p. 1273–1275, Mar, 1998.

BLACK, C. A. Increased severity of *Candida* vaginitis in BALB:c nu:nu mice versus the parent strain is not abrogated by adoptive transfer of T cell enriched lymphocytes. **Journal of Reproductive Immunology**, v.45, p. 1-18, 1999.

BUDAVARI, S. editor. **The Merck Index**. An encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 12.th ed. n. 6137, p. 1035, Merck and CO, Whitehouse Station, NJ, 1996.

BYERS, S. L. et al. Mouse estrous cycle identification tool and images. **Plos One**, v.7, n.4 p. e35538, April, 2012.

CALDERONI, R. A.; FONZI, W. A. Virulence Factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n.7, p.327-335, Dec, 2001.

CALIGIONI, C. Assessing Reproductive Status/Stage in Mice. **Curr. Protoc. Neurosci.**, Appendix 4I, p.1-11, Jul, 2009.

CAPILLA, J.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Animal models: an important tool in mycology. **Medical Mycology**. v.45, p. 657-684, Dec, 2007.

CARRARA, M.A . et al. New Model of Vaginal Infection by *Candida albicans* in Rats. **Mycopathologia**, n. 170, p. 331-338, Jun, 2010.

CHAMPLIN, ARTHUR K.; DORR, DARROLD L.; GATES, ALLEN H. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. **Biology of reproduction**, v.8, n.4, p. 491-494, 1973

CHIBEJE JR, J. et al. Selective Photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. **BMC Microbiology**, v.13, n.219, p.1-9, 2013.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica e Apl.**, v.28, n.1, p.11-23, 2007.

CLEMONS, K. V., et al. Genetic susceptibility of mice to *Candida albicans* vaginitis correlates with host estrogen sensitivity. **Infection and immunity**, v.72, n.8, p.4878-4880, 2004.

COLOMBO, A.L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis... **Braz. J. infec. Dis.**, v.17, n.3, p. 283-312, may, 2013.

CUMMINS, J. E. JR; DONCEL, G.F Biomarkers of cervicovaginal inflammation for the assessment of microbicide safety. **Sex Transm Dis.**, n. 36,3 Suppl, p.S84-S91, Mar, 2009.

DAI,T.; HUANG, Y.Y; HAMBLIM, M.R. Photodynamic therapy for localized infections - State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.** v.6, n.3-4, p.170-188, 2009.

DAI, T.; BIL DE ARCE, V.J.; TEGOS, G.J; HAMBLIN, M. R. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 55, n.12, p. 5710-5717, Dec, 2010.

De BERNARDIS, F.; BOCCANERA, M.; ADRIANI, D.; SPREGHINI, E.; SANTONI, G.; CASSONE, A. Protective Role of Antimannan and Anti-Aspartyl Proteinase Antibodies in an Experimental Model of *Candida albicans* Vaginitis in Rats. **Infection and Immunity**, v.65, n.8 p. 3399–3405, Aug, 1997.

DEMIDOVA, T.N. ; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J Immunopathol Pharmacol.**, v.17, n.3, p. 245-254, 2004.

DOLMANS, D. EJGJ; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer.** v.3, n. 5, p. 380-387, 2003.

DONNELLY, R.F.; McCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M. Antifungal Photodynamic Therapy. **Microbiological Research**, n.163, p.1-12, 2008.

DOUGHERTY, T.D. et al. Photodynamic therapy. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 90, n.12, Jun, 1998.

DOVIGO, L. N. et al. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by photogem®. **Braz. J. Microbiol.** [online], v.41, n.1, p. 42-49, 2010.

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, A.C.; MIMA, E.G.O.; GIAMPAOLO, C.E.; VERGANI, C.E. BAGNATO, V.S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v.54, p.123 -130, 2011.

ECKERT, L. O. et al. Vulvovaginal Candidiasis: Clinical Manifestations, Risk factors, Management algorithm. **Obstet. Gynecol.**, v. 92, n. 5, p. 757 - 765, 1998.

EHRSTROM S.; KORNFELD D.; RYLANDER E. Perceived stress in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **J. Psychosom. Obstet. Gynecol.**, v.28, p. 169-176, 2007.

ESCHENBACH, D. A. Chronic Vulvovaginal Candidiasis. **N. Engl. J. Med.**, n.351, p.851-852, Aug, 26, 2004.

FAN, S R.; LIU, XP. *Nonalbicans Candida* Species and Antifungal Susceptibility. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v.98, n. 2, p. 158-159, Aug, 2007.

FAGUNDES, D.J.; TAHA M.O. Animal disease model: choice's criteria and current animals specimens. **Acta Cir Bras.**, v.19, n.1, p.59–65, 2004.

FARAGE, M; MAIBACH, H. Lifetime Changes in the Vulva and Vagina. **Arch Gynecol Obstet.**, San Francisco, USA, v. 273, p.195 - 202, 2006.

FERRAZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F. *et al.* Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev. Bras. de Ginecol. e Obst.**, v. 27 n.2 p. 58-63, 2005.

FIDEL JR, P.L.; LYNCH, M.E.; SOBEL, J.D., *Candida*-specific cell-mediated immunity is demonstrable in mice with experimental vaginal candidiasis. **Infect. Immun.**, v. 61, p.1990-1995, 1993.

FIDEL JR, P. L.; JESSICA, L.; CUTRIGHT, J.; *et al.* A Murine Model of *Candida glabrata* Vaginitis. **J Infect Dis**, v.173, n.2, p.425-431, 1996.

FIDEL JR, P. L.; CUTRIGHT, J.; STEELE, C.. Effects of Reproductive Hormones on Experimental Vaginal Candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 8, n. 2, p. 651-657, Feb, 2000.

FIDEL PL. History and update on host defence against vaginal candidiasis. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v.57,p.2 -12, 2007.

FURR, P.M.; TAYLOR-ROBINSON, D. The influence of hormones on the bacterial flora of murine vagina and implications for human disease. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.4, p.141 - 147, 2009.

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.40, n.4, p. 229 – 236, ago, 2004.

GARCEZ, A. S. Effects of photodynamic therapy on Gram-positive and Gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.31, n.11, p. 519-525, Nov, 2013.

GENNARO, A. R. ;**Remington** – A Ciência e a Prática da Farmácia, 17.ed. 6. reimp Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1153, 1995.

GIRALDO, P; NOWASKONSKI, A. V. *et al.* Vaginal Colonization by *Candida* in Asymptomatic Women With and Without a History of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Obstet. Gynecol.**, v. 95, p. 413-416, 2000.

GIROLDO, L. M.; FELIPE, M. P.; ALVES, et al., Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers Med Sci.**, v. 24, p.109-112, 2009.

GONZALEZ, G.M.; ELIZONDO, M.; GARZA-GONZALEZ, E.; GONZALEZ, J.G. Therapeutic efficacy of posaconazole against *Candida glabrata* in a murine model of vaginitis. **Mycoses**, v. 54, n.2, p. 2009.

GONZALES, F.P.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Mycological Research**, v. 116, n. 1, p. 1-10, 2012.

GOW, N. A. R.; et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**. v. 10, n.2, p. 112-122, Feb, 2012.

HAMAD, M. et al. Utility of the oestrogen-dependent vaginal candidosis murine model in evaluating the efficacy of various therapies against vaginal *Candida albicans* infection. **Mycoses**. v. 49, n. 2, p. 104-108, mar, 2006.

HAMBLIN, MR, HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci.**, v.3, n.5, p.436-450, 2004.

HARRIOTT, M. M. et al. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**. v. 56, p. 3635–3644, 2010.

JACOBSEN, I. D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v.10, n.1, p.85-93, 2012.

JAYATILAKE. J. A. M. S. A Review of the Ultrastructural Features of Superficial Candidiasis **Mycopathologia**, v.171, n.4, p.235-250, Oct, 2010.

JETT, B.D; HATTER, K.L.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**, v. 23, n.4, p. 648-650, 1997.

JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. **Metal-Based Drugs**. v. 2008, Article ID 276109, p.1-24, 2008.

JUNQUEIRA, J. C., DA SILVA MARTINS, J., FARIA, R. L., COLOMBO, C. E. D.; JORGE, A. O. C. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. **Lasers in medical science**, v.24, n.6, p. 877-884, 2009.

KÅHRSTRÖM, Christina Tobin. In the news: entering a post-antibiotic era? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n.146, Mar, 2013.

Kato, I. T., Prates, R. A., Sabino, C. P., Fuchs, B. B., Tegos, G. P., Mylonakis, E., ... Ribeiro, M. S. (2013). Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n.1, p. 445-451, 2013.

KINSMAN, O.S.; COLLARD A.E., Hormonal factors in vaginal candidiasis in rats. **Infect. Immun.**, v.53, p. 498-504, 1986.

KIRKPATRICK, W.R. et al. Animal models in mycology: What have we learned over the past 30 years. **Curr Fungal Infec Rep.**, v.7 p.68 – 78, 2013.

KOMERIK,N. NAKANISHI,H.; MACROBERT, A.J.; HENDERSON, B.; SPEIGHT, P.; WILSON, M. In vivo killing of *Porphyromonas gengivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother.**, n.47, p. 932–940, 2003.

KOTHAVADE, R; KURA ,M. M.; VALAND, A. G. PANTHAKI, H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, n.59, v. 59, p. 873–880, 2010.

LAMB, J.C.; NEWBOLD, R. R.; STUMPF.W.E.; McLACHLAN, J. A. Transitional Changes in the Surface Epithelium of the Cycling Mouse Vagina, Cervix and Uterus: Scanning Electron Microscopic Studies. **Biology of Reproduction**, n.19, p. 701-711, 1978.

LANDINI G. Color deconvolution using ImageJ. 2010. Acesso em 1 de abril de 2013. Disponível em:
<<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>>

LARSEN, Bryan; GALASK, RUDOLPH P. Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology. **Annals of internal medicine**, 96.6_Part_2: 926-930, 1982.

LEE, Y et al., The photodynamic therapy on *S. mutans* biofilms. **International Journal of Oral Science**. n. 4, p. 196-201, 2012.

LEON, E. M. et al. Prevalence and Risk Factors for Vaginal *Candida* Colonization in Woman with Type 1 and Type 2 Diabetes. **BMC Infections Diseases**. v. 2, p.1 – 6, 2002.

LINHARES, I. M. et al., Vulvovaginal Recurrent Candidiasis: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. **Rev. Cienc.Med. Campinas**, v.14, n.4, p.373-378, julho, 2005.

MALIK R, MANOCHA A., SURESH D K . Photodynamic therapy - A strategic review. **Indian Journal of Denture Research**, v. 21, n.2, p. 285-291, 2010.

MARTINS, J.S., JUNQUEIRA, J.C., FARIA, R.L., SANTIAGO, N.S., ROSSONI, R.D., COLOMBO, C.E.D. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 11, n. 1, p. 71-77, 2011.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, n.4, v. 2, p. 1-10, feb, 2013.

MIJAC, V. D. DUKIC, M.K.; OPAVSKI, N. Z.; RANIN, L. T. Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with vaginal infections. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 129, n.1, p.69-76, Nov, 2006

MOSCI, P. ; PIETRELLA, D.; RICCI, G. *et al.* Mouse Strain-Dependent Differences in Estrogen Sensitivity During Vaginal Candidiasis. **Mycopathologia**. v.175, n.1-2, p. 1-11, 2013.

MOYES, D. L.; RUNGLALL, M. ...NAGLICK, J. R. A biphasic Innate Immune MAPK Response Discriminates between the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* in Epithelial Cells. **Cell Host Microbe**, v.8, n.3, p. 225-235, Sep, 2010.

MUNIN E; GIROLDO LM; ALVES LP, COSTA MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Photochem Photobiol.**, v.88, n.1, p.16-20, 2007.

NAGLIK, J. R., FIDEL JR, P. L.; ODDS, F. C. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 283, p.129 – 139, 2008.

NAGLIK, J.R. *et al.* *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v.13, p. 963 -976, 2011.

NÚÑEZ, S.C. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de ortotoluidina com relação à eficiência fotodinâmica**. 2007. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

O'RIORDAN, K; AKILOV, O. E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 2, p. 247-262, 2005.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America **Clin. Infect. Dis.**, v.48 n.5, p.503-535, 2009.

PEREIRA, C.A., ROMEIRO, R.L., COSTA, A.C.B.P., MACHADO, A.K.S., JUNQUEIRA, J.C., JORGE, A.O.C. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. **Lasers Med. Sci.**, v.26, p.341-48, 2011.

PFALLER, M.A., *et al.*, Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculums preparation. **J Clin Microbiol.**, v.26, n.8, p. 1437- 1441, 1988.

PRATES, R.A., *et al.*, Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Photochem. Photobiol. B**. v.86, n.1, p. 70-76, 2007.

PRATES, R. A. et al. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. Mechanisms for Low-Light Therapy III: **SPIE**. 2008. 684606 p.

PRATES R. A et al., Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in fluence and rate fluence-dependent manner. **Laser Physics**, v.19, n. 5, p.1038 -1044, 2009.

PRATES, R. A.; SILVA, E.G. ; SUZUKI, L. C. ; PAULA, C.R. ; RIBEIRO, M. S. . Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, p. 53-57, 2010.

PRATES, R.A. **Avaliação dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre Leveduras Patogênicas**. 2010. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

PRATES, R.A., et al. Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **Plos One**. v.8, n.1 p. e54387, 2013.

RAAB,Oscar. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. **R. Oldenbourg** . p.524-546, 1900.

RAHMAN, D. et al. Murine Model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 615 - 622, 2007.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LÓPEZ-RIBOT, J. *Candida* Biofilms: an Update . **Eukariotic Cell.**, v.4, n.4, p. 633-638, 2005.

RUIFROK, A.C.; JOHNSTON, D.A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Anal Quant Cytol Histol**. n.23, p.291-299, 2008.

SANTOS, B. F. Criação e Manejo de Camundongos. In: ANDRADE, A., PINTO, S.C., OLIVEIRA, R.S., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 115-118, 2002. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf> <acesso em: 14/08/2013>.

SENA, R. M. M.; NAVAL L.P.; BERTOLIN, A. O. Fatores pessoais e socioambientais relacionados à prevalência de candidíase vulvovaginal. **Rev. Bras. Pesq. Des.**, v. 9, p. 59-65, 2007.

SENNA, A. M. **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no Tratamento da Estomatite Protética**. 2012. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SHIH M.H., HUANG, F.C. Repetitive methylene blue-mediated photoantimicrobial chemotherapy changes the susceptibility and expression of the outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.10, p. 664-671, 2013.

SIDRIM, J. J. S.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

SIMÕES, R. S.; KULAY JR., R; BARACAT, E.C. Importância da experimentação animal em Ginecologia e Obstetrícia. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 33, n.7, p. 119-122, 2011.

SOBEL, J. D., MULLER, G., BUCKLEY, H. R. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. **Infection and immunity**, v.44, n.3, p. 576-580, 1984

SOBEL, J.D.; CHAIM, W.. Vaginal Microbiology of Women with Acute Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 34, n.10, p. 2497-2499, oct, 1996.

SOBEL, J. D. Vaginitis. **The New England Journal of Medicine**, v.337, n.26, p. 1896 – 1903, dec, 1997.

SOBEL, Jack D., et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American journal of obstetrics and gynecology**. v.178, n.2, p.203-211, 1998.

SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**. v. 369, n. 9577, p. 1961–1971, 2007.

SOBEL et al. Mixed Vaginitis - More Than Coinfection and With Therapeutic Implications. **Curr Infect Dis Rep**. v. 15, p.104–108, jan, 2013.

SOUKOS, N. S. et al. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 18, p. 253-259, 1996.

SOUZA, S. C.; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y. ;MUNIN, E., JORGE, A. O. C. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **J Photochem Photobiol B Biol**. v. 83, p. 34-38, 2006.

SOUZA, R.C.; JUNQUEIRA, J. C.; ROSSONI, R. D. et al. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Lasers Med Sci.**, n. 25, p. 385–389, 2010. DOI 10.1007/s10103-009-0706-z

SPERANDIO, F. F. ; SIMOES, D. A. ; ARANHA A.C.C. ; CORREA, L. ; SOUSA, S. C. O. M. . Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, p. 581-587, 2010.

STEELE, C.; RATTERREE, M.; FIDEL, P.L. Differential Susceptibility of Two Species of Macaques to Experimental Vaginal Candidiasis. **The Journal of Infectious Diseases**. n. 180, p. 802–810, Sep, 1999.

TANAKA, M.; MROZ, P. DAI, T. et al. Linezolid and Vancomycin Decrease the Therapeutic Effect of Methylene Blue-Photodynamic therapy in a Mouse Model of MRSA Bacterial Arthritis. **Photochemistry and Photobiology**. v. 89, n.3, p.679 – 682, mai-jun, 2013.

TARDIVO JP, DEL GIGLIO, A, OLIVEIRA CS, GABRIELLI DS, JUNQUEIRA, HC, TADA, DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagn Photodyn Ther.**, v.2, n.3, p. 175-191, 2005.

TARRY, W. et al. *Candida albicans*: The Estrogen Target for Vaginal Colonization. **Journal of Surgical Research**, v. 129, n. 2, p. 278-282, dez, 2005.

TAVARES, A.; CARVALHO, C.M.B.; FAUSTINO, M.A. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. **Mar. Drugs**, v. 8, p 91-105, 2010.

TAYLOR, B. N. et al. Profile of *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Elicited during Vaginal Infection **Infect. Immun.**, p. 1828-1835, mar, 2005.

TEICHERT, M. C., JONES, J. W. USACHEVA, M. N. BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue–mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 93, n.2, p.155-160, 2002.

VILELA, S. F. G. et al. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An *in vitro* study. **Archives of Oral Biology**, n.57, p. 704-710, 2012.
doi:10.1016/j.archoralbio.2011.12.002

WAINWRIGHT, M., Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother.**, v.42, n.1, p.13-28, 1998.

WAINWRIGHT, M. Photoinactivation of viruses. **Photochem Photobiol Sci**, v.3, n.5, p.406-411. 2004.

WILSON, M; DOBSON J; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol**, v.25, n.2, p.77-81. 1992.

ZHANG, X. et al. Estrogen Effects on *Candida albicans*: A Potential Virulence-Regulating Mechanism. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1441-1446, apr, 2000.

ZHOU, X. et al. Characterization of Vaginal Microbial communities in Adult Healthy Women using cultivation-independent Methods. **Microbiology**.v. 150, p. 2565-2573, 2004.

WÄCHTLER, B.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* adhesion to and invasion and damage of vaginal epithelial cells: stage-specific inhibition by clotrimazole and bifonazole. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.55, n.9, p.4436-4439, 2011.

WILSON, D. et al. Clotrimazole Dampens Vaginal Inflammation and Neutrophil Infiltration in Response to *Candida albicans* Infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n.10, jul, 2013.

APÊNDICE 1

Preparo da Solução de Estrogênio
Valerato de 17 β estradiol 1mg/mL

Preparo da Solução de Estrogênio

Valerato de 17 β estradiol 1mg/mL

1 – Materiais utilizados:

- Álcool Benzílico Merck®
- Óleo de gergelin Lipo® do Brasil)
- Valerato de 17- β estradiol Sigma®
- Béquer e bastão de vidro
- Filtro microporoso com membrana de 0,22 μ m estéreis
- Micropipeta com ponteiros estéreis
- Seringa descartável estéril 5 mL
- Tubos Eppendorf
- Autoclave
- Balança analítica
- Fluxo laminar

2. Preparo das soluções:

Solução estoque (5mg/mL)

Valerato de β estradiol _____ 20mg
 Álcool benzílico (99,5%) _____ 40mg (~0,038mL)
 Óleo de gergelin qsp _____ 4,0mL

Solução de Uso (1mg/mL)

Solução de Valerato de β estradiol 5mg/mL _____ 1,0mL
 Óleo de gergelin q.s.p _____ 5,0mL

O estradiol foi dissolvido nos líquidos e a seguir utilizou-se um mL da solução estoque para completar o volume para 5 mL, o conteúdo foi homogeneizado e esterilizado por passagem em filtro estéril de 0,22 μ m diâmetro, utilizando uma seringa, sendo armazenado em tubos Ependorff de 2ml, previamente esterilizados em autoclave a 121°C/ 15 min.

ANEXO 1

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL