



Voltar

## Modelo de estudo *in vitro* de infecções por biofilme de *Candida albicans* e sua inativação por terapia fotodinâmica

Caetano Padial Sabino e Martha Simões Ribeiro  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

### INTRODUÇÃO

Vários organismos vivos desenvolveram durante sua evolução natural a capacidade de emitir luz. Este processo, conhecido como bioluminescência, é produzido por ciclos metabólicos envolvendo enzimas chamadas luciferases em reação dependente de ATP com proteínas chamadas luciferinas [1]. Recentemente, a engenharia genética possibilitou o desenvolvimento de técnicas que de maneira geral realizam a detecção de luz emitida por células ou tecidos artificialmente bioluminescentes, reportando a densidade celular e sua localização espacial simultaneamente.

*Candida albicans*, considerado um fungo oportunista, é capaz de rapidamente se converter em patógeno em resposta a mudanças do meio ambiente que favoreçam seu desenvolvimento. A resistência microbiana a quimioterápicos é um dos mais graves problemas de saúde pública, portanto, medidas preventivas como a

geração de múltiplos eventos de óxido-redução, que do ponto de vista terapêutico deve implantar no sítio de ação o estresse oxidativo levando ao dano irreversível da célula alvo [3].

### OBJETIVO

Neste trabalho desenvolvemos um modelo de biofilme de *C. albicans* bioluminescente em canais de dentes humanos para monitorar a inativação microbiana em função do tempo de exposição à TFD em tempo real e da distribuição de luz no tecido duro dental de forma não destrutiva.

### METODOLOGIA

Dez molares humanos cedidos pelo banco de dentes da FOU SP foram utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa. Os canais radiculares foram instrumentados utilizando-se um sistema de limas rotatórias (Dentisplay Maillefer Instru. S, Switzerland) até o diâmetro apical #30 (F3), intercalando-se com a instrumentação e irrigação com

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 terapia fotodinâmica (TFD) como uma possível alternativa terapêutica para o tratamento de infecções fúngicas localizadas [2].

A TFD utiliza o princípio de ativação de um composto fotossensibilizador através da energia luminosa, sendo que esta ativação deve resultar na transferência de energia ou elétrons do composto para o ambiente circunvizinho. O processo que se segue é a

Para executar a TFD, todos os canais foram preenchidos com 30  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de azul de metileno (90  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich, EUA) e coelenterazina (0,5mg/mL, Gold Biotech, EUA) dissolvidos em solução salina tamponada, sendo mantida em contato com o biofilme no interior do canal por 1 min como tempo de pré-irradiação. Um laser de InGaAlP (MMOptics, Brasil) de emissão em 660 nm a 100 mW de potência foi utilizado para irradiação dos grupos submetidos à TFD. Dois grupos foram realizados: Grupo 1 – dente irradiado com auxílio da fibra óptica difusora e Grupo 2 – dente irradiado com a ponteira laser posicionada na entrada do canal.

Ambos os grupos foram avaliados em relação a um grupo de controle de estabilidade de sinal bioluminescente. O tempo de irradiação foi de 2 min/canal para ambos os grupos resultando em uma energia total entregue de 12 J. Para avaliar a redução microbiana obtida pela TFD os dentes selecionados foram fotografados a cada dois minutos de irradiação, empregando equipamento e software específicos para esta modalidade de análise

3 mL de NaOCl a 2,5%. Após instrumentação, todos os canais foram irrigados com 5 mL de EDTA a 17% seguidos de solução salina tamponada com fosfato. Os dentes foram então esterilizados em autoclave.

Suspensões de 10  $\mu\text{L}$  contendo  $10^5$  células de *C. albicans* bioluminescente (CEC 789) foram inoculadas nos canais radiculares e estes mantidos em estufa a 37°C por 72 h em agitação constante a 115 RPM e 10  $\mu\text{L}$  de meio de cultura YPD (Difco, USA) foi suplementado a cada 24 h.

fibra óptica difusora foi empregada para melhor distribuir a luz entregue.

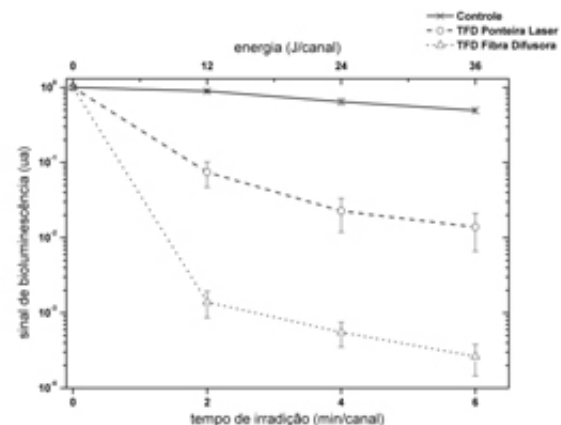


Figura 1: Redução microbiana obtida durante a TFD para as condições avaliadas. Os dados são relativos à diminuição da intensidade do sinal de bioluminescência normalizado. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

## CONCLUSÕES

O modelo de biofilme de *C. albicans* bioluminescente demonstrou ser um bom método não destrutivo de avaliação seguido de eficácia de sua inativação pela TFD.

(Argus, Hamamatsu, EUA).

## RESULTADOS

Devido à dependência diretamente proporcional da intensidade de sinal de bioluminescência em função do número de células viáveis, a redução microbiana no interior do canal foi correlacionada à redução de sinal detectado durante TFD [4]. Nota-se baixo erro padrão obtido no grupo controle, representado pela monitoração de um dente sem nenhuma intervenção ao longo do tempo, apresentando um resultado de bioluminescência satisfatoriamente constante. Na figura 1, observa-se os sinais de bioluminescência obtidos durante a realização da TFD a cada dois minutos de irradiação para ambos os grupos experimentais. Nota-se que a maior descontaminação foi obtida quando uma

da eficácia de sua inativação pela TFD.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]Hastings, JW. *Gene*, v. 173, p. 5-11, 1996.
- [2]Souza, R.C. et al. *Lasers in Medical Sciences*, v.25, n. 3, p.385-9, 2010.
- [3]Wainwright, M. *Journal of Antimicrobial Chemothererapy*, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.
- [4]Dai, T. et al. (2011). *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, n. 12, p. 5710-17, 2011.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

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

[Voltar](#)