

Desenvolvimento de Metodologia para o Estudo do Efeito Fotodinâmico em Infecções Fúngicas

Larissa Sartori Nogueira da Silva e Renato Araujo Prates
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN

INTRODUÇÃO

O estudo das terapias antimicrobianas é um campo de investigação que sofre constantes desafios, devido ao crescente número de patógenos identificados e do aumento nos fatores de risco relacionados às infecções, bem como ao surgimento da resistência aos agentes antimicrobianos pelos micro-organismos patogênicos, devido à recombinação genética e mutação¹. Assim, a busca por terapias alternativas que sejam acessíveis e eficientes, como a terapia fotodinâmica (PDT, *PhotodynamicTherapy*) torna-se de grande relevância².

OBJETIVO

O presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento e a viabilização de metodologias para a pesquisa do efeito fotodinâmico em *Candida albicans*.

METODOLOGIA

Este projeto divide-se em duas etapas: i) desenvolvimento de fonte de luz para terapia fotodinâmica antimicrobiana e ii) inativação de células fúngicas (*in vitro*).

Na primeira etapa foi confeccionada um equipamento para irradiação de placas de microtitulação de 96 poços ($\varnothing=7$ mm; $A=0,38$ cm²), utilizando para isso uma fonte LED R080F (3W) com emissão central em 664 nm. A distância da amostra à fonte foi determinada experimentalmente para que se alcançasse uma intensidade de 100 a 150 mW/cm², a qual é considerada eficiente para o objetivo proposto. A intensidade desejada foi determinada utilizando-se um

espectrômetro (USB2000, Ocean Optics Inc), fibra óptica UV-VIS CUST e filtro de densidade óptica neutra 3 (NE530A, THORLABS) com transmissão de 0,1%.

A cepa ATCC 90028 de *Candida albicans* foi utilizada para formação do biofilme. As células foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 poços com caldo Sabouraud, e incubado a 37°C por 48h, para adesão e crescimento do biofilme.

Com o biofilme formado, os poços foram lavados com PBS (solução salina tamponada com fosfato) em pH 7,2 para remoção das células não aderidas, e então divididos em grupos (TABELA 1).

TABELA 1 - Divisão do Biofilme em Grupos

Grupos	Característica
Controle	Sem corante ou irradiação
Luz	Irradiação por 9 min.
PDT 0	Sem irradiação com FS
PDT 3	Irrradiado por 3 min
PDT 9	Irrradiado por 9 min

O fotossensibilizador (FS) utilizado foi o azul de metileno (Sigma Ltd., Poole, UK), na concentração de 1 mM. Os grupos que receberam FS ficaram em contato com o fármaco durante 10 min antes da irradiação e protegidos da luz ambiente por uma folha de alumínio. Em seguida, o biofilme foi então irradiado com os diferentes tempos propostos (TABELA 1).

Após passar pelos tratamentos propostos no estudo, o biofilme foi mecanicamente

desorganizado e as amostras foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-5} vezes da concentração original. Posteriormente, alíquotas de 10 μ L de cada diluição foram estriadas, em triplicata, em placa de petri com ágar Sabouraud e estas foram incubadas por 24h a 37°C para formação de unidades formadoras de colônias (UFC). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando-se teste de variância *one-way* (ANOVA). A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey e a significância ajustada em 5%.

RESULTADOS

O equipamento desenvolvido mostrou ser adequado para irradiação de placas de 96 poços para estudo da PDT. Foi observado uma distribuição homogênea da luz no interior dos poços com biofilme e a intensidade pretendida foi alcançada.

Nem a irradiação com o LED, nem o contato de 10 minutos com FS na ausência de luz mostrou efeitos deletérios ao biofilme de *C. albicans* ($p > 0,05$). Por outro lado, os grupos irradiados na presença de FS apresentaram redução estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle (Figura 1).

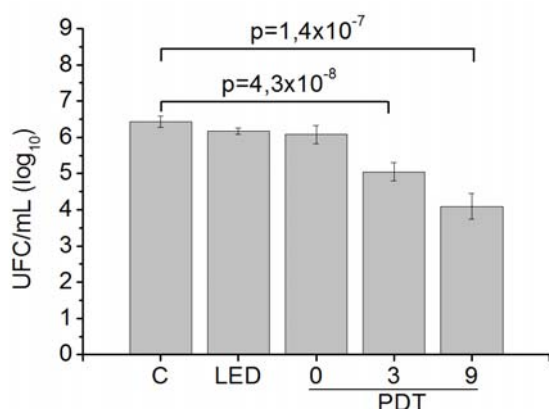


Figura 1: Média e Desvio Padrão da Inativação Fúngica.

Entre os grupos PDT 3 e 9, foi observado maior redução microbiana com a irradiação de 9 min ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A terapia fotodinâmica, dentro dos parâmetros estudados, produziu inativação de leveduras patogênicas. Com base nos dados constatou-se que a fonte projetada para o estudo do efeito fotodinâmico *in vitro* foi eficiente em iluminar de forma padronizada placas de microtitulação de 96 poços, o que demonstra que este é um método viável para estudar ação antimicrobiana induzida por luz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] COWEN, L.E., J.B. ANDERSON e L.M. KOHN. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. ***Annu Rev Microbiol***, v. 56, n. p. 139-165, 2002.
- [2] DONNELLY, R.F., P.A. MCCARRON e M.M. TUNNEY. Antifungal photodynamic therapy. ***Microbiol Res***, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.
- [3] PRATES, R.A., E.G.D. SILVA, A.M. YAMADA-JR, L.C. SUZUKI, C.R. PAULA e M.S. RIBEIRO. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. in: Mechanisms for Low-Light Therapy III2008, San Jose. ***Proceedings***. San Jose: SPIE, p. 684606.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

“Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)”