

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

**Aplicação de Terapia Fotodinâmica (PDT) usando luz LED azul sobre
culturas de *Candida albicans* - *in vitro***

Felipe Brunatto da Luz

Pelotas, 2014

Felipe Brunatto da Luz

**Aplicação de Terapia Fotodinâmica (PDT) usando luz LED azul sobre
culturas de *Candida albicans* - *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Diagnóstico Bucal, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Etges

Co-Orientadores: Prof^a Dr^a Ana Paula Neutzling Gomes

Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L979a Luz, Felipe Brunatto da

Aplicação de terapia fotodinâmica (PDT) usando luz led azul sobre culturas de candida albicans - in vitro / Felipe Brunatto da Luz ; Adriana Etges, orientadora ; Ana Paula Neutzling Gomes, Fábio Renato Manzolli Leite, coorientadores. — Pelotas, 2014. 59 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal) Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Candida albicans. 3. Diodo emissor de luz. 4. Azul de metileno. I. Etges, Adriana, orient. II. Gomes, Ana Paula Neutzling, coorient. III. Leite, Fábio Renato Manzolli, coorient. IV. Título

Black: D6

Felipe Brunatto da Luz

Aplicação de Terapia Fotodinâmica (PDT) usando luz LED azul sobre culturas de *Candida albicans* - *in vitro*

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29 de Agosto de 2014

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana Etges (Orientadora)

Doutora em Odontologia – Patologia Bucal pela Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Uchoa Vasconcelos

Doutora em Odontologia – Estomatologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC/RS, Brasil

Prof^a. Dr^a. Luciana de Rezende Pinto

Doutora em Odontologia – Reabilitação Oral pela Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Prof^a. Dr^a. Isadora Luana Flores (suplente)

Doutora em Estomatopatologia – concentração Patologia pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Dedicatória

Aos professores de todos os níveis que
contribuíram com a minha formação.

A minha família por todo o apoio prestado.

Aos meus amigos e colegas, especialmente da
pós-graduação pelo companheirismo e
incentivo.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e à Faculdade de Odontologia , pela oportunidade da realização de um sonho. Por ter sido minha segunda casa desde quando comecei a graduação.

À todos os professores que com dedicação fizeram parte dessa trajetória.

À todos os funcionários da Faculdade de Odontologia pelo carinho.

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação, por todos os momentos compartilhados. Meu agradecimento em especial aos verdadeiros amigos que levarei para sempre e que não citarei nomes para não correr o risco de esquecer injustamente algum.

Aos diversos alunos e pacientes que durante o mestrado contribuíram para minha formação.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Adriana Etges, pelo carinho, atenção, dedicação e paciência.

Aos meus co-orientadores, Prof^a. Dr^a. Ana Paula Neutzling Gomes e Prof.Dr. Fábio Renato Manzolli Leite, bem como ao Prof. Dr. Rafael Guerra Lund pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do CDDB e do Laboratório de Microbiologia, pelo trabalho prestado e incentivo durante a realização desta pesquisa. À minha amiga e colega Simone Gomes Dias de Oliveira, por toda a ajuda, incentivo, paciência e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

À minha tia Dircinha Granciani da Luz, por me incentivar, apoiar, compreender e auxiliar incansavelmente. Por permitir que eu tenha chegado até aqui.

Resumo

LUZ, Felipe Brunatto da. **Aplicação de Terapia Fotodinâmica (PDT) usando luz LED azul sobre culturas de *Candida albicans* - *in vitro***. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O fungo *Candida albicans* é frequentemente encontrado como componente da microbiota da cavidade oral, sendo agente etiológico da candidíase eritematosa crônica (estomatite por dentadura). Condição esta, uma infecção oportunista, de caráter crônico que acomete grande parte dos usuários de próteses. O tratamento tradicional com antifúngicos, muitas vezes é duradouro, colaborando para o surgimento de cepas resistentes desse fungo. Assim sendo, torna-se necessária uma alternativa de tratamento efetiva contra a candidíase oral e que não apresente efeitos colaterais. O objetivo desse estudo foi desenvolver um novo dispositivo a partir de um fotopolimerizador odontológico, baseado na tecnologia LED com emissão de luz azul. Além disso, verificar a ação da PDT com azul de metileno associada ao uso dessa fonte sobre culturas de *Candida albicans*. Após o crescimento e identificação das colônias foram selecionadas 04 cepas de *Candida albicans* e 01 cepa ATCC (62342) e realizadas diluições obedecendo-se a escala 0,5 de Macfarland (1×10^8 UFC). Desse inóculo, foram colocados 100 μ l em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. As amostras das colônias de *Candida albicans* foram distribuídas em triplicata nas placas de cultura. No grupo testado foram colocados 90 μ l de PBS, adicionado a 10 μ l de azul de metileno. As placas foram incubadas durante 30 minutos e, após esse período, foi realizada a irradiação com LED azul. Para realizar a PDT a placa foi dividida em 6 setores de dimensões iguais. Cada setor foi irradiado durante 6 minutos na dosimetria de 122 J/cm², potência de 260 mW e comprimento de onda de 455 nm em aplicação única, totalizando 36 minutos de aplicação em cada placa. Após esse desafio, foram realizadas diluições seriadas 1:10 em 4 alíquotas sucessivas. Dessa diluição foram semeados 25 μ l em placas de Petri e incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período foram feitas as contagens das colônias por dois examinadores previamente treinados e calibrados. Os resultados foram analisados estatisticamente usando ANOVA seguido por teste de Tukey com 5% de nível de significância e não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes grupos e o grupo controle. Constatando-se que a PDT usando fonte de luz LED é uma alternativa viável, no entanto no presente estudo não foi possível constatar a ação dessa terapia.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica; *Candida albicans*; Diodo emissor de luz; Azul de Metileno.

Abstract

LUZ, Felipe Brunatto da. **Application of Photodynamic Therapy (PDT) using blue LED light on cultures of *Candida albicans* - *in vitro***. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The fungus *Candida albicans* is often found as the microflora of the oral cavity component, as the etiological agent of erythematous candidiasis (denture stomatitis), this condition is an opportunistic infection, a chronic condition that affects most users of prostheses. Traditional treatment with antifungals, often lasting, contributing to the manifestation of resistant strains of this fungus. Therefore, it is necessary effective alternative treatment for oral candidiasis and who does not produce side effects. The aim of this study was to develop a new device from a dental curing light, based on the LED technology with blue light emission. As well, check the action of PDT with methylene blue associated with the use of this source on cultures of *Candida albicans*. After the growth and identification of colonies were selected 04 strains of *Candida albicans* and 01 strain ATCC (62342) and made dilutions obeying the scale of 0.5 Macfarland (1×10^8 CFU). In this inoculum, 100 μ L were placed in each well of a 96-well microtiter plate wells. Samples of colonies of *Candida albicans* were triplicate distributed in culture plates. On the test group 90 μ L of PBS, added to 10 μ L of methylene blue were placed. The plates were incubated for 30 minutes and, thereafter, irradiation was performed with blue LED. To perform PDT the plate was divided into 6 sectors of equal dimensions. Each sector was irradiated for 6 minutes dosimetry of 122 J/cm² power of 260 mW and wavelength of 455 nm in a single application, totaling 36 minutes of application on each plate. After this challenge, serial dilutions 1:10 in 4 successive aliquots were performed. This dilution were seeded 25 μ L in Petri dishes and incubated at 37 ° C for 48 hours. After this period the numbers of colonies were made by two previously trained and calibrated examiners. The results were statistically analyzed using ANOVA followed by Tukey test at 5% significance level and showed no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the different groups and the control group. The authors verified that PDT using LED light source is a viable alternative, however in this study it was not possible to observe the action of this therapy.

Key-words: Photodynamic Therapy; *Candida albicans*; Light-emitting diode; Methylene Blue.

Lista de Figuras

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Sensibilidade Antifúngica de cepas de <i>C. albicans</i> frente à ação de Luz LED Azul e Azul de Metileno..... | 51 |
| Figura 2 | Sensibilidade Antifúngica de cepas de <i>C. albicans</i> frente à ação de Azul de Metileno..... | 51 |
| Figura 3 | Sensibilidade Antifúngica de cepas de <i>C. albicans</i> frente à ação de Luz LED Azul..... | 52 |

Lista de Tabelas

| | | |
|---------------|---|----|
| Tabela 1 | Temperaturas de anelamento de cada primer utilizado..... | 24 |
| Tabela 2 | Primers utilizados para a identificação de espécies fúngicas específicas, conferidos pelo BLAST20..... | 25 |
| Artigo | | |
| Tabela 1 | Grupos testes utilizados no desafio antifúngico..... | 50 |
| Tabela 2 | Resultados do teste de sensibilidade antifúngica (log 10 para a contagem de unidades formadoras de colônia)..... | 50 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|-------------------|---|
| % | por cento |
| °C | graus Celsius |
| / | por |
| µg/ml | Micrograma por mililitro |
| C. | Fungo do gênero <i>Candida</i> |
| CDDB | Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucléico) |
| EPI | Equipamento de proteção individual |
| et al. | E outros |
| J/cm ² | Joules por centímetro quadrado |
| LED | Diodo emissor de luz |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| MB | Do inglês, <i>Methylene Blue</i> , que em português significa, Azul de metileno |
| mg/ml | Miligrama por mililitro |
| mL | Mililitro |
| mW | Miliwatts |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NCTBIO | Núcleo de Biologia Celular e Tecidual |
| nm | Nanômetro |
| PDT | Do inglês, <i>Photodynamic Therapy</i> , que em português significa, Terapia Fotodinâmica |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| UFPEL | Universidade Federal de Pelotas |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônia |

Sumário

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Projeto de pesquisa..... | 12 |
| 1.1 | Introdução..... | 12 |
| 1.2 | Justificativa..... | 18 |
| 1.3 | Objetivos..... | 19 |
| 1.4 | Métodos e Pacientes..... | 20 |
| 1.4.1 | Aspectos Éticos..... | 20 |
| 1.4.2 | Seleção dos Pacientes..... | 20 |
| 1.4.3 | CrITÉrios de Inclusão e Exclusão..... | 20 |
| 1.4.4 | CrITÉrio Definidor de Candidíase..... | 20 |
| 1.4.5 | Instrumentos..... | 21 |
| 1.4.6 | Procedimentos..... | 22 |
| 1.4.7 | Diluições Seriadas e Preparo das Soluções para Aplicação da PDT..... | 24 |
| 1.4.8 | Zimografia..... | 27 |
| 1.4.9 | Aplicação da PDT nos Pacientes..... | 27 |
| 1.4.10 | Análise dos dados..... | 28 |
| 1.5 | Referências..... | 30 |
| 1.6 | Orçamento..... | 34 |
| 1.7 | Cronograma..... | 36 |
| 2 | Relatório de Trabalho de Campo..... | 37 |
| 3 | Artigo..... | 39 |
| 4 | Apêndice..... | 57 |
| 5 | Anexo..... | 59 |

1 Projeto de Pesquisa

1.1 Introdução

O fungo *Candida* sp., principalmente a espécie *C. albicans*, é frequentemente encontrado como componente da microbiota dos tratos digestivo e vaginal do ser humano. Dessa maneira, em muitos casos esse fungo é importante agente de infecções nessas superfícies mucosas (MARTINS et al., 2011; MIMA et al., 2010).

Na cavidade oral, a candidíase manifesta-se como uma infecção oportunista, a qual apresenta-se sob diferentes formas clínicas, sendo dividida em três variantes: pseudomembranosa, eritematosa (atrófica) e hiperplásica (agudas e crônicas). A candidíase pseudomembranosa é caracterizada pela presença de placas brancas ou amareladas, de consistência cremosa, que podem estar presentes em qualquer parte da mucosa oral e ao serem removidas revelam áreas eritematosas. Já a candidíase eritematosa é visualizada como áreas de eritema localizadas no palato e dorso de língua, mas ocasionalmente em qualquer sítio da mucosa oral. Denominando-se como queilite angular a presença de fissuras vermelhas ou brancas ou úlceras lineares situadas nas comissuras labiais. A manifestação da candidíase hiperplásica é caracterizada pela presença de placas brancas, que variam de tamanho e são comumente observadas na mucosa jugal próximo às comissuras labiais (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000; GONÇALVES et al., 2012; OKAMOTO et al., 2012).

A candidíase eritematosa (estomatite por dentadura) é um problema comum, de caráter crônico, sendo a forma mais comum de infecção oral, acometendo entre 15 e 70% dos usuários de próteses. Apesar da alta prevalência, essa manifestação é assintomática na maioria das vezes. Apenas uma minoria dos afetados manifesta sensação dolorosa, prurido ou ardência, presença de pontos hemorrágicos, além de halitose, sensação de gosto ruim

ou secura na boca. Essa alteração é diagnosticada primariamente durante o exame intraoral, como inflamação e eritema nas superfícies mucosas recobertas pela prótese (GENDREAU e LOEWY, 2011; VERGANI et al., 2012; WEBB et al., 1998;).

A estomatite por dentadura inicia a partir da adesão da *C. albicans* às células epiteliais da mucosa, seguindo-se com crescimento e invasão. Entretanto, o mecanismo envolvido na produção dos fatores de virulência desse fungo são complexos e podem variar de acordo com o local, o estágio de invasão e o tipo de resposta do hospedeiro (HAZEN, 1989; WEBB et al., 1998).

Desse modo, entre os fatores etiológicos da estomatite por dentadura estão a interação entre a *C. albicans* e as células do hospedeiro, alterações do fluxo salivar, trauma de próteses desadaptadas, pobre higiene oral e da prótese, além de resposta imune reduzida devido às condições sistêmicas. Contudo, ainda não está totalmente esclarecida a relação causa-efeito de muitos desses fatores etiológicos associados (ALTARAWNEH et al., 2012; GENDREAU e LOEWY, 2011; SALERNO et al., 2011; VERGANI et al., 2012).

Os antifúngicos são amplamente utilizados no tratamento da estomatite por dentadura, os quais dependendo da severidade da infecção podem ser administrados local ou sistemicamente. Há também necessidade de interrupção do uso da prótese durante a noite, além do emprego de agentes desinfetantes, mantendo-se o minucioso controle da higiene oral, e tornando-se muitas vezes necessário o reembasamento ou confecção de uma nova prótese em alguns casos (ANDRADE et al., 2013; SALERNO et al., 2011; VERGANI et al., 2012).

Entre os antifúngicos mais utilizados no tratamento da estomatite por dentadura estão a Nistatina, Anfotericina-B, Miconazol e Fluconazol. A Nistatina e o Miconazol são administrados por via tópica, sendo o uso parenteral da Nistatina inviabilizado devido à sua toxicidade. Já a Anfotericina-B é o medicamento de escolha para o tratamento da candidíase sistêmica, sendo administrada por via endovenosa, embora apresente efeitos colaterais imediatos como febre, calafrios e náuseas. O Fluconazol pode ser administrado por via oral ou endovenosa, mostrando-se alternativa viável, especialmente para os casos de candidíase disseminada, devido à sua eficácia e baixa

toxicidade (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000; MARINHO et al., 2006; SALERNO et al., 2011).

Praticamente todos os tratamentos antifúngicos sistêmicos utilizados garantem a remissão de sintomatologia em torno de 14 dias. A Nistatina e a Anfotericina-B causam mudanças na permeabilidade da membrana celular da *Candida* sp., penetrando na célula e finalmente levando o fungo à morte. Esses antifúngicos e o Miconazol também são capazes de inibir a adesão da *Candida* sp. às células epiteliais do hospedeiro (AZCURRA et al., 2006; MONROY et al., 2004; SALERNO et al., 2011).

Por outro lado, a ação de dissolução e limpeza da cavidade oral pela saliva contribuem para reduzir a concentração dos antifúngicos tópicos, tornando o tratamento prolongado e as taxas de recorrência altas. Ainda é importante considerar que a administração sistêmica de Anfotericina-B e Fluconazol, apesar de efetiva, não elimina os microrganismos que colonizaram a superfície da prótese. Seja de forma sistêmica ou tópica, o uso prolongado e recorrente dos antifúngicos contribui para o desenvolvimento de espécies resistentes (PEREA e PATTERSON, 2002; SHAPIRO et al., 2011).

Dessa maneira, torna-se necessário o emprego de novas possibilidades terapêuticas. Uma modalidade promissora é a denominada Terapia Fotodinâmica (do inglês *Photodynamic Therapy* PDT), a qual usa um agente fotossensibilizante e luz no comprimento de onda adequado. Ao entrar em contato com a luz, o agente fotossensibilizante na presença de oxigênio libera radicais livres e espécies reativas do oxigênio, os quais podem causar dano e morte celular (MIMA et al., 2012). Em virtude da ação desses agentes oxidantes não específicos, os microrganismos resistentes à terapia antifúngica convencional podem ser eliminados com sucesso através da PDT, sendo improvável que possam desenvolver resistência a essa terapia, uma vez que a mesma é efetiva contra as espécies orais e não causa danos às células e tecidos do hospedeiro (MIMA et al., 2010, MIMA et al., 2012; TRINDADE et al., 2012).

A PDT tem sido empregada com relativo sucesso no campo da oncologia, especialmente nos tumores de cabeça e pescoço, sendo utilizada também para erradicar bactérias, vírus e fungos, incluindo a *C. albicans* (TEICHERT et al., 2002). Os produtos formados com a aplicação da PDT

rompem a membrana citoplasmática da *C. albicans*, aumentando a permeabilidade celular, o que danifica estruturas intracelulares. Esse dano intracelular compromete os fatores de virulência do fungo, tais como a capacidade de aderência às células epiteliais do hospedeiro, e a produção de proteases, o que por sua vez colabora para redução da formação do biofilme e dos tubos germinativos (COSTA et al., 2011; DOVIGO et al., 2009; MARTINS et al., 2011, RIBEIRO et al., 2012).

Os principais fotossensibilizadores utilizados na PDT antimicrobiana são corantes fenotiazínicos, ftalocianinas e porfirinas, sendo associados com lasers e outras fontes de luz não coerente. Entre esses corantes, destacam-se o azul de toluidina e o azul de metileno (fenotiazínicos), ambos apresentando características químicas e físico-químicas semelhantes, e atuando contra os microrganismos em virtude de suas propriedades fotodinâmicas (COSTA et al., 2011; RAJESH et al., 2011).

O uso do azul de metileno (do inglês *Metilene Blue* MB) na prática médica tem sido realizado por mais de 100 anos, apresentando baixa toxicidade tecidual. A administração do MB nos seres humanos pode ser realizada por via intraoral ou endovenosa. Além disso, o MB apresenta grande absorção em comprimentos de onda maiores que 620 nm, no qual a penetração da luz nos tecidos é considerada ótima. Devido à conhecida baixa toxicidade do MB, seu emprego na prática médica é aceito em função de seu potencial antimicrobiano fotoativo, além de ser ideal na avaliação do efeito na eliminação dos fungos. O emprego desse fotossensibilizante mostrou-se capaz de reduzir as alterações epiteliais e a resposta inflamatória crônica na candidíase bucal induzida em modelo murino (COSTA et al., 2012; MARTINS et al., 2011; MIMA et al., 2010; TEICHERT et al., 2002).

A aplicação da PDT requer a exposição do fotossensibilizador a uma luz visível de baixa potência apresentando comprimento de onda específico. Há um grande número de fotossensibilizadores que são ativados com a luz vermelha, em um comprimento de onda entre 630 e 700 nm. Atualmente, o tipo de luz aplicado na PDT são os lasers Hélio-Neônio (630 nm), Diodo de Arseneto de Gálio (630-690 nm, 830 ou 906 nm) e laser de Argônio (488-514 nm). O comprimento de onda de luz visível é o azul no laser de Argônio, vermelho no laser de Hélio-Neônio e o infravermelho nos lasers diodo.

Recentemente, uma fonte de luz não laser, o diodo emissor de luz (LED), tem sido aplicado como um novo ativador na PDT. O LED é mais compacto, portátil, apresenta fácil operação, e baixo custo quando comparado com os lasers tradicionais. Além disso, existem diferentes cores de luz LED que envolvem quase todos os espectros eletromagnéticos visíveis. Assim sendo há relatos do emprego da PDT contra a *C. albicans* utilizando luz LED azul, vermelha e verde associadas com azul de metileno e azul de toluidina (COSTA et al., 2011; DOVIGO et al., 2009; JUZENIENE et al., 2004; PELOI et al., 2008; RAJESH et al., 2011; TAKASAKI et al., 2009).

Desse modo, a PDT utilizando o LED mostra-se uma alternativa viável, devido às facilidades que essa fonte de luz oferece quando comparada com a luz laser, sendo aplicada clinicamente com sucesso no tratamento de ceratoses actínicas (BABILAS et al., 2006; WIEGELL et al., 2011), além do uso *in vitro*, mostrando-se eficaz contra colônias bacterianas e fúngicas (AMORIM et al., 2012; ANDRADE et al., 2013; COSTA et al., 2011; DOVIGO et al., 2009; DOVIGO et al., 2011; PELOI et al., 2008; ROLIM et al., 2012), sem causar danos aos fibroblastos e às células humanas (REZUSTA et al., 2012; SOARES et al., 2009).

Recentemente, MIMA et al., (2011), utilizaram a PDT associada com a luz LED azul em 5 pacientes, os quais apresentavam diagnóstico clínico e microbiológico de estomatite por dentadura, com intensidade de 122 J/cm², potência de 260 mW e comprimento de onda máximo de 455 nm. Realizaram a terapia durante 20 minutos, 3 vezes por semana, durante 15 dias. Os autores constataram que a PDT foi efetiva no tratamento da estomatite por dentadura, indicando que a *C. albicans*, incluindo as cepas resistentes, mostram-se suscetíveis à terapia fotodinâmica. Dessa maneira, a PDT parece ser promissora na eliminação desse fungo, tanto em modelo murino, conforme constatado em outros trabalhos, quanto em seres humanos (DONNELLY et al., 2007; DOVIGO et al., 2009; MIMA et al., 2010; MIMA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012; TEICHERT et al., 2002).

Desse modo, considerando-se os aspectos anteriormente citados, esse estudo propõe o desenvolvimento de uma fonte de luz LED azul. Para isso será utilizado um fotopolimerizador odontológico adaptado para seguir os mesmos parâmetros do estudo de MIMA et al., 2011. A fim de aproximar essa

possibilidade de tratamento da atuação do cirurgião dentista. Levantando-se a hipótese de que há o efeito positivo da fonte de luz LED azul sobre as cepas de *Candida albicans*.

1.2 Justificativa

A candidíase oral é uma manifestação comum, de caráter crônico, que atinge grande parte dos indivíduos usuários de próteses dentárias. O tratamento tradicional com antifúngicos tópicos depende exclusivamente da colaboração do paciente, sendo muitas vezes prolongado e recorrente, colaborando para a manifestação de cepas resistentes do fungo *C. albicans*. Desse modo, torna-se necessária uma alternativa de tratamento efetiva contra a candidíase oral e que não apresente efeitos colaterais. Nesse contexto, destaca-se a PDT, devido à possibilidade de tratar a estomatite por dentadura de forma barata, rápida e sem gerar efeitos colaterais. Assim sendo, um fotopolimerizador odontológico pode ser adaptado para a aplicação dessa terapia, com o intuito de aproximar a mesma da atuação do cirurgião-dentista.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo testar, *in vivo*, a ação da PDT sobre a estomatite por dentadura empregando o azul de metileno associado à luz LED azul, comparando esses achados com o efeito dessa terapia em estudo *in vitro* sobre culturas de *Candida albicans*.

1.3.2 Objetivos específicos

a. Desenvolver um novo aparelho, a partir de um fotopolimerizador odontológico, baseado na tecnologia LED com emissão de luz azul.

b. Verificar o efeito da PDT com este novo aparelho na remissão da estomatite por dentadura nos pacientes da amostra.

c. Comparar a remissão da estomatite por dentadura entre os pacientes tratados com antifúngicos e aqueles submetidos à PDT.

d. Verificar se a PDT com azul de metileno associado à luz LED azul, exerce inativação sobre as culturas de *Candida albicans*.

e. Verificar a atividade proteolítica das metaloproteinases produzidas pelas culturas de *Candida albicans*.

1.4 Métodos e pacientes

1.4.1 Aspectos Éticos

O presente projeto será encaminhado para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas para avaliação e aprovação antes de seu desenvolvimento.

Após a aprovação pelo CEP terá início a coleta de dados para o estudo conforme mostra o cronograma (Apêndice II).

Antes do início dos exames os pacientes receberão orientações sobre o estudo e quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice III).

1.4.2 Seleção dos pacientes

Serão coletadas amostras de *Candida* sp. de pacientes adultos, portadores de candidíase oral, usuários de prótese dentária, de ambos os sexos, atendidos no Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) da Faculdade de Odontologia – UFPEL.

1.4.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Serão incluídos apenas pacientes portadores de prótese total ou parcial com diagnóstico de candidíase oral. Não serão incluídos na amostra os indivíduos sob terapia antifúngica em curso, usuários de drogas imunossupressoras ou em situação de imunossupressão, diabéticos e aqueles com sensibilidade conhecida ao azul de metileno. Somente serão selecionados os pacientes que, após esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos do estudo, assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice III)

1.4.4 Critério Definidor de Candidíase

O diagnóstico de candidíase atrófica crônica será estabelecido de acordo com os critérios de Newton (1962):

Tipo 1: Área pontual de inflamação ou hiperemia.

Tipo 2: Eritema difuso presente na superfície mucosa recoberta pela prótese.

Tipo 3: Tipo granular (hiperplasia papilar inflamatória), geralmente acomete a parte central do palato duro e do rebordo alveolar. Esse tipo geralmente é visto em associação com os tipos I e II. Comumente corresponde à resposta epitelial ao quadro de inflamação crônica causado pela presença da levedura da *C. albicans*, e possivelmente ao trauma de baixo grau resultante da presença da prótese.

A estomatite por dentadura associada com queilite angular ou a glossite romboidal mediana indicam a expansão da infecção da superfície mucosa recoberta pela prótese para o ângulo da boca e língua, respectivamente.

1.4.5 Instrumentos

1.4.5.1 LED

Será utilizado um aparelho fotopolimerizador LED modificado com intensidade de 122 J/cm², potência de 260 mW e comprimento de onda máximo de 455 nm.

1.4.5.2 Cálculo da Dosimetria

Será utilizado o protocolo clínico de PDT com luz LED azul publicado por MIMA et al., (2011).

1.4.5.3 Normas de Segurança

Em todas as etapas do estudo, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, serão utilizados Equipamentos de Proteção Individual (EPI), sendo obedecidos os

princípios de bissegurança. Operador e pacientes utilizarão os respectivos óculos de proteção no momento da aplicação da PDT.

1.4.5.4 Fotossensibilizador

Será utilizado o corante azul de metileno (Sigma, St Louis, MO), preparado como solução de estoque na concentração de 200 mg/mL em pH 7. O corante será acondicionado em recipiente de cor âmbar, mantido sob proteção da luz e acondicionado em geladeira à temperatura de 4°C a 8°C. Para aplicação do tratamento, o corante será utilizado na concentração de 100 µg/mL (MARINHO, 2006).

1.4.6 Procedimentos

1.4.6.1 Coleta de dados

Serão anotados os dados pessoais dos pacientes, idade, sexo e informações referentes ao tipo, localização e extensão da lesão.

O presente estudo será desenvolvido no Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB), Laboratório de Microbiologia e Núcleo de Biologia Celular e Tecidual (NCTBIO II) da Faculdade de Odontologia – UFPEL.

1.4.6.2 Coleta de Material da Mucosa Oral

Os pacientes serão submetidos à coleta de material da mucosa oral por meio de swabs (Newprov, Pinhais, PR) estéreis e secos, os quais serão suavemente friccionados na mucosa afetada por candidíase.

1.4.6.3 Cultivo de *Candida sp.*

O material coletado da mucosa oral será cultivado em placa de Petri contendo meio de cultura agar Sabouraud 4% dextrose (Merck, Damstadt, Alemanha) com cloranfenicol (16 mg/mL, Neo Química, Anápolis, GO) e incubado a 30°C por 48 horas.

Três colônias de coloração creme e de consistência mole, sugestivas de *Candida* sp., serão inoculadas em caldo YPD (Yeast Peptone Dextrose, extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, Sigma, St Louis, EUA) e mantidas em estufa a 30°C por 48 horas. Ao término deste período, uma alíquota de 1,5 mL de cada cultivo de *Candida* sp. será adicionada a 0,5 mL de glicerol, acondicionada em microtubos estéreis e congelada a -20°C para posterior identificação.

1.4.6.4 Identificação da *Candida* sp.

A identificação da *C. albicans* por meio dos testes fenotípicos, será confirmada através da reação em cadeia da polimerase PCR (Polymerase Chain Reaction).

1.4.6.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) será realizada conforme a sequência a seguir.

1.4.6.6 Extração do DNA

Após o descongelamento das amostras, as mesmas serão cultivadas em caldo YPD a 30°C por 48 horas, e, posteriormente, cultivadas em agar Sabouraud dextrose a 30°C por 48 horas.

Para extração do DNA da *Candida* sp., será colhida uma colônia do cultivo em agar Sabouraud dextrose, a qual serão adicionados a 20 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) e homogeneizada. O material será aquecido por 10 minutos em banho-maria a 100°C. Após esse período, o mesmo será aquecido em forno de microondas ajustado para uma potência alta por 2 minutos. Serão utilizados como controles positivo e negativo, as cepas de referência *C. albicans* ATCC 28367 e *C. dubliniensis* CBS 7987, respectivamente.

1.4.7 Reação de PCR

Após a extração do DNA, a reação de PCR será realizada em um aparelho de termociclagem convencional (Mastercycler Family – Eppendorf Brasil). Para a reação de PCR, uma mistura com volume total de 25µl, contendo 1,5µl do DNA extraído; 5,0µl de Reaction Buffer; 1,0µl de Forward primer; 1,0µl Reverse primer; 0,5µl de dNTP's; 1,5µl de MgCl₂; 0,15µl de Taq Polymerase; e, 14,35µl de água RNase e DNase *Free*.

Os protocolos de temperatura que serão seguidos são determinados pelas características dos primers empregados, e seguem quatro estágios:

- a) Estágio 1: 95°C por 2 minutos.
- b) Estágio 2, que compreende 45 ciclos de:
 - Passo 1: 94°C por 30 segundos;
 - Passo 2: Segundo a tabela 1

Tabela 1: Temperaturas de anelamento de cada *primer* utilizado.

| Espécie | Temperatura (°C) | Tempo (min) |
|-------------------------|------------------|-------------|
| <i>C. albicans</i> | 55 °C | 45 segundos |
| <i>C. parapsilosis</i> | 55 °C | 45 segundos |
| <i>C. guillermondii</i> | 55 °C | 1 minuto |
| <i>C. lipolytica</i> | 55 °C | 1 minuto |
| <i>C. glabrata</i> | 55 °C | 1 minuto |
| <i>C. famata</i> | 55 °C | 1 minuto |

- Passo 3: 72°C por 2 minutos.
- c) Estágio 3: 72°C por 10 minutos.
- d) Estágio 4: manter a 4°C

Os *Primers* específicos utilizados para a identificação das espécies fúngicas pelo método de PCR estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: *Primers* utilizados para a identificação de espécies fúngicas específicas, conferidos pelo BLAST.

| Espécie | Seqüência | Tamanho | Referência |
|-------------------------|--|---------|------------------------------|
| <i>C. albicans</i> | 5'- GGG TTT GCT TGA AAG ACG GTA -3' 5'- TTG AAG ATA TAC GTG GTG GAC GTT A -3' | 107pb | Guiver <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>C. parapsilosis</i> | 5'- GGG TTT GGT GTT GAG CGA TAC -3' 5'- GGA GTT TGT ACC AAT GAG TGG AAA -3' | 93pb | Guiver <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>C. guillermondii</i> | 5'-CCCAAATCACAAAGCTCAAGT-3' 5'-TACGACTTGAAGTTGCGAATTG-3' | 202pb | Liguori <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>C. lipolytica</i> | 5'-AAGACGGCAAGATTTACACCCAGA-3' 5'-CGTGGGTGGTACCGGCAATGTG-3' | 200pb | Liguori <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>C. glabrata</i> | 5'- TTT CTC CTG CCT GCG CTT AA -3' 5'- ACG CAC ACT CCC AGG TCT TT -3' | 83pb | Guiver <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>C. famata</i> | 5'-GTAGGTAGTCATATGCTTGTCTC-3' 5'-GCTGCGTTCTTCATC GATGC-3' | 230pb | Liguori <i>et al.</i> , 2009 |

4.7 Diluições Seriadas e Preparo das Soluções para Aplicação da PDT

Após o descongelamento, serão inoculados 10 µL de cada uma das amostras selecionadas das culturas de *Candida sp.*, em caldo YPD e incubados a 30°C por 48 horas. Após esse período, 1 mL do caldo será transferido para 9 mL de solução salina estéril NaCl 0,85%. Serão realizadas diluições seriadas 1:10 em 4 alíquotas sucessivas e colhidas 2 alíquotas de 100 µL da última diluição (10^{-4}), que serão semeadas em placas de Petri de 9 cm contendo agar Sabouraud dextrose e incubadas a 30°C por 48 horas. Para o cálculo das UFCs, serão selecionadas placas que contenham de 30 a 300 colônias.

Alíquotas de 100 µL da diluição 10^{-4} serão utilizadas para aplicação dos tratamentos. Essas serão transferidas para microtubos de 3 mL. Nos microtubos teste serão adicionados 90 µL de PBS e 10 µL de azul de metileno, com incubação de 5 minutos. Nos microtubos-controle serão adicionados 100 µL de PBS. Dos microtubos, as soluções serão transferidas para placas de 96 poços de cultura, com 8 mm de diâmetro cada poço, em que serão aplicados

os tratamentos. O grupo-controle também será transferido do microtubo para o poço da placa e, desse, para um novo microtubo estéril (MARINHO et al., 2006).

1.4.7.1 Aplicação da PDT nas Culturas de *Candida sp.*

As amostras das colônias de *Candida sp.* em solução salina serão distribuídas, em duplicata, nas placas de cultura, como descrito a seguir:

a) Grupo-teste:

Placas de 96 poços de cultura de *Candida sp.* contendo, cada poço, 100 μL da diluição 10^{-4} de *Candida sp.*, 90 μL de PBS e 10 μL de azul de metileno, com concentração final de azul de metileno de 100 $\mu\text{g/mL}$. O azul de metileno será incubado por 5 minutos e, após esse período, será realizada irradiação com LED por 6 minutos, na dosimetria de 122 J/cm^2 , em aplicação única, com a ponteira tocando a tampa da placa de cultura posicionada perpendicularmente a esta e na parte central do poço.

b) Grupo-controle:

Placas de 96 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 μL da diluição 10^{-4} de *Candida sp.* e 100 μL de PBS, em que não será aplicado nenhum tratamento, serão manipuladas e avaliadas, cada uma dessas, simultaneamente a um dos grupos-teste.

A manipulação dos grupos será realizada na ausência de luz direta, e as culturas serão protegidas por uma caixa plástica fosca no intuito de evitar-se ação da luz ambiente durante os tratamentos. Será empregado um dispositivo para manutenção do LED sempre na mesma posição em todas as aplicações.

1.4.7.2 Quantificação da Inativação Fotodinâmica da *Candida sp.*

Imediatamente após os tratamentos, as soluções serão transferidas para microtubos estéreis para remoção do corante. Este será removido com PBS em 3 lavagens sucessivas, por meio de centrifugação durante 3 minutos a 21°C e 8500g.

A cada lavagem, serão retirados 150 μL , sendo repostos este volume com PBS. Após a centrifugação, alíquotas de 100 μL de cada microtubo serão

semeadas em placa de Petri de 9 cm contendo agar Sabouraud dextrose e incubadas a 30°C por 48 horas. Após este período, será efetuada a contagem das UFCs.

1.4.8 Zimografia

A atividade proteolítica da *C. albicans* será examinada por zimografia com substrato gelatina, para as gelatinases, e colágeno, para as collagenases, adicionado ao gel de poliacrilamida a 10%. Para isso, após o descongelamento, 10 µL de cada uma das amostras selecionadas das culturas serão misturados ao tampão de amostra (2% SDS; 125mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) e então a eletroforese será realizada. Após a eletroforese, o gel será lavado duas vezes em Triton X-100 (2%) por 60 minutos à temperatura ambiente e então incubado a 37°C por 24h em tampão 50mM Tris-HCl pH 7,4, contendo 5mM CaCl₂ (Tris-CaCl₂). Após a incubação, os géis serão corados com Azul de Coomassie G-250 a 0,05% (Bio Rad, Richmond, CA). A atividade gelatinolítica será detectada como bandas não coradas no gel e será quantificada por densitometria.

1.4.9 Aplicação da PDT nos pacientes

Os participantes do estudo serão pacientes adultos portadores de candidíase oral, de ambos os sexos, usuários de prótese dentária, atendidos no Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDB) da Faculdade de Odontologia – UFPEL.

Os pacientes serão classificados e acompanhados em relação à candidíase oral de acordo com os critérios elaborados por Newton.

1.4.9.1 Grupo-teste

Será utilizado o corante azul de metileno (Sigma, St Louis, MO), preparado como solução de estoque na concentração de 200 mg/mL em pH 7, para aplicação nos pacientes. O corante será acondicionado em recipiente de cor âmbar, mantido sob proteção da luz e acondicionado em geladeira à

temperatura de 4°C a 8°C. Para aplicação do tratamento, o corante será utilizado na concentração de 100 µg/mL.

O dispositivo utilizado será um aparelho fotopolimerizador LED modificado com intensidade de 122 J/cm², potência de 260 mW e comprimento de onda máximo de 455 nm.

Para aplicação da PDT, cada paciente será orientado a escovar suas próteses após cada refeição e antes de dormir, bem como evitar o uso das mesmas durante as horas de sono, deixando-as imersas em água potável nesse período.

Durante os 15 dias de duração do tratamento e período de preservação (30 e 45 dias), os pacientes serão aconselhados a seguir essas recomendações.

O fotossensibilizador será aplicado com o auxílio de um spray na mucosa do palato duro dos pacientes, para a irradiação da cavidade bucal, o dispositivo será manuseado pelo operador e a terapia será realizada durante 20 minutos (3 vezes por semana, totalizando 6 sessões, em cada paciente (MIMA et al., 2011).

Para aplicação da terapia serão respeitados os princípios de biossegurança, e tanto paciente quanto operador usarão os respectivos óculos de proteção.

1.4.9.2 Grupo-controle:

Cada paciente será orientado a escovar suas próteses após cada refeição e antes de ir dormir, bem como evitar o uso das mesmas durante as horas de sono, deixando-as imersas em água potável nesse período.

Esses pacientes receberão o tratamento convencional com Nistatina creme e serão examinados após 15, 30 e 45 dias. Recebendo alta do tratamento assim que houver a remissão da candidíase.

1.4.10 Análise dos Dados

Para avaliar a distribuição da amostra, será realizada análise descritiva estimando-se as frequências relativas e absolutas. Posteriormente, serão

realizados os testes t de Student para amostras pareadas e análise de variância complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerado nível de significância de 5%.

1.5 REFERÊNCIAS

ALTARAWNEH, S.; BENCHARIT, S.; MENDOZA, L.; CURRAN, A.; BARROW, D.; BARROS, S.; PREISSER, J.; LOEWY, Z. G.; GENDREAU, L.; OFFENBACHER, S. Clinical and Histological Findings of Denture Stomatitis as Related to Intraoral Colonization Patterns of *Candida albicans*, Salivary Flow, and Dry Mouth. **Journal of Prosthodontics**, v.1, n.1, p.1-10, 2012.

AMORIM, J.C.F.; ALVES, O.A.; SOUSA, G.R.; PIANCASTELLI, A.C.C.; SOARES, B.M.; FERREIRA, M.V.L.; SILVEIRA, L.B.; PINOTTI, M. Phototoxic action of light emitting diode in the *in vitro* viability of *trichophyton rubrum*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.87, n.2, p.250-255, 2012.

ANDRADE, M.C.; RIBEIRO, A.P.D.; DOVIGO, L.N.; BRUNETTI, I.G.; GIAMPAOLO, E.T.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Effect os different pré-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of candida spp. **Archives of Oral Biology**, v.1, n.58, p.200-210, 2013.

AZCURRA, A.I.; BAREMBAUM, S.R.; BOJANICH, M.A.; CALAMARI, S.E.; AGUILAR, J.; BATTELLINO, L.J.; DORRONSORO, S.T. Effect of the high molecular weight chitosan and sodium alginate on *Candida albicans* hydrophobicity and adhesion to cells. **Oral Medicine and Pathology**, v.11, n.1, p.120-125, 2006.

BABILAS, P.; KOHL, E.; MAISCH, H.; BÄCKER, B.; GROB, A.L.; BRANZAN, W.; BÄUMLER, LANDTHALER, M.; KARRER, S.; SZEIMIES, R-M. In vitro and *in vivo* comparison of two different light sources. **British Journal of Dermatology**, n.154, p.712-718, 2006.

COSTA, A.C.B.P.; RASTEIRO, V.M.C.; PEREIRA, C.A.; HASHIMOTO, E.S.H.S.; JUNIOR, M.B.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, O.A.C. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n.1, p.1299-1305, 2011.

COSTA, A.C.B.P.; RASTEIRO, V.M.C.; HASHIMOTO, E.S.H.S.; ARAÚJO, C.F.; PEREIRA, C.A.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.114, n.1, p.67-74, 2012.

DONNELLY, R.F.; McCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M.; WOOLFSON, A.D. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.86, n.1, p.59-69, 2007.

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, N.C.; MIMA, E.G.O.; GIAMPAOLO, E.T.; VERGANI, C.E.; BAGNATO, V.S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 54, n.1, p.123-130, 2009.

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, A.P.; BRUNETTI, I.L.; COSTA, C.A.S.; JACOMASSI, D.P.; BAGNATO, V.S.; KURACHI, C. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, n.87, p.895-903, 2011.

ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral Candidal Infections and Antimycotics. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.11, n.2, p.172-198, 2000.

GENDREAU, L.; LOEWY, G. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. **Journal of Prosthodontics**, v.20, n.1, p.251-260, 2011.

GONÇALVES, L.S.; JÚNIOR, A.S.; FERREIRA, S.M.S.; SOUSA, C.O.; FONTES, T.V.; VETTORE, M.V.; TORRES, S.R. Factors associated with specific clinical forms of oral candidiasis in HIV-infected Brazilian adults. **Archives of Oral Biology**, v.1, n.1, p.1-7, 2012.

HAZEN, K.C. Participation of Yeast Cell Surface Hydrophobicity in Adherence of *Candida albicans* to Human Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 57, n.7, p.1894-1900, 1989.

ISSA, M.A.C.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.5, n.4, p.501-511, 2010.

JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; MA, LI-WEI.; IANI, V.; MOAN, JOHAN. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v.19, n.1, p.139-149, 2004.

MARINHO, S.A. **Efeito da Terapia Fotodinâmica (PDT) Sobre Culturas de *Candida sp.* e de Células Epiteliais: Estudo *in vitro***. Porto Alegre, 2006. (Tese de Doutorado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.

MARTINS, J.S.; JUNQUEIRA, J.C.; FARIA, R.L.; SANTIAGO, N.F.; ROSSONI, R.D.; COLOMBO, C.E.D.; JORGE, O.A.C. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.111, n.1, p.71-77, 2011.

MIMA, E.G.O.; PAVARINA, A.C.; DOVIGO, L.N.; VERGANI, C.E.; COSTA, C.A.S.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.109, n.3, p.392-401, 2010.

MIMA, E.G.O.; PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, D.G.; DOVIGO, L.N.; VERGANI, C.E.; BAGNATO, V.S. Effectiveness of Photodynamic Therapy for the Inactivation of *Candida* spp. on Dentures: In Vitro Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.29, n.12, p.827-833, 2011.

MIMA, E.G.O.; PAVARINA, A.C.; SILVA, M.M.; RIBEIRO, D.G.; VERGANI, C.E.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Denture stomatitis treated with photodynamic therapy: five cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.112, n.5, p.602-608, 2011.

MIMA, E.G.; VERGANI, C.E.; MASSUCATO, E.M.S.; COLOMBO, A.L.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, n.10, p.380-388, 2012.

MONROY, T.B.; MALDONADO, V.M.; MARTINEZ, F.F.; BARRIOS, B.A.; QUINDÓS, G.; VARGAS, L.O.S. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Oral Medicine and Pathology**, v.10, n.1, p.27-39, 2005.

OKAMOTO, M.R.; KAMOI, M.; YAMACHIKA, S.; TSURUMOTO, A.; IMAMURA, T.; YAMAMOTO, K.; KADOMATSU, S.; SAITO, I.; MAEDA, N.; NAKAGAWA, Y. Efficacy of Fungiflora Y staining for the diagnosis of oral erythematous candidiasis. **Gerodontology**, v.1, n.1, p.1-6, 2012.

PELOI, L.S.; SOARES, R.R.S.; BIONDO, C.E.G.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Biosciences**, v.33, n.2, p.231-237, 2008.

PEREA, S.; PATTERSON, T.F. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v.35, n.1, p.1073-80, 2002.

RAJESH, E.K.S.; KOSHI, P.; MOHAN, A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. **Journal Indian Society Periodontology**, v.15, n.4, p.323-327, 2011.

REZUSTA, A.; LÓPEZ-CHICÓN, P.; PAZ-CRISTOBAL, M.; ALEMANY-RIBES, M.; ROYO-DÍEZ, D.; AGUT, M.; SEMINO, C.; NONELLI, S.; REVILLO, M.J.; ASPIROZ, C.; GILABERTE, Y. In Vitro Fungal photodynamic Effect of Hypericin on *Candida* Species. **Photochemistry and Photobiology**, n.88, p.613-619, 2012.

RIBEIRO, D.G.; PAVARINA, A.C.; DOVIGO, L.N.; MIMA, E.G.O.; MACHADO, A.L.; BAGNATO, V.S.; VERGANI, C.E. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. **Lasers in Medical Science**, v.27, n.1, p.161-168, 2012.

ROLIM, J.P.M.L.; DE-MELO, M.A.S.; GUEDES, S.F.; ALBUQUERQUE-FILHO, F.B.; SOUZA, J.R.; NOGUEIRA, N.A.P.; ZANIN, I.C.J, RODRIGUES, L.K.A. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.1, n.106, p.40-46, 2012.

SALERNO, C.; PASCALE, M.; CONTALDO, M.; ESPOSITO, V.; BUSCIOLANO, M.; MILILLO, L.; GUIDA, A.; PETRUZZI, M.; SERPICO, R. Candida-associated denture stomatitis. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.16, n.2, p.139-143, 2011.

SHAPIRO, R.S.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.75, n.2, p.213-267, 2011.

SOARES, B.M.; SILVA, D.L.; SOUSA, G.R.; AMORIM, J.C.F.; RESENDE, M.A.; PINOTTI, M.; CISALPINO, P.S. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. Growth and adhesion to buccal epithelial cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.1, n.94, p.65-70, 2009.

TAKASAKI, A.A.; AOKI, A.; MIZUTANI, K.; SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; WANG, C-Y.; KOSHI, G.; ROMANOS, G.; ISHIKAWA, I.; IZUMI, Y. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. **Periodontology 2000**, v.51, n.1, p.109-140, 2009.

TEICHERT, M.C.; JONES, J.W.; USACHEVA, M.N.; BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 93, n.2, p.155-160, 2002.

TRINDADE, F.Z.; PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, A.P.; BAGNATO, V.S.; VERGANI, C.E. Toxicity of photodynamic therapy with LED associated to Photogem_: an in vivo study. **Lasers in Medical Science**, v.27, n.1, p.403-411, 2012.

WEBB, B.C.; THOMAS, C.J.; WILLCOX, M.D.P.; HARTY, D.W.S.; KNOX, K.W. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by candida species. **Australian Dental Journal**, v.43, n.3, p.160-166, 1998.

WIEGELL, S.R.; HEYDENREICH, J.; FABRICIUS, S.; WULF, H.C. Continuous ultra-low-intensity artificial daylight is not as effective as red LED light in photodynamic therapy of multiple actinic keratoses. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, n.27, p.280-285, 2011.

1.6 Orçamento

Quadro 1. Orçamento previsto para viabilização do projeto.

| Descrição | Quantidade | Custo (unidade) | Custo (total) |
|---------------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| Máscaras descartáveis | 2 cx. | R\$ 6,00 | R\$ 12,00 |
| Toucas descartáveis | 1 pct. | R\$ 10,00 | R\$ 10,00 |
| Luvas para procedimento | 2 cx. | R\$ 21,00 | R\$ 42,00 |
| Papel filme 300 m. | 1 un. | R\$ 18,00 | R\$ 18,00 |
| Luvas plásticas | 2 pct. | R\$ 4,00 | R\$ 8,00 |
| Azul de Metileno | 3 un. | R\$ 31,00 | R\$ 124,00 |
| Ponteiras amarelas | 2 cx. | R\$ 34,25 | R\$ 68,50 |
| Ponteiras Azuis | 1 cx. | R\$ 13,85 | R\$ 13,85 |
| Eppendorf | 1 pct. | R\$ 100,00 | R\$ 100,00 |
| Tubos de ensaio | 10 | R\$ 9,00 | R\$ 9,00 |
| Pipetador automático | 1 | R\$ 209,00 | R\$ 209,00 |
| Filtro Milipore | 1 cx. | R\$ 230,00 | R\$ 230,00 |
| Alça de platina | 15 | R\$ 10,50 | R\$ 157,50 |
| Micropipeta de 100-1000µL | 1 | R\$ 350,00 | R\$ 350,00 |
| Micropipeta de 1-20µL | 1 | R\$ 350,00 | R\$ 350,00 |
| Frasco alemão | 10 | R\$ 10,00 | R\$ 100,00 |
| Erlenmeyer graduado | 5 | R\$ 23,00 | R\$ 115,00 |
| Béquer graduado | 5 | R\$ 9,90 | R\$ 49,90 |
| Swabs | 1 cx. | R\$ 35,95 | R\$ 35,95 |
| Agar Sabouraud Dextrose | 1 | R\$ 257,00 | R\$ 257,00 |
| Alcool Etilico 70% | 5 | R\$ 4,29 | R\$ 21,45 |
| Azul de Trypan | 1 | R\$ 85,00 | R\$ 85,00 |
| Agar Egg Youlk | 5 | R\$ 47,30 | R\$ 236,50 |
| RPMI | 1 | R\$ 240,00 | R\$ 240,00 |
| Solucao Salina (NaCl) | 5 | R\$ 1,95 | R\$ 9,75 |
| MOPS | 1 | R\$ 277,10 | R\$ 277,10 |
| Filtro 22mm | 1 | R\$ 233,20 | R\$ 233,20 |
| Placas Petri 60X15 | 100 | R\$ 27,00 | R\$ 135,00 |

| | | | |
|--------------------------------------|-----|---------------|--------------------|
| Placas Petri 90X15 | 100 | R\$ 3,92 | R\$ 39,20 |
| Placas de Microtitulacao 96 pocos | 100 | R\$ 169,40 | R\$ 338,80 |
| Placas de Microtitulacao 24 pocos | 50 | R\$ 4,32 | R\$ 216,00 |
| Placas Petri 100X15 | 50 | R\$ 2,47 | R\$ 123,50 |
| Placas Petri 150X20 | 50 | R\$ 4,95 | R\$ 247,50 |
| | | Total: | R\$ 4346,05 |

2. Relatório de trabalho de campo

O projeto inicialmente submetido à qualificação junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia consistiu no trabalho intitulado: “Avaliação dos efeitos da Terapia Fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida sp.* e na Candidíase Oral.

Foram aceitas as sugestões da banca de qualificação do projeto e as modificações foram realizadas.

Neste capítulo estão relatadas as complementações e alterações baseadas no Projeto de Pesquisa aprovado no exame de qualificação.

Os problemas enfrentados durante a execução do projeto completo foram decorrentes do atraso na aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia FO/UFPel. Esse projeto foi submetido ao CEP no mês de setembro de 2013. Visto que esse estudo apresenta o desenvolvimento de um novo dispositivo, em novembro de 2013 o CEP recomendou a divisão do projeto em dois estudos: *in vitro* e *in vivo*, a fim de que o estudo *in vivo* fosse enviado ao CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) para avaliação. A divisão do projeto foi realizada em dezembro de 2013. No entanto, em maio de 2014 o projeto *in vivo* ainda não tinha sido enviado ao CONEP, desse modo o mesmo foi retirado do CEP a fim de que talvez em um momento futuro essa submissão possa ser realizada. Enquanto que, a aprovação do estudo *in vitro*, somente aconteceu no mês de junho de 2014, sob o parecer nº 17/2014 (ANEXO 1).

Uma vez que a aprovação do CEP ocorreu 09 meses após a submissão do projeto, e conseqüentemente, temos prazo para a finalização do trabalho para não incorrer em prejuízo maior ao aluno e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, fomos obrigados a optar pela redução da pesquisa.

Para isso foram realizadas várias alterações referentes à metodologia: Foi executado o estudo *in vitro* no qual foi desenvolvido um novo aparelho, a partir de um fotopolimerizador odontológico, baseado na tecnologia LED com emissão de luz azul. Verificando-se a ação da PDT com azul de metileno

associada ao uso desse dispositivo sobre culturas de *Candida albicans*. Assim sendo, não foi realizada a análise da atividade proteolítica das metaloproteinases produzidas pelas culturas de desse fungo e nem a parte de biologia molecular, a fim de que fosse respeitado o prazo para execução da pesquisa.

No presente estudo, foi utilizada a metodologia de coleta de material junto aos pacientes portadores de candidíase atrófica crônica diagnosticados clinicamente nos atendimentos do CDDB. Para avaliação laboratorial, realizou-se o cultivo das amostras e avaliações no Laboratório de Microbiologia da FO/UFPel.

Para essa execução o orçamento foi de R\$ 1.424,58, valor pago através do projeto PNPd, sob responsabilidade da Prof^a Dr^a. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio.

3 Artigo

Aplicação de Terapia Fotodinâmica (PDT) usando luz LED azul sobre culturas de *Candida albicans* - *in vitro*

Felipe Brunatto da Luz¹; Simone Gomes Dias de Oliveira² Rafael Guerra Lund³; Fábio Renato Manzolli Leite³; Ana Paula Neutzling Gomes³; Adriana Etges³

1 - Pós-Graduando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas/RS.

2 - Pós-Graduanda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas/RS.

3 - Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas/RS.

Autor Correspondente:

Prof^a Dr^a Adriana Etges
Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca - CDDB
Faculdade de Odontologia - FO
Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Rua Gonçalves Chaves, 457/607
Cep 96015-560
Centro – Pelotas
Rio Grande do Sul
Brasil

Resumo

O objetivo desse estudo foi desenvolver um novo dispositivo a partir de um fotopolimerizador odontológico, baseado na tecnologia LED com emissão de luz azul, bem como verificar a ação da PDT com azul de metileno associada ao uso dessa fonte sobre culturas de *Candida albicans*. Foram coletadas amostras de 05 pacientes adultos, usuários de próteses totais, com diagnóstico clínico de candidíase atrófica crônica. Após o crescimento das colônias as mesmas foram congeladas e identificadas. Foram selecionadas 04 cepas de *Candida albicans* e 01 cepa ATCC (62342) e realizadas diluições obedecendo-se a escala 0,5 de Macfarland (1×10^8 UFC). Desse inóculo, foram colocados 100 μ l em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. As amostras das colônias de *Candida albicans* foram distribuídas em triplicata nas placas de cultura. No grupo testado foram colocados 90 μ l de PBS, adicionado a 10 μ l de azul de metileno. As placas foram incubadas durante 30 minutos e, após esse período, foi realizada a irradiação com LED azul. Para realizar a PDT a placa foi dividida em 6 setores de dimensões iguais. Cada setor foi irradiado durante 6 minutos na dosimetria de 122 J/cm^2 , potência de 260 mW e comprimento de onda de 455 nm em aplicação única, totalizando 36 minutos de aplicação em cada placa. Após esse desafio, foram realizadas diluições seriadas 1:10 em 4 alíquotas sucessivas. Dessa diluição foram semeados 25 μ l em placas de Petri e incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período foram feitas as contagens das colônias por dois examinadores previamente treinados e calibrados. Os resultados foram analisados estatisticamente usando ANOVA seguido por teste de Tukey com 5% de nível de significância e não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes grupos e o grupo controle. Constatando-se que a PDT usando fonte de luz LED é uma alternativa viável, no entanto no presente estudo não foi possível constatar a ação dessa terapia.

Introdução

O fungo *Candida sp.*, principalmente a espécie *C. albicans*, é componente da microbiota dos tratos digestivo e vaginal do ser humano. Cerca de 60% de todos os indivíduos imunocompetentes podem apresentar esse fungo como integrante da região orofaríngea. Dessa maneira, em muitos casos o mesmo é importante agente de infecções nessas superfícies mucosas (MARTINS et al., 2011; MIMA et al., 2010; MUZYCA & EPIFANIO, 2013). Na boca, a candidíase atrófica crônica (estomatite por dentadura) é uma infecção oportunista comum, de caráter crônico, acometendo entre 15 e 70% dos usuários de próteses (GENDREAU e LOEWY, 2011). Entre os fatores etiológicos dessa manifestação estão alterações do fluxo salivar, trauma de próteses desadaptadas, higiene pobre, resposta imune reduzida devido às condições sistêmicas, além do uso de medicações (ALTARAWNEH et al., 2012; MUZYCA & EPIFANIO, 2013; SALERNO et al., 2011). No entanto uma minoria dos afetados manifesta sensação dolorosa, prurido ou ardência, presença de pontos hemorrágicos, além de halitose, sensação de gosto ruim ou secura na boca (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000; MIMA et al., 2012; WEBB et al., 1998).

Os antifúngicos são amplamente utilizados no tratamento da estomatite por dentadura, destacando-se medicamentos tópicos como o Micostatin e o Nitrato de Miconazol que atuam causando mudanças na permeabilidade da membrana celular da *Candida sp.*, contribuindo para levar o fungo à morte, além de inibirem a adesão do mesmo às células epiteliais do hospedeiro (AZCURRA et al., 2006; MIMA et al., 2012; MONROY et al., 2005; SALERNO et al., 2011). Por outro lado, a ação de dissolução e limpeza da boca pela saliva contribuem para reduzir a concentração dos antifúngicos tópicos, tornando o tratamento prolongado e as taxas de recorrência altas, favorecendo o aparecimento de espécies resistentes (PEREA e PATTERSON, 2002; SHAPIRO et al., 2011).

Dessa maneira, torna-se necessário o emprego de novas possibilidades terapêuticas. Uma modalidade promissora é a Terapia Fotodinâmica (do inglês *Photodynamic Therapy* - PDT), a qual usa um agente fotossensibilizante excitado por um comprimento de onda de luz específico. Essa interação na presença de oxigênio libera radicais livres e espécies reativas do oxigênio que rompem a membrana plasmática e aumentam a permeabilidade celular (ANDRADE et al., 2013; MIMA et al., 2012; RKEIN & OZOG, 2014). O dano intracelular compromete os fatores de virulência do fungo, tais como a capacidade de aderência às células epiteliais do hospedeiro, e a produção de proteases, o que por sua vez colabora para redução da formação do biofilme e dos tubos germinativos, sem causar danos às células e tecidos do hospedeiro (COSTA et al., 2011; DOVIGO et al., 2009; MARTINS et al., 2011, MIMA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012). Entre os agentes fotossensibilizantes utilizados, estão o azul de toluidina e o azul de metileno (fenotiazínicos) (COSTA et al., 2011; RAJESH et al., 2011). O emprego do azul de metileno destaca-se devido à baixa toxicidade e em função de seu potencial antimicrobiano fotoativo, além de ser ideal na avaliação do efeito na eliminação dos fungos. O uso desse fotossensibilizante mostrou-se capaz de reduzir as alterações epiteliais e a resposta inflamatória crônica na candidíase bucal induzida em modelo murino (COSTA et al., 2012; MARTINS et al., 2011; MIMA et al., 2010; TEICHERT et al., 2002).

O diodo emissor de luz (LED) tem sido aplicado como um novo ativador na PDT. O LED é mais compacto, portátil, apresenta fácil operação, amplo espectro eletromagnético visível, e baixo custo quando comparado com os lasers tradicionais. Sendo que há relatos do emprego da PDT contra a *C. albicans* utilizando luz LED azul, vermelha e verde associadas com azul de metileno e azul de toluidina (COSTA et al., 2011; DOVIGO et al., 2009; JUZENIENE et al., 2004; PELOI et al., 2008; RAJESH et al., 2011; TAKASAKI et al., 2009).

Desse modo, considerando-se os aspectos anteriormente citados, esse estudo propõe o desenvolvimento de uma fonte de luz LED azul para a realização de PDT *in vitro* com azul de metileno. Para isso foi utilizado um fotopolimerizador odontológico, a fim de aproximar essa possibilidade de tratamento da atuação do cirurgião dentista. Levantando-se a hipótese de que

há o efeito positivo da fonte de luz LED azul sobre as cepas de *Candida albicans*.

Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), sob o Parecer nº 17/2014 (ANEXO).

Foram coletadas amostras de *Candida sp.* de 05 pacientes adultos, com diagnóstico clínico de candidíase atrófica crônica, usuários de prótese dentária, de ambos os sexos, atendidos no Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) da Faculdade de Odontologia – UFPel. Não foi realizada a coleta do fungo em indivíduos sob terapia antifúngica em curso, usuários de drogas imunossupressoras, diabéticos ou em situação de imunossupressão. Foram seguidos os critérios de Newton (1962) para classificação da candidíase atrófica crônica: tipo 1: área pontual de inflamação ou hiperemia; tipo 2: eritema difuso presente na superfície mucosa recoberta pela prótese; tipo 3: hiperplasia papilar inflamatória, geralmente acomete a parte central do palato duro e do rebordo alveolar. Geralmente é visto em associação com os tipos I e II.

Os pacientes selecionados foram submetidos à coleta de material da mucosa oral por meio de swabs (Newprov, Pinhais, PR) estéreis e secos, os quais foram suavemente friccionados na mucosa afetada por candidíase (Lund et al., 2009).

Após a coleta o material foi cultivado em placa de Petri contendo meio de cultura agar Sabouraud 4% dextrose (Merck, Damstadt, Alemanha) com cloranfenicol (16 mg/mL, Neo Química, Anápolis, GO) e incubado a 37°C por 48 horas. Após esse período e a constatação do crescimento de colônias de coloração creme e de consistência mole, sugestivas de *Candida sp.*, as mesmas foram congeladas para posterior identificação. Essas foram identificadas através do VITEK 2 Compact (Biomérieux, Portugal).

Com a identificação executada, foram selecionadas quatro cepas de *Candida albicans* e uma ATCC (62342) para o teste de sensibilidade dessas frente à terapia fotodinâmica proposta. Para isso, 24 horas antes do desafio as

cepas foram repicadas em meio agar Sabouraud dextrose 4% e incubadas a 37°C . O inóculo foi preparado dissolvendo-se uma alíquota do microrganismo em meio BHI caldo (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Mumbai, India) obedecendo-se a escala 0,5 de Macfarland (1×10^8 UFC). Desse inóculo, foram colocados 100 µl em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Nesses poços, foram colocados 90 µl de PBS (LBC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) adicionado a 10 µl de Azul de metileno (Labsynth Ltda, São Paulo, Brasil) dependendo do grupo testado. As amostras das colônias de *Candida albicans* foram distribuídas, em triplicata nas placas de cultura. (Tabela 1).

As placas foram incubadas durante 30 minutos e, após esse período, foi realizada a irradiação com LED azul. Para essa aplicação a placa foi dividida em 6 setores de dimensões iguais. Cada setor foi irradiado durante 6 minutos na dosimetria de 122 J/cm², potência de 260 mW e comprimento de onda de 455 nm em aplicação única, totalizando 36 minutos de aplicação em cada placa, com a ponteira localizada perpendicularmente a 2 cm da tampa da placa de cultura.

A manipulação dos grupos foi realizada na ausência de luz direta, e as culturas foram protegidas por uma caixa fosca no intuito de evitar-se ação da luz ambiente durante os tratamentos. Foi empregado um dispositivo para manutenção do LED sempre na mesma posição em todas as aplicações. Sendo também realizado tratamento somente com aplicação de luz e somente com azul de metileno. (Tabela 1).

Após esse desafio, as placas foram levadas por 5 minutos a um Shaker TS-2000 A VDRL (Biomixer, São Paulo, Brasil), 100 µl de cada poço foram então passados para 900 µl de BHI Broth (Bio-Rad, São Paulo Brasil) e realizadas diluições seriadas 1:10 em 4 alíquotas sucessivas. Dessa diluição foram semeados 25 µl em placas de Petri de 9 cm contendo BHI Caldo (Neogen Corporation, Michigan, USA) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período foram feitas as contagens das colônias por dois examinadores previamente treinados e calibrados.

Os resultados foram analisados estatisticamente usando ANOVA seguido por teste de Tukey com 5% de nível de significância (SPSS 11.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Resultados

As amostras coletadas e cultivadas dos 05 pacientes selecionados para o estudo foram identificadas no VITEK 2 Compact (Biomérieux, Portugal). Os testes fenotípicos apontaram que 04 amostras eram de *Candida albicans*. Dessas, 02 eram de pacientes diagnosticados segundo os critérios de Newton como tipo 1, nos quais era possível observar área pontual de hiperemia na mucosa do palato duro. E outras 02 como tipo 2, em que observou-se a presença de eritema difuso na mucosa recoberta pela prótese. A amostra excluída foi de *Saccharomyces cerevisiae*, cujo diagnóstico clínico de candidíase atrófica crônica foi tipo 01.

As amostras selecionadas foram submetidas à PDT usando luz LED azul associada ao azul de metileno e testados individualmente tanto a ação do azul de metileno quanto à ação da luz LED azul (Tabela 2 e Figuras 1, 2, 3). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes grupos e o grupo controle.

Discussão

Fungos do gênero *Candida* são comumente encontrados na cavidade oral de indivíduos saudáveis, sendo que a espécie mais prevalente é a *Candida albicans*, correspondendo entre 60 e 70% dos isolados, seguida pela *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* (MUZYCA & EPIFANIO, 2013; SOUZA et al., 2006). O uso de próteses dentárias provoca mudanças na ecologia bucal, favorecendo a colonização e proliferação de microrganismos, especialmente leveduras. Desse modo, a candidíase atrófica crônica (estomatite por dentadura) é uma infecção crônica comum nos usuários de próteses dentárias, diagnosticada como áreas eritematosas intimamente relacionadas com a base de próteses antigas ou insatisfatórias. Os pacientes no presente estudo foram diagnosticados clinicamente com candidíase atrófica crônica, sendo que a presença da *Candida albicans* foi fenotipicamente comprovada, evidenciando-

se que esse fungo é importante fator etiológico dessa condição, como em outros estudos (BARBEAU et al., 2003; CORONADO & JIMÉNEZ, 2013; MIMA et al., 2011).

A amostra de 01 paciente diagnosticado clinicamente com candidíase atrófica crônica tipo 1 de Newton, foi identificada fenotipicamente como *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo Bulacio et al., 2012, embora o fungo *Candida albicans*, seja a espécie mais frequente na mucosa oral, outras espécies do gênero como *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, além de outros fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, também podem ser responsáveis por manifestações clínicas na cavidade bucal.

Nesse estudo foram selecionadas amostras de 04 pacientes com diagnóstico clínico de candidíase atrófica crônica, todos portadores de próteses totais superiores. Desses, 02 foram diagnosticados segundo os critérios de Newton (1962) como tipo 1 e outros 02 como tipo 2. No estudo de Altarawneh et al., 2012, foram selecionados 08 pacientes com candidíase atrófica crônica tipo 2 e 07 tipo 3 de Newton. Esses autores compararam os pacientes diagnosticados com essa infecção com 17 usuários de próteses dentárias sem essa manifestação. Por conseguinte, constataram que a presença de *Candida albicans* tanto na prótese quanto na saliva é o principal agente etiológico da candidíase atrófica crônica. Fatores como o fluxo salivar e presença do fungo na mucosa oral foram menos importantes na população estudada e, esses fatores não foram analisados nos pacientes inseridos em nosso estudo. Os antifúngicos tópicos como o Micostatin e o Nitrato de Miconazol são amplamente utilizados no tratamento da estomatite por dentadura, contudo adequada higiene da prótese, além da descontinuidade do uso da mesma durante o período noturno, são aspectos importantes. A ação desses medicamentos é limitada, pois a diluição pela saliva contribui para a redução da concentração desses agentes, tornando o tratamento prolongado e facilitando o desenvolvimento de cepas resistentes, bem como a recorrência da infecção (GENDREAU e LOEWY, 2011; MIMA et al., 2012).

Recentemente fontes de luz LED têm sido empregadas na PDT, destacando-se devido ao baixo custo quando comparadas com fontes de luz laser e exercendo ação antimicrobiana satisfatória (COSTA et al., 2011; PELOI

et al., 2008). Tal método mostra-se eficaz contra colônias de *Streptococcus mutans* (ROLIM et al., 2012), além de fungos como cepas de *Trichophyton rubrum* (AMORIM et al., 2012), e *Candida albicans* (COSTA et al., 2011; MIMA et al., 2011; PELOI et al., 2008; SOARES et al., 2009; SOUZA et al., 2010).

Segundo Rajesh et al., 2001, o azul de metileno quando empregado como agente fotossensibilizante é capaz de eliminar a *Candida albicans*. Contudo, no presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) tanto na aplicação de luz LED azul associada ao azul de metileno, quanto na ação individual da luz e do corante.

PELOI et al., 2008, utilizaram uma fonte de luz LED vermelha com comprimento de onda de 663 nm, também associada ao azul de metileno, testando os efeitos da terapia sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, em tempos de 10, 20, 30 e 60 minutos. Constataram que o tratamento inibiu em mais de 93% o crescimento desses microrganismos.

No estudo de SOARES et al., 2009, realizaram PDT em diferentes isolados de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, com uma fonte LED vermelha com comprimento de onda de 630 nm, 100 mw de potência e intensidade de 180 J/cm² e o azul de toluidina como fotossensibilizante empregado e realizaram irradiação durante 15 minutos. Os resultados apontaram que a PDT foi capaz de inibir o crescimento da *Candida spp.*, bem como reduzir a capacidade de adesão da mesma às células do epitélio bucal.

SOUZA et al., 2010, observaram a ação da PDT usando laser de baixa potência associado com azul de metileno, azul de toluidina e verde malaquita contra a *Candida albicans*. Constatando que a mais alta redução na formação de UFC/ml após o tratamento foi observada com o azul de toluidina, seguido pelo azul de metileno e verde malaquita, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os corantes utilizados. Além disso, observaram que tanto a irradiação com o laser de baixa potência quanto o uso dos agentes fotossensibilizantes exerceram ação fungicida.

Costa et al., 2011, realizaram a PDT sobre culturas planctônicas e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. O agente fotossensibilizante foi a eritrosina combinada com luz LED verde com

comprimento de onda de 532 nm, potência de 90 mW, sendo realizada aplicação durante 3 minutos. A observação em microscopia eletrônica constatou redução quantitativa das leveduras e hifas no biofilme após a PDT, demonstrando a suscetibilidade das cepas estudadas ao tratamento empregado. No entanto a estrutura do biofilme, quando comparada às culturas planctônicas, foi mais resistente à PDT.

Já o estudo de MIMA et al., 2011, testou a ação da PDT na inativação da *Candida spp.* em 34 próteses totais superiores confeccionadas para essa finalidade. As mesmas foram inoculadas e incubadas durante 24 horas na temperatura de 37°C. O agente fotossensibilizante utilizado foi a hematoporfirina, ficando em contato com as próteses durante 30 minutos. Após esse período de incubação foi aplicada luz LED azul, com comprimento de onda de 455 nm, a qual irradiou as próteses durante 26 minutos. Nesse estudo, constatou-se que a PDT resultou em significativa redução da viabilidade de diferentes espécies de *Candida*.

Em outro estudo, MIMA et al., 2011, também utilizaram uma fonte de luz LED azul, com os mesmos parâmetros do dispositivo desenvolvido e aplicado em nosso trabalho. No entanto, esses autores estudaram os efeitos da PDT *in vivo* no tratamento de 05 pacientes com diagnóstico clínico e microbiológico de candidíase eritematosa crônica. A terapia foi realizada durante 20 minutos, 3 vezes por semana, durante 15 dias. Os autores constataram que a PDT foi efetiva no tratamento da estomatite por dentadura, indicando que a *C. albicans*, incluindo as cepas resistentes, mostram-se suscetíveis à terapia fotodinâmica. Contudo, 03 dos 05 pacientes tratados, apresentaram recorrência da infecção no primeiro mês após o tratamento.

Os achados do presente estudo não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos e o grupo controle. Por conseguinte, observa-se que existe um número limitado de estudos empregando diferentes metodologias na aplicação da PDT com fontes de luz LED. As divergências constatadas entre esse estudo e os demais encontrados na literatura mostram a ausência de parâmetros pré-definidos na execução da PDT *in vitro*.

Segundo SOUZA et al., 2010, fatores referentes ao agente fotossensibilizante, como o tempo de incubação e a concentração, além de

aspectos relacionados aos microrganismos, e as características da fonte de luz, como a densidade de energia e tempo de exposição também influenciam nos resultados.

Considerações Finais

A PDT usando fonte de luz LED é uma alternativa viável, no entanto no presente estudo não foi possível constatar a ação efetiva dessa terapia na redução das UFC/ml. Desse modo, a hipótese positiva levantada pelos autores não foi comprovada. As diferentes metodologias empregadas sugerem a necessidade de mais estudos na tentativa de padronizar os parâmetros dessa modalidade terapêutica.

Tabela 1. Grupos testes utilizados no desafio antifúngico.

| | |
|-------------------|---|
| Grupo 1 | 100 µl de inóculo + 90 µl de PBS + 10 µl de Azul de metileno + luz (122 J/cm ²) |
| Grupo 2 | 100 µl de inóculo + 90 µl de PBS + 10 µl de Azul de metileno |
| Grupo 3 | 100 µl de inóculo + 90 µl de PBS + luz (122 J/cm ²) |
| Controle positivo | 100 µl de inóculo + 90 µl de PBS + dependendo do grupo: 10 µl de azul de metileno e/ou luz (122 J/cm ²) |

Tabela 2. Resultados do teste de sensibilidade antifúngica (log 10 para a contagem de unidade formadoras de colônia).

| C. albicans1 | | | | | |
|---------------------------------|----------|------------------|----------|--------------|----------|
| Azul de metileno + Luz LED Azul | Controle | Azul de Metileno | Controle | Luz LED Azul | Controle |
| 108,3 | 98 | 156,7 | 98 | 73 | 68,3 |
| C. albicans2 | | | | | |
| Azul de metileno + Luz LED Azul | Controle | Azul de Metileno | Controle | Luz LED Azul | Controle |
| 256,3 | 131 | 141 | 150,3 | 125,7 | 94,7 |
| C. albicans3 | | | | | |
| Azul de metileno + Luz LED Azul | Controle | Azul de Metileno | Controle | Luz LED Azul | Controle |
| 103,7 | 94,7 | 148,7 | 100 | 54,3 | 56,7 |
| C. albicans4 | | | | | |
| Azul de metileno + Luz LED Azul | Controle | Azul de Metileno | Controle | Luz LED Azul | Controle |
| 133,7 | 136,3 | 118,7 | 97,6 | 46 | 41,7 |
| C. albicans ATCC 62342 | | | | | |
| Azul de metileno + Luz LED Azul | Controle | Azul de Metileno | Controle | Luz LED Azul | Controle |
| 5 | 7 | 46,3 | 50,2 | 46,3 | 52 |

Figura 1. Sensibilidade Antifúngica de cepas de *C. albicans* frente à ação de Luz LED Azul e Azul de Metileno.

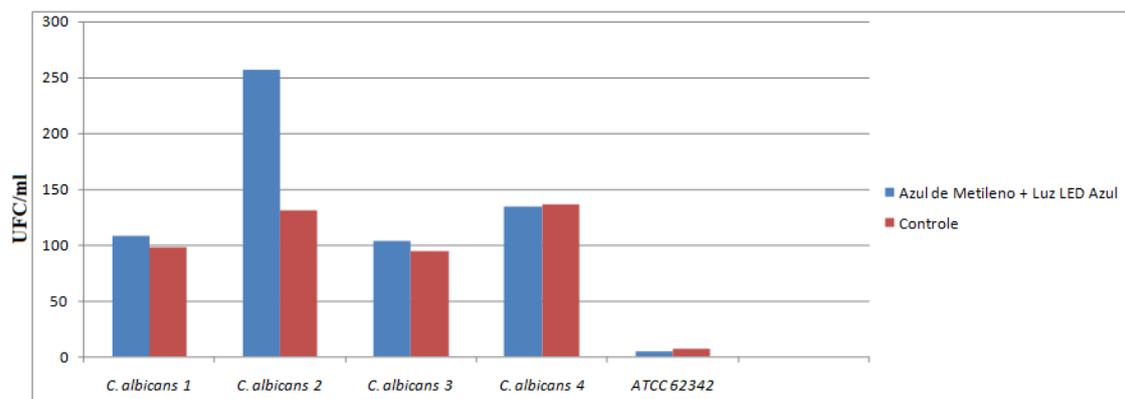


Figura 2. Sensibilidade Antifúngica de cepas de *C. albicans* frente à ação de Azul de Metileno.

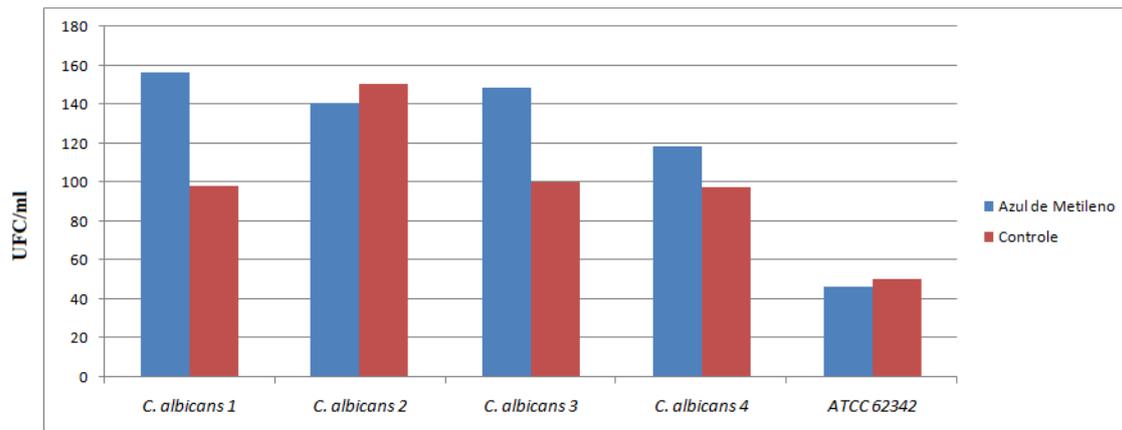
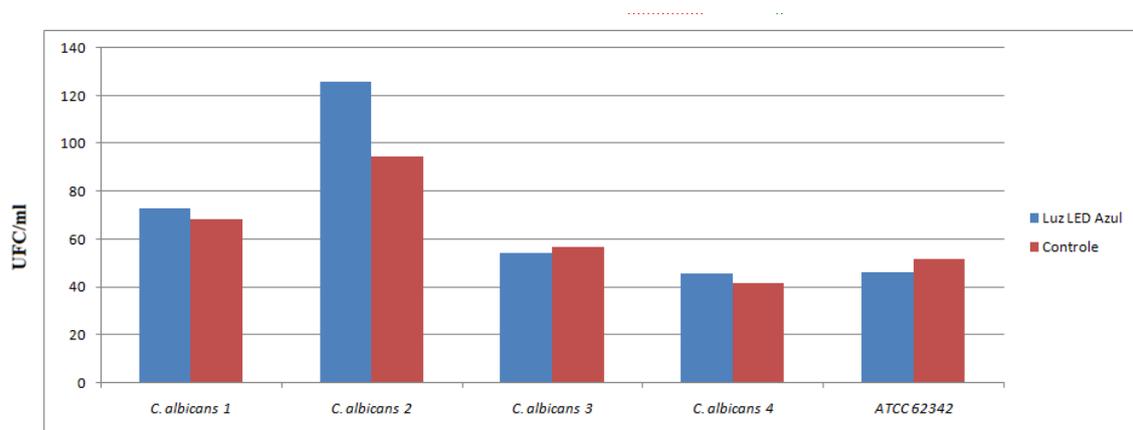


Figura 3. Sensibilidade Antifúngica de cepas de *C. albicans* frente à ação de Luz LED Azul.



REFERÊNCIAS

ALTARAWNEH, S.; BENCHARIT, S.; MENDOZA, L.; CURRAN, A.; BARROW, D.; BARROS, S.; PREISSER, J.; LOEWY, Z. G.; GENDREAU, L.; OFFENBACHER, S. Clinical and Histological Findings of Denture Stomatitis as Related to Intraoral Colonization Patterns of *Candida albicans*, Salivary Flow, and Dry Mouth. **Journal of Prosthodontics**, v.1, n.1, p.1-10, 2012.

AMORIM, J.C.F.; ALVES, O.A.; SOUSA, G.R.; PIANCASTELLI, A.C.C.; SOARES, B.M.; FERREIRA, M.V.L.; SILVEIRA, L.B.; PINOTTI, M. Phototoxic action of light emitting diode in the *in vitro* viability of *trichophyton rubrum*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.87, n.2, p.250-255, 2012.

ANDRADE, M.C.; RIBEIRO, A.P.D.; DOVIGO, L.N.; BRUNETTI, I.G.; GIAMPAOLO, E.T.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Effect os different pré-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of candida spp. **Archives of Oral Biology**, v.1, n.58, p.200-210, 2013.

AZCURRA, A.I.; BAREMBAUM, S.R.; BOJANICH, M.A.; CALAMARI, S.E.; AGUILAR, J.; BATTELLINO, L.J.; DORRONSORO, S.T. Effect of the high molecular weight chitosan and sodium alginate on *Candida albicans* hydrophobicity and adhesion to cells. **Oral Medicine and Pathology**, v.11, n.1, p.120-125, 2006.

BARBEAU, J.; SÉGUIN, J.; GOULET, J.P.; KONINCK, AVON, S.L.; LALONDE, B.; ROMPRÉ, P.; DESLAURIERS, N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.95, n.1, p.51-59, 2003.

BULACIO, L.; PAZ, M.; RASMADÁM, S.; RAMOS, L.; PAIROBA C.; SORTINO, M.; ESCOVICH, L.; LÓPEZ, C. Oral infections caused by yeasts in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. Identification of the yeasts and evaluation of their antifungal susceptibility. **Journal de Mycologie Médicale**, v.22, n.1, p.348-353, 2012.

CORONADO, L.C.; JIMÉNEZ, Y.S. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v.5, n.5, p.279-286, 2013.

COSTA, A.C.B.P.; RASTEIRO, V.M.C.; PEREIRA, C.A.; HASHIMOTO, E.S.H.S.; JUNIOR, M.B.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, O.A.C. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n.1, p.1299-1305, 2011.

COSTA, A.C.B.P.; RASTEIRO, V.M.C.; HASHIMOTO, E.S.H.S.; ARAÚJO, C.F.; PEREIRA, C.A.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of

immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. **Oral Medicine**, v.114, n.1, p.67-74, 2012.

DONNELLY, R.F.; McCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M.; WOOLFSON, A.D. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.86, n.1, p.59-69, 2007.

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, N.C.; MIMA, E.G.O.; GIAMPAOLO, E.T.; VERGANI, C.E.; BAGNATO, V.S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 54, n.1, p.123-130, 2009.

ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral Candidal Infections and Antimycotics. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.11, n.2, p.172-198, 2000.

GENDREAU, L.; LOEWY, G. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. **Journal of Prosthodontics**, v.20, n.1, p.251-260, 2011.

GURSOY, H.; OZCAKIR-TOMRUK, C.; TANALP, J.; YILMAZ, S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. **Clinical Oral Investigations**, v.17, n.1, p- 1113-1125, 2013.

JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; MA, LI-WEI.; IANI, V.; MOAN, JOHAN. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v.19, n.1, p.139-149, 2004.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **Journal of Dental Research**, v.86, n.8, p.694-707, 2007.

LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; ETGES, A.; RIBEIRO, G.A.; ROSALEN, P.L.; DEL PINO, F.A.B. Occurrence, isolation and differentiation of *Candida* spp. and prevalence of variables associated to chronic atrophic candidiasis. **Mycoses**, n.53, p.232-238, 2009.

MARTINS, J.S.; JUNQUEIRA, J.C.; FARIA, R.L.; SANTIAGO, N.F.; ROSSONI, R.D.; COLOMBO, C.E.D.; JORGE, O.A.C. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.111, n.1, p.71-77, 2011.

MIMA, E.G.O.; PAVARINA, A.C.; DOVIGO, L.N.; VERGANI, C.E.; COSTA, C.A.S.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.109, n.3, p.392-401, 2010.

MIMA, E.G.O.; PAVARINA, A.C.; SILVA, M.M.; RIBEIRO DG, L.N.; VERGANI, C.E.; KURACHI C.; BAGNATO, V.S. Denture stomatitis treated with

photodynamic therapy: five cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.112, n.1, p.602-608, 2011.

MIMA, E.G.O.; PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, D.G.; DOVIGO, L.N.; VERGANI, C.E.; BAGNATO, V.S. Effectiveness of Photodynamic Therapy for the Inactivation of *Candida* spp. on Dentures: In Vitro Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.29, n.12, p.827-833, 2011.

MIMA, E.G.; VERGANI, C.E.; MASSUCATO, E.M.S.; COLOMBO, A.L.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, n.10, p.380-388, 2012.

MONROY, T.B.; MALDONADO, V.M.; MARTINEZ, F.F.; BARRIOS, B.A.; QUINDÓS, G.; VARGAS, L.O.S. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Medicina Oral Patología Oral Cirugía Bucal**, v.10,n.1, p.27-39, 2005.

MUZYKA, B.C.; EPIFANIO, R.N. Update on Oral Fungal Infections. **Dental Clinics of North America**, v.57, n.1, p.561-581, 2013.

PELOI, L.S.; SOARES, R.R.S.; BIONDO, C.E.G.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Biosciences**, v.33, n.2, p.231-237, 2008.

PEREA, S.; PATTERSON, T.F. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v.35, n.1, p.1073-1080, 2002.

RAJESH, E.K.S.; KOSHI, P.; MOHAN, A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. **Journal Indian Society Periodontology**, v.15, n.4, p.323-327, 2011.

RKEIN, A.M.; OZOG, D.M. Photodynamic Therapy. **Dermatologic Clinics**, v.32, n.1, p.415-425, 2014.

RIBEIRO, D.G.; PAVARINA, A.C.; DOVIGO, L.N.; MIMA, E.G.O.; MACHADO, A.L.; BAGNATO, V.S.; VERGANI, C.E. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. **Lasers in Medical Science**, v.27, n.1, p.161-168, 2012.

ROLIM, J.P.M.L.; DE-MELO, M.A.S.; GUEDES, S.F.; ALBUQUERQUE-FILHO, F.B.; SOUZA, J.R.; NOGUEIRA, N.A.P.; ZANIN, I.C.J, RODRIGUES, L.K.A. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.1, n.106, p.40-46, 2012.

SALERNO, C.; PASCALE, M.; CONTALDO, M.; ESPOSITO, V.; BUSCIOLANO, M.; MILILLO, L.; GUIDA, A.; PETRUZZI, M.; SERPICO, R.

Candida-associated denture stomatitis. **Medicina Oral Patología Oral Cirugía Bucal**, v.16, n.2, p.139-143, 2011.

SHAPIRO, R.S.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.75, n.2, p.213-267, 2011.

SOARES, B.M.; SILVA, D.L.; SOUSA, G.R.; AMORIM, J.C.F.; RESENDE, M.A.; PINOTTI, M.; CISALPINO, P.S. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. Growth and adhesion to buccal epithelial cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.1, n.94, p.65-70, 2009.

SOUZA, S.C.; JUNQUEIRA, J.C.; BALDUCCI, I.; KOGAI-ITO, C.Y.; MUNIN, E.; JORGE, A.O.C. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.83, n.1, p.34-38, 2006.

SOUZA, R.C.; JUNQUEIRA, J.C.; ROSSONI, R.D.; PEREIRA, C.A.; MUNIN, E.; JORGE, A.O.C. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v.25, n.1, p.385-389, 2010.

TAKASAKI, A.A.; AOKI, A.; MIZUTANI, K.; SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; WANG, C-Y.; KOSHI, G.; ROMANOS, G.; ISHIKAWA, I.; IZUMI, Y. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. **Periodontology 2000**, v.51, n.1, p.109-140, 2009.

TEICHERT, M.C.; JONES, J.W.; USACHEVA, M.N.; BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 93, n.2, p.155-160, 2002.

WEBB, B.C.; THOMAS, C.J.; WILLCOX, M.D.P.; HARTY, D.W.S.; KNOX, K.W. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by candida species. **Australian Dental Journal**, v.43, n.3, p.160-166, 1998.

APÊNDICE

Termo de consentimento ético para pesquisa em seres humanos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Autorização para Pesquisa Clínica

Projeto: **Avaliação dos efeitos da Terapia Fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida sp.* e na Candidíase Oral.**

Responsável: Prof^a Dr^a Adriana Etges.

I- Justificativa: A candidíase é uma infecção provocada pelo fungo *Candida sp.*, principalmente a espécie *C. albicans*. A maioria de nós possui esse fungo na cavidade bucal sem provocar doença, mas, se houver algum fator local (por exemplo, o uso de próteses) ou alterações nas nossas defesas orgânicas (imunodepressão), a *C. albicans* passará a ter a capacidade de provocar candidíase oral (doença).

II- Objetivo: Nesta pesquisa, pretende-se testar, em pacientes, a ação da PDT sobre a estomatite por dentadura (candidíase oral) empregando-se o azul de metileno associado à luz LED azul, correlacionando esses achados com o efeito dessa terapia sobre culturas de *Candida sp.*.

III- Procedimento de coleta: O (A) Sr. (a) será submetido (a) a um exame clínico de sua boca e, caso haja a presença de candidíase, será coletado material da área afetada, com auxílio de um swab (espécie de cotonete) estéril e descartável.

IV- Aplicação da PDT: O fotossensibilizador (azul de metileno) será aplicado com o auxílio de um spray no palato duro (céu da boca), para a irradiação da cavidade bucal, o dispositivo será manuseado pelo operador e a terapia será realizada durante 20 minutos (3 vezes por semana, totalizando 6 sessões).

V- Desconforto ou riscos: O procedimento de coleta do fungo e aplicação da PDT não trará prejuízos a sua boca, ao seu tratamento e a sua saúde. O (A) Sr. (a) sentirá apenas um leve toque na mucosa, sem dor.

VI- Ficha de coleta e privacidade: Os dados referentes à sua identificação, saúde e tratamento serão anotados em uma ficha de coleta numerada e

elaborada por mim, que ficará em meu poder, com a garantia de que haverá sigilo quanto a sua identidade. A coleta será identificada apenas por um número.

VII- Benefícios: Ao ser examinado (a), se for constatada presença clínica de candidíase oral, o (a) Sr. (a) será submetido ao tratamento adequado.

VIII- Dúvidas: Qualquer dúvida, não receie em perguntar tantas vezes quantas se façam necessário.

IX- Abandono: caso não deseje participar dessa pesquisa, seu material não será coletado e em nada mudará o tratamento a que está se submetendo. Caso a coleta seja realizada e o (a) Sr. (a) quiser desistir da pesquisa, poderá fazê-lo em qualquer momento.

Eu, _____,
RG número _____, abaixo assinado, declaro que concordo em participar do Trabalho intitulado “Aplicação da Terapia Fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida sp.* e na Candidíase Oral”. Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido e que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa sem que isso implique prejuízo ao meu tratamento e que não preciso apresentar justificativas para isso. Sei também que todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos na pesquisa só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato de esses poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa. Concordo, também, em responder às questões contidas no formulário que me foi apresentado. Qualquer dúvida, contatarei o acadêmico Felipe Brunatto da Luz, pelo telefone (53) 8114-3281 ou a Professora Dr^a Adriana Etges através do telefone (53) 8402-7893. Assim, concordo em participar da pesquisa em questão. Declaro ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Pelotas, _____

Assinatura do paciente: _____

Assinatura do Pesquisador responsável: _____

ANEXO

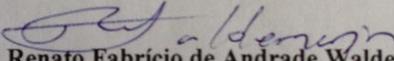


**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA**

PELOTAS, 04 de junho de 2014

PARECER Nº 17/2014

O projeto de pesquisa intitulado "Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida sp*" está constituído de forma adequada, cumprindo, nas suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, **PARECER APROVADO**.


Prof. Dr. Renato Fabricio de Andrade Waldemarin
Coordenador do CEP- FOP/UFPEL

Entregue em 02/07/2014