

# Desenvolvimento de um Modelo *in vivo* para o Estudo do Efeito Fotodinâmico em Infecção Fúngica

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

## INTRODUÇÃO

O estudo de terapias antimicrobianas alternativas é um campo de investigação promissor, particularmente devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos nas últimas décadas, que acelerou a seleção de cepas microbianas resistentes [1].

*Candida albicans* é um fungo oportunista, comumente encontrado na microbiota residente do ser humano, estando presente em até 62% dos indivíduos saudáveis. A ocorrência de resistência a alguns fármacos amplamente empregados já foi relatada, preocupando diversas organizações internacionais de saúde [2].

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) surge como potencial alternativa de tratamento para várias doenças infecciosas de alta relevância clínica [3]. A PDT causa morte celular baseada na associação de fármacos fotossensíveis (FS) à aplicação de luz com comprimento de onda adequado. Ao absorver um fóton o FS é promovido para um estado excitado e após sofrer decaimento para o estado intermediário, o FS pode transferir energia para o oxigênio molecular ou participar de um processo de transferência de elétrons que levam à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que possuem efeitos citotóxicos, independentemente de mecanismos de resistência a fármacos antimicrobianos quimioterápicos tradicionais [3].

Trabalhos *in vitro* têm demonstrado os positivos efeitos antimicrobianos da PDT em várias espécies de *Candida* [4]. 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 na prática clínica com sucesso.

## OBJETIVO

Desenvolver um modelo de candidíase localizada no tecido vaginal de camundongos fêmeas para estudo do efeito fotodinâmico antimicrobiano.

## METODOLOGIA

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

Camundongos fêmeas BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas foram tratados com estrógeno semanalmente para permitir o estabelecimento e a manutenção da infecção vaginal. A infecção foi induzida por uma cepa de *C. albicans* bioluminescente (CEC 789), 72 h após a primeira administração do hormônio por meio da deposição de 20 µL da suspensão de leveduras ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) na vagina dos animais.

Cinco dias após a inoculação, a infecção fúngica foi confirmada mediante análise histológica com a coloração padrão PAS e a recuperação dos microrganismos por lavagem do canal vaginal com 50 µL de solução salina fosfatada (PBS). Para quantificar o número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), o conteúdo obtido foi diluído seriadamente e plaqueado em ágar Sabouraud com cloranfenicol, em triplicata. Animais

representantes de cada grupo foram eutanasiados e o canal vaginal foi retirado para preparação histológica.

Para avaliar a eficácia da PDT, os grupos experimentais foram anestesiados e receberam 20  $\mu$ L da solução do FS (azul de metileno, AM) depositado no do canal vaginal em diferentes concentrações: 0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM. Após aguardar 10 minutos para incorporação do AM pelas células, a PDT foi realizada posicionando a ponteira do laser na entrada do canal vaginal com os seguintes parâmetros:  $\lambda = 660$  nm, (GaAIs, Photon Lase III, DMC ), P= 100 mW,  $\Phi = 0,03$  cm<sup>2</sup> em modo contínuo, com tempo de exposição de 6 min [5].

A análise da distribuição espacial do fungo e do AM no canal vaginal foi feita por imagem, via monitoramento de emissão de bioluminescência e fluorescência. Para indução da bioluminescência, 20  $\mu$ L de solução de coelenterazina (500  $\mu$ g/mL) e AM (1 mM) diluídos em PBS foram inoculados no canal vaginal de animais previamente infectados, onde em seguida uma câmera ultrasensível (C2400-30H, Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ) foi utilizada para captação da bioluminescência e uma câmera de fluorescência (MaestroTM, CRI Inc, Woburn, MA) monitorou a distribuição do FS.

## RESULTADOS

O conteúdo da lavagem vaginal mostrou a presença de células epiteliais enucleadas, confirmando a ação do hormônio. A infecção persistiu até o final do período experimental e o aspecto da infecção corrobora com a literatura [6].

Observamos que o FS está presente principalmente na mucosa do canal vaginal em distribuição coincidente com a infecção induzida.

O número de células fúngicas recuperadas de animais tratados com 1 mM de AM e não irradiados ( $2,1 \times 10^6$  UFC/mL) não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle. Entretanto, após a PDT o número de células viáveis foi significativamente reduzido ( $\sim 1 \log_{10}$ ), em relação ao controle, para todas as concentrações de AM testadas. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos PDT.

## CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível estabelecer um modelo reprodutível de candidíase vulvo-vaginal em camundongas para estudo da PDT. Nossos resultados mostram que a PDT foi capaz de reduzir significativamente o número de células fúngicas viáveis neste modelo de infecção. No entanto, mais trabalhos são ainda necessários para otimização de nossos achados *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bennadi, D. *J Basic Clin Pharm*, 5(1):19-23, 2013.
- [2] John, JF & Steed, LL. *J S C Med Assoc*. 109(2):54-8, 2013.
- [3] Dai, T et al. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 6(3-4): 170–188, 2009.
- [4] Souza, RC et al. *Lasers in Med Scien*, v.25, n. 3, p.385-9, 2010.
- [5] Machado-de-Sena, RM et al. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. (ahead of print) doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.03.013, 2014.
- [6] Calderon, L et al. *Med Mycol*, 41(2):143-7, 2003.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

FAPESP, CNPq e CNEN.