

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO *IN VIVO* PARA O ESTUDO DO EFEITO FOTODINÂMICO EM INFECÇÃO FÚNGICA

M. S. Ribeiro*, I. T. Kato*, C. P. Sabino*, C. C. Santos* e R. A. Prates****

*Centro de Lasers e Aplicações/IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brazil

**Departamento de Periodontia/UNINOVE, São Paulo, Brazil

marthasr@usp.br

Abstract: *In vitro* studies have demonstrated positive antifungal activities of photodynamic therapy (PDT), but employment of this treatment *in vivo* requires adjustments. In this work we develop a mice model of vaginal candidiasis (VC) once evidences of systemical complications caused by this type of infection are not reported. Twenty female Balb-c mice were treated subcutaneously with estrogen 72h before intravaginal inoculation of *Candida albicans* to establish a persistent infection. Vaginitis was verified by histological and microbiological evaluation after 5 days. With the infection induced we investigated fungal localization by bioluminescence and photosensitizer distribution by fluorescence. Light propagation into vaginal canal was also analyzed. To test PDT, crescent concentrations of methylene blue were topically applied intravaginally for 10min before irradiation. The vaginal area was illuminated using a 660nm-red laser (P= 100mW, E= 3J) during 6min. Samples were collected from vaginal content for microbiological counting. The animals were then euthanized and tissue was removed and processed for scan electron microscopy (SEM). Our findings showed a decrease of fungal burden of 1 log after PDT. SEM analysis of the vaginal tissue presented epithelium desquamation, disrepair fungal cells, and dendritic cells suggesting an improvement of the infectious process compared to control. These findings suggest that mice induced-VC is a good model to study PDT in local fungal infection.

Palavras-chave: atenuação da luz, *Candida albicans*, distribuição de fotossensibilizador, laser, modelo animal, redução fúngica

Introdução

O estudo das terapias antimicrobianas é um campo de investigação que sofre constantes desafios, particularmente devido ao crescente número de patógenos identificados e do aumento nos fatores de risco relacionados às infecções [1]. O uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos nas últimas décadas acelerou a seleção natural de cepas microbianas

resistentes e permitiu a rápida evolução da resistência a estes agentes por meio de recombinação genética dos fatores de resistência e mutação [2].

A resistência microbiana é um assunto que preocupa diversas organizações mundiais e vem ganhando cada vez mais a atenção do setor público de saúde. A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) surge nesse contexto como potencial alternativa de tratamento para várias doenças de significativa importância clínica.

A PDT causa morte celular baseada no uso de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras e aplicação de uma luz com comprimento de onda adequado. Ao absorver a luz, o fotossensibilizador (FS) é excitado para o seu estado singleto. Após sofrer decaimento para o estado tripleto via cruzamento intersistemas, o FS pode transferir energia para o oxigênio molecular ou participar de um processo de transferência de elétrons que leva à formação de radicais. Estas transferências resultam na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como radicais superóxido, hidroxila e oxigênio singleto, que possuem efeitos citotóxicos e podem levar à morte celular [3].

O FS azul de metileno (AM) é um composto pertencente à família das fenotiazinas que possui, em solução aquosa, duas bandas principais de absorção, uma referente ao componente monomérico ($\lambda_{max}=664\text{nm}$) e outra da sua forma dimerizada ($\lambda_{max}=610\text{nm}$) [3]. Além de apresentar diversas características favoráveis ao efeito fotodinâmico, este FS é seguro para as aplicações da PDT *in vivo*, visto que sua utilização é consagrada em diversos procedimentos na área médica. É importante salientar também que a foto-inativação de fungos e bactérias com o AM pode ser realizada de forma seletiva quando comparada às células epiteliais [4].

Candida albicans é um fungo comumente encontrado na microbiota residente da pele e mucosas, e pode estar presente em até 62% dos indivíduos saudáveis. Esta levedura é considerada um microrganismo oportunista, pois é capaz de rapidamente se manifestar como patógeno em resposta a mudanças do meio ambiente, tanto em indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos [5]. Embora haja um crescente número de espécies de

Candida isoladas de pacientes, *C. albicans* é a predominante tanto nas infecções superficiais em cavidade oral, pele e genitais, como nas infecções sanguíneas [6], condição que pode levar ao comprometimento de vísceras do hospedeiro infectado e levar o indivíduo ao óbito.

Apesar da resistência aos antifúngicos ter sido inicialmente reportada em outras espécies, resistência de *C. albicans* a alguns fármacos começou a ser relatada [2]. Além disso, o tratamento convencional com fármacos antifúngicos muitas vezes é prolongado, pode ter um custo elevado, causar sérios efeitos adversos e, em casos de uso crônico, principalmente em grupos de alto risco, colabora para o surgimento de cepas resistentes [7].

Trabalhos *in vitro* têm demonstrado os positivos efeitos antimicrobianos da PDT em várias espécies de *Candida* [8-9]. Entretanto, os resultados e as conclusões obtidas nestes estudos servem apenas de ponto de partida para a aplicação *in vivo*, e outras diversas questões necessitam ser avaliadas para que esta terapia seja empregada com sucesso.

Nosso objetivo neste trabalho foi desenvolver um modelo de candidíase localizada no tecido vaginal de camundongas para estudo do efeito fotodinâmico antimicrobiano.

Materiais e Métodos

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Ipen, tendo sido considerada aprovada sob no. 2009/38.

Estrogenização das fêmeas e indução de pseudo-estro – Camundongas BALB/c com idade entre 6 a 8 semanas foram tratados com estrógeno semanalmente para induzir o estado de pseudo-estro e permitir o estabelecimento e a manutenção da infecção vaginal. A quantidade adequada de estrógeno (17- valerato de β -estradiol em óleo de sésamo) para ser administrada em cada animal foi testada e estabelecida em 100 μ g de hormônio por semana (0,1 mL de uma solução de 1 mg/mL de estrógeno).

Indução da infecção - A infecção foi induzida 72 h após a primeira administração do hormônio por meio da deposição de 20 μ L da suspensão de células fúngicas (suspensão com 15% de transmitância a $\lambda = 540$ nm – 1×10^5 UFC) na vagina dos animais. Uma das formas de avaliação testadas foi a cultura microbiológica das células de *C. albicans* recuperadas do sítio infectado. A recuperação dos microrganismos foi realizada por meio da lavagem do canal vaginal com 50 μ L PBS (solução salina tamponada com fosfato).

Confirmação da infecção – A infecção fúngica foi confirmada mediante a recuperação dos microrganismos cinco dias após a inoculação das suspensões das leveduras. As amostras foram coletadas e cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol. Posteriormente, foi realizada a contagem das colônias, segundo metodologia proposta por Jett *et al.* [10]. Também foram realizadas análises citológicas para

verificação da presença do microrganismo no material coletado. Os animais foram eutanasiados e o canal vaginal foi retirado e armazenado em paraformaldeído a 10% tamponado para análise histológica do tecido.

Distribuição do fungo e FS no tecido – Para este ensaio, utilizamos uma cepa de *C. albicans* modificada geneticamente para bioluminescer (CEC 789). A indução da infecção foi realizada conforme anteriormente descrito. Para indução da bioluminescência, dez- μ L de solução de coelenterazina (500 μ g/mL) em PBS foi inoculada no canal vaginal. Imediamente após, uma câmera ultrasensível para captação da bioluminescência (C2400-30H, Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ) foi utilizada.

Em outro animal também com processo infeccioso instalado, foram inoculados 20 μ L a 1 mM de AM no interior do canal vaginal. Após 30 min, o excesso de AM foi removido com filtro de papel e uma câmera de fluorescência (MaestroTM, CRI Inc, Woburn, MA) capturou a distribuição do FS com excitação em $\lambda = 640$ (15) nm e emissão $\lambda > 700$ nm.

Em ambos os experimentos, os animais foram colocados em posição supina para a captação da imagem e os órgãos internos foram cirurgicamente removidos *post-mortem* para melhor visualização do canal vaginal.

Distribuição da luz - Previamente aos ensaios de PDT, também analisamos a propagação da luz no tecido vaginal, com e sem FS. Usamos um laser com emissão vermelha em $\lambda = 660$ nm para a irradiação e azul de metileno como FS na concentração de 1 mM. No primeiro experimento, a ponteira do feixe foi posicionada dentro ou fora do canal vaginal. Uma vez observada a melhor condição, realizamos um novo ensaio inoculando azul de metileno e deixando o canal vaginal úmido (com azul de metileno) ou seco (o excesso de AM não absorvido foi removido com papel filtro). Para ambas avaliações, um dispositivo CCD foi posicionado ortogonalmente ao eixo de propagação do feixe e o perfil da luz espalhada no sentido do detector foi registrado.

Avaliação da PDT – Neste ensaio, usamos diferentes concentrações de AM e diferentes parâmetros de irradiação. Cinco dias após a indução da vaginite, foi realizada a terapia fotodinâmica em vinte animais distribuídos em quatro grupos (n=5/grupo). Animais do grupo controle não receberam tratamento.

Após anestesia, quinze animais receberam 20 μ L da solução de azul de metileno nas concentrações de 0,1 mM (n=5), 0,5 mM (n=5) e 1 mM (n=5), que foi depositado no interior do canal vaginal. Após uma pausa de 10 minutos de pré-irradiação, o excesso de AM foi removido com um papel de filtro e a ponteira do laser foi posicionada na entrada do canal vaginal com os seguintes parâmetros: laser de emissão vermelha, $\lambda = 660$ nm, (GaAlAs, Photon Lase III, DMC), P= 100 mW, $\Phi = 0,03$ cm² em modo contínuo, com tempo de exposição de 6 min [11].

No dia seguinte ao tratamento, os animais foram anestesiados e o canal vaginal de foi lavado com 50 μ L

de PBS. O conteúdo líquido recuperado foi diluído seriadamente em PBS e as diluições foram plaqueadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 28 h e em seguida foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

Avaliação morfológica do tecido vaginal - Após realização da quantificação microbiológica, amostras de dois animais foram selecionadas para avaliação em microscopia eletrônica de varredura (MEV), um do grupo controle (sem irradiação) e outro do grupo PDT. Os espécimes de ambos os grupos foram colhidos cirurgicamente e fixados em formaldeído a 10% por no mínimo 48 h. Posteriormente, estas amostras foram desidratadas em concentrações progressivas de etanol (50, 60, 70, 80, 90 e 100%), revestida por cobertura metálica de ouro-paládio e observadas ao MEV (Phillips XI, Eindhoven, Holanda). As amostras foram preparadas e observadas em toda sua extensão.

Resultados

O conteúdo da lavagem vaginal mostrou a presença de células epiteliais enucleadas, confirmando a ação do hormônio administrado para induzir o estado de pseudo-estro. O número de microrganismos recuperados corrobora com dados descritos na literatura [12] e, no animal não tratado, a infecção persiste até o final do período experimental.

A presença de hifas e leucócitos no epitélio e a formação de microabscessos nas amostras de tecido vaginal podem ser observadas na figura 1. Dois cortes histológicos provenientes de duas amostras de tecido vaginal com infecção e não tratados são apresentados (figuras 1A e 1B). Os aspectos analisados confirmam a instalação do processo infeccioso no modelo animal.

A figura 2 mostra a localização de *C. albicans* no interior do tecido vaginal. Nota-se a colonização fúngica localizada preferencialmente no canal vaginal.

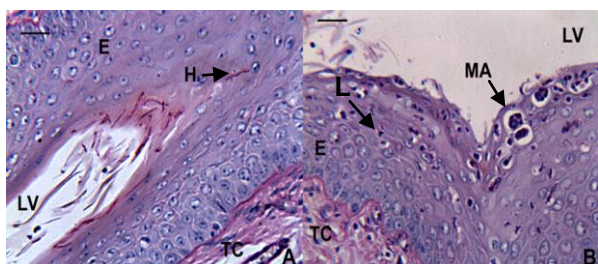


Figura 1: Fotomicrografia de tecido vaginal de camundonga infectada por *C. albicans*. O lúmen vaginal (LV), o epitélio (E) e o tecido conjuntivo (TC) estão indicados nas imagens. Coloração com PAS permitiu a visualização de hifas (H) apontados na imagem A. Na imagem B, nota-se a presença de leucócitos (L) e a formação de microabscessos (MA). Barra representa 10 μ m.

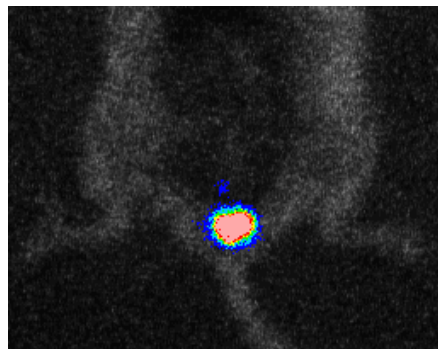


Figura 2: Distribuição espacial da colonização de *C. albicans* CEC789 bioluminescente na mucosa do canal vaginal.

Após inoculação do azul de metileno e espera de 30 minutos, observamos que o FS está presente principalmente na mucosa do canal vaginal e no biofilme formado em sua superfície, conforme apresentado na figura 3.

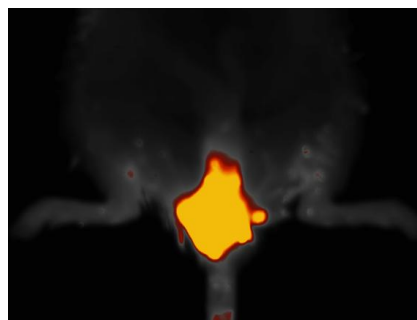


Figura 3: Captação por fluorescência em $\lambda > 700$ nm do azul de metileno impregnado no biofilme formado por *Candida albicans* e na mucosa do canal vaginal de camundongas e. $\lambda_{exc} = 640$ nm.

A figura 4A mostra a atenuação da luz no canal vaginal. Na integral da curva (fig. 4B), nota-se que a luz é melhor distribuída quando a ponteira é colocada dentro do canal vaginal.

Após inoculação do AM e posterior secagem, nova imagem foi capturada e a curva correspondente é apresentada na figura 5A. A figura 5B mostra a curva de integração. Nota-se que quando o excesso de AM é removido a quantidade de luz é maior ao longo do canal vaginal.

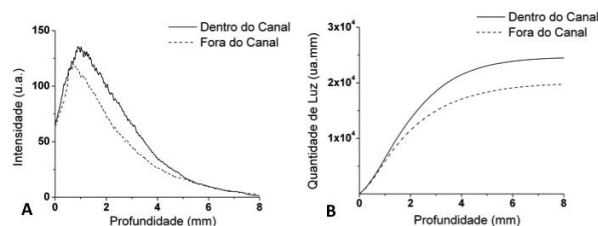


Figura 4: Propagação da luz no tecido vaginal (A) e integral da área sob a curva (B).

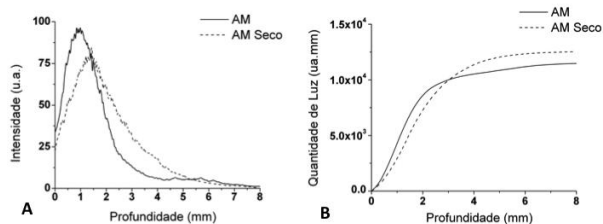


Figura 5: Propagação da luz no tecido vaginal com a ponta do feixe situada dentro do canal e azul de metileno (A) e integral da área sob a curva (B).

Nos ensaios realizados para estudo da PDT, observamos que o AM não apresentou efeito citotóxico nas células de *C. albicans* presentes no tecido vaginal. O valor médio de leveduras recuperadas de animais tratados com 1 mM de AM e não irradiado (6,2 logs) foi similar ao do grupo controle (6,3 logs). Entretanto, conforme mostrado na figura 6, após PDT, o número de células viáveis foi significativamente reduzido para os grupos de 500 μ M e 1mM aproximadamente (recuperação aproximada de 5 logs).

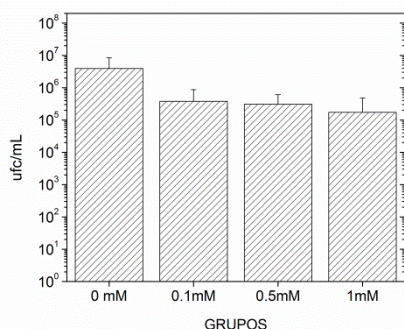


Figura 6: Número de células fúngicas viáveis recuperadas do canal vaginal após PDT. Os dados representam as médias e as barras, os desvios padrão (n=5 por grupo).

A figura 7 apresenta o conjunto de características morfológicas mais comumente observado no campo de visão das amostras através da MEV. Observa-se que no grupo controle há biofilme aderido à mucosa vaginal (A), bem como células fúngicas (B) (setas amarelas). Após PDT, nota-se epitélio descamado (E), células fúngicas amorfas (seta azul) e células dendríticas características do sistema imunológico (seta vermelha).

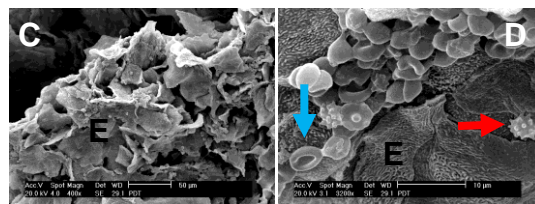
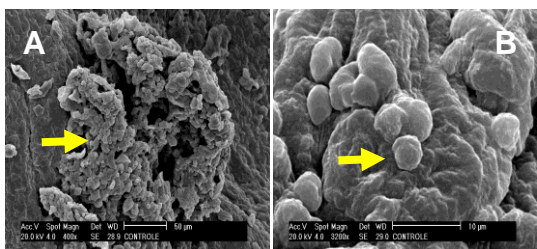


Figura 7: Micrografias eletrônicas de candidíase induzida em mucosa vaginal de camundongas sem tratamento (A e B) e pós PDT (C e D). A seta amarela indica biofilme (A) e células de *C. albicans* (B). A seta vermelha indica células do sistema imune presente no campo D. A seta azul aponta para uma célula de *C. albicans* amorfa. Barras representam 10 μ m.

Discussão

A candidíase vulvovaginal é uma infecção localizada que acomete a mucosa vaginal e é caracterizada pela inflamação dos tecidos afetados, associada à presença de corrimento esbranquiçado e prurido. Cerca de 75% das mulheres sexualmente ativas são acometidas pelo menos uma vez durante a vida e a gravidez aumenta a prevalência de colonização dos tecidos vaginais por *Candida* spp. Durante o parto, há chance de colonização dos recém-nascidos e, especialmente em prematuros de baixo peso, é um importante fator de risco para o desenvolvimento da candidíase invasiva.

Considerando-se que esta infecção é considerada hoje como uma importante questão de saúde pública e que vários aspectos da sua fisiopatogenia ainda não estão esclarecidos, o desenvolvimento de um modelo animal facilmente gerenciável, reprodutível e economicamente viável é extremamente relevante. Neste estudo, desenvolvemos um modelo de candidíase vaginal (CV) induzida em camundongas que se mostrou também apropriado para estudo do efeito fotodinâmico.

Para obtenção do quadro infeccioso, foi necessária a administração de estrogênio, necessário para indução do estado de pseudo-estro, sustentação e manutenção da CV [13]. Neste trabalho, o hormônio utilizado foi o valerato de estradiol dissolvido em óleo de sésamo. A manutenção da infecção foi monitorada através da cultura do material vaginal coletado das camundongas, observando o crescimento de colônias de levedura. Observamos a instalação da infecção cinco dias após inoculação da levedura.

Com a infecção induzida, observamos a distribuição da levedura no canal vaginal. Nossos resultados sugerem que a infecção é localizada na região vaginal e não se difunde através de órgãos mais internos (vide figura 2).

Nosso próximo passo foi analisar a distribuição do FS. Observou-se que o AM está distribuído principalmente na mucosa do canal vaginal e no biofilme formado em sua superfície (vide figura 3). Estes dados sugerem que o AM se liga preferencialmente ao biofilme ao invés da mucosa vaginal.

O perfil de decaimento exponencial para atenuação da luz dentro do canal vaginal também já era esperado [14]. Entretanto, neste trabalho observamos que a maior quantidade de luz disponível para excitação do FS foi quando a ponteira do feixe é posicionada dentro do canal vaginal e quando o excesso de AM é removido do interior do canal. Esta condição permite que mais moléculas do FS sejam excitadas aumentando a probabilidade de ação fotodinâmica.

Uma vez estabelecido um modelo padronizado de infecção fúngica localizada e a melhor maneira de se entregar a luz e o FS dentro do canal vaginal, realizamos um primeiro ensaio para avaliar o efeito fotodinâmico em CV. Como a literatura mostra resultados díspares da PDT em biofilme de *C. albicans* [15-16], três diferentes concentrações de AM foram testadas. Os parâmetros de irradiação foram selecionados baseados em trabalhos prévios do nosso grupo [11, 17].

Nossos resultados mostram que a PDT foi capaz de reduzir o número de células fúngicas viáveis em aproximadamente 1 log, quando a concentração de AM foi de 500 μ M ou 1 mM, após 6 min de irradiação. Para 100 μ M a redução não foi estatisticamente significativa. Nestas condições, a análise por MEV sugere que a PDT pode ter acelerado o processo inflamatório, visto que observamos tecido epitelial descamado, bem como células fúngicas amorfas e células de defesa do sistema imunológico (compare figuras 7 A e B com 7 C e D).

Para um resultado positivo da PDT, alguns fatores devem ser considerados: tipo de microrganismo, sistema imune do hospedeiro, tipo e concentração do FS, tempo de pré-irradiação, parâmetros da fonte de luz. Neste trabalho, foi possível estabelecer um modelo reprodutivo de CV em camundongas para estudo do efeito fotodinâmico. No entanto, mais trabalhos são ainda necessários para otimização de nossos achados *in vivo*.

Conclusão

Nossos resultados mostram que o modelo de candidíase vaginal induzido em camundongas é apropriado para estudo do efeito da terapia fotodinâmica em infecções fúngicas localizadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (proc. 10/13313-9) e CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

[1] Taylor, B.N., Staib, P.; Binder, A., Biesemeier, A., Sehnal, M., Rollinghoff, M., Morschhauser, J., Schroppel, K. (2005) Profile of *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 3, p. 1828-1835.

[2] Stevens, D.A., Calderon, L., Martinez, M., Clemons, K.V., Wilson, S.J., Selitrennikoff, C.P. (2002). Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a *Candida* vaginitis model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, n. 3, p. 361-364.

[3] Wainwright, M. (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 42, n. 1, p. 13-28.

[4] Soukos, N.S., Wilson, M., Burns, T., Speight, P.M. (1998) Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 18, n. 3, p. 253-259.

[5] Pfaller, M.A., Pappas, P.G., Wingard, J.R. (2006) Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. *Clinical Infectious Diseases*, v.43, n.S1, p.S3-14.

[6] Gualco, L., Debbia, E.A., Bandettini, R., Pescetto, L., Cavallero, A., Ossi, M.C., Schito, A.M., Marchese, A. (2007) Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.29, n.2, p.179-184.

[7] Jabra-Rizk, M.A., Falkler, W.A., Meiller, T.F. (2004) Fungal biofilms and drug resistance. *Emerging Infectious Diseases*, v.10, n.1, p.14-19.

[8] Souza, R.C., Junqueira, J.C., Rossoni, R.D., Pereira, C.A., Munin, E., Jorge, A.O. (2010) Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Medical Sciences*, v.25, n. 3, p.385-389.

[9] Prates, R.A., Kato, I.T., Ribeiro, M.S., Tegos, G.P., Hamblin, M.R. (2011) Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 7, p. 1525-1532.

[10] Jett, B.D., Hatter, K.L., Huycke, M.M., Gilmore, M.S. (1997) Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques*, v.23, n.4, p.648-650. 1997.

[11] Suzuki, L.C., Prates, R.A., Raelle, M.P., Freitas, A.Z., Ribeiro, M.S. (2010) Real time optical coherence tomography monitoring of *Candida albicans* biofilm in vitro during photodynamic treatment. *Progress in Biomedical Optical and Imaging*, v. 11, n. 41, p. 771521-771525.

[12] Calderon, L., Williams, R., Martinez, M., Clemons, K.V., Stevens, D.A. (2003) Genetic susceptibility to vaginal candidiasis. *Medical Mycology*, v. 41, n. 2, p. 143-147.

[13] Fidel Jr, P.L., Cutright, J., Steele, C. (2000) Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 651-657.

[14] Silva, D.F.T., Ribeiro, M.S. (2010) Light attenuation in rat skin following low level laser therapy on burn healing process, *Progress in Biomedical Optical and Imaging*, v. 11, n. 41, p. :7715101-6.

[15] Pereira, C.A., Romeiro, R.L., Costa, A.C., Machado, A.K., Junqueira, J.C., Jorge, A.O. (2011) Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers in Medical Sciences*, v.26, n.3, p.341-348.

[16] Dovigo, L.N., Pavarina, A.C., Ribeiro, A.P., Brunetti, I.L., Costa, C.A., Jacomassi, D.P., Bagnato, V.S., Kurachi, C. (2011) Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochemistry and Photobiology*, v. 87, n. 4, p. 895-903.

[17] Prates, R.A., da Silva, E.G., Yamada, A.M., Suzuki, L.C., Paula, C.R., Ribeiro, M.S. (2009) 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.