

## ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DOIS COMPRIMENTOS DE ONDA NO EFEITO FOTODINÂMICO EM BIOFILMES DE *Candida albicans*

L. C. Suzuki\*, T. M. Yoshimura\*, I. T. Kato\*\*, R. A. Prates\*\*\* e M. S. Ribeiro\*

\*Laboratório de Terapia Óptica, Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil

\*\*Departamento de Engenharia Biomédica, UFABC, São Paulo, Brasil

\*\*\*Programa de Pós-Graduação em Biofotônica, UNINOVE, São Paulo, Brasil

e-mail: lcsuzuki@gmail.com

**Resumo:** O biofilme formado por *Candida albicans* é a principal causa de infecções associadas a dispositivos médicos, tais como cateteres e próteses articulares artificiais. Estudos têm demonstrado que a terapia fotodinâmica (PDT) apresenta um efeito letal sobre leveduras de *C. albicans*, e baseia-se na utilização de um fotossensibilizador (FS) na presença de luz para gerar espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da PDT comparando dois comprimentos de onda para irradiação ( $\lambda = 630$  nm e  $\lambda = 660$  nm) usando o azul de metileno (AM) como FS. Os biofilmes de *C. albicans* foram crescidos em discos de hidrogel, e padronizados em relação à espessura ( $56,2 \pm 9,93$   $\mu$ m) e à morfologia. Previamente à PDT, realizamos ensaios de captação do AM variando o tempo de pré-irradiação. Assim, 500  $\mu$ M de AM foram deixados em contato com o biofilme antes da irradiação, por 30 min. A irradiação em  $\lambda = 630$  nm não promoveu redução de atividade metabólica das células fúngicas quando comparada ao controle não irradiado. Em  $\lambda = 660$  nm, no entanto, observamos menor atividade metabólica celular.

**Palavras-chave:** Fotossensibilizador, Fotoinativação fúngica, Azul de metileno, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

**Abstract:** The biofilm formed by *Candida albicans* is the cause of infections associated with medical devices such as catheters and artificial joint prosthesis. Studies have shown that photodynamic therapy (PDT) presents a lethal effect on *C. albicans* yeast, and it is based on the use of a photosensitizer (PS) in the presence of light to generate reactive oxygen species in biological systems. The aim of this study was to evaluate the effects of PDT comparing two wavelengths irradiations ( $\lambda = 630$  nm and  $\lambda = 660$  nm) and using methylene blue (MB) as PS. *C. albicans* biofilms were grown in hydrogel discs with standardized thickness ( $56.2 \pm 9.93$  mm) and morphology. Prior to PDT, MB uptake tests were performed depending on pre-irradiation time. Thus, 500 mM of MB was left in contact with the biofilm before irradiation for 30 min. Irradiation at  $\lambda = 630$  nm showed no reduction in metabolic activity on yeast cells when compared to non-irradiated control group. At  $\lambda = 660$  nm, however, we observed lower metabolic cellular activity.

**Keywords:** Photosensitizer, Antimicrobial Photodynamic Therapy, Yeast photoinactivation, Methylene blue.

### Introdução

Biofilmes formados por fungos, especialmente *C. albicans*, são a principal causa de infecções associadas a dispositivos médicos, próteses articulares e lentes de contato [1]. Os cateteres venosos centrais cirurgicamente instalados demandam troca quando infectados, causando risco à saúde dos pacientes. O tratamento com antifúngicos, tanto nesses casos como em infecções de próteses articulares, apresenta baixos índices de sucesso, abrindo oportunidades para novas terapias que combatam essas infecções.

Modelos de formação de biofilme em substratos são reportados na literatura [2-5], entretanto, a dificuldade em se estabelecer um protocolo para a obtenção de amostras com biofilmes em quantidade e qualidade padronizadas ainda existe.

A terapia fotodinâmica (PDT) é baseada na utilização de fotossensibilizadores (FS) ativados na presença da luz. Tais substâncias podem ser incorporadas pelas células-alvo da PDT e, quando irradiadas por luz com um comprimento de onda ressonante ao FS, na presença de O<sub>2</sub>, produzem espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete, peróxidos, radicais hidroxilas e íons superóxidos) [6-8].

O azul de metileno (AM) é um FS bastante utilizado para esse tipo de tratamento. Estudos mostram sua eficiência na redução microbiana de *C. albicans* em levedura [9-13], que se torna mais difícil em biofilmes [14]. A concentração necessária de FS para uma redução fúngica significativa pode ser até 10 vezes maior em biofilmes do que em leveduras [7, 15]. Entretanto, o AM em concentrações elevadas pode apresentar toxicidade para as células do tecido hospedeiro, podendo agravar o quadro inflamatório [9-13, 16].

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método de crescimento de biofilme maduro em quantidade e qualidade padronizado para avaliar quantitativamente o efeito fotodinâmico comparando dois comprimentos de onda de irradiação utilizando o AM como FS.

## Materiais e métodos

**Formação do biofilme** – O fungo *Candida albicans* ATCC 10231 foi obtido dos estoques do Laboratório de Terapia Óptica (LATO) do CLA. Formamos o biofilme sobre discos de hidrogel (Acuvue 2® - de 42 % polímero e 58 % água) removidos de lentes de contato gelatinosas, em meio de cultura YNBd (*yeast nitrogen base* enriquecido com dextrose), que contém todos os nutrientes necessários para o crescimento de leveduras. A qualidade do biofilme formado foi avaliada por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um equipamento de MEV ambiental (TM 3000, Hitashi, Japão), que não demanda processamento prévio das amostras.

**Teste de captação de AM no biofilme** – Biofilmes de *C. albicans* foram crescidos em placas de 96 poços com tratamento de superfície para adesão celular. Após 48 h, quando os biofilmes se encontravam maduros, removemos o meio de cultura, lavamos com PBS e incubamos em concentrações crescentes de AM, variando também os tempos de pré-irradiação (PIT). Adicionamos 200 µL de uma solução digestora (0,1 M de NaOH e dodecil sulfato de sódio a 1 %) por 24 h para medir a quantidade de AM captada pelo biofilme [17]. As placas foram levadas ao espectrofotômetro (Spectramax M4, Molecular Devices Sunnyvale, CA – USA), para o cálculo da porcentagem da concentração de AM que penetrou no biofilme pela medida de fluorescência no volume do líquido digerido, excitando em  $\lambda = 532$  nm e lendo na emissão de  $\lambda = 690$  nm.

Uma curva com três PIT (5 min, 10 min e 30 min) foi obtida em três concentrações distintas (100 µM, 500 µM e 1 mM) de AM. Com o melhor PIT definido, avaliamos novamente a captação em um leque maior de concentrações (50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM e 1 mM).

**Análise da sensibilidade do biofilme ao efeito fotodinâmico** – Após a determinação do PIT e da concentração de AM que resultaram em maior captação do FS, amostras com biofilmes maduros foram submetidas ao efeito fotodinâmico para quantificar a redução da atividade metabólica. Optamos por utilizar dois LED com diferentes comprimentos de onda ( $\lambda = 630$  nm  $\pm$  20 nm e  $\lambda = 660$  nm  $\pm$  10 nm), mantendo constantes a potência de saída (16 mW) e a taxa de fluência (127,3 mW/cm<sup>2</sup>). As amostras foram irradiadas por 0, 3 min, 6 min, 9 min ou 12 min, resultando em fluências de 23, 46, 69 e 92 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

O diâmetro do feixe foi ajustado para irradiar toda a superfície do disco de hidrogel onde foram crescidos os biofilmes (diâmetro  $d = 4$  mm), em uma área de aproximadamente 0,126 cm<sup>2</sup>. O estudo foi realizado em triplicata ( $n = 3$ ) para cada comprimento de onda. Após tratamento, as amostras foram acondicionadas individualmente nos poços da placa de 96 *wells* para a realização do ensaio XTT.

**Ensaio XTT** – Em um tubo falcon, adicionamos

8 mL de PBS, 100 µL de XTT 1 mg/mL e 8 µL de menadione 1 mM. Sobre amostras do biofilme crescido em hidrogel previamente lavadas com PBS, adicionamos 200 µL de XTT em poços de placas de 96 *wells*, com tempo de contato de 5 h. Após este período, os 200 µL foram transferidos individualmente para *ependorfs*, e centrifugados a 3.000 rpm por 5 min. Desse volume, alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram alocados em novos poços para determinação da densidade óptica em espectrofotômetro, lida em  $\lambda = 492$  nm [18, 19].

## Resultados e discussão

A MEV mostrou um biofilme maduro, com grande quantidade de hifas (fig. 1). Na fase de adesão celular, houve inclusive uma maior quantidade de células aderidas ao substrato, sugerindo uma produção adequada de adesinas [18].

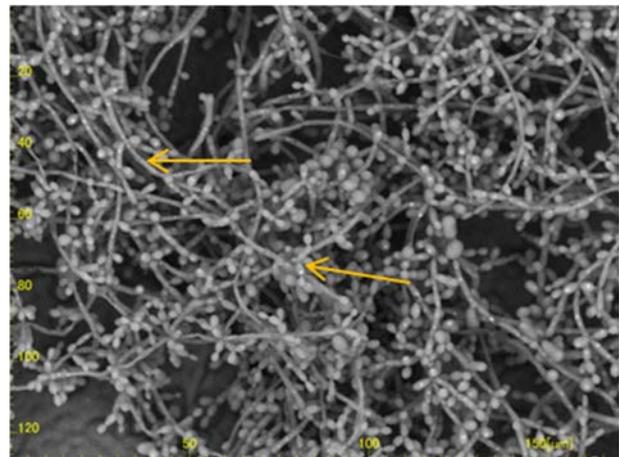


Figura 1. Elétron-micrografia da amostra de biofilme formada. Aumento de 1000x. As setas apontam para hifas de *C. albicans* no biofilme.

A fig. 2 mostra os resultados de captação do AM pelo biofilme variando sua concentração e o PIT. Observa-se diferença significativa entres os grupos de 5 e 30 min com 500 µM, sendo maior em 30 min (fig. 2A). Nota-se também que não existe diferença significativa entre as concentrações de 500 µM e 1 mM usando um PIT de 30 min (fig. 2B). A utilização de concentrações menores para sensibilizar o biofilme formado é mais indicada, pois acima desta concentração existe a possibilidade de o excesso de AM formar uma barreira óptica durante a irradiação, e em baixas concentrações a toxicidade do AM nas células do hospedeiro é menor [20].

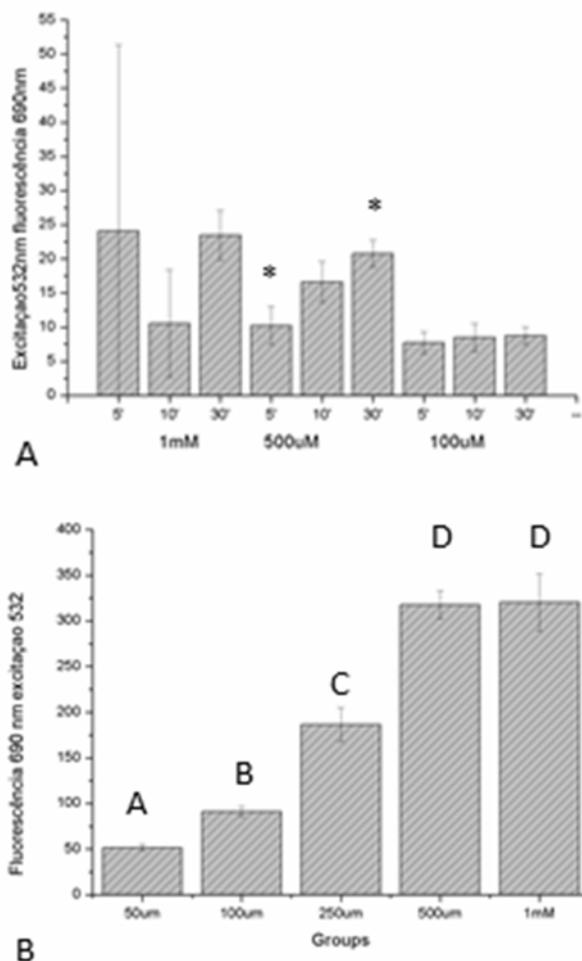


Figura 2: Fluorescência medida da captação de AM. A: em função do PIT e concentração de AM (\*  $p < 0,05$ ); B: em função da concentração de AM mantendo um PIT de 30 min (letras diferentes indicam grupos com diferenças estatisticamente significantes).

Os biofilmes formados em 48 h nas lentes de contato foram submetidos ao efeito fotodinâmico com um LED emitindo em  $\lambda = 630$  nm. A atividade metabólica das células foi medida através do ensaio XTT. Nestes parâmetros, não houve redução de viabilidade celular (fig. 3). A irradiação das amostras por 12 min sem a adição de AM não alterou o índice de metabolismo da célula pelo ensaio XTT.

A irradiação dos experimentos anteriores foi realizada com um LED de 630 nm pelo fato do dímero de AM estar em maior quantidade na concentração de 500  $\mu\text{M}$ . O dímero do AM pode ocasionar danos fotodinâmicos, principalmente quando a dimerização é induzida por um micro-organismo [16]. Já o LED em  $\lambda = 660$  nm possui maior ressonância com o monômero do AM, podendo ocasionar maior efeito fotodinâmico. Foi realizado um espectro de absorção do AM 50  $\mu\text{M}$ , ilustrando as bandas de irradiação dos LEDs = 630 nm  $\pm$  20 nm e  $\lambda = 660$  nm  $\pm$  10 nm sobre a banda de absorção

do dímero (centrado em  $\lambda = 614$  nm) e do monômero ( $\lambda = 664$  nm) (fig. 4).

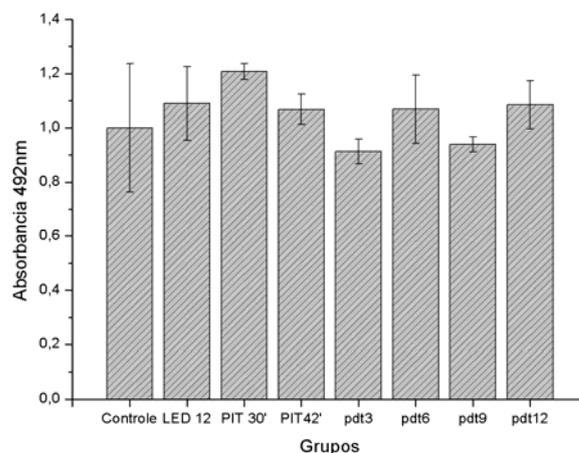


Figura 3: Densidade óptica relacionada aos índices de respiração celular (ensaio XTT) dos biofilmes submetidos à PDT utilizando um LED  $\lambda = 630$  nm.

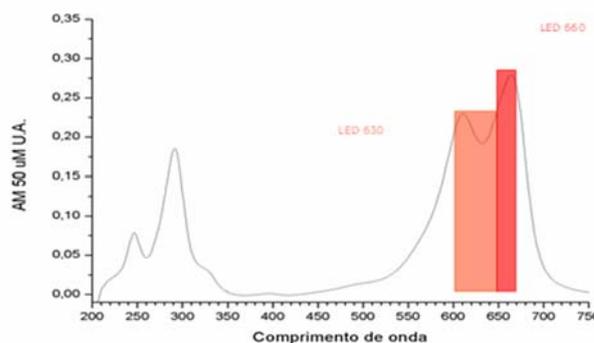


Figura 4: Espectro de absorção do AM 50  $\mu\text{M}$  em unidades arbitrárias, com a sobreposição das bandas de emissão dos LED utilizados neste trabalho.

A fig. 5 mostra maior redução dos índices de respiração celular medidos pelo ensaio XTT quando irradiados com um LED em  $\lambda = 660$  nm, revelando uma tendência da terapia fotodinâmica em reduzir a atividade metabólica das células dos biofilmes formados. Apesar do alto desvio padrão observado, nota-se que para este comprimento de onda, a redução da atividade metabólica da célula é de aproximadamente 60% depois de 6 min. de irradiação.

Interessantemente, o comprimento de onda  $\lambda = 660$  nm (grupo só LED) também mostrou uma redução na respiração celular de cerca de 40%. Já que a literatura não fundamenta tais achados, novos ensaios são necessários para confirmação deste resultado.

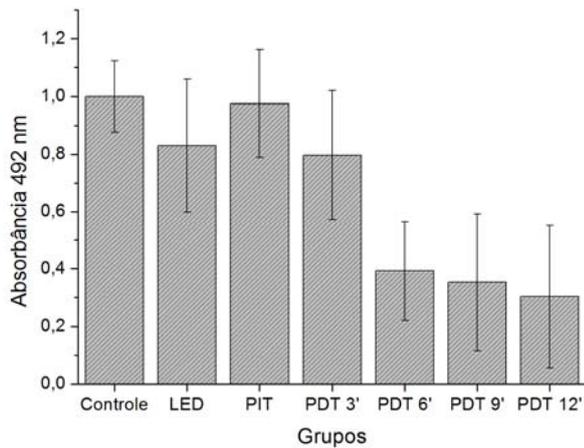


Figura 5: Densidade óptica relacionada aos índices de respiração celular (ensaio XTT) dos biofilmes submetidos à PDT utilizando um LED  $\lambda = 660$  nm.

### Conclusão

A PDT realizada no comprimento de onda de  $\lambda = 630$  nm visando fotoativar a banda de absorção do dímero do AM não apresentou um dano fotodinâmico nos parâmetros testados. Entretanto, uma redução de 60 % na atividade metabólica celular foi observada quando irradiamos com o LED em  $\lambda = 660$  nm, excitando a banda do monômero do azul de metileno.

### Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP (grant 2010/013313-9) e ao CNPq pelo suporte financeiro.

### Referências

- [1] Mukherjee, P.K., et al., Candida biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol*, 2005. 43(3): p. 191-208.
- [2] Chandra, J., et al., Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*, 2001. 183(18): p. 5385-94.
- [3] Andes, D., et al., Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infection and Immunity*, 2004. 72(10): p. 6023-6031.
- [4] Schneider, M., et al., The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers Med Sci*, 2012. 27(3): p. 615-20.
- [5] Tournu, H. and P. Van Dijck, *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *Int J Microbiol*, 2012. 2012: p. 845352.
- [6] Wilson, M. and N. Mia, Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med*, 1993. 22(8): p. 354-7.
- [7] Prates, R.A., et al. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells.

- in *Mechanisms for Low-Light Therapy III*. 2008: SPIE.
- [8] Wainwright, M., Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*, 1998. 42(1): p. 13-28.
- [9] Queiroga, A.S., et al., In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. by different doses of low power laser light. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2011. 8(4): p. 332-336.
- [10] Dai, T., et al., Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55(12): p. 5710-7.
- [11] Prates, R.A., et al., Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. *Laser Physics*, 2009. 19(5): p. 1038-1044.
- [12] Prates, R.A., et al., Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*, 2011. 66(7): p. 1525-32.
- [13] Souza, R.C., et al., Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*, 2009.
- [14] Pereira, C.A., et al., Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci*, 2011. 26(3): p. 341-8.
- [15] Suzuki, L.C., et al., Real time optical coherence tomography monitoring of *Candida albicans* biofilm in vitro during photodynamic treatment. *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II*, 2010. 7715.
- [16] Usacheva, M.N., M.C. Teichert, and M.A. Biel, The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B*, 2003. 71(1-3): p. 87-98.
- [17] Fuchs, B.B., et al., Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007. 51(8): p. 2929-2936.
- [18] Chandra, J., P.K. Mukherjee, and M.A. Ghannoum, In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*, 2008. 3(12): p. 1909-24.
- [19] Nweze, E.I., et al., Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 2012. 67(1): p. 149-53.
- [20] Wainwright, M., et al., Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *J Photochem Photobiol B*, 1997. 40(3): p. 233-9.