

MODELO DE ESTUDO *IN VITRO* DA DISTRIBUIÇÃO DA LUZ EM INFECÇÕES DE BIOFILME DE *Candida albicans*

S. C. Nunez*, C. P. Sabino*, A. S. Garcez*** e M. S. Ribeiro*

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

**Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas, Brazil

silvianunez@uol.com.br

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) can be an interesting and innovative antifungal approach. Several studies have demonstrated positive antifungal activities of PDT, but some discrepancies can still be found in the literature and PDT parameters certainly lack consistency. In this work we developed a model of *Candida albicans* biofilm infection inside dental root canal to evaluate microbial reduction and light distribution into the root canal system using different light delivery methods to perform the irradiation. After conventional endodontic treatment ten teeth were sterilized and the canals were contaminated with genetic engineered bioluminescent *C. albicans* to form a 3 days biofilm. The samples were divided into two groups one using laser tip in contact with the root canal entrance and the second using a diffuse fiber to perform irradiation. Images of the irradiated area were obtained during irradiation and microbial reduction was monitored via bioluminescence. Our findings demonstrate that the bioluminescent biofilm shows good reproducibility, the images can be easily accessed and allow several repetitions in the same sample. Light distribution in dental tissue was markedly dependent on the irradiation device and this parameter is directly related with microbial destruction. Our model of bioluminescent *C. albicans* biofilm demonstrated to be a useful and non-destructive method of evaluation that can be used for several parameters involved in PDT.

Palavras-chave: distribuição da luz, laser, bioluminescência, redução fúngica

Introdução

A terapia fotodinâmica (PDT do inglês- *Photodynamic Therapy*) utiliza o princípio de ativação de um composto através da energia luminosa, sendo que esta ativação deve resultar na transferência de energia ou elétrons do composto, conhecido como fotossensibilizador, para o ambiente circunvizinho. Este processo tem por finalidade a formação das chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) [1].

O processo que se segue é a geração de múltiplos processos de oxido-redução que do ponto de vista terapêutico deve implantar no sítio de ação o estresse oxidativo levando ao dano irreversível da célula alvo [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 dos mais graves problemas de saúde pública, portanto, medidas preventivas como a regulação da prescrição e venda de agentes antimicrobianos, bem como a busca por métodos alternativos para o tratamento das infecções tem povoado o cenário das pesquisas internacionais neste campo. Neste contexto se insere a PDT como uma possível alternativa terapêutica para o tratamento de infecções localizadas.

Vários organismos vivos desenvolveram durante sua evolução natural, seja para sobreviver de predadores ou para atrair parceiros, a capacidade de emitir luz [3]. Este processo, conhecido como bioluminescência, é produzido por ciclos metabólicos envolvendo enzimas chamadas luciferases em reação dependente de ATP com proteínas chamadas luciferinas. De maneira geral, a detecção de luz emitida por células ou tecidos bioluminescentes pode ser realizada através de um dispositivo CCD (Couple Charged Device) amplificado. Tipicamente, uma imagem em escala de cinza é capturada em condições de baixa luminosidade, para ser utilizada como referencia espacial da intensidade de sinal da amostra analisada [4].

Candida albicans é um fungo comumente encontrado na microbiota residente humana. Ela é considerada um microrganismo oportunista, pois é capaz de rapidamente se converter em patógeno em resposta a mudanças do meio ambiente que favoreçam seu desenvolvimento [5]. Os tratamentos convencionais com drogas antifúngicas são na maioria das vezes prolongados, de alto custo e apresentam diversos efeitos colaterais, principalmente em casos de uso prolongado [6].

Trabalhos *in vitro* têm apresentado efeitos encorajadores para o emprego da PDT como alternativa aos antifúngicos em diferentes espécies de *Candida* [7-8]. Entretanto, os resultados e as conclusões obtidas nestes estudos apresentam divergências e múltiplos

parâmetros devem ser avaliados simultaneamente para a obtenção do melhor entendimento do exato escopo desta terapia *in vivo*.

Neste trabalho nós desenvolvemos um modelo de biofilme de *C. albicans* geneticamente modificada dentro de canais radiculares humanos para permitir o monitoramento da morte microbiana em função do tempo e da distribuição de luz no tecido duro dental de forma não destrutiva.

Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Ipen (processo no. 62/02).

Dez molares humanos cedidos pelo banco de dentes da FOUSP foram utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa. Os canais radiculares foram instrumentados utilizando-se um sistema de limas rotatórias Pro Tapper System (Dentisply Maillefer Instruments SA, Switzerland) até o diâmetro apical #30 (F3). Intercalando-se com a instrumentação, foi feita a irrigação do canal com 3mL de hipoclorito de sódio a 2,5%.

A superfície externa dos dentes foi impermeabilizada com esmalte transparente para evitar contaminação e os ápices selados com resina composta fotopolimerizável (Filtek Z 250, 3M, Brazil). Após a instrumentação, todos os canais foram irrigados com 5 mL de EDTA a 17% seguidos de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os dentes foram então esterilizados em autoclave.

Suspensões de 10 μ L contendo 10^5 células de *C. albicans* geneticamente modificada para expressão de bioluminescência (CEC 789) [9] foram inoculadas nos canais radiculares e estes mantidos em estufa a 37°C por 72 h em agitação constante a 115 RPM. Para facilitar a formação de biofilme, os canais radiculares receberam 10 μ L meio de cultura YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) fresco a cada 24 h.

Distribuição de luz no canal - Para análise da distribuição de luz no interior dos canais radiculares em toda sua extensão foram obtidas imagens digitais em escala de cinza e padronizadas dos dentes, sendo as imagens analisadas através do software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

Para obtenção das imagens uma câmara CCD (G10, Canon, Tóquio, Japão) foi posicionada ortogonalmente à direção de propagação do feixe de luz e do eixo meridional do dente registrando a intensidade de luz espalhada por todo perfil da amostra estudada. Um laser de diodo (MMOptics, São Carlos, SP) de emissão vermelha ($\lambda= 660\text{nm}$) com 40 mW de potência foi utilizado para análise da distribuição da luz. Dois experimentos foram realizados, no primeiro deles a ponta de saída do feixe foi posicionada na entrada do canal radicular. Em um segundo experimento uma fibra óptica difusora com 300 μ m de diâmetro foi acoplada a ponta de saída do laser e inserida dentro do canal radicular. As imagens obtidas neste experimento foram avaliadas utilizando o valor de cinza (valores de zero

para o limiar de captura e 256 para o limite de saturação) expresso por cada pixel das imagens e os diferentes valores foram substituídos por uma escala padrão de falso colorido.

Terapia Fotodinâmica - As avaliações microbiológicas foram feitas de forma sequencial nas amostras, ou seja, após a avaliação de uma das variáveis as amostras foram limpas, esterilizadas e o processo de contaminação foi novamente realizado. Para avaliar a redução bacteriana obtida através do emprego da PDT, os dentes selecionados foram fotografados a cada dois minutos de irradiação e as imagens de bioluminescência registradas para avaliação da redução obtida.

As amostras foram utilizadas para a análise de dois grupos: Grupo 1: 10 dentes irradiados com auxílio da fibra óptica e Grupo 2: 10 dentes irradiados com a ponteira laser posicionada na entrada do canais.

Todos os canais foram preenchidos com 30 μ L de uma solução aquosa de azul de metileno a 90 μ M (Sigma-Aldrich, Wi, USA), dissolvido em água destilada e solução de coelenterazina (0,5 mg/mL) sendo mantida em contato com o biofilme no interior do canal por 1 min como tempo de pré-irradiação. No grupo 1 a irradiação foi realizada com a fibra posicionada o mais apical possível e movimentos helicoidais foram realizados de apical para cervical e vice-versa até o final da irradiação, realizada por um tempo total de dois minutos. No grupo 2, a ponta do laser foi posicionada no interior da câmara pulpar, sobre a entrada do sistema de canais radiculares e se manteve fixa durante a PDT. O mesmo processo de imagem foi realizado após os dois minutos de irradiação.

A fonte de luz utilizada foi um laser de diodo emitindo em $\lambda= 660\text{ nm}$, com 100 mW de potência (MMOptics, São Carlos SP). O tempo de irradiação foi de dois minutos para ambos os grupos resultando em uma energia total de 12 J.

Resultados

Inicialmente foi observado através das imagens de bioluminescência a confirmação da presença de biofilme de *C. albicans* no interior dos canais radiculares. A figura 1 apresenta uma amostra contaminada em um intervalo de 10 min comprovando a estabilidade de sinal emitido pelas células fúngicas na metodologia empregada.

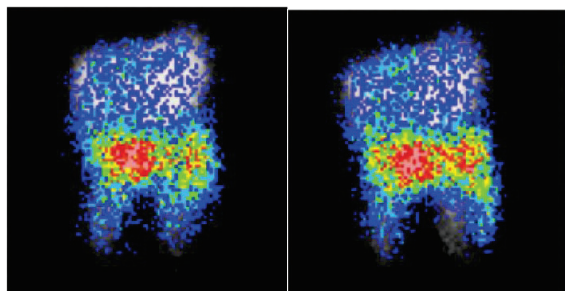


Figura 1: Imagem de bioluminescência do biofilme de *C. albicans* CEC 789 dentro dos canais radiculares de molares. As duas imagens correspondem à contaminações obtidas em diferentes momentos, confirmando a estabilidade da metodologia.

Na Figura 2 podemos observar os resultados obtidos para a distribuição da luz no interior do sistema de canais radiculares.

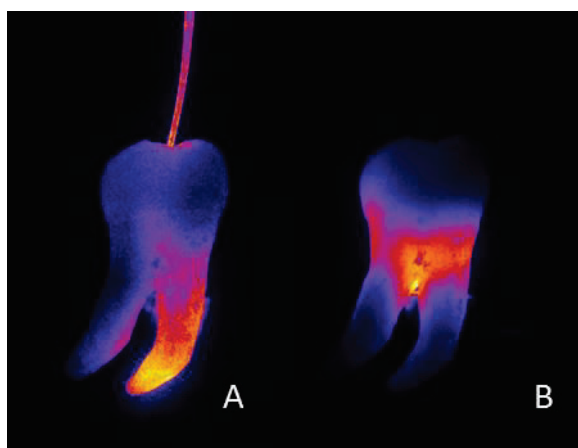


Figura 2: Distribuição da luz pelos canais radiculares. (A) irradiação com fibra difusora e (B) irradiação diretamente com a ponteira do laser.

Conforme observado nas imagens das figuras 2 A e B, como o tecido dental é altamente espalhador para a radiação vermelha e durante o procedimento de irradiação, o canal está preenchido por fotossensibilizador altamente absorvedor de luz nesse comprimento de onda, a intensidade luminosa atingida no ápice radicular é grandemente desfavorecida na ausência de sistemas de entrega adequados. Esta característica tem por consequência menor eficácia antimicrobiana da PDT quando não empregada a irradiação com fibra difusora. Vale ressaltar que nestas imagens não há o biofilme de *C. albicans*.

Na figura 3, observamos as imagens obtidas por bioluminescência após a realização da PDT com dois minutos de tempo de irradiação. Nota-se que a maior descontaminação foi obtida quando a fibra difusora foi utilizada.

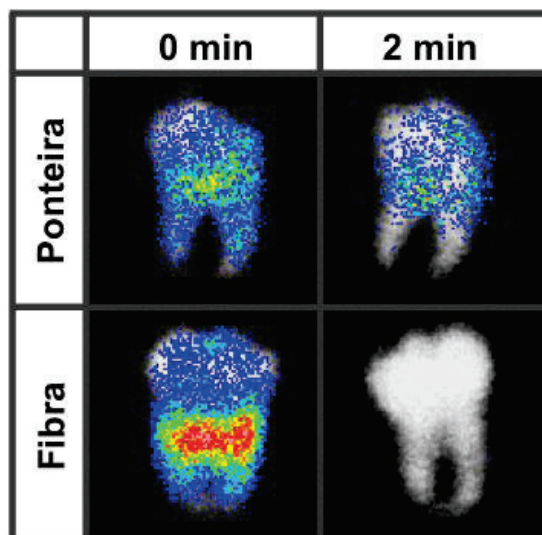


Figura 3: Captação da emissão bioluminescente durante o processo de PDT. As imagens foram registradas depois de dois minutos e a diminuição da emissão bioluminescente em função do tempo de irradiação pode ser observada.

Devido à dependência diretamente proporcional da intensidade de sinal de bioluminescência em função do número de células viáveis [10] a redução microbiana no interior do canal foi correlacionada a redução de sinal detectado após a PDT (Fig. 4). Nota-se baixo erro padrão obtido no grupo controle, representado pela monitoração de um dente sem nenhuma interferência ao longo do tempo, apresentando um resultado de bioluminescência constante.

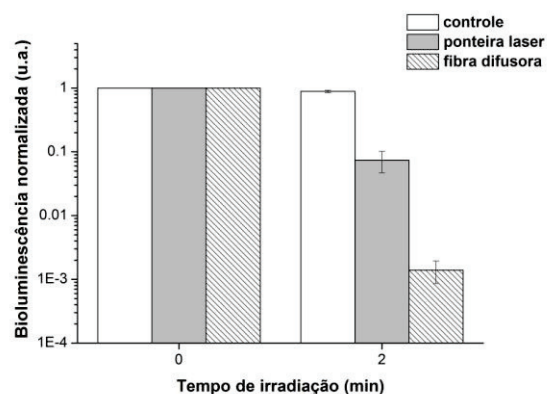


Figura 4: Gráfico da redução microbiana obtida após a PDT para as duas condições testadas (com e sem fibra óptica). Os dados são relativos à diminuição da intensidade do sinal de bioluminescência normalizado.

Discussão

A PDT antimicrobiana tem potencial para se tornar uma alternativa terapêutica principalmente para os casos de infecções localizadas, como as de maior frequência na pele e cavidade oral.

Muitos parâmetros estão envolvidos no sucesso da PDT como tempo de pré-irradiação, energia, tempo de exposição, tipo e concentração do fotossensibilizador empregado, além de tipo de microrganismo, localização e distribuição dos mesmos dentro do tecido.

As metodologias empregadas para análise dos parâmetros envolvidos na PDT envolvem intervenção na amostra, não possibilitando diversas análises em função do tempo na mesma amostra. A metodologia de bioluminescência representa uma possibilidade de investigação em tempo real de parâmetros envolvidos na PDT.

Nossos resultados demonstraram a estabilidade e a viabilidade desta metodologia quando empregada em tecidos biológicos. Além da estabilidade, a reprodutibilidade da metodologia também apresentou resultados satisfatórios pois diferentes amostras apresentaram sinal de bioluminescência semelhante.

Nosso estudo também mostra que quando a fibra difusora é utilizada no interior do sistema de canais radiculares, a entrega da luz é mais homogênea, atingindo maior profundidade dentro do tecido dental. De fato, nossos resultados após PDT corroboram que o uso da fibra difusora permite uma maior desinfecção intracanal (vide figuras 3 e 4), comparada ao método de irradiação onde a ponteira do laser se manteve fixa no interior da câmara pulpar e concorda com dados prévios obtidos por nosso grupo [11].

A correlação entre perda de viabilidade celular e ausência do sinal de bioluminescência para *C. albicans* pode não ser linear, uma vez que a luciferease (enzima luminescente) fica localizada na membrana plasmática [10]. Devido a sua localização ela poderia ser destruída pelas ROS formadas durante a PDT antes do dano irreversível ser provocado na membrana celular. Porém, uma vez que os resultados obtidos apresentaram interessante estabilidade, ao longo do tempo as infecções podem ser monitoradas para avaliar o sucesso da terapia a longo prazo e, principalmente, a metodologia pode ser utilizada *in vivo* para análise de infecção em animais sem necessidade da eutanásia de animais permitindo maior viabilidade das pesquisas nesta área.

Conclusão

Neste trabalho, nosso modelo de biofilme de *C. albicans* bioluminescente demonstrou ser um método não destrutivo de avaliação que pode ser usado para vários parâmetros envolvidos na PDT.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (proc. 10/13313-9) e CNPq pelo apoio financeiro. Os autores também agradecem ao Prof. Michael Hamblin pelo uso do equipamento de bioluminescência e úteis discussões.

Referências

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

13-28.

- [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] Hastings, J.W. (1996) Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*, v. 173, p. 5-11.
- [4] Demidova, T.N., Gad, F., Zahra, T., Francis, K.P., Hamblin, M.R. (2005). Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. *J Photochem Photobiol B*, v. 81, p. 15-25.
- [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] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Enjalbert, B., Rachini, A., VEDIYAPPAN, G., PIETRELLA, D., SPACCAPALO, R., VECCHIARELLI, A., BROWN, A.J., d'ENFERT, C. (2009) A multifunctional, synthetic *Gaussia princeps* luciferase reporter for live imaging of *Candida albicans* infections. *Infect Immun*, v. 77, p. 4847-4858.
- [10] Dai, T., Bil de Arce, V.J., Tegos, G.P., Hamblin, M.R. (2011) Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, n. 12, p. 5710-5717.
- [11] Garcez, A.S., Fregnani, E.R., Rodriguez, H.M., Nunez, S.C., Sabino, C.P., Suzuki, H., Ribeiro, M.S. (2012) The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? *Lasers in Medical Sciences*, Epub ahead of print