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

**ESTUDO *IN VITRO* DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
EM *CANDIDA ALBICANS* MEDIADA POR AZUL DE METILENO E
GLICOSE**

LUIS CLÁUDIO SUZUKI

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

**Orientadora:
Prof^a. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**São Paulo
2015**

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

**ESTUDO *IN VITRO* DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
EM *CANDIDA ALBICANS* MEDIADA POR AZUL DE METILENO E
GLICOSE**

LUIS CLÁUDIO SUZUKI

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

**Orientadora:
Prof^a. Dra. Martha Simões Ribeiro**

São Paulo
2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho para todos os futuros pesquisadores aplicados no esforço de controlar as infecções causadas por biofilmes. Espero que este trabalho possa influenciar e ajudar pelo menos uma pessoa. Dedico também para meus filhos, Luis, Ricardo e Guilherme. Espero que este exemplo seja positivo nas suas vidas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço minha esposa fiel e companheira Sara Suzuki, sendo imbuída de paciência e com muito esforço conduziu com sucesso esplendoroso a criação de nossos filhos, mesmo sendo gestante por duas vezes durante o período do doutorado! Minha enorme gratidão e eterno reconhecimento pela ajuda.

Agradeço minha orientadora, amiga, muitas vezes até mãe, Prof^a. Martha Simões Ribeiro. Além de orientadora, conselheira, superprotetora e honesta, uma excelente professora de português, sempre nos ajudando em tudo durante este longo período no IPEN.

Agradeço aos meus pais, Cecília e Hisashi, por sempre me apoiarem, ajudarem e darem exemplo de conduta, ética, educação e humildade. A importância da carreira acadêmica foi passada por eles para mim e para meus irmãos.

Agradeço meus irmãos, Ricardo e Cássia, e suas respectivas famílias por sempre me apoiarem e darem o exemplo acadêmico, por vezes me impulsionando em realizar um bom trabalho.

Agradeço minha madrinha Elisa e sua família, por ser um suporte indispensável na criação dos meus filhos, sempre do lado da minha esposa neste período difícil.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos que fiz durante todos esses anos no CLA. Tenho que ressaltar a importância direta de duas pessoas na realização deste trabalho: Renato Araújo Prates e sua esposa Ilka Tiemy Kato. Além de padrinhos de casamento, foram conselheiros e importantíssimos colaboradores do trabalho.

Ao Prof. Anderson Zanardi de Freitas, por ajudar e realizar medidas no OCT, sempre disponibilizando o prestativo aluno Lucas de Pretto.

Aos pesquisadores Prof. Wagner de Rossi pelo uso do MEV ambiental, estando sempre disponível para o uso, e à Prof^a. Denise Maria Zezell, pelo microscópio de fluorescência.

À Leica microsystems do Brasil e o funcionário Piero Bagnaresi, especialista de aplicação e produto, pela disposição e conhecimento nas análises dos dados.

Ao pesquisador do programa de pós-graduação em biofotônica aplicado em ciências da saúde Alessandro Melo Deana, pela construção e caracterização do LED utilizado neste estudo.

Os amigos do CLA: Caetano, Tania, Alessandra, Aguinaldo, Saiyuri, Sílvia, Camila, Débora, Claudinei, Fernanda, Carolzinha, Thiago(s), Marcelo, Paulo, Vivi, Anne, Cássio, Letícia, Leandro, Maíra, Pedro, Derly, pela amizade e carinho.

Aos amigos pesquisadores: Marcos Scapin, Ricardo Samad, Marcus Paulo Raele, Laércio Gomes, Gessé Calvo Nogueira, ao chefe Niklaus Ursus Wetter, Sonia Lícia Baldochi, Ivone Mulako Sato e Nilson Dias Vieira Jr.

À Marilu Hataoka, Maria de Lourdes Akiyama, João Bosco e Eiji por me darem muita ajuda com meus filhos durante todo o período de doutorado.

Aos funcionários: Luiz Rosa, Cléber, Rubens por sempre me acompanharem nos finais de semana de experimentos. Sempre preparando um café e dispostos em uma divertida conversa.

Aos funcionários: Dora, Dona Marta, Sueli, Valdir, Tort, Elsa, pelo carinho durante todos estes anos de Ipen.

Ao Ipen e ao Centro de Lasers e Aplicações pela infraestrutura fornecida para este estudo.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado e pela taxa de bancada disponibilizada.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais
inteligência.”

Henry Ford

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação
no trabalho e reconhecimento.”

Frederick Herzberg

ESTUDO *IN VITRO* DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM *CANDIDA ALBICANS* MEDIADA POR AZUL DE METILENO E GLICOSE

RESUMO

Neste estudo foi proposto um modelo de formação de biofilme fúngico formado por *Candida albicans* em dois diferentes substratos associado ou não à glicose para o estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica (PDT) utilizando o azul de metileno (AM) como fotossensibilizador, avaliando os efeitos de dois comprimentos de onda distintos incluindo a investigação na captação do AM quando sensibilizados previamente com a glicose. Foi avaliada a susceptibilidade da levedura em suspensão de células crescidas por 24 h (início da fase estacionária) com e sem a adição prévia da glicose. Foram investigadas duas linhagens de *C. albicans* para a padronização do biofilme, ATCC 90028 e ATCC 10231. Com os biofilmes formados, avaliamos a captação de AM para determinarmos a mais eficiente concentração e tempo de pré-irradiação (PIT). Por último, avaliamos sua sensibilidade à PDT em dois comprimentos de onda distintos ($\lambda = 645$ nm e $\lambda = 660$ nm) em função do tempo de irradiação (potência = 16 mW, taxa de fluência = 127,3 mW/cm²). A linhagem de célula que possibilitou a formação de biofilme foi a ATCC 10231 em discos de hidrogel. A menor concentração que possibilitou uma melhor captação do AM foi de 500 μ M com um PIT de 30 min e em contato prévio com a glicose 50 mM por 90 min. O comprimento de onda mais eficiente, que promoveu redução em leveduras e biofilmes foi o de $\lambda = 660$ nm, reduzindo melhor no estudo de leveduras quando sensibilizados com glicose. Nos biofilmes, a redução foi iniciada mais precocemente sem a adição de glicose (com 6 min de irradiação e fluência = 46 J/cm²), porém, em 12 min (fluência = 92 J/cm²) o grupo com glicose passou a ter maior eficiência.

IN VITRO STUDY OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY IN *CANDIDA ALBICANS* MEDIATED BY METHYLENE BLUE AND GLUCOSE

ABSTRACT

In this study we propose a fungal biofilm model of *Candida albicans* developed on different substrates for photodynamic effect of photodynamic therapy (PDT) study, using the methylene blue (MB) as photosensitizer, evaluating the effects on two wavelengths distinct, including investigating the difference in uptake of MB when sensitized with glucose. Susceptibility was evaluated in the yeast cell suspension with or without the prior addition of glucose to cells grown for 24 h (early stationary phase). Two strains of *C. albicans* were investigated for the standardization of the biofilm, ATCC 90028 and ATCC 10231. In biofilms, we evaluated the uptake of MB including cell suspension to determine the most efficient concentration and pre-irradiation time (PIT). Finally, we assess its sensitivity to PDT in two distinct wavelengths ($\lambda = 645$ nm and $\lambda = 660$ nm) as a function of irradiation time (power = 16 mW, fluence rate = 127,3 mW/cm²). The ATCC strain that allowed the biofilm formation was ATCC 10231 on hydrogel disks. The lowest concentration that enabled better uptake of MB was 500 μ M with a PIT 30 min and prior contact with 50 mM glucose for 90 min. The most effective wavelength, which promoted a reduction in biofilms and yeasts was $\lambda = 660$ nm, reducing yeast best when primed with glucose and reduction in biofilms started earlier without the addition of glucose (6 min irradiation, fluence = 46 J/cm²), but at 12 min (fluence = 46 J/cm²) the glucose group now has greater efficiency.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	ix
LISTA DE FIGURAS/TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS	xviii
1. Introdução	19
2. Objetivo:	26
3. Revisão de literatura:	28
3.1. <i>Candida albicans</i>	28
3.2. PDT em <i>C. albicans</i> e biofilmes	32
3.3. Transportadores de hexose.	37
4. Materiais e métodos	41
5. Procedimento Experimental	42
5.1. Etapa I – Formação de biofilme	42
5.1.1. Meios de cultura: Caldo Sabouraud e YNB modificado	44
5.1.2. Substratos, cepas ATCC 90028 e ATCC 10231:	45
5.1.3. Avaliação do biofilme formado nos substratos:	46
5.1.4. Análise Estatística:	48
5.2. Etapa II - Teste de captação de AM no biofilme:	49

5.2.1. Análise Estatística:	52
5.3. Etapa III – Teste da influência do tempo de irradiação na PDT.....	52
5.3.1. Teste da sensibilidade de leveduras em suspensão com e sem a adição de glicose:	53
5.3.2. Análise da sensibilidade do biofilme à PDT determinando o tempo de irradiação:	55
5.3.3. Análise Estatística:	57
6. Resultados	58
6.1. Etapa I – Formação de biofilme:	58
6.2. Etapa II – Teste de captação de AM no biofilme:.....	62
6.3. Etapa III – Teste da influência do tempo de irradiação na PDT:	75
6.3.1. Teste da sensibilidade de leveduras em suspensão com a adição de glicose:	75
6.3.2. Análise da sensibilidade do biofilme à PDT determinando o tempo de irradiação	78
7. Discussão:	85
Conclusão:	92
Referências	93

LISTA DE FIGURAS / TABELAS

Página

Tabela 1. Legendas dos grupos estudados	74
Figura 1. Densidade óptica (492 nm) de alíquotas com <i>C. albicans</i> ATCC 10231 crescidas em YNB modificado na presença de antifúngicos com diferentes concentrações. Grupo controle = •. Imagem adaptada de Blanco <i>et al</i> , 1992 ⁴⁶	30
Figura 2. Cinética de crescimento da <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 monitorada pela absorbância em $\lambda = 660$ nm. Imagem adaptada de Cyranka, 2011 ⁴⁷	30
Figura 3. Cronograma de crescimento do biofilme.....	44
Figura 4. Espectros de absorção em U.A. de 350 nm até 750 nm. Em A, o espectro de absorção da glicose 50 mM + AM 50 μ M e em B somente AM 50 μ M.	49
Figura 5. Espectro de absorção do AM em unidades arbitrárias. Note a banda de absorção do dímero (pico $\lambda = 610$ nm) e do monômero (pico $\lambda = 664$ nm) e a banda de emissão dos dois LEDs utilizados neste trabalho.	53
Figura 6. Amostras de discos de hidrogel com o biofilme formado sendo irradiado após a fotossensibilização com o AM com 500 μ M por 30 min. Em A: início da irradiação e em B: amostras após 15 min de irradiação.	56
Figura 7. Fotomicrografias de biofilme não formado de <i>C. albicans</i> ATCC 90028, em lentes de contato gelatinosa em 72 h (A) e 96 h (B) com o caldo Sabouraud.	58
Figura 8. Elétron-micrografias das amostras de biofilme de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 crescido em lentes de contato (hidrogel). Em A, B e C observa-se biofilme não formado sobre as amostras, sendo crescidas em caldo Sabouraud após 72 h. Em D observamos a ausência de células aderidas, realizadas na fase de adesão celular, para a formação de biofilme.	59
Figura 9. Elétron-micrografias das amostras de biofilme de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 crescido em lentes de contato (hidrogel). Em A, imagem 3D do biofilme.	

Note a maior quantidade e riqueza de biofilme formado com a metodologia utilizada, comparada à metodologia da ATCC 90028 e com YNB modificado 1/5 de meio crescido no frasco. Em B o biofilme em maior aumento. Setas amarelas indicam as hifas, e as laranjas indicam os canais de água.....	60
Figura 10. Discos de hidrogel sobre uma placa de petri. Em A: disco sem biofilme (translúcido) e em B: disco com biofilme formado (com maior opacidade).	60
Figura 11. Imagem por OCT do biofilme de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 crescido em lente de contato. Em A: determinação da espessura do biofilme. Note que a lente de contato (L) é transparente para esta técnica. Em B: distribuição do biofilme sobre o substrato (n=4).	61
Figura 12. Curvas das intensidades de fluorescência (excitação em $\lambda=532$ nm e fluorescência em $\lambda=690$ nm) das amostras sem biofilme em diferentes concentrações de AM (n= 8). AM diluído em água na presença de SDS 1% e NaOH 0,1 M.	62
Figura 13. Valores médios $\pm$ DP do valor da intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de AM. *: $p < 0,05$. (n=6). Excitação $\lambda= 532$ nm e fluorescência $\lambda= 690$ nm.	63
Figura 14. Fluorescência medida (excitação $\lambda= 532$ nm e fluorescência $\lambda= 690$ nm) nas amostras de biofilme digeridas por NaOH + SDS, após o contato com AM em diversas concentrações por 30 min. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (n=6). Excitação $\lambda= 532$ nm e fluorescência $\lambda= 690$ nm.	64
Figura 15. Intensidade de absorbância $\pm$ DP (em U. A.) do AM das amostras de biofilmes crescidos nas lentes de contato.	65
Figura 16. Fotomicrografias de fluorescência confocal. Em azul, fluorescência do marcador Hoecsht; em vermelho, QD CdTe Con-a; em verde fluorescência do AM e por último a composição dos três quadros. Em A: biofilme sem a glicose e em	

contato com o AM 500 μ M por 30 min. Em B: biofilme em contato com a glicose 50 mM por 90 min + AM 500 μ M por 30 min. Barra de escala= 10,0 μ M.....	68
Figura 17. Espectro de fluorescência do QD CdTe Con-A quando excitado em λ = 405 nm.	68
Figura 18. Espectro de fluorescência da <i>C. albicans</i> 10231 quando excitado em λ = 405 nm.	69
Figura 19. Quantificação de fluorescência do AM através do software LAS AF em função da profundidade do biofilme. Em vermelho: amostras em contato com 500 μ M de AM por 30 min. Em preto: amostras em contato inicial com glicose 50 mM por 90 min e posteriormente 30 min em AM 500 μ M. Valores normalizados com o inicial.	70
Figura 20. Foto-micrografias de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 em forma de levedura com a adição de AM 50 μ M. O canal 1 se refere à auto-fluorescência da <i>C. albicans</i> quando excitado em λ = 405 nm e captado em λ = 640 nm, o canal 2 representa a fluorescência do AM, quando excitado em λ = 532 nm e captado em λ = 690 nm long-pass. O canal 3 é o campo claro e o canal 4 a composição dos três. Em A: células de levedura com o AM por 10 min, em B: células com 20 min de contato com AM e C: PIT de 30 min com AM 50 μ M. Seta azul indica células pouco coradas, seta amarela indica células coradas e seta verde célula fora do foco confocal.	72
Figura 21. Foto-micrografias de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 em forma de levedura com a adição prévia de glicose 50 mM e posteriormente AM 50 μ M. O canal 1 se refere à auto-fluorescência da <i>C. albicans</i> quando excitado em λ = 405 nm e captado em λ = 640 nm, o canal 2 representa a fluorescência do AM quando excitado em λ = 532 nm e captado em λ = 690 nm long-pass. O canal 3 é o campo claro e o canal 4 a composição dos três. Em A: células de levedura com o AM por 10 min, em B: células com 20 min de contato com AM e C: PIT de 30 min com AM	

50 μ M. Seta azul indica células pouco coradas, seta amarela indica células coradas e seta verde célula fora do foco confocal.	74
Figura 22. Absorbância do formazan oriundo da redução do sal de XTT pela respiração das células em função do número de UFC contido nas placas de 96 poços em um volume de 100 μ L.	75
Figura 23. Gráfico de susceptibilidade da <i>C. albicans</i> ATCC 10231 com médias e desvios padrões quando submetidas à PDT, sem a adição de glicose e em 24 h de crescimento (n= 12).	76
Figura 24. Gráfico de susceptibilidade da <i>C. albicans</i> ATCC 10231 com médias e desvios padrões quando submetidas à PDT, com a adição de glicose e em 24 h de crescimento (n= 12).	77
Figura 25. Elétron-micrografias das amostras de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 crescidas por 24 h em diferentes meios e condições. Em A: 24 h de crescimento em 10 mL de caldo YNB modificado com atmosfera de 4/5 (tubo falcon com capacidade de 50 mL). Em B: 24 h de crescimento em 10 mL de caldo Sabouraud em um tubo falcon com capacidade de 15 mL. As setas amarelas indicam a presença de tubo germinativo e a seta laranja indica a hifa.	78
Figura 26. Amostras de biofilme formado sobre discos de hidrogel em placa de 96 poços. Em A: amostras sem lavagem com PBS. Em B: amostras após a lavagem com PBS e em C: amostra com AM incubadas esperando o PIT.	79
Figura 27. Gráfico da absorbância do formazan $\pm$ DP oriundo da redução do sal de XTT, indicando índices de respiração celular das amostras na redução de biofilme quando submetido à PDT realizada com o LED λ = 645 nm (n= 9) sem a adição de glicose.	80
Figura 28. Gráfico da absorbância do formazan $\pm$ DP oriundo da redução do sal de XTT, indicando índices de respiração celular das amostras na redução de	

biofilme quando submetido à PDT realizada com o LED $\lambda = 645$ nm na presença de glicose (n= 9).	81
Figura 29. Gráfico da viabilidade celular mensurado pelo ensaio XTT, indicando índices de respiração celular das amostras. PDT realizada com um LED de $\lambda = 660$ nm sem adição prévia de solução com glicose. Valores normalizados com a média do grupo controle (n=9).	82
Figura 30. Gráfico da viabilidade celular mensurado pelo ensaio XTT, indicando índices de respiração celular das amostras. PDT realizada com um LED de $\lambda = 660$ nm com adição prévia de solução com glicose. Valores normalizados com a média do grupo controle (n=9).	83
Figura 31. Elétron-micrografias de biofilmes de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 formado sobre amostras de hidrogel. Em A: biofilme formado por 48 h e em contato prévio com a glicose. Em B: biofilme formado por 48 h. Em C: biofilme após PDT sem glicose 12' e em D: biofilme após PDT com adição de glicose G12'. As setas amarelas em A e B indicam os canais de água. Em C, as setas amarelas indicam as células alteradas, aparentemente com perda de material citoplasmático.	84
Figura 32. Tubos falcon contendo ATCC 10231 crescidos por 24 h, em diferentes meios de cultura após 5 min de centrifugação. Meio YNB modificado (esquerda) e caldo Sabouraud (direita).	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	azul de metileno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (coleções de culturas americanas)
ATP	adenosina trifosfato
Con-A	concanavalina A
DP	desvio-padrão
FS	fotossensibilizador
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HGT	<i>horizontal gene transfer</i> (transferência horizontal de genes)
LATO	Laboratório de Terapia Óptica
LED	<i>light emission diode</i> (diodo emissor de luz)
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i> (Principal Superfamília Facilitadora)
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i> (concentração inibitória mínima)
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i> (Terapia Fotodinâmica)
PF	Photofrin® (porfímero sódico)
PIT	<i>Pre-irradiation Time</i> (Tempo de pré-irradiação)
QD CdTe	<i>Quantum Dot CdTe</i> (Pontos Quânticos CdTe)

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
rpm	rotações por minuto
SFB	soro fetal bovino
SRR	<i>sugar receptor-repressor</i> (do inglês)
U. A.	unidades arbitrárias
UFC/mL	unidades formadoras de colônia por mililitro
YNB modificado	<i>yeast nitrogen base with 50 mM dextrose</i> (Meio de cultura fúngica com bases nitrogenadas enriquecida 50mM dextrose).

LISTA DE SÍMBOLOS

J	joule
cm	centímetro
h	hora
L	litro
min	minuto
mm	milímetro
mM	milimolar
mW	miliwatt
M	molar
nm	nanometro
°C	graus Celsius
g	grama
μm	micrometro
μM	micromolar
μL	microlitro
s	segundo

1. Introdução

Durante os últimos 60 anos, o uso indiscriminado de antimicrobianos associados com a automedicação aumentou significativamente o surgimento de micro-organismos antibiótico-resistentes^{1; 2}. A resistência desses seres vivos, principalmente fungos e bactérias, acontece quando um micro-organismo sobrevive na presença do antimicrobiano em uma concentração sub-letal, levando a linhagem resistente a predominar nesse meio. Fungos e bactérias são seres vivos que se replicam rapidamente, fato que pode tornar provável uma mutação bem sucedida, principalmente quando a concentração do fármaco antimicrobiano está em níveis sub-letais³.

Candida albicans é um fungo normalmente encontrado no corpo humano sem, contudo, ocasionar um processo patológico em indivíduos saudáveis. Esse micro-organismo pode facilmente ser recuperado da mucosa oral, vaginal, do trato gastrointestinal e da pele⁴. Entretanto, sob certas circunstâncias, *C. albicans* pode causar uma infecção conhecida como candidose, que acomete principalmente pacientes imunodeficientes ou imunossuprimidos, podendo evoluir para infecção sistêmica⁴.

Além disso, a incidência de infecções hospitalares por fungos tem aumentado expressivamente nas últimas décadas, sendo responsáveis por até 60 % dos óbitos⁵. Neste contexto, as espécies do gênero *Candida* têm sido os agentes mais frequentemente encontrados, correspondendo a cerca de 80 % das infecções fúngicas de origem hospitalar, e são a quarta causa de infecção da corrente sanguínea, conduzindo ao óbito em torno de 25 a 38 % dos pacientes que desenvolvem candidemia^{5; 6}.

A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença em conjunto é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Um dos principais mecanismos de virulência deste fungo é a sua versatilidade de adaptação e capacidade de adesão em sítios variados, principalmente a formação de biofilme em uma superfície^{7; 8}. O biofilme é uma comunidade organizada de micro-organismos, em uma massa diferenciada de microtubos, que se forma em uma superfície viva ou inerte, circundada de uma matriz extracelular polimérica⁹.

Alguns modelos *in vitro* foram utilizados no estudo dos estágios de desenvolvimento e protocolos para a formação do biofilme de *C. albicans*^{10; 11; 12; 13; 14}. Atualmente está claro que a interação e adesão entre célula-substrato e célula-célula, além da levedura poder se diferenciar em hifas, e a produção de matriz extracelular, são passos chaves para o desenvolvimento e maturação do biofilme⁹. A maturação do biofilme acontece em ambientes líquidos com a existência de um fluxo, tornando essa matriz extracelular polimérica mais densa, organizada e, conseqüentemente, mais resistente à penetração de substâncias no seu interior, conferindo uma autodefesa química aos agentes tóxicos⁷. O biofilme de *C. albicans* se organiza em três fases de desenvolvimento: fase inicial (0-11 h) – as células oriundas da corrente sanguínea ou do meio externo aderem ao substrato e iniciam um crescimento horizontal das colônias sobre a superfície; fase intermediária (12-30 h) – momento em que ocorre um crescimento vertical do biofilme e, finalmente, a maturação (31-72 h) – fase onde ocorre, principalmente, um amadurecimento da matriz extracelular e da arquitetura do biofilme¹⁵. O tempo e a velocidade do fluxo também são fundamentais para a formação de um biofilme bem organizado com uma arquitetura complexa, contendo *water channels*

que permitem certa microcirculação no seu interior, levando a uma captação de nutrientes mais efetiva e à eliminação de catabólitos tóxicos^{4; 8; 16; 17}.

Os fungos, quando organizados em biofilme, possuem uma taxa de crescimento menor e, conseqüentemente, são menos susceptíveis a antifúngicos¹⁸. Outro mecanismo de menor susceptibilidade a antifúngicos seria a presença da matriz extracelular polimérica produzida na fase de maturação do biofilme, que envolve as células fúngicas e promove uma barreira físico-química aos antimicrobianos (no caso da anfotericina-B, um bem estabelecido antifúngico, o biofilme reduz em até 20 % sua ação letal)¹⁵. A qualidade da matriz dificulta a penetração dos antimicrobianos, sendo necessárias altas concentrações para combater o biofilme formado (até 1000 vezes, dependendo das características do fármaco)^{11; 15}. Nos biofilmes, aproximadamente 1 % das células são resistentes aos agentes antimicrobianos em concentração acima do MIC (concentração inibitória mínima, do inglês *minimal inhibitory concentration*), chamadas *persisters cells*¹⁹. Estas células geralmente se localizam em regiões com pouca concentração de nutrientes, ficando em um estado vegetativo de baixo metabolismo e, quando são aumentadas as concentrações de fontes de carbono, essas células voltam seu metabolismo para níveis normais¹⁸.

O biofilme formado por fungos, especialmente pelo patógeno *C. albicans*, é a principal causa de infecções associadas aos dispositivos médicos, próteses articulares e lentes de contato^{8; 12}. O aumento de pacientes imunocomprometidos portadores de HIV e o uso de drogas imunossupressoras em terapias oncológicas e pacientes transplantados agravaram ainda mais os problemas causados por este fungo²⁰. Os cateteres venosos centrais de inserção periférica são dispositivos intravenosos cirurgicamente instalados, e sua troca,

quando infectados, além do alto custo, pode ocasionar um risco para a saúde do paciente. O tratamento com antifúngicos nestes dispositivos bem como em próteses articulares artificiais apresentam baixos índices de sucesso, revelando uma tendência na busca de novas terapias alternativas para o combate de infecções oriundas de um biofilme instalado nessas superfícies artificiais. Neste panorama, a terapia fotodinâmica antimicrobiana surge como uma alternativa para o combate das infecções oriundas de biofilmes formados por *C. albicans*.

O efeito fotodinâmico é baseado na utilização de agentes fotossensibilizadores que são capazes de serem ativados na presença de luz. Células que são consideradas alvos do tratamento fotodinâmico são coradas pelo fotossensibilizador (FS) e irradiadas por luz com um comprimento de onda ressonante ao espectro de absorção do FS. Na presença de oxigênio, o processo fotoquímico rapidamente gera espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês *reactive oxygen species*) por transferência de energia ou de elétrons (oxigênio singlete, peróxidos, radicais hidroxilas e íons superóxidos). Essa técnica tem apresentado bons resultados contra um grande número de patógenos distintos, inclusive micro-organismos antibiótico-resistentes^{21; 22; 23; 24; 25}.

O FS azul de metileno (AM) é um FS que vem sendo bastante utilizado para esse tipo de tratamento, apresentando baixo custo e uso autorizado pela ANVISA*. Estudos mostram sua grande eficiência na redução microbiana de *C. albicans* em forma de levedura^{26; 27; 28; 29; 30; 31}, porém, em biofilme sua efetividade é menor³². A literatura relata baixa redução microbiana de *C. albicans* em biofilmes com terapia fotodinâmica utilizando AM^{32; 33}, o que pode permitir uma recolonização do micro-organismo, demonstrando uma necessidade de otimizar a

* www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B11672-1-0%5D.PDF

terapia para uma melhor eficácia do tratamento. Um fator importante seria melhorar a captação do FS no biofilme e, conseqüentemente, nas células que o compõem. Em trabalhos realizados em nosso laboratório pudemos avaliar a susceptibilidade da *C. albicans*, tanto em forma de levedura como organizado em biofilme, à PDT^{26; 34}. A concentração necessária de FS para uma eficiente redução fúngica foi 10 vezes maior em biofilmes do que na fase de levedura, indicando a dificuldade de difusão do AM no interior do biofilme^{26; 34}. Entretanto, o AM em concentrações elevadas pode apresentar toxicidade para as células do tecido hospedeiro, podendo agravar um quadro inflamatório³⁵.

Sendo assim, a possibilidade de reduzir, ou até eliminar, o biofilme formado em substratos usando concentrações de FS de baixa toxicidade no escuro é de grande relevância. Além disso, para possibilitar o tratamento com PDT, há a necessidade de estabelecer uma metodologia padronizada e reproduzível para a formação do biofilme, de forma que os melhores parâmetros para a terapia, como concentração do FS, tempo de pré-irradiação (PIT, do inglês, *pre-irradiation time*), tempo de irradiação e comprimento de onda da fonte de luz possam ser estudados.

Modelos de formação de biofilme em substratos são reportados na literatura^{11; 14; 16; 36}. No entanto, ainda são encontradas dificuldades para estabelecer um protocolo na obtenção de amostras de biofilmes em quantidade e qualidade padronizadas, que podem depender do substrato, tipo de cepa de *C. albicans* e do meio de cultura empregados no desenvolvimento do biofilme. Com relação ao substrato, deve-se promover boa adesão da célula, para que o biofilme cresça horizontal e verticalmente.

C. albicans possuem um sensor de glicose, muitas vezes associado ao dimorfismo da célula (transição levedura-hifa) determinante na sua patogenicidade³⁷. A célula em levedura é facilmente disseminada no organismo pelos fluidos corporais, enquanto que, na forma de hifa, o micro-organismo pode invadir tecidos e formar biofilmes sobre um substrato vivo ou inerte. A glicose é utilizada pela *C. albicans* como fonte de energia e carbono, que pode ser captada pelos mais de 20 tipos de transportadores de hexose que esse fungo possui³⁸. *S. cerevisiae* é um fungo muito utilizado na indústria alimentícia (na produção de cervejas, pães etc...) que possui transportadores de glicose ortólogos a *C. albicans*, e sua preferência na fermentação de glicose é bastante conhecida (o processo de fermentação demanda muito influxo de glicose, cada molécula gera somente 2 ATP para seu metabolismo, apresentando baixo rendimento). *C. albicans* utiliza a glicose na respiração celular, produzindo mais de 38 ATP por molécula de glicose. Assim, *S. cerevisiae* necessita de um maior número de transportadores para suficiente captação de glicose^{39; 40}. A forma pela qual os sensores da *C. albicans* respondem à presença de glicose é pouco conhecida, mas acredita-se que tais sensores são capazes de gerar um sinal intracelular que induz a expressão de genes HGT, grandes ativadores de transportadores de hexose. A *C. albicans* possui um sensor em sua membrana, o Hgt4, que promove filamentação de hifas, otimizando sua virulência³⁷. Quando os transportadores estão ativados, ocorre uma captação maior de glicose e, esse tipo de transporte pode ser uma via de entrada do AM para o interior da célula: em ensaios bacterianos, Allison *et al.* relataram a dificuldade de eliminar bactérias em estado persistente usando antibióticos⁴¹. Ao estimular seu metabolismo com a adição de glicose, as bactérias *Escherichia coli* (gram-negativa) e *Staphylococcus aureus*

(gram-positiva) persistentes tornaram-se sensíveis aos aminoglicosídeos, sendo constatado, inclusive, uma captação maior do antibiótico por estas células⁴¹.

Portanto, neste trabalho desenvolvemos um método de crescimento de biofilme maduro em quantidade e qualidade padronizadas em diferentes amostras para estudar e avaliar quantitativamente o efeito fotodinâmico. Investigamos também qual seria a melhor concentração de AM, em função do PIT, suficiente para otimizar a difusão do FS no interior da massa de biofilme, e, por fim, sugerimos um protocolo de irradiação para uma maior redução microbiana do biofilme por terapia fotodinâmica.

2. Objetivo:

Desenvolver biofilme de *C. albicans* de quantidade e qualidade padronizadas, para estudo do efeito fotodinâmico usando o azul de metileno como fotossensibilizador e verificar a influência da glicose na PDT.

Metas:

1. Desenvolver biofilme de *C. albicans* (cepas ATCC 90028 e ATCC 10231), variando os meios de cultura em caldo Sabouraud e meio YNB modificado para verificar a melhor padronização qualitativa e quantitativamente;
2. Desenvolver biofilme de *C. albicans* em discos de silicone elastomérico (cateteres), poços de placa de poliestireno e discos de hidrogel formado por 42% de polimetil-metacrilato e 58% de água (oriundos de lentes de contato), avaliando a melhor metodologia para formação de biofilme maduro através da microscopia eletrônica de varredura e quantificar sua espessura pela técnica de tomografia por coerência óptica;
3. Desenvolver ensaios *in vitro* para estudo da melhor concentração de AM e PIT para uma maior captação do FS no interior do biofilme, quantificada por microscopia confocal a laser e por espectroscopia de absorção óptica;
4. Testar dois comprimentos de onda para investigar os parâmetros de luz adequados para eliminar o biofilme do substrato através da PDT ($\lambda = 645$ nm e $\lambda = 660$ nm);

5. Acrescentar glicose ao biofilme para verificar se o efeito fotodinâmico pode ser otimizado.

3. Revisão de literatura:

3.1. *Candida albicans*

Os fungos foram classificados em um reino próprio em 1969, sendo anteriormente classificados como vegetais. Sua incapacidade de sintetizar clorofila ou outro pigmento fotossintético, não possuir a capacidade de armazenar amido como reserva alimentar e, apesar de algumas espécies aquáticas, não terem celulose na parede celular, possibilitaram sua exclusão do reino vegetal. Eles são considerados seres ubíquos, sendo encontrados em animais, vegetais, água e solo, com uma importante função de decompor a matéria orgânica⁴². *Candida albicans* é um fungo dimórfico nutricional, podendo ser capaz de crescer tanto em forma de hifas como em leveduras, dependendo da oferta nutricional⁴³. Esta habilidade em mudar seu modo de crescimento é intrigante, porém está fortemente associada à sua patogenicidade⁴⁴. A patogenicidade deste fungo também está associada na sua capacidade de se dividir em temperatura de 37°C. Outros importantes fatores muito investigados relacionados com sua virulência estão relacionados à sua parede celular (importante para seu crescimento e proteção contra a pressão osmótica), à adesão celular (que promove a colonização em tecido hospedeiro) e à produção de enzimas proteolíticas extracelulares (responsável pela penetração tecidual)⁴⁵. Muitos fenótipos da espécie *C. albicans* diferenciam-na em muitas subespécies, sendo catalogadas em linhagens diferentes devido ao comportamento típico de cada cepa⁴⁵.

Blanco e colaboradores testaram, em *C. albicans* ATCC 10231 crescidas no meio YNB enriquecido com glicose, a susceptibilidade do micro-organismo em várias concentrações de antifúngicos, medindo seu crescimento pela densidade óptica em $\lambda = 492 \text{ nm}$ ⁴⁶. Os tempos de incubação avaliados foram

0, 4, 12, 24, 48 e 72 h em um volume de 200 μ L. Através deste método, a fase estacionária de crescimento foi atingida após 24 h da cultura (Figura 1), e a fase lag desta ATCC compreende as duas primeiras horas de incubação, seguida pela fase exponencial, que ocorre após a quarta hora (Figura 2)⁴⁷.

Figura 1. Densidade óptica (492 nm) de alíquotas com *C. albicans* ATCC 10231 crescidas em YNB modificado na presença de antifúngicos com diferentes concentrações. Grupo controle = •. Imagem adaptada de Blanco *et al*, 1992⁴⁶.

Figura 2. Cinética de crescimento da *Candida albicans* ATCC 10231 monitorada pela absorbância em $\lambda = 660$ nm. Imagem adaptada de Cyranka, 2011⁴⁷.

As condições de crescimento deste microrganismo podem induzir o aparecimento de certos fenótipos comportamentais. O crescimento das células em um frasco fechado, contendo 1/5 do volume total de meio de cultura, pode induzir a formação de adesinas (estruturas glicoproteicas localizadas na superfície do microrganismo que interagem com receptores ou moléculas específicas⁴⁸), importantes para a adesão primária das células em um substrato para a formação de biofilme¹⁰. Isto se deve pela produção de CO_2 oriunda da respiração celular, sendo o aumento de concentração desta molécula responsável por sinalizar um importante mecanismo na produção de adesinas⁴⁹. Este mecanismo induz o

dimorfismo de levedura-hifa, essencial para a patogenicidade de *C. albicans*⁵⁰. A patogenicidade deste fungo ou a capacidade dele em provocar doença estão relacionadas aos fatores de virulência, que incluem além de adesão a sítios inertes ou vivos, a formação de tubo germinativo e posterior filamentação, variabilidade genotípica e variedade fenotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas, variabilidade antigênica e imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro^{51; 52}. Outro fator ambiental seria a presença de H₂O₂ exógeno em concentrações sub-tóxicas podendo induzir sua diferenciação em hifas⁵³.

Os biofilmes formados por *C. albicans* são quantificados atualmente através de dois diferentes métodos: os ensaios colorimétricos que determinam a sua atividade metabólica e a determinação do *dry weight* (do inglês – massa seca), que mensura a biomassa total dos biofilmes¹⁰. Os ensaios colorimétricos estão associados à redução de sais tetrazólios (XTT ou MTT) pelas desidrogenases mitocondriais ou redutases férricas, resultando em um formazan solúvel (XTT) ou insolúvel (MTT)^{10,11}. A intensidade da cor do formazan é proporcional à atividade metabólica, medida em densidade óptica da solução através de um espectrofotômetro. No caso do MTT um passo extra é necessário, a lise das células com o DMSO (dimetilsulfóxido), sendo então preterido e substituído pelo XTT¹⁰. A determinação do *dry weight* consiste em raspar todo o biofilme de um substrato (geralmente com uma lâmina de bisturi estéril) e filtrado em uma membrana-filtro (previamente pesada em uma balança analítica) sob vácuo. Esta membrana é seca em uma estufa e pesada posteriormente para a determinação de sua massa. A diferença entre os dois valores resultam na massa seca do biofilme¹⁰. A morfologia e a arquitetura do biofilme geralmente são

visualizadas através das microscopias de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser¹⁰. A análise por microscopia de fluorescência permite a visualização da matriz do biofilme durante sua formação. A microscopia eletrônica de varredura permite a avaliação da topografia do biofilme com grande magnificação, porém o processamento das amostras podem degradar estruturas hidratadas (como por exemplo, a matriz). A microscopia confocal é capaz de analisar tridimensionalmente a arquitetura do biofilme, bem como mensurar sua espessura sem processamento da amostra, preservando estruturas morfológicas nativas¹⁰.

3.2. PDT em *C. albicans* e biofilmes

A capacidade de formar biofilme é um fator de virulência das espécies de *Candida*. Um estudo realizado em 2009 recuperou amostras sanguíneas de 32 pacientes com candidemia e 19 pacientes HIV positivos (em lesões orofaríngeas), sendo isoladas as espécies de *Candida* e separadas através de sua atividade pelo ensaio de XTT, comparando também sua habilidade em formar biofilme. *C. albicans*, *C. lusitanae* e *C. krusei* produziram mais biofilme do que as outras espécies. Em amostras sanguíneas, *C. tropicalis* e *C. albicans* foram as predominantes, sendo encontradas outras espécies não *albicans*, mas em lesões orais foram encontradas somente *C. albicans*. O estudo mostrou que linhagens com crescimento lento apresentam grande capacidade de formar biofilmes. Outro estudo, de infecção em camundongos usando linhagens de *Candida*, revelou uma menor sobrevida dos animais quando *C. albicans* apresentava grande capacidade de formar biofilme, demonstrando que esta capacidade está diretamente associada à sua virulência⁵⁴.

Os primeiros estudos da utilização da PDT em *C. albicans in vitro* começaram a ser publicados na década de 90. Wilson e Mia²⁴ realizaram um estudo em 1993 utilizando como FS o azul de toluidina (AT), o AM e o cristal violeta. Os resultados deste estudo mostraram uma redução fúngica significativa, quando estes microrganismos foram sensibilizados com o AT e posteriormente irradiados com um laser de HeNe, obtendo também redução quando sensibilizados por AM e irradiados através de um laser de diodo de AsGaAl (energia= 876 mJ e densidade de energia= 2,04 J/cm²).

No final da mesma década, Mark Wainwright publicou uma revisão sobre a terapia fotodinâmica antimicrobiana (*PACT- Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*), descrevendo os mecanismos de ação de diversos fotossensibilizadores²². Quando uma molécula com anel aromático, como no caso do AM, absorve luz com uma determinada energia, sua camada eletrônica pode sofrer uma transição para um estado excitado singleto (com o *spin* dos elétrons pareados). Dependendo da sua estrutura molecular e do meio onde ele se encontra, esta molécula pode perder energia por processos físicos, voltando para seu estado fundamental. Porém, quando ela passa do singleto para o estado de transição tripleto (com o *spin* dos elétrons não-pareados), a molécula do FS também pode decair para o estado fundamental, transferindo esta energia para o substrato, promovendo reações de óxido-redução no ambiente onde ela se encontra. O FS no estado tripleto pode transferir esta energia para o oxigênio molecular (que no estado fundamental se encontra no estado tripleto também) formando oxigênio singleto. Esta habilidade da molécula do FS em produzir reações de óxido-redução e/ou formar oxigênio singleto (ambos causadores de danos celulares nos microrganismos), depende da quantidade de moléculas no

estado tripleto. O rendimento do FS é maior, portanto, quando um maior número de moléculas decai do estado singleto para o tripleto, e o FS permanece mais tempo neste estado energético de transição.

Em 2008, *Peloi et al* utilizaram um diodo emissor de luz (LED) como fonte de luz para a PDT⁵⁵. Os autores usaram um sistema LED emissor de luz vermelha com 5 mW de potência, com seu pico de emissão centrado no comprimento de onda de $\lambda = 663$ nm. O FS utilizado foi o AM, em concentrações variando entre 7 a 140,8 μ M, e o tempo de irradiação foi de 10, 20 e 30 min, e os autores obtiveram mais de 2 log de redução microbiana. Os microrganismos submetidos à PDT foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *C. albicans*, sendo testado inclusive o micro-crustáceo *Artemia salina*. O alvo da investigação foi a inibição do crescimento destes microrganismos e *C. albicans* sofreu uma inibição de 93,33 % do crescimento.

Os parâmetros de luz são um importante fator na PDT antimicrobiana. Prates *et al*, em 2009, estudaram a influência dos parâmetros de luz na fotoinativação de fungos⁵⁶, sendo testados *C. albicans*, *C. krusei* e *C. neoformans var. grubii*. Duas taxas de fluência distintas foram investigadas: 100 mW/cm² e 300 mW/cm² durante 3, 6 e 9 min, resultando em fluências entre 18 a 162 J/cm². O laser utilizado apresentava comprimento de onda na região do vermelho ($\lambda = 660$ nm), com uma potência de saída de 30 e de 90 mW. O FS escolhido foi o AM na concentração de 100 μ M. Os resultados mostraram uma redução microbiana de até 6 log, com um aumento de redução conforme se aumentava a fluência; quando a fluência foi padronizada, e o tempo de irradiação foi variado (resultando, portanto, em taxas de fluência diferentes), e os autores mostraram a

importância do tempo de exposição à luz durante a PDT, ainda que a fluência seja mantida.

Também em 2009, Souza *et al* compararam a eficiência da PDT em *C. albicans* ATCC 18804 utilizando três FS distintos: o AM, o AT e o verde de malaquita (VM)⁵⁷. O laser utilizado para a PDT tinha um comprimento de onda de $\lambda = 660$ nm, potência de saída de 35 mW e fluências variando entre 15,8 J/cm² (energia = 6 J; tempo = 171 s), 26,3 J/cm² (energia = 10 J; tempo = 285 s) e 39,5 J/cm² (energia = 15 J; tempo = 428 s). As concentrações dos FS foram de 0,1 mg/mL (no caso do AM, seria o equivalente a 3,1 mM) com o tempo de pré-irradiação (PIT, do inglês *pré irradiation time*) de 5 min realizado no *orbital shaker*. Os autores não encontraram diferenças estatísticas entre os FS estudados. Além disso, fluências maiores aumentaram a redução microbiana, sendo a maior redução constatada com o AT, utilizando uma densidade de energia de 39,5 J/cm². Os autores concluíram que a PDT realizada com os FS testados, irradiados com um laser de baixa potência, tem efeito fungicida satisfatório.

Um dos mecanismos pelo qual a PDT promoveria a morte microbiana, no caso da *C. albicans*, seria o aumento na permeabilidade da membrana, como observado por Giroldo e colaboradores⁵⁸. Os autores realizaram a PDT em suspensão de células com $1,5 \times 10^7$ células em um volume de 200 μ L, e AM em concentrações entre 0,01 % e 0,5 % (312,5 μ M e 15,6 mM respectivamente). A irradiação foi realizada por um laser (Theralaser, DMC, São Carlos, Brasil $\lambda = 684$ nm), com potência de saída de 35 mW e com taxa de fluência de 125 mW/cm², obtidas após 3 min de exposição. Após irradiação, as amostras fotossensibilizadas foram diluídas e plaqueadas para a contagem de UFC/mL e para o teste de captação de SYTOX green. Este fluoróforo (emissão em

$\lambda = 530$ nm) tem a propriedade de corar ácidos nucleicos, porém, quando íntegra, a membrana celular não permite sua passagem para o interior da célula. Os autores relataram uma inibição microbiana de aproximadamente 50 %, em concentrações abaixo de 1,56 mM, sendo que, acima desta concentração, a inibição foi progressivamente diminuindo. Ainda na concentração de 1,56 mM, o sinal de fluorescência do *SYTOX green* esteve maior do que nos outros grupos, exceto em relação ao grupo com 3,1 mM, que apresentou alta captação do fluoróforo, apesar de menor inibição de crescimento. Os autores concluíram que este dano causado pela PDT no grupo AM 3,1 mM promoveu uma maior permeabilidade celular, mas este dano foi reversível para as células.

Existem na literatura alguns trabalhos reportando a utilização da PDT em biofilmes bacterianos^{59; 60; 61} ou biofilmes de placa bacteriana bucal^{62; 63; 64; 65}. Em biofilme de *C. albicans*, Chabrier-Roselló *et al.* analisaram a PDT com o FS Photofrin® (porfímero sódico - PF)³³. Neste estudo, os autores relataram que o biofilme de *C. albicans* é sensível à fototoxicidade mediada pelo PF, sendo dose-dependente. A atividade metabólica do biofilme após a PDT foi significativamente menor do que a do biofilme tratado com anfotericina B, pelo mesmo período de tempo. Os autores sugeriram que os mecanismos de defesa do biofilme usados para subverter substâncias oxidativas antimicrobianas ou terapias antimicrobianas aparentemente não são eficazes durante a PDT com PF. Outros autores associaram o uso de AM em uma concentração de 6,25 mM e nanopartículas de ouro, que quando irradiadas em $\lambda = 660$ nm possuem um pico de emissão em $\lambda = 665$ nm, podendo excitar o AM⁶⁶. O biofilme de *C. albicans* (ATCC 90028) foi crescido por 24 h e as amostras foram submetidas ao teste XTT. Os autores observaram maior redução da atividade metabólica nas amostras irradiadas com

AM associado às nanopartículas de ouro, quando comparadas com biofilmes que receberam somente irradiação com AM, nas mesmas concentrações (ainda que irradiadas com a mesma fluência).

3.3. Transportadores de hexose.

Glicose, uma importante fonte de carbono para a maioria das células, foi identificada inicialmente por Andreas Marggraf em 1747. Os seres vivos, de bactérias a humanos, desenvolveram sensores e mecanismos de sinalização dedicados a detectar, captar e utilizar este açúcar^{67; 68; 69; 70; 71}. Os estudos com glicose realizados em fungos foram iniciados com a *Saccharomyces cerevisiae*, que possui enorme afinidade por glicose, produzindo etanol e CO₂ como produtos finais de seu metabolismo. *C. albicans* começou então a ser estudada devido ao seu enorme impacto na saúde humana, tendo seu mapeamento genético e bioquímico analisado^{72; 73; 74; 75}. A glicose possui uma influência morfogênica em *C. albicans* na transição levedura-hifa, podendo otimizar sua virulência no hospedeiro^{76; 77}. Os sensores de glicose fúngicos atuam através de três vias, sendo que nenhuma delas age independentemente: a SRR (do inglês *sugar receptor-repressor*), a via repressora de glicose e a via adenilato ciclase. Cada uma delas utiliza uma cascata de transdução de sinalizações, mas com uma interligação regulatória entre elas, gerando uma única rede de resposta à glicose⁶⁷.

A via SRR utiliza os transportadores de hexose, compostos de 12 proteínas transmembrana, que formam poros seletivos para substratos na membrana plasmática, facilitando a captação destes substratos (entre eles a glicose) em células eucariontes⁷⁸. Os transportadores são proteínas de uma

grande família denominada “*major facilitator superfamily*”, que transportam solutos por difusão facilitada³⁸. Em fungos, alguns transportadores de hexose estão associados aos sensores de glicose. Estes sensores foram estudados na *S. cerevisiae* e os sensores que monitoram o ambiente são os Snf3 (alta afinidade e na *C. albicans* é o Hgt4) e o Rgt2 (baixa afinidade). Estes possuem um domínio muito semelhante ao domínio que se liga ao açúcar (*sugar binding domains*) dos transportadores de hexose, sendo crítico para a resposta celular à glicose. Estes sensores são incapazes de transportar a glicose, mas geram sinais intracelulares que induzem a expressão de genes apropriados dos transportadores de hexose (Hxt). Cada sensor possui um terminal-C (uma cauda citoplasmática ausente nos transportadores) que amplifica a transdução de sinal de glicose para o repressor Rgt1, que é o maior responsável na regulação dos genes Hxt⁷⁹. Estas caudas são parte de um complexo de proteínas que inclui a caseína-quinase fúngica (Yck1, que são codificada pela YCK1 ou YCK2 das *S. cerevisiae*) e dois co-repressores, Std1 e Mth1. A *C. albicans* possui dois genes homólogos da YCK2 da *S. cerevisiae*, a YCK2 e YCK3, que são codificadas pela Yck1 da *Candida*, mas somente a YCK2 possui o terminal-C necessário para a sensibilidade de glicose na membrana plasmática⁸⁰.

Na presença de glicose, o Yck1 catalisa a fosforilação do Std1 e do Mth1, causando sua degradação. A depleção destes dois co-repressores permite a fosforilação do Rgt1 (que é um repressor), tornando este incapaz de se ligar ao DNA, e seu papel repressor dos genes é bloqueado⁸¹. Os sensores de glicose Snf3 e o Rgt2 e o complexo Std1/Mth1 repressor de Rgt1 são específicos para os fungos, bem como certos receptores que são sensíveis aos nutrientes (açúcares e aminoácidos), a Gpr1 e Gpa2 (*G-protein-coupled receptors and G α protein*)

presentes na superfície da célula fúngica⁸². Estas proteínas, responsáveis pela via adenilato ciclase, iniciam esta via quando o Gpr1 se liga na glicose com uma concentração de 20 mM e na sucrose dissacáride (glucose-frutose) em uma concentração menor (0,5 mM). A sucrose é hidrolisada no espaço periplasmático do fungo (entre a membrana plasmática e a parede celular), podendo ativar tanto o Gpr1 e o receptor SRR (Hgt4), sendo que na estimulação do Gpr1, este se torna GTP-bound (forma ativa) do Gpa2, pela liberação do GDP, podendo ser antagonizado pela Asc1⁸³. O Gpa2-GTP ativa a adenilato ciclase, que catalisa a produção do AMP cíclico do ATP⁸⁴. O esgotamento de ATP por esta via pode contribuir na flutuação de índices de AMP/ATP pela exposição de glicose, influenciando a via repressora de glicose através das mudanças na carga energética celular⁶⁷. Os aumentos dos índices de AMP cíclico influenciam na transição morfológica da célula de levedura-hifa⁸⁵ podendo inclusive aumentar a produção de adesinas⁸⁶ e a secreção de aspartil-proteases pelas hifas⁸⁷, que são fatores que possibilitam a colonização e virulência.

Com a via SRR ativada, os transportadores de hexose “*major facilitator superfamily*” (MFS) podem, além de captar a glicose, aumentar a captação de solutos por difusão facilitada, como o fotossensibilizador AM. Estes transportadores, quando silenciados com o INF₂₇₁, não permitem a entrada do AM nas leveduras de *C. albicans*, reduzindo sua atividade fotodinâmica e consequentemente uma menor fototoxicidade^{29; 88}.

Alguns autores, no entanto, relatam uma maior resistência de *Candida* spp aos agentes antifúngicos quando em contato prévio com glicose (maior resistência ao voriconazol e anfotericina B)⁸⁹. A glicose possui uma enorme afinidade com o voriconazol, formando uma ponte de hidrogênio que reduz a

atividade quimioterápica destas moléculas. O voriconazol possui três sítios possíveis de pontes de hidrogênio, enquanto que a anfotericina B, duas. Em casos de diabéticos, os autores sugerem um estudo da glicemia antes de escolher qual antifúngico de eleição. A glicose pode, inclusive, aumentar a resistência do patógeno *C. albicans* SC 5314 a stress oxidativo, osmótico, miconazol e ROS intracelular⁹⁰. Em leveduras ainda na fase exponencial, as células foram expostas por uma hora em glicose 1 % (56 mM), sendo submetidas ao tratamento por várias doses de peróxido de hidrogênio no período de uma hora. Sua resistência em concentrações acima de 10 mM de peróxido de hidrogênio aumentou significativamente. A resistência destas células a concentrações crescentes de ROS intracelular foi maior também nos grupos em contato com a glicose. O mecanismo de resistência estava associado a oxidases codificadas no AOX1a e AOX1b, que alguns autores relacionam com a proteção das células após a respiração mitocondrial, que aumenta os níveis intracelulares de ROS⁹¹.

A via de captação da glicose pelos MFS pode ser uma porta de entrada para o AM, podendo aumentar o efeito fungicida causado pela PDT. Entretanto, o aumento dos mecanismos antioxidantes provocado pela glicose podem dificultar os danos promovidos por esta terapia. Este estudo possui o objetivo de avaliar a susceptibilidade do microrganismo à terapia utilizando azul de metileno, quando sensibilizados com a glicose previamente.

4. Materiais e métodos

Dividimos nosso estudo em três etapas para uma melhor apresentação do trabalho. Primeiramente, estabelecemos uma metodologia para obtenção de amostras de biofilmes maduros de *C. albicans* em quantidade e qualidade padronizadas. Foram testadas duas cepas (ATCC 90028 e 10231), substratos compostos por polímeros distintos (silicone e hidrogel) e, dois meios de cultura para o crescimento das células fúngicas (Sabouraud dextrose e YNB modificado).

Com as amostras padronizadas, prosseguimos com o teste de captação do FS pelos biofilmes, pré-tratados ou não com glicose, avaliando a melhor concentração, tempo de contato para difusão e distribuição do AM no biofilme.

Na etapa III, realizamos previamente um teste de sensibilidade à PDT de *C. albicans* ATCC 10231 em forma de levedura associada ou não à glicose. Então de posse dos melhores parâmetros obtidos na etapa II, estudamos para qual comprimento de onda e tempos de irradiação obteríamos um resultado eficaz na redução microbiana. De fato, em baixas concentrações, o AM possui uma banda de absorção com pico em aproximadamente $\lambda = 664$ nm, enquanto que em concentrações mais elevadas, a dimerização deste fenotiazínico leva o seu pico máximo de absorção, para em torno de $\lambda = 615$ nm⁹².

5. Procedimento Experimental

5.1. Etapa I – Formação de biofilme

Os fungos *Candida albicans* cepas ATCC 10231 e ATCC 90028 foram obtidos dos estoques mantidos em glicerol 10% (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) e caldo Sabouraud do Laboratório de Terapia Óptica (LATO) do Centro de Lasers e Aplicações. A ATCC 90028 foi historicamente um isolado de sangue, sensível ao fluconazol. Já a ATCC 10231 foi isolada de um paciente com broncomicose, conforme informações da ATCC (*American Type Culture Collection*)[†].

Células de *C. albicans* foram crescidas no meio *Sabouraud dextrose* agar por 24 h a 37 °C em estufa microbiológica (Olidex CZ, ECB linea, Ribeirão Preto – SP.). A seguir, uma colônia foi colhida do agar com alça descartável e suspensa em meio de cultura *yeast nitrogen base* enriquecida com dextrose (YNB modificado) e *Sabouraud dextrose broth* em um tubo falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio YNB modificado (1/5 de seu volume, para favorecer o desenvolvimento de adesinas¹⁰), e posteriormente incubada por 24 h a 37 °C. As suspensões foram lavadas 2 vezes com PBS (*Phosphate Buffer Saline*- solução salina tamponada) sendo submetidas à centrifugação (1.200 g por 10 min) e ressuspensas em PBS. Após este procedimento, o líquido foi removido, mantendo o *pellet* de células depositado no fundo do tubo *falcon*.

Em um tubo de ensaio contendo 4 mL de PBS, adicionamos as células lavadas para serem contadas no espectrofotômetro (Biospectro SP-220 Curitiba,

[†] www.atcc.org/products/all/90028.aspx
www.atcc.org/products/all/10231.aspx

PR, Brasil com o software Winspec 2.3.1, *Princeton Instruments, New Jersey, EUA*). O nível de transmitância na suspensão de PBS foi ajustado em $17\% \pm 3\%$ para o comprimento de onda $\lambda = 530$ nm, que corresponde à concentração de $2,3 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Os substratos utilizados, discos de silicone elastomérico (cateteres) e discos de hidrogel formado por 42% de polimetil-metacrilato e 58% água (oriundos de lentes de contato), foram previamente autoclavados e mantidos em contato com soro fetal bovino (SFB) por 24 h. Após este período, removemos o SFB, lavamos os poços com PBS (em testes de desenvolvimento de biofilmes em poços de placas de 96 poços), removemos o PBS e adicionamos o inóculo contendo *C. albicans* na concentração de $2,3 \times 10^6$ UFC/mL. A figura 3 mostra o cronograma do procedimento experimental para crescimento do biofilme.

Figura 3. Cronograma de crescimento do biofilme

5.1.1. Meios de cultura: Caldo Sabouraud e YNB modificado.

Inicialmente testamos dois tipos de caldo para o desenvolvimento do biofilme: o caldo Sabouraud e o YNB modificado. A fonte de carbono de ambos é a dextrose (também denominado glicose ou glucose). O caldo Sabouraud possui uma alta concentração de dextrose e um pH ácido. O meio de cultura YNB modificado contém todos os nutrientes necessários para o crescimento de leveduras, exceto aminoácidos. O aumento de pH durante o crescimento das células favorece o dimorfismo celular na transição levedura-hifa. Uma alcalinização extracelular está relacionada à redução da fonte de carbono,

ocorrendo em meios pobres em glicose, e o fungo necessita de aminoácidos exógenos – condições semelhantes ao interior de células fagocitárias. Os fungos utilizam os aminoácidos como fonte de carbono e liberam amônia, elevando o pH e induzindo a formação de hifas⁹³. Testamos ambos para verificar qual meio oferecia melhor condição para a formação do biofilme.

Outro fator estudado na metodologia foi o crescimento das leveduras antes de serem incluídas nos substratos tratados. A influência da quantidade de meio de cultura no interior dos tubos falcon com somente 1/5 da sua capacidade total permite uma atmosfera com uma tensão de CO₂ aumentada¹⁰. Esta molécula pode agir como um sinalizador, promovendo a mudança de forma de levedura-hifa, essencial para a sua patogenicidade, melhorando a colonização inicial através das suas adesinas⁴⁹.

5.1.2. Substratos, cepas ATCC 90028 e ATCC 10231:

Os substratos utilizados para o crescimento do biofilme foram: discos de hidrogel (acuvue 2® - 42% polímero e 58% água) oriundos de lentes de contato gelatinosas^{10; 94}, e discos de silicone elastoméricos oriundos de cateteres^{12; 95}.

Os substratos de lentes de contato foram cortados com um *punch* com 4 mm de diâmetro (obtendo aproximadamente 10 amostras de substrato por lente). Os discos de silicone elastoméricos (SE) oriundos de cateteres foram confeccionados com 6 mm de diâmetro. Para a conformação em discos, os cateteres (originalmente em formato de tubo) foram planificados entre duas placas de vidro e aquecidos em autoclave. As tiras de silicone formadas foram então cortadas em discos. A utilização deste material se deve à semelhança

apresentada aos materiais usados em cateteres e a habilidade destes em crescer biofilme, segundo Hawser e Douglas^{12; 96}. Posteriormente, os discos obtidos (tanto de hidrogel, como de SE) foram esterilizados em autoclave com água destilada.

5.1.3. Avaliação do biofilme formado nos substratos:

Inicialmente, avaliamos por microscopia óptica e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a qualidade dos biofilmes formados nos substratos, onde pudéssemos observar a presença de estruturas morfológicas presentes no biofilme, como *water-channels* e hifas. Para análise MEV ambiental (*TM 3000 tabletop microscope, Hitashi, Krefeld, Germany*), as amostras não necessitaram de processamento.

A medida da espessura do biofilme foi realizada através da tomografia por coerência óptica (OCT) no Centro de Lasers e Aplicações – IPEN (*OCP930SR, Thorlabs, EUA*). As imagens obtidas pela OCT foram analisadas através do software ImageJ v 1.47v (Wayne Rasband, *National Institutes of Health, USA*). Em cada amostra, selecionamos 3 regiões distintas de biofilme do disco para medir sua espessura média.

Para a quantificação de biofilme formado foram utilizados a contagem de UFC/mL e o ensaio de XTT.

5.1.3.1. Contagem de UFC/mL:

Após o crescimento dos biofilmes, cada amostra foi introduzida individualmente em tubos tipo *eppendorf* contendo 1 mL de PBS. Os tubos foram identificados e submetidos a uma cuba ultrassônica de 40 kHz por 10 min e posterior agitação em vórtex, durante 60 s^{11; 13; 97}.

Após a homogeneização das amostras, retiramos alíquotas de 20 µL de cada tubo e submetemos à diluição seriada em placas de 96 *wells* conforme metodologia de Jett e colaboradores⁹⁸. Alíquotas de 10 µL foram removidas de cada diluição e escorridas em triplicata em meio de cultura Agar de dextrose Sabouraud. Subsequentemente, elas foram incubadas a 37 °C por 16 h para a contagem de UFC.

5.1.3.2. Ensaio XTT:

O teste de redução de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-hidroxide tetrazolium (XTT *Sigma-Aldrich*, *cat. no. X4251*) com menadione (*Sigma-Aldrich*, *cat. no. M5625*) para quantificação de biofilme avalia a atividade metabólica celular baseada na conversão do corante XTT pela desidrogenase mitocondrial em um formazan solúvel em água, cuja densidade óptica pode ser medida através de um espectrofotômetro^{10; 99}. Em um tubo falcon, adicionamos 8 mL de PBS, 100 µL de XTT (1 mg/mL) e 8 µL de menadione (1 mM)¹⁰. Nas amostras do biofilme (crescidas nos substratos de hidrogel ou SE) e previamente lavadas cuidadosamente com PBS, para a remoção de células não aderidas e remoção do excesso do meio de cultura, adicionamos 200 µL de XTT em poços estéreis de placas de 96 *wells* com as amostras de biofilme posicionadas e incubamos por 5 h. Após este período, removemos os 200 µL e colocamos as amostras individualmente em *ependorfs*. Centrifugamos em uma centrífuga de *ependorfs* a 2.000 g por 5 min, coletamos alíquotas de 100 µL do sobrenadante que foram colocadas em novas placas de 96 *wells* e a densidade óptica das soluções foi lida a $\lambda=492$ nm para detectar a quantidade de formazan formado^{10; 99}. Para determinarmos sua equivalência em leveduras, adicionamos, em placas de 96 poços, 100 µL de um inóculo de

levedura em suspensão com 17,1 % de transmitância (em $\lambda = 530$ nm, o equivalente a uma concentração de $2,3 \times 10^6$ UFC/mL, realizada anteriormente), e prosseguimos com as diluições seriadas 1/10 com 6 repetições (n=6). Adicionamos 100 μ L de uma solução de XTT 2x concentrado no poço e incubamos por 5 h. Após este período, cada alíquota foi transferida para um tubo *ependorf*, sendo que removemos 20 μ L para outra placa de 96 poços, sendo diluído 1/10 por 5 x e semeados em triplicata para a contagem microbiológica desta concentração de células. Os tubos *ependorfs* foram centrifugados durante 3 min a 2.000 g e transferimos 100 μ L do sobrenadante em placas de 96 *wells* de fundo chato para a leitura da absorbância de formazan. Com o resultado de UFC/mL, multiplicamos este valor por 0,1 para determinar a quantidade de UFC existentes em 100 μ L do inóculo, sendo este valor dividido por 10 em 6 repetições, para relacionarmos com as leituras do teste XTT nas suas respectivas diluições.

5.1.4. Análise Estatística:

Os índices de absorbância medidos pelo ensaio XTT e da espessura medida pelo OCT de todas as amostras foram submetidos à análise estatística pelo teste de variância *one-way* ANOVA. As médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$

5.2. Etapa II - Teste de captação de AM no biofilme:

Inicialmente, foi realizado um espectro de absorção do AM com e sem glicose, com o intuito de observar agregações ou alterações espectroscópicas da glicose com o AM. Para verificarmos se a glicose 50 μ M poderia interferir com o pico de absorção do AM, obtivemos os espectros de uma solução de 50 μ M de AM com e sem a glicose (fig 4) medidas no espectrofotômetro CARY 5000 UV-Vis-NIR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Observa-se que a glicose não influencia a absorção do AM nos comprimentos de onda $\lambda=660$ nm (banda do monômero) e $\lambda=615$ nm (banda do dímero). De fato, não se observa diferenças na absorbância das duas amostras nos comprimentos de onda entre 350 nm até 750 nm.

Figura 4. Espectros de absorção em U.A. de 350 nm até 750 nm. Em A, o espectro de absorção da glicose 50 mM + AM 50 μ M e em B somente AM 50 μ M.

Durante 48h, crescemos o biofilme em placas de 96 poços com tratamento de superfície para adesão celular e previamente condicionadas com SFB por 24 h, para obtenção do biofilme de *C. albicans*. Após sua formação, removemos o meio de cultura com o auxílio de uma micropipeta, lavamos com PBS e incubamos com o AM. A cada um dos poços, adicionamos 200 μ L de uma

solução digestora composta de 0,1 M de NaOH e dodecil sulfato de sódio a 1 %, durante 24 h para depois medirmos a quantidade de AM captada pelo biofilme¹⁰⁰. As placas foram posicionadas ao espectrofotômetro (*Spectramax M4, Molecular Devices Sunnyvale, CA – USA*), para cálculo da porcentagem de AM que penetrou no biofilme através da medida da intensidade de fluorescência no volume do líquido digerido, excitando em $\lambda = 532$ nm e lendo na emissão de $\lambda = 690$ nm. Em outra placa de 96 poços, fizemos uma tabela de valores de referência para a obtenção de uma curva de calibração, com o AM diluído nas soluções digestoras com concentrações de 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,13 μ M e 1,56 μ M em volume de 100 μ L com oito repetições em cada, para obtenção da média e desvio padrão das intensidades de fluorescência. Com esses valores de referência, calculamos a quantidade de moléculas captadas pelo biofilme.

Com os biofilmes padronizados formados nos substratos escolhidos (discos de hidrogel), prosseguimos com a inclusão dos biofilmes em diferentes concentrações de AM por diferentes tempos de contato, para identificarmos qual a concentração que seria utilizada para estudo do efeito fotodinâmico. Uma curva com 3 tempos de contato (5 min, 10 min e 30 min) foi obtida em 3 concentrações distintas (100 μ M, 500 μ M e 1 mM). Após a determinação do melhor tempo de contato, fixamos o tempo e incluímos os biofilmes em 5 concentrações diferentes: 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M e 1 mM.

A glicose foi outra variável incluída no teste de captação do fotossensibilizador pelos biofilmes. A adição de glicose no biofilme pode provavelmente ativar os transportadores de hexose através dos sensores de membrana HGT^{37; 38}, permitindo a entrada de glicose no interior das células do

biofilme. Esta captação pode ser a via de entrada do AM no interior da célula como possível explicação para uma ação fotodinâmica otimizada. As células persistentes do biofilme em contato com a glicose também podem ativar esses transportadores de hexose⁴¹, podendo promover a sensibilização destas com o AM. Utilizamos uma concentração de D(+) glucose (Sigma-Aldrich Corp., St Louis., MO, USA) semelhante à concentração do meio de cultura YNB modificado (50 mM), com um tempo de contato de 90 min (semelhante ao tempo de adesão celular primária das leveduras nos substratos para a formação de biofilme)¹⁰. Os biofilmes formados foram divididos em 2 grupos (n=6): glicose 90 min + 30 min AM e outro grupo sem glicose (PBS + 30 min AM). Incluímos as amostras nas soluções digestoras (após lavarmos uma vez com PBS) e levamos ao espectrofotômetro após 24 h para medirmos sua absorbância.

A quantidade de AM incorporada no biofilme foi analisada através da microscopia de fluorescência confocal (*Leica TCS-SP8 – Leica Microsystems– Wetzlar – Germany*). Utilizamos o software LAS AF (*Leica Microsystems– Wetzlar – Germany*) para analisar as imagens obtidas, quantificando a fluorescência do AM em função da profundidade nas amostras de biofilme com e sem a adição prévia de glicose por 90 min. Realizamos as imagens em três canais do microscópio confocal: canal 1 (azul) emissão 405 nm e filtro 461 nm (± 1 nm), canal 2 (vermelho) emissão 405 nm e filtro 605 nm (± 1 nm) e canal 3 (verde) emissão 532 nm e filtro 690-*long pass*. No canal 1 temos a fluorescência medida do fluoróforo de núcleo Hoechst 33342 (Invitrogen- Molecular Probes), no canal 2 a fluorescência do ponto quântico QD CdTe conjugado com Con-A e no canal 3 temos a captação da fluorescência do AM. O QD conjugado com a

concanavalina-A foi utilizado para marcar a membrana celular fúngica e a matriz extracelular polimérica dos biofilmes.

O teste de captação do AM em tempos de 10 min, 20 min e 30 min com e sem a adição prévia da glicose foi realizada nas células em suspensão, para ilustrar a farmacocinética do AM em função do tempo. Para isso, crescemos a cepa ATCC 10231 em um tubo falcon de 15 mL contendo 10 mL de caldo Sabouraud e incubamos a 37°C por 24 h. Após este período, centrifugamos e lavamos as células 2 vezes e ressuspendemos estas células em um tubo de ensaio até uma transmitância de 17,1 % em um $\lambda = 530$ nm. Este inóculo foi incluído em tubos eppendorfs com um volume de 1 mL em cada, sendo submetidos à centrifugação para a formação de um *pellet* e removemos o sobrenadante. No grupo com o AM, incluímos 50 μ L de AM e esperamos os tempos de 10, 20 e 30 min para depois levarmos no microscópio. No grupo com glicose, adicionamos 50 μ L de glicose 50 mM por 90 min e após este período variamos os tempos de AM por 10, 20 e 30 min, sendo adicionado 50 μ L de AM 1 mM, resultando em uma concentração final de AM = 500 μ M.

5.2.1. Análise Estatística:

Os índices de absorbância medidos pelo teste de captação de FS de todas as amostras foram submetidos à análise estatística pelo teste de variância *one-way* ANOVA. As médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$

5.3. Etapa III – Teste da influência do tempo de irradiação na PDT.

Nesta etapa, verificamos a ação da PDT em função do tempo de irradiação, sendo utilizados dois LED (*Light-Emitting Diode*- diodo emissor de luz)

com dois diferentes comprimentos de onda nos experimentos realizados com o biofilme ($\lambda = 645 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ e $\lambda = 660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$). No estudo em suspensão de leveduras utilizamos somente o LED com $\lambda = 660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, pois a concentração final utilizada de AM foi de $50 \mu\text{M}$, e o comprimento de onda 660 nm possui maior ressonância com o monômero do AM (figura 5).

Figura 5. Espectro de absorção do AM em unidades arbitrárias. Note a banda de absorção do dímero (pico $\lambda = 610 \text{ nm}$) e do monômero (pico $\lambda = 664 \text{ nm}$) e a banda de emissão dos dois LEDs utilizados neste trabalho.

5.3.1. Teste da sensibilidade de leveduras em suspensão com e sem a adição de glicose:

Em uma placa de petri com ágar Sabouraud semeamos *Candida albicans* ATCC 10231 e incubamos por 37°C durante 24 h. Após este período, selecionamos uma colônia para incluirmos em um tubo *falcon* de 15 mL contendo 10 mL de caldo *Sabouraud*, sendo posteriormente incubado por 24 h a 37°C . Este procedimento permite um crescimento deste fungo em formato de levedura, não induzindo um dimorfismo celular.

Com as células crescidas por 24 h, lavamos 2x em PBS e preparamos o inóculo através do espectrofotômetro ajustando em $\lambda = 530$ nm, resultando em uma transmitância do inóculo diluído em PBS em um tubo de ensaio de 17,1 %, o que significa uma concentração de aproximadamente $2,3 \times 10^6$ UFC/ mL.

Em placas de 96 poços com fundo chato, adicionamos 180 μ L de inóculo em cada grupo. Separamos em 18 grupos: controle (C), grupo irradiado por 18 min (LED), grupo em contato com a glicose por 90 min (G), grupo com glicose e posteriormente irradiados por 18 min (GL), grupo com glicose e depois em contato com AM por 30 min (GAM0'), grupo somente AM por 30 min (0'), grupo somente AM e irradiados por 3 min (3'), grupo com AM e irradiados por 6 min (6'), grupo com AM e irradiados por 9 min (9'), grupo com AM e irradiados por 12 min (12'), grupo com AM e irradiados por 15 min (15'), grupo com AM e irradiados por 18 min (18'), grupo com glicose e AM e irradiação por 3 min (G3'), grupo com glicose e AM e irradiação por 6 min (G6'), grupo com glicose e AM e irradiação por 9 min (G9'), grupo com glicose e AM e irradiação por 12 min (G12'), grupo com glicose e AM e irradiação por 15 min (G15'), grupo com glicose e AM e irradiação por 18 min (G18') (tabela 1). Nos grupos C e LED adicionamos 20 μ L de PBS, nos grupos G e GL adicionamos 10 μ L de PBS e 10 μ L de glicose 1 M, nos grupos 0', 3', 6', 9', 12', 15' e 18' adicionamos 10 μ L de PBS e 10 μ L de AM 1 mM, e, por fim nos grupos GAM0', G3', G6', G9', G12', G15', e G18' foi adicionado 10 μ L glicose 1 M e 10 μ L AM 1 mM.

Tabela 1: Legendas dos grupos estudados

GRUPOS	LEGENDA	GRUPOS	LEGENDA
Controle	C	PDT 12'	12'
Irradiado	LED	PDT 15'	15'
Glicose 90'	G	PDT 18'	18'
Glicose + LED	GL	PDT Glicose 3'	G3'
Glicose + AM	GAM0'	PDT Glicose 6'	G6'
AM 30'	0'	PDT Glicose 9'	G9'
PDT 3'	3'	PDT Glicose 12'	G12'
PDT 6'	6'	PDT Glicose 15'	G15'
PDT 9'	9'	PDT Glicose 18'	G18'

Os parâmetros utilizados para a irradiação foram: LED $\lambda = 660$ nm, potência= 75 mW, irradiância= 268 mW/cm^2 , altura do líquido no poço: 7 mm. 3 min= 48 J/cm^2 , 6 min= 96 J/cm^2 , 9 min= 145 J/cm^2 , 12 min= 193 J/cm^2 , 15 min= 241 J/cm^2 , 18 min= 289 J/cm^2 . O LED utilizado para este estudo foi o de $\lambda = 660$ nm, pois a concentração de AM final que nós utilizamos foi $50 \mu\text{M}$, havendo predominantemente o monômero de AM (pico de absorção em PBS $\lambda = 664$ nm Fig 5).

5.3.2. Análise da sensibilidade do biofilme à PDT determinando o tempo de irradiação:

As amostras com os biofilmes formados no substrato escolhido foram submetidas à PDT para quantificar a redução microbiana nos parâmetros escolhidos. Estas foram incubadas com AM pelo PIT pré-determinado na concentração estudada previamente. As amostras foram posteriormente colocadas em placas de Petri estéreis e secas, sendo irradiadas por 0, 3 min, 6 min, 9 min e 12 min. Incluímos também o grupo controle e um grupo somente irradiado. A irradiação foi realizada por dois LED com comprimentos de onda $\lambda = 645 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ (potência de 16 mW) e $\lambda = 660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ (potência de 16 mW), com taxa de fluência de $127,3 \text{ mW/cm}^2$ resultando em fluências de 23, 46, 69, 92, 115 e 138 J/cm^2 , respectivamente em 3 min, 6 min, 9 min, 12 min, 15 min e 18 min de irradiação. O diâmetro do feixe foi ajustado para irradiar toda a superfície do disco de diâmetro $d=4 \text{ mm}$, em uma área de aproximadamente $0,126 \text{ cm}^2$, conforme ilustrado na fig 6. Cada grupo teve 9 amostras ($n=9$).

Figura 6. Amostras de discos de hidrogel com o biofilme formado sendo irradiado após a fotossensibilização com o AM com $500 \mu\text{M}$ por 30 min. Em A: início da irradiação e em B: amostras após 15 min de irradiação.

Após a terapia, as amostras foram acondicionadas individualmente nos poços da placa de 96 wells para a realização do ensaio XTT. Os materiais

infectados utilizados no estudo foram embalados em embalagens próprias para autoclave e esterilizados antes de serem despejados no lixo de coleta hospitalar.

5.3.3. Análise Estatística:

Os índices de absorbância medidos pelo ensaio XTT e pelo teste de captação de FS de todas as amostras foram submetidos à análise estatística pelo teste de variância *one-way* ANOVA. As médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Etapa I – Formação de biofilme:

A cepa ATCC 90028 não formou um biofilme de forma padronizada nas condições testadas sobre o cateter e o hidrogel. Por outro lado, a ATCC 10231 se organizou em um biofilme denso, padronizado. Entre os substratos testados, o hidrogel obteve um melhor resultado comparado aos discos de cateteres. Nas placas de poliestireno, o biofilme da ATCC 10231 apresentou maiores quantidades de hifas do que a ATCC 90028, mas ambas formaram biofilmes nos poços.

O meio de cultura influenciou bastante na formação de biofilmes ricos em hifas. O YNB modificado propiciou um biofilme maduro, rico em hifas, ao contrário do caldo Sabouraud que em muitas amostras não formou biofilme (fig 7 e 8).

Figura 7. Fotomicrografias de biofilme não formado de *C. albicans* ATCC 90028, em lentes de contato gelatinosa em 72 h (A) e 96 h (B) com o caldo Sabouraud.

Figura 8. .Elétron-micrografias das amostras de biofilme de *C. albicans* ATCC 90028 crescido em lentes de contato (hidrogel). Em A, B e C observa-se biofilme não formado sobre as amostras, sendo crescidas em caldo Sabouraud após 72 h. Em D observamos a ausência de células aderidas, realizadas na fase de adesão celular, para a formação de biofilme.

A MEV realizada em amostras com o biofilme crescido no caldo YNB modificado apresentou uma maior quantidade de hifas (fig 9). Na fig 10 é possível visualizar uma amostra com o biofilme formado macroscopicamente, com maior opacidade.

Figura 9. Elétron-micrografias das amostras de biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 crescido em lentes de contato (hidrogel). Em A, imagem 3D do biofilme. Note a maior quantidade e riqueza de biofilme formado com a metodologia utilizada, comparada à metodologia da ATCC 90028 e com YNB modificado 1/5 de meio crescido no frasco. Em B o biofilme em maior aumento. Setas amarelas indicam as hifas, e as laranjas indicam os canais de água.

Figura 10. Discos de hidrogel sobre uma placa de petri. Em A: disco sem biofilme (translúcido) e em B: disco com biofilme formado (com maior opacidade).

Com a OCT, medimos a espessura e analisamos a distribuição do biofilme na lente de contato. Este substrato se mostrou mais eficiente do que os discos de cateteres na identificação do biofilme formado (fig 11). A espessura do biofilme foi medida resultando em um valor médio de $56 \pm 10 \mu\text{m}$ de espessura (3 medidas em cada amostra com $n=4$).

Figura 11. Imagem por OCT do biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 crescido em lente de contato. Em A: determinação da espessura do biofilme. Note que a lente de contato (L) é transparente para esta técnica. Em B: distribuição do biofilme sobre o substrato (n=4).

A OCT é uma técnica que gera a imagem de uma amostra pelo retro-espalhamento da luz. Neste trabalho, a luz foi proveniente de um LED com emissão em $\lambda=930$ nm, potência de 2 mW e resolução lateral e longitudinal no ar de $6,2 \mu\text{m}$. Nestas condições, o índice de refração utilizado foi o da água= 1,33 – condição esta em que as amostras de hidrogel ficaram transparentes à técnica, facilitando a separação do biofilme para análise.

Para quantificação do biofilme, primeiramente tentamos a análise de UFC/mL após a homogeneização das amostras formadas nas lentes de contato. Contudo, o desvio padrão foi muito alto, provavelmente porque a desorganização do biofilme não foi eficiente e uniforme em todas as amostras. Possivelmente, quando deixamos as amostras na cuba ultrassônica e posteriormente agitamos no vórtex, algumas hifas podem ter sido quebradas desigualmente em cada biofilme. As placas de petri semeadas apresentaram valores não confiáveis (ex: na diluição 10^{-2} contamos 3 colônias, e na diluição 10^{-3} contamos 5 colônias e na diluição 10^{-4}

contamos 2 colônias). Prosseguimos, então, nosso estudo com o teste XTT para a quantificação do biofilme. Para o teste de leveduras, a contagem de UFC/mL é mais eficiente.

6.2. Etapa II – Teste de captação de AM no biofilme:

A curva de calibração realizada com o AM na solução digestora ausente em microrganismos (SDS 1% e NaOH 0,1 M com $n=5$ por grupo) foi feita medindo o pico de fluorescência em $\lambda=690$ nm quando excitado em $\lambda=532$ nm (figura 12).

Figura 12. Intensidade de fluorescência (excitação em $\lambda=532$ nm e fluorescência em $\lambda=690$ nm) das amostras sem biofilme em diferentes concentrações de AM ($n=8$). AM diluído em água na presença de SDS 1% e NaOH 0,1 M.

Para a verificação do tempo de pré-irradiação (PIT) do fotossensibilizador, analisamos sua captação nos biofilmes em 3 tempos distintos: 5 min, 10 min e 30 min. O biofilme foi formado nas placas de 96 poços em um volume de 200 μ L e testamos as concentrações de 100 μ M, 500 μ M e 1 mM com n=6 por grupo (fig 13).

Figura 13. Valores médios $\pm$ DP do valor da intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de AM. *: $p < 0,05$. (n=6). Excitação $\lambda = 532$ nm e fluorescência $\lambda = 690$ nm.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes na captação de AM quando a concentração foi 500 μ M entre 5 min e 30 min ($p = 1,23682 \times 10^{-4}$). Entretanto, nas outras concentrações testadas, a captação do FS em função do tempo (5 min, 10 min e 30 min) não apresentaram diferenças entre elas, mas o desvio padrão dos grupos de 5 min e 10 min na concentração de 1

mM foi demasiado grande. Com estes dados, escolhemos então o tempo do PIT em 30 min de contato, e outra curva de concentração com o tempo fixado em 30 min foi realizada para determinar qual concentração de AM seria mais captada pelo biofilme.

Com os biofilmes formados nas lentes de contato, fizemos então um teste de captação de AM em diversas concentrações: 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M e 1 mM, com o tempo de contato de 30 min escolhido no experimento anterior. Os resultados estão na fig 14.

Figura 14. Intensidade de fluorescência $\pm$ DP nas amostras de biofilme digeridas por NaOH + SDS, após o contato com AM em diferentes concentrações por 30 min. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($n=6$). Excitação $\lambda= 532$ nm e fluorescência $\lambda= 690$ nm.

Os grupos com 250 μ M e com 500 μ M apresentaram diferenças estatísticas entre eles ($p<0,05$). Os grupos com 1 mM e 500 μ M não

apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Com este dado, resolvemos utilizar a concentração de 500 μM para sensibilizar o biofilme.

A glicose 50 mM em contato prévio de 90 min com o biofilme formado nas amostras de lentes de contato foram incluídas em 200 μL de AM 500 μM por 30 min. O grupo controle recebeu PBS prévio a inclusão de AM 500 μM . Decorridos 30 min, todas as amostras foram lavadas com PBS para remover o excesso de AM e depois mantidas em 200 μL da solução digestora por 24 h. Após este período, misturamos todos os poços com o auxílio de pipetas, incluímos individualmente o sobrenadante em *ependorfs*, centrifugamos por 3 min em uma velocidade de 2.000 G e removemos 100 μL do sobrenadante para a leitura do pico de absorção em $\lambda = 660 \text{ nm}$ (fig 15).

Figura 15. Intensidade de absorbância $\pm$ DP do AM das amostras de biofilmes crescidos nas lentes de contato, com presença e ausência de contato prévio com glicose. Letras diferentes indicam diferença estatística significante.

Observa-se na fig. 15 a absorbância do grupo que contém a glicose é maior que a do grupo com AM sem glicose, indicando maior captação de AM pelo biofilme.

A microscopia de fluorescência confocal foi realizada para mensurarmos a quantidade de AM incorporada pelas células no interior do biofilme. Os biofilmes maduros foram lavados levemente e deixados em contato com os fluoróforos Hoechst 33342 (Invitrogen- Molecular Probes) e QD CdTe-MSA conjugado com concanavalina- A (Con A) por 30 min. (fig 16).

O QD CdTe-MSA foram conjugados através de adsorção em uma razão de 1000:1 (QDs:Con A). A solução de QD foi ajustada em um pH= 8.0 e incubada com Con A por 2 h, em uma temperatura ambiente e baixa agitação. Para 3 mL de solução contendo QDs concentrados à 5×10^{-6} mol/ L, foi adicionado 280 µg/ mL de Con A na solução. Os QDs bioconjugados foram caracterizados opticamente por emissão de fluorescência quando excitados em $\lambda = 405$ nm (fig 16.).

Figura 16. Fotomicrografias de fluorescência confocal. Em azul, fluorescência do marcador Hoechst; em vermelho, QD CdTe Con-a; em verde fluorescência do AM e por último a composição dos três quadros. Em A: biofilme sem a glicose e em contato com o AM 500 μM por 30 min. Em B: biofilme em contato com a glicose 50 mM por 90 min + AM 500 μM por 30 min. Barra de escala= 10,0 μM .

O fluoróforo bis-benzimida Hoechst-stain 33342 possui uma afinidade pelo DNA das células e quando excitado em $\lambda = 350 \text{ nm}$ possui uma fluorescência no azul (pico de emissão $\lambda = 461 \text{ nm}$). O QD CdTe conjugado com concanavalina A possui afinidade com a matriz extracelular polimérica e com a parede celular fúngica¹⁰¹. Quando excitado em $\lambda = 405 \text{ nm}$, sua fluorescência tem pico em $\lambda = 605 \text{ nm}$, não possuindo fluorescência em 690 nm (fig. 17). A captação da fluorescência do QD, portanto, não será captada no canal do filtro $\lambda = 690 \text{ nm}$ *long-pass* do AM. A figura 15 mostra o espectro de emissão do QD CdTe Con-A quando excitado em $\lambda = 405 \text{ nm}$.

Figura 17. Espectro de fluorescência do QD CdTe Con-A quando excitado em $\lambda = 405 \text{ nm}$.

Realizamos o espectro de fluorescência de *C. albicans* quando excitadas em $\lambda = 405$ nm. Em uma concentração de $2,3 \times 10^6$ UFC/ mL, incluímos 100 μ L em uma placa de 96 poços e utilizamos o espectrofotômetro (*Spectramax M4, Molecular Devices Sunnyvale, CA – USA*). A quitina, presente na parede celular fúngica, possui uma fluorescência no azul. Entretanto, podemos notar que existem outras substâncias presentes no fungo com a capacidade de fluorescer na banda do vermelho, que poderia ser captada erroneamente no canal do QD (fig.18).

Figura 18. Espectro de fluorescência de *C. albicans* 10231 quando excitado em $\lambda = 405$ nm.

A análise quantitativa da fluorescência pelo microscópio confocal foi realizada através do software LAS AF (Leica Microsystems - *Germany*), sendo possível a quantificação em uma mesma área do biofilme ($3.366 \mu\text{m}^2$) selecionando inclusive a profundidade (eixo Z). As amostras que tiveram o contato prévio de 90 min com a glicose possuíram uma maior captação do AM em regiões mais profundas do biofilme (fig. 19). Foi realizada a leitura até $14 \mu\text{m}$ de

profundidade, pois houve uma grande intensidade de fluorescência do FS absorvido pelo hidrogel.

Figura 19. Quantificação de fluorescência do AM através do software LAS AF em função da profundidade do biofilme. Em vermelho: amostras em contato com 500 μ M de AM por 30 min. Em preto: amostras em contato inicial com glicose 50 mM por 90 min e posteriormente 30 min em AM 500 μ M. Valores normalizados com o inicial.

O teste de captação do AM na concentração de 50 μ M foi realizado em suspensão de células. A fig 20 mostra os resultados das foto-micrografias obtidas no microscópio confocal nos grupos com o AM por 10, 20 e 30 min de contato. Podemos notar que após 10 min de contato, o AM corou somente a membrana das células, e em 20 min podemos notar algumas células com a

penetração de AM, e em 30 min podemos visualizar grande número de células coradas.

Figura 20. Fotomicrografias de *C. albicans* ATCC 10231 em forma de levedura com a adição de AM 50 μ M. O canal 1 se refere à auto-fluorescência da *C. albicans* quando excitado em $\lambda = 405$ nm e captado em $\lambda = 640$ nm, o canal 2 representa a fluorescência do AM, quando excitado em $\lambda = 532$ nm e captado em $\lambda = 690$ nm long-pass. O canal 3 é o campo claro e o canal 4 a composição dos três. Em A: células de levedura com o AM por 10 min, em B: células com 20 min de contato com AM e C: PIT de 30 min com AM 50 μ M. Seta azul indica células pouco coradas, seta amarela indica células coradas e seta verde célula fora do foco confocal.

A fig 21 mostra os grupos com a adição prévia de glicose, sendo observada somente uma diferença com 30 min de contato em relação aos grupos sem glicose. Em 30 min de AM 50 μ M, após o contato com a glicose 50 mM por 90 min, podemos observar a predominância de células coradas.

Figura 21. Fotomicrografias de *C. albicans* ATCC 10231 em forma de levedura com a adição prévia de glicose 50 mM e posteriormente AM 50 μ M. O canal 1 se refere à auto-fluorescência da *C. albicans* quando excitado em $\lambda = 405$ nm e captado em $\lambda = 640$ nm, o canal 2 representa a fluorescência do AM quando excitado em $\lambda = 532$ nm e captado em $\lambda = 690$ nm long-pass. O canal 3 é o campo claro e o canal 4 a composição dos três. Em A: células de levedura com o AM por 10 min, em B: células com 20 min de contato com AM e C: PIT de 30 min com AM 50 μ M. Seta azul indica células pouco coradas, seta amarela indica células coradas e seta verde célula fora do foco confocal.

6.3. Etapa III – Teste da influência do tempo de irradiação na PDT:

6.3.1. Teste da sensibilidade de leveduras em suspensão com a adição de glicose:

A curva de calibração do teste XTT em leveduras foi realizada com o intuito de mensurarmos os índices de respiração celular em concentrações celulares distintas. Nas alíquotas semeadas, o inóculo de 17,1% de transmitância obteve uma concentração aproximadamente $2,3 \times 10^6$ UFC/mL. A Figura 22 mostra o gráfico do teste XTT em leveduras, determinando os índices de redução do sal de XTT medidos pela absorbância em $\lambda = 492$ nm e o número de células contidas em cada poço da placa de 96 poços.

Figura 22. Absorbância do formazan oriundo da redução do sal de XTT pela respiração das células em função do número de UFC contido nas placas de 96 poços em um volume de 100 μ L.

As células de ATCC 10231 em levedura crescidas no caldo Sabouraud dextrose foram submetidas ao teste de susceptibilidade à PDT com e sem a adição prévia de glicose 50 mM. Para avaliar a redução microbiana, foi realizada a diluição e contagem de UFC/mL. Os resultados da fig 24 mostram uma maior eficiência da terapia com a adição prévia de glicose quando irradiados por 15 min e 18 min, com reduções de aproximadamente 6 log no grupo com 15 min e 18 min de irradiação, quando comparados com o teste de sensibilidade sem a adição de glicose (fig 23). Neste último, obtivemos uma redução menor do que 1 log, quando irradiados por 18 min.

Figura 23. Gráfico de susceptibilidade da *C. albicans* ATCC 10231 com médias e desvios padrões quando submetidas à PDT, sem a adição de glicose e em 24 h de crescimento (n= 12).

Figura 24. Gráfico de susceptibilidade da *C. albicans* ATCC 10231 com médias e desvios padrões quando submetidas à PDT, com a adição de glicose e em 24 h de crescimento (n= 12).

A ATCC 10231 quando crescida no caldo YNB modificado com atmosfera de 4/5 no interior do tubo falcon possui algumas hifas e tubos germinativos na sua população, impossibilitando inclusive a formação de um pellet após sua centrifugação. O caldo Sabouraud apresentou uma predominância de leveduras bem superior. A fig 25 mostra as diferenças entre elas, mostrando a maior quantidade da levedura na forma vegetativa quando crescido no caldo YNB modificado.

Figura 25. Elétron-micrografias das amostras de *C. albicans* ATCC 10231 crescidas por 24 h em diferentes meios e condições. Em A: 24 h de crescimento em 10 mL de caldo YNB modificado com atmosfera de 4/5 (tubo falcon com capacidade de 50 mL). Em B: 24 h de crescimento em 10 mL de caldo Sabouraud em um tubo falcon com capacidade de 15 mL. As setas amarelas indicam a presença de tubo germinativo e a seta laranja indica a hifa.

6.3.2. Análise da sensibilidade do biofilme à PDT determinando o tempo de irradiação

Os biofilmes formados nas amostras apresentaram-se com uma maior aderência, quando comparados aos formados nas placas de poliestireno. A fig 26 mostra as amostras antes da lavagem (A), após a lavagem (B) e as amostras sendo fotossensibilizadas pelo AM (C). Nesta imagem, podemos visualizar a grande remoção das células que estavam no fundo do poço, com uma grande padronização do biofilme nos discos de hidrogel (B).

Figura 26. Amostras de biofilme formado sobre discos de hidrogel em placa de 96 poços. Em A: amostras sem lavagem com PBS. Em B: amostras após a lavagem com PBS e em C: amostra incubada com AM no PIT pré-determinado.

Os biofilmes formados em 48h nas lentes de contato com a ATCC 10231 foram submetidos ao efeito fotodinâmico primeiramente utilizando-se um LED de $\lambda = 645$ nm. A contagem microbiológica foi medida através do ensaio XTT. Nestes parâmetros, não houve diferença estatisticamente significativa na redução microbiana comparada ao grupo controle (fig 27). A irradiação das amostras por 12 min sem a adição de AM não alterou o índice de metabolismo da célula pelo ensaio XTT.

Figura 27. Gráfico da absorbância do formazan $\pm$ DP oriundo da redução do sal de XTT, indicando índices de respiração celular das amostras na redução de biofilme quando submetido à PDT realizada com o LED $\lambda = 645$ nm ($n = 9$) sem a adição de glicose.

A adição de glicose em um contato prévio de 90 min na concentração de 50 mM foi feita com a irradiação em $\lambda = 645$ nm e os resultados são apresentados na fig 28. Nos parâmetros testados, a adição de glicose não promoveu uma redução microbiana significativa comparada ao grupo controle.

Figura 28. Gráfico da absorbância do formazan $\pm$ DP oriundo da redução do sal de XTT, indicando índices de respiração celular das amostras na redução de biofilme quando submetido à PDT realizada com o LED $\lambda = 645$ nm na presença de glicose (n= 9).

O LED $\lambda = 645$ nm não ocasionou efeito citotóxico nos parâmetros testados. Porém, o uso do LED $\lambda = 660$ nm obteve redução da viabilidade celular inclusive nos grupos sem a adição de glicose prévia. Em 12 min de irradiação, o grupo 12' e o G12' obteve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,00743$), sendo o G12' menor (12': média= 30,44% DP= 8,63 G12': média= 14,4% DP= 7,82). Após 15 min de irradiação, todos os grupos demonstraram a mesma redução de respiração celular (fig 29 e 30).

Figura 29. Gráfico da viabilidade celular mensurado pelo ensaio XTT, indicando índices de respiração celular das amostras. PDT realizada com um LED de $\lambda = 660$ nm sem adição prévia de solução com glicose. Valores normalizados com a média do grupo controle ($n=9$).

Figura 30. Gráfico da viabilidade celular mensurado pelo ensaio XTT, indicando índices de respiração celular das amostras. PDT realizada com um LED de $\lambda = 660$ nm com adição prévia de solução com glicose. Valores normalizados com a média do grupo controle ($n=9$).

A PDT realizada com 6 min de irradiação proporcionou uma redução estatisticamente significativa em relação ao controle, no grupo sem adição de glicose. Porém, quando comparado com o mesmo tempo de irradiação no experimento com adição de glicose, não há diferença. Este último não apresentou diferença com seu controle (grupos Controle e 6' – fig 30).

Após o ensaio XTT, as amostras com o biofilme formado antes e depois da PDT foram analisadas ao MEV (fig 31)

Figura 31. Elétron-micrografias de biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 formado sobre amostras de hidrogel. Em A: biofilme formado por 48 h e em contato prévio com a glicose. Em B: biofilme formado por 48 h. Em C: biofilme após PDT sem glicose 12' e em D: biofilme após PDT com adição de glicose G12'. As setas amarelas em A e B indicam os canais de água. Em C, as setas amarelas indicam as células alteradas, aparentemente com perda de material citoplasmático.

As amostras submetidas à PDT após 15 min de irradiação demonstraram um extravasamento do material intracelular. Os biofilmes que estiveram em contato com a glicose não exibiram diferenças morfológicas comparados aos biofilmes sem glicose.

7. Discussão

Para a formação de biofilme, durante a fase de adesão celular sobre o substrato condicionado pelo SFB, houve uma maior quantidade de células aderidas ao substrato quando cultivadas no YNB modificado em um tubo falcon fechado com 1/5 de meio de cultura e 4/5 de atmosfera ar¹⁰, sugerindo uma produção maior de adesinas da levedura. Este fator pode ter sido importante na indução destas células em se organizarem em biofilme. Estas células crescidas nesta condição demonstraram uma grande população de pseudo-hifas e tubos germinativos entre os blastoconídios, sugerindo um aumento dos fatores da sua virulência⁵⁰ (fig 25). Um fato interessante é que após a centrifugação dos tubos falcon contendo as células crescidas em YNB modificado, o *pellet* formado começava a se desprender do fundo do tubo, diferentemente das células crescidas no caldo Sabouraud (fig 32). A análise ao MEV das amostras com o biofilme crescidos em hidrogel mostraram a riqueza de hifas, formando um biofilme denso (fig. 9) e padronizado nas amostras. Podemos notar nos estudos com estes biofilmes o pequeno desvio padrão dos grupos controle, obtidos nos testes de redução de XTT (fig 27, 28, 29 e 30). O MEV ambiental permite a visualização das amostras sem a necessidade de processamento, mantendo sua estrutura menos alterada. Entretanto, sua limitação é a visualização da matriz extracelular polimérica, que é um material pouco denso e com pouca condutividade elétrica, não sendo detectada sem um recobrimento. Vale ressaltar que a literatura reporta outro método de quantificação de biofilme, a medição da sua “massa seca” (*dry weight*) conforme citamos na revisão de literatura. Entretanto, em caso de biofilme formado em lentes de contato, não é

recomendável raspar o biofilme, pois este substrato facilmente rasga, podendo ser pesados inclusive pequenos restos de lentes¹⁰.

Os biofilmes utilizados neste estudo foram todos crescidos sob agitação de 60 RPM por 48h. As amostras de silicone elastomérico e de poliestireno, possivelmente, não permitiram uma aderência primária das células, e a ATCC 90028 não expressou muitas adesinas inclusive nas amostras de hidrogel (fig 8D). O caldo Sabouraud também foi ineficaz para o desenvolvimento do biofilme, sendo que na maioria das amostras não conseguimos um biofilme aderido, mesmo utilizando a ATCC 10231.

Figura 32. Tubos falcon contendo ATCC 10231 crescidos por 24 h, em diferentes meios de cultura após 5 min de centrifugação. Meio YNB modificado (esquerda) e caldo Sabouraud (direita).

Entretanto, com os biofilmes formados nas lentes de contato, o teste de captação de AM nas diferentes concentrações para determinar o PIT, houve muita diferença nas medidas. O hidrogel não absorveu uniformemente o AM, mesmo quando estavam incluídas na mesma concentração e no mesmo tempo. Realizamos, então, a medida com os biofilmes formados em placas de 96 poços de fundo chato, com tratamento de superfície e condicionadas previamente com SFB por 24 h. O cuidado na remoção das células não aderidas foi maior, e a inclusão do AM nos poços foi realizada com uma pipeta multicanal (fig 13). Nas amostras com 1 mM e com 100 μ M, a captação de AM não variou entre os tempos de 5 min, 10 min e 30 min. Já na concentração de 500 μ M houve uma diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 5 min e 30 min. O desvio padrão no tempo de 30 min também foi menor, sugerindo então uma estabilização e saturação na farmacocinética do AM neste tempo, pois mesmo com o dobro da concentração não houve mais incorporação de AM. Com os biofilmes formados em hidrogel, fixamos este tempo de 30 min e incluímos as amostras em diferentes concentrações de AM, podendo ser verificado a máxima incorporação a partir de 500 μ M. Podemos notar a maior fluorescência captada na fig 14 em relação à fig 13. Este fato se deve pela maior captação de AM em um biofilme mais espesso, mas principalmente pela incorporação deste FS no hidrogel.

A glicose, na concentração de 50 mM, ativa os receptores Gpr1 da superfície da célula fúngica⁸², ativando a via adenilato ciclase de captação de glicose e também a via SRR. Com esta via ativada, os MFS iniciam o transporte de hexoses, solutos e possivelmente o AM por difusão facilitada. Prates e colaboradores avaliaram em leveduras de *C. albicans* a captação de AM com o

bloqueio destas MFS utilizando INF_{271} ²⁹. A análise ao microscópio confocal mostrou uma captação 70% menor do AM com estes transportadores inibidos, sendo inclusive menos susceptíveis ao efeito fotodinâmico quando irradiadas com um laser $\lambda = 660 \text{ nm}$ e fluências variando entre 0 a 60 J/cm^2 . Em nosso estudo, analisamos a distribuição do AM em função da profundidade de biofilme formado, observando uma maior penetração do FS nas amostras que tiveram contato prévio com a solução de glicose 50 mM (fig 15, 16 e 19). Na análise com as células em suspensão, o número de células coradas no grupo com glicose foi maior do que no grupo somente AM (fig 20 e 21), sendo inclusive mais susceptível à PDT após 15 min de irradiação.

O teste XTT, quando realizado em suspensão de células, sugeriu um menor índice de respiração celular nas amostras com o AM indicando uma reação entre elas, o que não foi observado na contagem de UFC/ mL. A redução do XTT pelo NADH ocorre formando um pigmento chamado formazan e sua absorbância tem o pico em 492 nm ¹⁰². O AM, quando age no meio como um mediador de elétrons, é também reduzido pelo NADH formando AMH, podendo competir com esse tipo de reação, tornando-se leuco e na presença do oxigênio pode ser reoxidado¹⁰³. Porém, em testes realizados com os biofilmes, o formazan obtido pela redução do XTT nos grupos controle não demonstraram diferenças com os grupos que somente tiveram contato com o AM (os grupos PIT). Isso mostra que este teste não pode ser realizado com as células em suspensão, de acordo com a metodologia empregada. Desse modo, prosseguimos com a contagem microbiológica nos experimentos em leveduras em suspensão, verificando a redução microbiana da PDT em função do tempo de irradiação.

A baixa eficiência da PDT na ATCC 10231 com 24 h de crescimento (final da fase estacionária) pode estar relacionada com a presença do farnesol no meio de cultura, uma molécula relacionada com o *quorum-sensing* das leveduras que pode aumentar a resistência ao stress oxidativo, levando estas a expressar os genes antioxidantes CAT1, SOD1, SOD2 e SOD4¹⁰⁴. As células em contato com a glicose nesta concentração de 50 mM pode aumentar sua resistência ao stress oxidativo (peróxido de hidrogênio e ROS)⁹¹, sendo que estas defesas ativadas na presença da glicose por 90 min podem se esgotar após 12 min de irradiação. O fato de o FS ter sido incorporado em maior quantidade após a glicose do que no outro grupo, favoreceu a redução microbiana, apesar das defesas da célula aumentar.

O LED de emissão $\lambda = 645 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ utilizado não obteve redução da sua viabilidade celular em nenhum grupo, mesmo nos grupos com glicose. Este comprimento de onda não foi capaz de ocasionar nenhuma redução dos índices de respiração celular captados pelo teste XTT. Com a irradiação em $\lambda = 660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ o efeito oxidante foi maior, obtendo redução da atividade celular nos grupos com e sem a adição prévia da glicose. Estes resultados sugerem que a irradiação a ser utilizada deve ter sua emissão centrada no pico de absorção do monômero do azul de metileno.

C. albicans, em contato com a glicose, pode aumentar sua resistência ao stress oxidativo, osmótico, miconazol, ROS intracelular⁹⁰ voriconazol e anfotericina B⁸⁹. Segundo Huh e Kang, este patógeno, quando exposto por uma hora em glicose 1 % (56 mM), teve sua resistência aumentada quando mantido em contato com concentrações acima de 10 mM de peróxido de hidrogênio e em concentrações crescentes de ROS intracelular⁹¹. Esse mecanismo de defesa está

associado a oxidases codificadas no AOX1a e AOX1b, relacionadas com a proteção das células após a respiração mitocondrial associada ao aumento dos níveis intracelulares de ROS⁹¹. Em nosso trabalho, nos experimentos realizados na ausência da glicose e irradiados com o LED de emissão $\lambda = 660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, observamos um início de redução mais acentuado no grupo com 6 min de PDT, mas, subsequentemente, essa aceleração de redução diminui. Em 12 min, não observamos diferenças significativas em relação ao grupo 6 min, entretanto, obtivemos diferenças estatisticamente significantes após 15 min e 18 min de irradiação. No experimento com a sensibilização prévia com a glicose, apesar de haver uma maior captação do AM, provavelmente o aumento dos mecanismos antioxidantes provocado pelo contato com a glicose dificultaram os danos promovidos pela PDT até 9 min de irradiação. Porém, esses mecanismos de resistência parecem ter se esgotado, sendo que em 12 min de irradiação há uma redução expressiva de aproximadamente 33% na viabilidade celular, comparado ao grupo 9 min.

O MEV, realizado nas amostras de biofilme com células inativadas, demonstrou um esvaziamento do material citoplasmático das células (fig 31). Alguns autores descrevem a ação da PDT em células fúngicas relacionando um dano na membrana e na parede celular. Isto pode explicar este achado na elétron-micrografia obtida, sendo que o vácuo formado pelo aparelho antes das imagens serem realizadas pode ter extraído o material citoplasmático destas células. O dano celular inclusive pode estar relacionado com o dano nas proteínas trans-membrana MFS, que podem transportar o AM para a célula e, portanto, podem estar muito próxima à molécula de AM.

Neste estudo, a PDT mediada por glicose promoveu uma maior captação do FS otimizando seu efeito antifúngico em células e 12 min após irradiação em biofilme. Mais estudos são necessários, entretanto, para verificação do real mecanismo de ação e posterior utilização na prática clínica.

8. Conclusão

A ATCC 10231 formou um biofilme maduro mais padronizado nas amostras em 48 h, e a ATCC 90028 em muitas amostras não formou biofilme.

O hidrogel é uma amostra adequada para a formação de biofilme de *C. albicans* maduros. Para a formação de biofilme, o meio de cultura YNB modificado foi melhor em relação ao caldo *Sabouraud*.

No estudo da captação de AM pelo biofilme, entre os tempos estudados, o PIT de 30 min foi o que obteve maior captação, com a concentração de AM de 500 μ M e com o contato prévio com a glicose por 90 min.

A PDT realizada em suspensão de células obteve redução de mais de 6 log, quando em contato prévio com a glicose e após 15 min de irradiação.

A PDT realizada com o uso do LED $\lambda = 645$ nm não apresentou redução nos biofilmes formados em relação ao controle nos tempos de irradiação estudados.

A PDT realizada com o uso do LED $\lambda = 660$ nm apresentou redução significativa na viabilidade celular a partir de 12 min de irradiação em ambos os grupos, obtendo um resultado abaixo de 30% com a adição prévia da glicose.

Referências

- ¹ POOLE, M. D. Are we facing the end of the antibiotic era? **Ear, nose, & throat journal**, v. 72, n. 6, p. 433, Jun 1993. ISSN 0145-5613

- ² BELL, S. G. Antibiotic resistance: is the end of an era near? **Neonatal network : NN**, v. 22, n. 6, p. 47-54, Nov-Dec 2003. ISSN 0730-0832

- ³ DEMEREC, M. Origin of Bacterial Resistance to Antibiotics. **Journal of bacteriology**, v. 56, n. 1, p. 63-74, Jul 1948. ISSN 0021-9193

- ⁴ SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of Candida: a mini review. **Oral Dis**, v. 14, n. 7, p. 582-90, Oct 2008.

- ⁵ TAMURA, N. K. et al. [Virulence factors for Candida spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 1, p. 91-3, Jan-Feb 2007.

- ⁶ EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 11, p. 685-702, Nov 2003.

- ⁷ AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of Candida albicans and Candida tropicalis: chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 8, p. 999-1008, Aug 2006.

- ⁸ MUKHERJEE, P. K. et al. Candida biofilm: a well-designed protected environment. **Med Mycol**, v. 43, n. 3, p. 191-208, May 2005.
- ⁹ BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 6, p. 588-94, Dec 2006.
- ¹⁰ CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. In vitro growth and analysis of Candida biofilms. **Nat Protoc**, v. 3, n. 12, p. 1909-24, 2008. ISSN 1750-2799
- ¹¹ ANDES, D. et al. Development and characterization of an in vivo central venous catheter Candida albicans biofilm model. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 6023-6031, Oct 2004. ISSN 0019-9567.
- ¹² HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro. **Infect Immun**, v. 62, n. 3, p. 915-21, Mar 1994.
- ¹³ HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Candida albicans and Staphylococcus aureus form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 9, p. 3914-22, Sep 2009. ISSN 1098-6596
- ¹⁴ TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. Candida biofilms and the host: models and new concepts for eradication. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 845352, 2012. ISSN 1687-9198

- ¹⁵ TOBUDIC, S. et al. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 199-204, May 2012. ISSN 1439-0507
- ¹⁶ CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-94, Sep 2001. ISSN 0021-9193
- ¹⁷ MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 4-5, p. 301-9, Aug-Oct 2004.
- ¹⁸ LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3839-46, Nov 2006. ISSN 0066-4804
- ¹⁹ KEREN, I. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiol Lett**, v. 230, n. 1, p. 13-8, Jan 15 2004. ISSN 0378-1097
- ²⁰ LAI, C. C. et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections. **J Infect Chemother**, v. 14, n. 2, p. 77-85, Apr 2008. ISSN 1341-321X
- ²¹ 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. 70-6, Jan 3 2007.
- ²² WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother**, v. 42, n. 1, p. 13-28, Jul 1998.

- ²³ TEICHERT, M. C. et al. 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. 155-60, Feb 2002.
- ²⁴ WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J Oral Pathol Med**, v. 22, n. 8, p. 354-7, Sep 1993.
- ²⁵ LAMBRECHTS, S. A. et al. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. **Photochem Photobiol Sci**, v. 4, n. 7, p. 503-9, Jul 2005.
- ²⁶ PRATES, R. A. et al. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. **Mechanisms for Low-Light Therapy Iii**, v. 6846, 2008. ISSN 0277-786X.
- ²⁷ QUEIROGA, A. S. et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. by different doses of low power laser light. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 4, p. 332-336, Dec 2011. ISSN 1572-1000.
- ²⁸ DAI, T. H. et al. Blue Dye and Red Light, a Dynamic Combination for Prophylaxis and Treatment of Cutaneous *Candida albicans* Infections in Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5710-5717, Dec 2011. ISSN 0066-4804.

- 29 PRATES, R. A. et al. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 7, p. 1525-32, Jul 2011. ISSN 1460-2091
- 30 SOUZA, R. C. 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 in Medical Science**, v. 25, n. 3, p. 385-389, May 2010. ISSN 0268-8921.
- 31 PRATES, R. A. et al. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. **Laser Physics**, v. 19, n. 5, p. 1038-1044, May 2009.
- 32 PEREIRA, C. A. et al. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. **Lasers Med Sci**, v. 26, n. 3, p. 341-8, May 2011. ISSN 1435-604X
- 33 CHABRIER-ROSELLO, Y. et al. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 10, p. 4288-95, Oct 2005.
- 34 SUZUKI, L. C. et al. Real time optical coherence tomography monitoring of *Candida albicans* biofilm in vitro during photodynamic treatment. **Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II**, v. 7715, 2010. ISSN 0277-786X.

- 35 MAJITHIA, A.; STEARNS, M. P. Methylene blue toxicity following infusion to localize parathyroid adenoma. **The Journal of laryngology and otology**, v. 120, n. 2, p. 138-40, Feb 2006. ISSN 0022-2151
- 36 SCHNEIDER, M. et al. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 3, p. 615-20, May 2012. ISSN 1435-604X
- 37 BROWN, V.; SEXTON, J. A.; JOHNSTON, M. A glucose sensor in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 10, p. 1726-37, Oct 2006. ISSN 1535-9778
- 38 FAN, J.; CHATURVEDI, V.; SHEN, S. H. Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*. **J Mol Evol**, v. 55, n. 3, p. 336-46, Sep 2002. ISSN 0022-2844
- 39 BROWN, V.; SEXTON, J. A.; JOHNSTON, M. A glucose sensor in *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 10, p. 1726-37, Oct 2006. ISSN 1535-9778
- 40 DUMITRU, R.; HORNBY, J. M.; NICKERSON, K. W. Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 7, p. 2350-4, Jul 2004. ISSN 0066-4804
- 41 ALLISON, K. R.; BRYNILDSEN, M. P.; COLLINS, J. J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 216-20, May 12 2011. ISSN 1476-4687

- ⁴² SUZUKI, L. C. Características microbiológicas de interesse para a terapia fotodinâmica antimicrobiana. In: NÚÑEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S., *et al* (Ed.). **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., v.1, 2013. cap. 7, p.75-85. ISBN 978-85-352-6463-0.
- ⁴³ WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual review of microbiology**, v. 61, p. 529-53, 2007. ISSN 0066-4227
- ⁴⁴ SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 7, p. 317-24, Jul 2004. ISSN 0966-842X
- ⁴⁵ MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 25, n. 2, p. 136-44, Apr 1996. ISSN 0901-5027
- ⁴⁶ BLANCO, M. T. *et al*. In vitro studies of activities of some antifungal agents against *Candida albicans* ATCC 10231 by the turbidimetric method. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 4, p. 898-901, Apr 1992. ISSN 0066-4804
- ⁴⁷ CYRANKA, B. **Otimização do processo de descontaminação no sistema isolador de Bio-manguinhos**. 2011. 64 Dissertação de mestrado ICICT, Fiocruz, Rio de Janeiro.

- 48 FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol Rev**, v. 53, n. 2, p. 210-30, Jun 1989. ISSN 0146-0749
- 49 HALL, R. A. et al. CO₂ acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 11, p. e1001193, 2010. ISSN 1553-7374
- 50 MOCK, R. C.; POLLACK, J. H.; HASHIMOTO, T. Carbon dioxide induces endotrophic germ tube formation in *Candida albicans*. **Can J Microbiol**, v. 36, n. 4, p. 249-53, Apr 1990. ISSN 0008-4166
- 51 CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 7, p. 327-35, Jul 2001. ISSN 0966-842X
- 52 GHANNOUM, M. A.; ABU-ELTEEN, K. H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, v. 33, n. 6, p. 265-82, Jun 1990. ISSN 0933-7407
- 53 NASUTION, O. et al. Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 11, p. 2008-11, Nov 2008. ISSN 1535-9786
- 54 HASAN, F. et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes Infect**, v. 11, n. 8-9, p. 753-61, Jul-Aug 2009. ISSN 1769-714X
- 55 PELOI, L. S. et al. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J Biosci**, v. 33, n. 2, p. 231-7, Jun 2008.

- ⁵⁶ PRATES, R. A. et al. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manne. **Laser Physics**, v. 19, n. 5, p. (in Press), 2009. ISSN 1054-660X.
- ⁵⁷ SOUZA, R. C. 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**, Jul 5 2009.
- ⁵⁸ GIROLDO, L. M. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 1, p. 109-12, Jan 2009. ISSN 0268-8921
- ⁵⁹ DI POTO, A. et al. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. **Biomaterials**, v. 30, n. 18, p. 3158-66, Jun 2009.
- ⁶⁰ SBARRA, M. S. et al. Photodynamic action of merocyanine 540 on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Int J Artif Organs**, v. 31, n. 9, p. 848-57, Sep 2008.
- ⁶¹ SHARMA, M. et al. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 1, p. 299-305, Jan 2008.
- ⁶² GARCEZ, A. S. et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. **Lasers Surg Med**, v. 39, n. 1, p. 59-66, Jan 2007.

- ⁶³ SOUKOS, N. S. et al. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Lasers Surg Med**, v. 33, n. 3, p. 161-8, 2003.
- ⁶⁴ WOOD, S. et al. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 4, p. 680-4, Apr 2006.
- ⁶⁵ MULLER, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMIDLIN, P. R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. **Eur J Oral Sci**, v. 115, n. 1, p. 77-80, Feb 2007.
- ⁶⁶ KHAN, S. et al. Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit *Candida albicans* biofilm. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 3245-57, 2012. ISSN 1178-2013
- ⁶⁷ SABINA, J.; BROWN, V. Glucose sensing network in *Candida albicans*: a sweet spot for fungal morphogenesis. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 9, p. 1314-20, Sep 2009. ISSN 1535-9786
- ⁶⁸ ZHAO, F. Q.; KEATING, A. F. Functional properties and genomics of glucose transporters. **Curr Genomics**, v. 8, n. 2, p. 113-28, Apr 2007. ISSN 1389-2029
- ⁶⁹ SANTANGELO, G. M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 70, n. 1, p. 253-82, Mar 2006. ISSN 1092-2172

- ⁷⁰ ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annu Rev Plant Biol**, v. 57, p. 675-709, 2006. ISSN 1543-5008
- ⁷¹ JAHREIS, K. et al. Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 32, n. 6, p. 891-907, Nov 2008. ISSN 0168-6445
- ⁷² ARNAUD, M. B. et al. Sequence resources at the Candida Genome Database. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. Database issue, p. D452-6, Jan 2007. ISSN 1362-4962
- ⁷³ BRAUN, B. R. et al. A human-curated annotation of the Candida albicans genome. **PLoS Genet**, v. 1, n. 1, p. 36-57, Jul 2005. ISSN 1553-7390
- ⁷⁴ NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Large-scale gene disruption using the UAU1 cassette. **Methods Mol Biol**, v. 499, p. 175-94, 2009. ISSN 1064-3745
- ⁷⁵ STURTEVANT, J. Reporter gene assays in Candida albicans. **Methods Mol Biol**, v. 499, p. 157-67, 2009. ISSN 1064-3745
- ⁷⁶ MAIDAN, M. M.; THEVELEIN, J. M.; VAN DIJCK, P. Carbon source induced yeast-to-hypha transition in Candida albicans is dependent on the presence of amino acids and on the G-protein-coupled receptor Gpr1. **Biochem Soc Trans**, v. 33, n. Pt 1, p. 291-3, Feb 2005. ISSN 0300-5127

- ⁷⁷ BASTIDAS, R. J.; HEITMAN, J. Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 2, p. 351-2, Jan 13 2009. ISSN 1091-6490
- ⁷⁸ KARPOWICH, N. K.; WANG, D. N. Structural biology. Symmetric transporters for asymmetric transport. **Science**, v. 321, n. 5890, p. 781-2, Aug 8 2008. ISSN 1095-9203
- ⁷⁹ KANIAK, A. et al. Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 1, p. 221-31, Feb 2004. ISSN 1535-9778
- ⁸⁰ MORIYA, H.; JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 6, p. 1572-7, Feb 10 2004. ISSN 0027-8424
- ⁸¹ KIM, J. H.; JOHNSTON, M. Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 281, n. 36, p. 26144-9, Sep 8 2006. ISSN 0021-9258
- ⁸² MAIDAN, M. M. et al. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 4, p. 1971-86, Apr 2005. ISSN 1059-1524

- 83 ZELLER, C. E.; PARNELL, S. C.; DOHLMAN, H. G. The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. **J Biol Chem**, v. 282, n. 34, p. 25168-76, Aug 24 2007. ISSN 0021-9258
- 84 PEETERS, T. et al. Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 35, p. 13034-9, Aug 29 2006. ISSN 0027-8424
- 85 JUNG, W. H.; STATEVA, L. I. The cAMP phosphodiesterase encoded by CaPDE2 is required for hyphal development in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 10, p. 2961-76, Oct 2003. ISSN 1350-0872
- 86 FU, Y. et al. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. **Mol Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 61-72, Apr 2002. ISSN 0950-382X
- 87 FELK, A. et al. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infect Immun**, v. 70, n. 7, p. 3689-700, Jul 2002. ISSN 0019-9567
- 88 ZLOH, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 14, n. 4, p. 881-5, Feb 23 2004. ISSN 0960-894X

- ⁸⁹ MANDAL, S. M. et al. Glucose Directly Promotes Antifungal Resistance in the Fungal Pathogen, *Candida* spp. **J Biol Chem**, v. 289, n. 37, p. 25468-73, Sep 12 2014. ISSN 1083-351X
- ⁹⁰ RODAKI, A. et al. Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Mol Biol Cell**, v. 20, n. 22, p. 4845-55, Nov 2009. ISSN 1939-4586
- ⁹¹ HUH, W. K.; KANG, S. O. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. **Biochem J**, v. 356, n. Pt 2, p. 595-604, Jun 1 2001. ISSN 0264-6021
- ⁹² USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **J Photochem Photobiol B**, v. 71, n. 1-3, p. 87-98, Oct 15 2003. ISSN 1011-1344
- ⁹³ VYLKOVA, S. et al. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. **MBio**, v. 2, n. 3, p. e00055-11, 2011. ISSN 2150-7511
- ⁹⁴ IMAMURA, Y. et al. *Fusarium* and *Candida albicans* biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 1, p. 171-82, Jan 2008. ISSN 0066-4804

- ⁹⁵ SUZUKI, L. C. **Desenvolvimento de biofilme formado por Candida albicans in vitro para estudo da terapia fotodinâmica** 2009. MsC IPEN-CNEN São Paulo
- ⁹⁶ KUHN, D. M. et al. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect Immun**, v. 70, n. 2, p. 878-88, Feb 2002.
- ⁹⁷ TAFF, H. T. et al. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 8, p. e1002848, 2012. ISSN 1553-7374
- ⁹⁸ JETT, B. D. et al. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**, v. 23, n. 4, p. 648-50, Oct 1997. ISSN 0736-6205
- ⁹⁹ NWEZE, E. I. et al. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 1, p. 149-53, Jan 2012. ISSN 1460-2091
- ¹⁰⁰ FUCHS, B. B. et al. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2929-2936, Aug 2007. ISSN 0066-4804.
- ¹⁰¹ TENORIO, D. P. et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in

Candida albicans. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 142, p. 237-43, Jan 2015. ISSN 1873-2682

- ¹⁰² KUHN, D. M. et al. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 506-8, Jan 2003. ISSN 0095-1137
- ¹⁰³ SEVCIK, P.; DUNFORD, M. Kinetics of the Oxidation of NADH by Methylene Blue In a Closed System **J Phys Chem**, v. 95, n. 6, p. 2411-2415, Aug 1991.
- ¹⁰⁴ WESTWATER, C.; BALISH, E.; SCHOFIELD, D. A. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 10, p. 1654-61, Oct 2005. ISSN 1535-9778