# **UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

MÁRIO JOSÉ DE REZENDE

ATIVIDADE FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA DO AZUL DE METILENO SOBRE O Paracoccidioides brasiliensis

**TESE DE DOUTORADO** 

DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

# UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

# MÁRIO JOSÉ DE REZENDE

# ATIVIDADE FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA DO AZUL DE METILENO SOBRE O Paracoccidioides brasiliensis

### **TESE DE DOUTORADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes

## UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

## MÁRIO JOSÉ DE REZENDE

# ATIVIDADE FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA DO AZUL DE METILENO SOBRE O Paracoccidioides brasiliensis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes

Orientador

Doutorado em Engenharia Biomédica Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Divinomar Severino (externo)
USP

\_\_\_\_

Prof. Dra. Denise Costa Arruda (externo)

UMC

Prof. Dr. Ovídiu Constantin Baltatu (interno)

**UAM** 

Prof. Dr. Egberto Munin (interno)

UAM

Prof. Dr. Renato Amaro Zangaro (coordenador)

UAM

Prof. Dr. Adriana Barrinha Fernandes Moretti (Suplente)

UAM

Prof. Dr. Lanndulfo Silveira Junior (Suplente)

UAM

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

# MÁRIO JOSÉ DE REZENDE

Graduado em Fisioterapia pelas Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul-SP (FUNEC/FISA), Especialização em Docência no Ensino Superior pela União Panamericana de Ensino Superior (UNIPAN), Mestrado em Engenharia Biomédica pela Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

### Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UAM

R281a Rezende, Mário José de

Atividade Fotodinâmica Antimicrobiana do Azul de Metileno sobre o Paracoccidioides brasiliensis / Mário José de Rezende. - 2018.

89f.: il.; 30cm.

Orientador: Adjaci Uchôa Fernandes.

Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade

Anhembi Morumbi, São José Dos Campos, 2018.

Bibliografia: f.72-87

Engenharia Biomédica.
 Paracoccidioidomicose.
 Paracoccidioides brasiliensis.
 Terapia Fotodinâmica.
 Oxigênio singlete.

CDD 610.28

Dedico este trabalho a Deus, pela proteção constante e por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus Pais, José Florentino de Rezende e Maria Almeida Rezende, por tudo que já fizeram em minha vida. Tudo que sou e venha a ser algum dia devo a vocês.

À minha Avó Rolandina Maria de Rezende (*in memorian*), pela grande importância que teve em minha vida, sendo uma das grandes incentivadoras que tive no início de minha carreira.

Aos Primos, Magnaldo Alves de Rezende (in memorian) e Luiz Carlos de Matos (Baxim), pela amizade e por ter me propiciado condições no início de minha caminhada, sem as quais dificilmente teria chegado onde estou.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes. Muito obrigado pela confiança, amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Prof. Dr. Renato Amaro Zangaro.

À Analista de Controle de Pós-Graduação Nidia Lucia de Macedo, pelo grande apoio prestado durante toda a realização do programa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi, pelo convívio e conhecimentos transmitidos durante a realização das disciplinas.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) e ao grupo REDOXOMA, na pessoa do Prof. Dr. Maurício Baptista, pela parceria, nos permitindo realizar parte dos experimentos que fundamentaram esta Tese de Doutorado.

À Adriana Yamaguti Matsukuma (IQ-USP), pelo auxílio nas análises de microscopia confocal.

À Dr<sup>a</sup>. Helena Couto Junqueira e em especial ao Prof. Dr. Divinomar Severino (Divino) (IQ-USP), pelo auxílio prestado nos experimentos envolvendo a detecção do oxigênio singlete.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em especial ao Centro de Reabilitação Física (CRF), pelo apoio financeiro.

Ao laboratório de Micologia do LACEPE/HUOP, na pessoa do Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra, pelo apoio na fase inicial do Projeto.

Ao Laboratório de Microbiologia Experimental/UNIOESTE, na pessoa do Prof. Dr. Eduardo Alexandre Loth, pelo apoio na realização da Pesquisa.

Aos Professores Rodrigo Daniel Genske e Cleverson Marcelo Pilatti pelas coberturas nos estágios, nos momentos em que me ausentei para realização das disciplinas do programa. E aos Professores Jose Mohamud Vilagra e Carlos Eduardo de Albuquerque pela parceria.

Aos amigos do Doutorado Henrique Carvalho, Stella Giansante e Gilson Mineiro de Perdões, pela parceria durante o curso.

À Universidade Anhembi Morumbi, pelo apoio prestado.

À CAPES/PROSUP pelo apoio financeiro durante a realização do Doutorado.

### **RESUMO**

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistemica mais relevante da América Latina, causada pelo fungo dimórfico Paracoccidioides brasiliensis (Pb). Os principais desafios terapêuticos da PCM são a longa duração do tratamento, recidivas, efeitos colaterais e desenvolvimento de resistência medicamentosa. A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido proposta como tratamento alternativo para infecções localizadas fungicas que apresentam resistentes aos antimicóticos. O presente estudo, investigou a citotoxicidade isolada do corante fenotiazínico azul de metileno (AM) em leveduras de Pb cepa 18, in vitro, para elucidar a concentração de AM não tóxica a ser utilizada como fotossensibilizador (FS) na TFD. Estudado a fototoxicidade da irradiação laser em diferentes doses, na ausencia e presença do AM. A incorporação e internalização do corante foi verificada por espectroscopia UV e por microscopia de fluorescência e confocal respectivamente. A geração de oxigênio singlete (1O2), foi caracterizada através do seu decaimento no infravermelho próximo a 1274 nm. Os resultados, nas concentrações do FS testadas, apontaram que o AM é tóxico ao fungo em concentrações superiores a 25 µM. Observou-se, que o Pb apresentou grande afinidade pelo corante com imediata incorporação. O laser isoladamente, somente foi eficaz (p < 0,01) na redução (41,7 %) do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), quando se irradiou a 100 J (200 s). Já para as leveduras submetidas a TFD, observou-se redução significativa (p < 0,01) das UFC/mL de Pb diretamente proporcional a dose de irradiação, onde 40 J (80 s) foi a mais adequada para a TFD, tendo apresentado redução de 74,9 % no número de UFC/mL de Pb. Foi demonstado a geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Conclui-se que o AM se incorpora imediatamente ao *Pb*, e que nas concentrações testadas, é tóxico ao fungo quando superiore a 25 µM. A fototoxicidade exclusiva da irradiação laser, só foi observada quando irradiado a 100 J. Já no tratamento por TFD, mostrou-se dose dependente com a irradiação, sendo considerado 40 J a irradiação mais adequada para este estudo, onde foi observado que o efeito fungicida foi mediado por atuação do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e que TFD é uma alternativa para a PCM quando mediado pelo mecanismo tipo II.

**Palavras-chave:** Engenharia Biomédica. Paracoccidioides brasiliensis. Paracoccidioidomicose. Terapia Fotodinâmica. Oxigênio singlete.

### **ABSTRACT**

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most relevant systemic mycosis in Latin America, caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*). The main therapeutic challenges of PCM are the long duration of treatment, relapses, side effects and development of drug resistance. Photodynamic Therapy (PDT) has been proposed as an alternative treatment for localized fungal infections that are resistant to antibiotics. The present study investigated the isolated cytotoxicity of methylene blue (MB) phenothiazine dye in Pb yeast to elucidate the non-toxic MB concentration to be used as a photosensitizer (PS) in PDT. The strain of Pb used was the 18, processed in vitro. The laser phototoxicity was studied at different doses, in the absence and presence of MB. The incorporation and internalization of the dve was verified by UV spectroscopy and by fluorescence and confocal microscopy, respectively. The generation of singlet oxygen (1O2) was characterized by its decay in the near infrared near 1274 nm. The results showed that MB is toxic to the fungus at concentrations higher than 25 µM. It was observed that the Pb showed great affinity for the dye with immediate incorporation. The laser itself was only effective (p < 0.01) in the reduction (41.7 %) of the number of colony forming units (CFU/mL) when irradiated at 100 J (200 s). For yeasts submitted to PDT, a significant reduction (p < 0.01) in CFU/mL of Pb was observed, which was directly proportional to the irradiation dose, where 40 J (80 s) was the most adequate for PDT, for apresenting 74.9 % reduction in the number of CFU/mL of Pb. The generation of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> was demonstrated. It is concluded that MB is immediately incorporated into Pb, and is toxic to the fungus at concentrations greater than 25 µM. The phototoxicity of the laser irradiation was only observed when irradiated at 100 J. In the PDT treatment, the dose was shown to be dependent on the irradiation, with 40 J being considered the most suitable irradiation for this study, where it was observed that the fungicidal effect was mediated by the action of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and that PDT is an alternative to PCM when mediated by type II mechanism.

**Keywords**: Biomedical engineering. Paracoccidiodes brasiliensis. Paracoccidioidomycosis. Photodinamic Therapy. Singlet oxygen.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Paracoccidioides brasiliensis na forma filamentosa (micélio)13				
Figura 2 -	Levedura de Paracoccidioides brasiliensis, apresentando o aspecto de				
	roda de leme14				
Figura 3 -	Leveduras de Paracoccidioides brasiliensis observadas em microscopia				
	óptica18				
Figura 4 -	Morfologia da parede celular de fungos dimórficos20				
Figura 5 -	Crianças apresentando a forma aguda da paracoccidioidomicose				
	(PCM)				
Figura 6 -	Aspectos clínicos da forma crônica da paracoccidioidomicose				
	(PCM)				
Figura 7 -	Exames de imagem (Raio-X e Tomografia Computadorizada),				
	demonstrando o envolvimento pulmonar e do Sistema Nervoso Central				
	na paracoccidioidomicose				
Figura 8 -	Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose27				
Figura 9 -	Fórmula estrutural do azul de metileno (AM)32				
Figura 10 -	Paciente com câncer de pele tratado por H. Tappeiner e H. Jesionel				
	com solução de eosina a 1% em 190534				
Figura 11 -	Friedrich Betz Meyer antes da aplicação de hematoporfirina IX (à				
	esquerda). Meyer três dias depois da aplicação de hematoporfirina IX,				
	com um dia de exposição à luz solar (à				
	direita)35				
Figura 12 -	Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismo de ação em				
	TFD36				
Figura 13 -	Desenho experimental do teste de citotoxicidade do azul de metileno na				
	ausência de irradiação com luz a 660 nm41				
Figura 14 -	Desenho experimental do teste de fototoxicidade da irradiação da luz a				
	660 nm42				
Figura 15 -	Desenho experimental do teste de fototoxicidade da irradiação com luz				
	a 660 nm associado ao azul de metileno (TFD)43				
Figura 16 -	Unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) obtidas ao teste de				
	citotoxicidade do azul de metileno, em diferentes concentrações, quando				

	incubado	em	solução	contendo	Paraco	occidioides
	brasiliensis					45
Figura 17 -	Representação	gráfica	da citotoxi	cidade de	suspensão	contendo
	Paracoccidioid	les brasilie	ensis (Pb) + a	zul de metile	eno (AM), em	diferentes
	concentrações					46
Figura 18 -	Espectro UV –	visível (s	obrenadante)	do azul de	metileno (AM	l) a 25 μM,
	mais AM + Pa	racoccidio	oides brasilie	nsis ( <i>Pb</i> ) no	os tempos 1,	5, 10, 15,
	20, 30, 60 e 90	) s				48
Figura 19 -	Representação	o gráfica	da densid	dade óptica	a média, o	btida por
	espectroscopia	a de absoi	ção de varre	dura, do sob	orenadante d	e soluções
	de azul de met	ileno (AM)	) e suspensõ	es contendo	AM + Paraco	occidioides
	brasiliensis (F	Pb), nos	tempos de	1, 5, 10,	15, 20, 30,	60 e 90
	min					49
Figura 20 -	Representação	da curva	a de incorpor	ação do azı	ul de metilen	o (AM) em
	leveduras de	Paracocc	idioides bras	siliensis (Pb	), após incu	bação em
	tempos distinto	os (1, 5, 1	0, 15, 20, 30,	60 e 90 s)		50
Figura 21 -	Unidades form	adoras de	e colônias po	r mL (UFC/r	nL) obtidas r	no teste de
	fototoxidade, c	luando le	veduras de <i>l</i>	Paracoccidio	oides brasilie	<i>nsi</i> s foram
	irradiadas con	n <i>laser</i> à	660 nm na	a ausência	de fotosser	ısibilizador
	exógeno					52
Figura 22 -	Representação	gráfica d	lo ensaio de f	ototoxicidad	le utilizando s	suspensão
	contendo Para	coccidioid	des brasiliens	sis (Pb), irrac	diada com <i>las</i>	s <i>er</i> em 660
	nm em diferen	tes doses				53
Figura 23 -	Unidades form	nadoras c	le colônias p	oor mL (UF	C/mL) obtida	as após a
	irradiação de s	•				` ,
	azul de metile	no (AM),	a uma cond	centração d	e 25 µM, co	m <i>laser</i> a
	660 nm					
Figura 24 -	Representação	· ·			•	
	Paracoccidioid		` ,		` '	•
	diferentes dose		•			
Figura 25 -	Representação	· ·	•	•		
	e na presença		•	•		
Figura 26 -	Paracoccidioid		_			
	fluorescência (	B), sobre	posição das	imagens tra	nsmitida e flu	ıorescente

	(C) e (D) imagem tridimensional do micro-organismo incubado, com azul							
	de	metileno	(AM)	а	25	μΜ	(aumento	de
	1000x)							60
Figura 27 -	Paraco	occidioides b	rasiliensis	( <i>Pb</i> )	incubad	do em s	olução de a	azul de
	metiler	no (AM), a 2	5 μM. Co	rtes pla	anares	(Escala:	50 µm) obti	dos por
	micros	copia de fluo	rescência	confo	:al			62
Figura 28 -	Transie	ente de emis	são a 127	4 nm e	m água	deuterad	da (D₂O). Ins	erções:
	espect	ro de emiss	são do c	lecaime	ento do	oxigên	io singlete	$^{1}O_{2}$ de
	incorpo	oração do az	ul de meti	leno (A	AM) no <i>l</i>	Paracoco	cidioides bra	siliensis
	( <i>Pb</i> )							64

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM Azul de metileno

BHI Agar de infusão de cérebro e coração

CIE Contraimunodifusão

CCP Citocromo c peroxidase

cat Catalase A cm Centímetro

DNA Ácido desoxirribonucleico

EROS Espécies reativas de oxigênio

ERNS Espécies reativs de nitrogênio

FS Fotossensibilizador

FS\* Fotossensibilizador em estado singlete excitado

°C Graus Celsius

Hyr1 Peroxirredoxina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrogênio

ID Imunodifusão

J Joule

Laser Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação

da luz por emissão estimulada de radiação)

LED Diodo emissor de luz

Log Logaritmo

LPG Lipofosfoglicanos

Nm Nanômetros

mL Mililitro

mW Miliwatts

mJ Milijoule

mg Miligrama

μm Micrômetro

μM Micromolar

μL Microlitro

NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> Oxigênio singlete

ONOO Peroxidonitrito

PCM Paracoccidioidomicose

Pb Paracoccidioides brasiliensis

PMT Fotomultiplicadora

PBS Solução salina tampão fosfatada

pH Potencial de hidrogênio

% Porcentagem

qRT-PCR Teste quantitativo em tempo real da cadeia de polimerase

RNA Ácido ribonucleico

rpm Rotações por minuto

sod Superóxido dismutase

s segundos

TBO Azul de toluidina

TFD Terapia fotodinâmica

TMPyP 5,10,15,20-Tetraquis(1-Metil-4-Piridinio)Porfirina

UV Ultravioleta

UFC Unidade formadora de colônia

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Hipótese	15
1.2 Objetivo geral	15
1.3 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Paracoccidioides brasiliensis	17
2.2 Paracoccidioidomicose	23
2.2.1 Epidemiologia	26
2.2.2 Diagnóstico	29
2.2.3 Tratamento	30
2.3 Terapia fotodinâmica (TFD)	31
2.3.1 História da terapia fotodinâmica	33
2.3.2 Mecanismos de ação	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Suspensão de <i>Pb</i>	
3.2 Solução de AM	40
3.3 Teste de citotoxicidade do AM	40
3.4 Espectros de absorção	41
3.5 Testes de fototoxicidade	41
3.6 Teste de incorporação e internalização do FS	43
3.7 Caracterização do oxigênio singlete (¹O₂)	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Teste de citotoxicidade	45
4.2 Espectroscopia de absorção	47
4.3 Teste de fototoxicidade	
4.4 Teste de morte celular por efeitos fotodinâmicos	55
4.5 Microscopia por fluorescência com resolução confocal	60
4.6 Geração e decaimento de <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	63
5 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

# 1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica e restrita para a América Latina e América do Sul, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) (LACAZ et al., 2002), que pode ser fatal se não tratada (PRADO et al., 2009). No Brasil, a PCM é um grave problema de saúde pública e é a causa mais importante de morte entre as micoses sistêmicas em pacientes imunodeprimidos (PRADO et al., 2009; SHANKAR et al., 2011).

Os agentes etiológicos da PCM são fungos dimórficos que apresentam uma forma filamentosa a 25 °C e leveduriformes a 37 °C, pertencentes ao gênero *Paracoccidioides*. O fungo em temperaturas inferiores a 25 °C, *in vitro*, ou em ambiente sob condições de saprofitismo cresce na forma de micélios, formado por filamentos de células cilíndricas com ramificações (Figura 1).



Figura 1: Paracoccidioides brasiliensis na forma filamentosa (micélio). Disponível :<a href="http://www.misodor.com/PARACOCCIDIOMICOSE.php">http://www.misodor.com/PARACOCCIDIOMICOSE.php</a>. Acesso em: 22 mar. 2018.

A forma leveduriforme parasitária se desenvolve nos tecidos infectados, ou quando cultivada, *in vitro*, a 36 °C. Medindo de 5 a 25 µm de diâmetro, apresenta multibrotamentos originários da célula-mãe, aspecto conhecido como "roda de leme" (Figura 2) (RESTREPO, 2003).

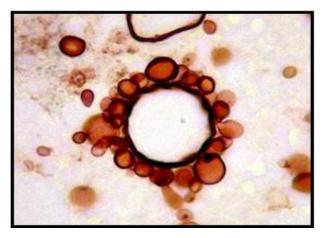


Figura 2: Levedura de Paracoccidioides brasilienses, apresentando o aspecto de roda de leme. Disponível:<a href="http://anatpat.unicamp.br/biinflparacoco3.ht">http://anatpat.unicamp.br/biinflparacoco3.ht</a> ml>. Acesso em 22 mar. 2018.

Os principais desafios terapêuticos da PCM são a longa duração e a alta frequência de recidivas, sequelas e efeitos colaterais medicamentosos (MENDES, 2009). Assim, como para diversas outras infecções fúngicas, o tratamento medicamentoso para a PCM persiste como desafio não resolvido totalmente. Para tanto, há necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos, bem como terapias alternativas ou complementares as existentes (ALMEIDA et al., 2004).

Uma terapia alternativa que tem sido indicada para o tratamento de infecções é a Terapia Fotodinâmica (TFD). Este método combina um fotossensibilizador (FS) não tóxico com luz visível, em comprimento de onda adequado, para excitar o FS ao seu estado tripleto reativo. Este, por sua vez, irá gerar espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como oxigênio singlete e superóxido, tóxicos para as células. Nos últimos anos, a TFD tem sido proposta como um tratamento alternativo para infecções localizadas bacterianas e fúngicas, as quais são resistentes aos antibióticos convencionais (TEGOS et al., 2008; ROSA et al., 2015).

A TFD, originalmente aplicada no tratamento de alguns tipos de câncer de pele, tem se desenvolvido no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. Constitui, assim, uma modalidade terapêutica alternativa no tratamento de processos infecciosos, muitos dos quais são resistentes ao tratamento convencional. Existem inúmeros relatos de estudos na literatura, utilizando essa

técnica terapêutica no tratamento de infecções fúngicas. Porém, é escasso de se encontrar referências dessa terapêutica no tratamento da PCM. Diante disso, tornou-se necessário verificar a eficácia e estudar alguns fatores envolvidos nessa modalidade de tratamento, frente ao *Pb*, utilizando-se para isso um FS de fácil aquisição, o corante fenotiazíco Azul de Metileno (AM).

# 1.1 Hipótese

Ho: O fotossensibilizador azul de metileno não se incorporará, por atração eletrostática, em leveduras de *Paracoccidioides* brasiliensis; uma vez irradiado, por luz visível, não gerará efeitos fotodinâmicos que acarretarão em destruição molecular e morte desse patógeno.

H<sub>1</sub>: O fotossensibilizador azul de metileno se incorporará, por atração eletrostática, em leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*; uma vez irradiado, por luz visível, gerará efeitos fotodinâmicos que acarretarão em destruição molecular e morte desse patógeno.

## 1.2 Objetivo geral

Estudar a ação fotodinâmica, *in vitro*, sobre leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, utilizando o fotossensibilizador azul de metileno.

### 1.3 Objetivos específicos

- Estudar a interação do azul de metileno e leveduras de Paracoccidioides brasiliensis:
- Verificar a relação do tempo de incubação de Paracoccidioides brasiliensis com a incorporação do fotossensibilizador azul de metileno;
- Avaliar a citotoxicidade do azul de metileno em leveduras de Paracoccidioides brasiliensis:

- Observar a ocorrência de fototoxicidade, na ausência e presença do fotossensibilizador azul de metileno;
- Analisar a geração de oxigênio singlete, após irradiação sobre leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, na presença do corante azul de metileno.

# 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Paracoccidioides brasiliensis

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*), agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), foi descrito inicialmente em 1908, no periódico Brazil-Médico, por Adolfo Lutz (1855-1940). A revista apresentou a primeira parte dos resultados, iniciados em 1905, no artigo "Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das Hyphoblastomycoses americanas". Nesta publicação, Lutz afirmava ter obtido o cultivo do parasita, a partir de lesões observadas em indivíduos infectados, sendo compreendidos sua estrutura e seu modo de reprodução. Ao verificar semelhanças morfológicas com micoses anteriormente descritas na Argentina e nos Estados Unidos incluiu-a em um grupo denominado de hifoblastomicoses americanas (LUTZ, 1908; LACAZ et al., 2002).

Afonso Splendore estudou casos desta micose fúngica, de 1908 até 1915, fatal no período pela inexistência de tratamento específico. Em 1912, Splendore classificou o agente etiológico da PCM no gênero *Zymonema*. A doença passou a ser denominada, então, de "blastomicose brasileira" e, logo após "blastomicose sul-americana", devido aos casos semelhantes relatados na América do Sul (LACAZ et al., 2002).

O médico Floriano Paulo de Almeida, em 1930, incluiu o gênero *Paraccoccidioides* dentro do Reino Fungi. Esta nova classificação se baseou em pesquisas comparativas entre o granuloma coccidioico no Brasil e nos Estados Unidos, determinando desta forma, diferenças expressivas entres o agente etiológico da coccidioidomicose e da PCM, corroborando com os achados que foram descritos por Lutz (ALMEIDA, 1930). As pesquisas sobre a PCM se intensificaram a partir de 1930, concomitantemente com o desenvolvimento terapêutico-farmacológico e ao surgimento de novas tecnologias de imagem, como a microscopia eletrônica, que possibilitou uma melhor compreensão da biologia do fungo (LACAZ, 1994).

A oficialização do termo PCM foi instituída em 1971, durante o primeiro simpósio sobre este tema, sediada na cidade de Medelín, na Colômbia (VALLE; COSTA, 2001).

Com bases em estudos de filogenia molecular, o fungo *Pb* é enquadrado taxonomicamente como segue: Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Plectomyceto; Ordem Onygenales; Família Onygenaceae; Gênero *Paracoccidioides*; espécie *brasiliensis* (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA, 2008).

Dentre aproximadamente 100 mil espécies fúngicas existentes, apenas um pequeno grupo causa micose sistêmica humana. A maioria é causada por fungos dimórficos, tornando esta alteração morfotípica um aspecto importante como mecanismo de virulência e de patogenicidade (SAN-BLAS et al., 1987).

O *Pb*, patógeno humano, possui dimorfismo morfológico termo dependente. Em temperaturas inferiores a 25 °C, *in vitro* ou em ambiente, sob condições de saprofitismo, o fungo cresce na forma de micélios (Figura 1), formado por filamentos de células cilíndricas com ramificações. A forma leveduriforme parasitária se desenvolve nos tecidos infectados, ou quando cultivada, *in vitro*, a 36 °C. A forma leveduriforme mede de 5 a 25 µm de diâmetro e apresenta multibrotamentos originários da célula-mãe. (Figura 3) (RESTREPO, 2003).



**Figura 3 -** Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* observadas em microscopia óptica, escala 50 μm. Fonte: O autor (2017).

A temperatura é um dos estímulos mais notórios para o dimorfismo do *Pb.* Porém, fatores hormonais, como a presença de 17-β-estradiol e nutricionais, podem interferir neste processo de alteração da forma não virulenta à patogênica. A adição de soro fetal bovino ao meio de cultura quimicamente definido permitiu preservar a expressão fenotípica de levedura, em temperaturas mais elevadas (VILLAR; SALAZAR; RESTREPO, 1998).

Quatro espécies filogenéticas de *Pb* S1, PS2, PS3 e *P lutzii* foram identificadas, através de estudos realizados por Matute et al. (2006). Os estudos analisaram sequências do ácido desoxirribonucléico (DNA), de oito regiões, a partir de cinco genes nucleares codificadores (quitina sintase, β-glucana sintase, fator adenil de ribosilação, α-tubulina e PbGP43). Foram estudados 65 isolados de *Pb*, abrangendo seis áreas endêmicas de PCM. Através da análise por concordância de genealogia de genes foi possível detectar as três espécies crípticas. Os resultados deste estudo demonstraram a existência de um grupo parafilético, denominado S1 e dois monofiléticos, PS2 e PS3. A espécie filogenética PS3 encontra-se restrita à Colômbia; enquanto S1, a qual tem como representante o *Pb* cepa18, se distribui no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. Isolados da espécie PS2 foram também encontrados no Brasil e Venezuela. Todas as três espécies foram capazes de induzir a doença em hospedeiros humanos e animais; entretanto, uma menor virulência tem sido verificada nas espécies PS2.

O habitat natural aparece em estudos com prevalência em áreas rurais, com temperaturas entre 10-28 °C; normalmente em regiões com invernos curtos e verões chuvosos, apresentando elevado índice pluviométrico, entre 1300-2500 mm/ano; e dotadas de vegetação abundante ou de extensas lavouras, com solo rico em proteínas, nos vales e nas proximidades de grandes rios (RESTREPO; MCEWEN; CASTANHEDA, 2001).

O *Pb* já foi isolado no solo em diversos países, como Argentina, Brasil e Venezuela (TELLES, 1987). A infecção natural do fungo em alguns animais silvestres, como tatus (*Dasypus septemcinctus* e *Cabassous centralis*), com intenso hábito fossorial e escavatório, reforça a teoria que o fungo tem como

habitat o solo. No entanto, estes organismos devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservas naturais de fungos (CONTI-DIAZ, 2007).

A parede celular (Figura 4) é o involucro externo à membrana citoplasmática do fungo. Suas características gerais, tanto na fase leveduriforme como na micelial, são semelhantes as dos demais fungos patogênicos dimórficos. Porém, guardam diferenças morfológicas e bioquímicas entre as duas fases morfológicas. Os principais constituintes da parede celular, de ambas as formas miceliana e leveduriforme do fungo *Pb*, são: quitina, glucanas (polissacarídeos), lipídios e proteínas.

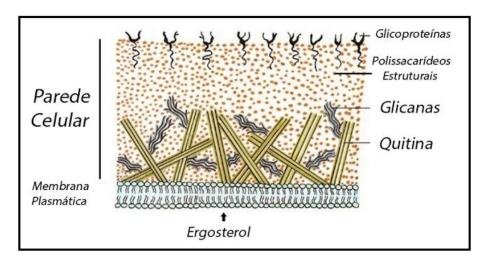


Figura 4: Morfologia da parede celular de fungos dimórficos. Disponível:<a href="http://www.biomedicinabrasil.com/2018/01/farmacologia-dos-antifungicos.html">http://www.biomedicinabrasil.com/2018/01/farmacologia-dos-antifungicos.html</a>. Acesso dia 22 mar. 2018.

A parede do micélio tem uma grande concentração de proteínas (24 a 41 %) quando comparada com a de células leveduriformes (7 a 14 %). O principal polissacarídeo da parede celular de leveduras de Pb é a alfa ( $\alpha$ )-glucana, enquanto que em micélio são as beta ( $\beta$ )-glucanas e as galactomananas (aproximadamente 6 %). As  $\alpha$ -glucanas de leveduras contêm pequenas concentrações de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,3 ou  $\alpha$ -1,6, sendo que as  $\beta$ -glucanas de micélio contêm ligações glicosídicas  $\beta$ -1,3 (TELLES, 1987).

Na fase micelial, a parede apresenta espessura variando entre 80 e 150 nm e é composta por duas camadas mescladas. A mais externa é densa e formada por fibrilas pouco nítidas, álcali-insolúveis, cuja análise bioquímica demonstrou ser constituídas principalmente por β-1,3-glucana. Esta camada

externa mescla-se intimamente com outra mais interna, menos densa, composta principalmente por quitina e que se relaciona com a membrana citoplasmática (TELLES, 1987).

A fase leveduriforme possui uma parede celular cuja espessura varia entre 200 a 600 nm e apresenta duas camadas distintas. A mais externa que recobre a superfície celular é formada por uma rede de fibrilas entrelaçadas, curtas e grossas, ora isoladas, ora dispostas em feixes. Estas fibrilas são álcalisolúveis e compõem-se principalmente por outro polissacarídeo, a  $\alpha$ -1,3-glucana. Internamente, observa-se uma camada menos densa, composta principalmente por quitina e que se relaciona intimamente com a membrana citoplasmática. Quando o fungo adota a forma leveduriforme, o aumento do conteúdo de quitina é observado na parede celular, seguido por alteração na estrutura anomérica da glucana de um polímero de  $\beta$ -1,3 para  $\alpha$ -1,3 (TELLES, 1987).

A parede celular apresenta um papel essencial na patobiologia do *Pb*. Os polissacarídeos da parede celular α-1,3-glucana e β-1,3-glucana têm sido sugeridos como fatores de virulência durante a transição dimórfica do *Pb*. Isto porque um baixo conteúdo de α-1,3-glucana na parede celular de leveduras tem sido correlacionado com baixa virulência. A transição dimórfica do *Pb* ocorre simultaneamente às mudanças na composição da parede celular, envolvendo alterações estruturais nos polímeros de carboidratos e reorganização dos lipídios de membrana, especialmente glicoesfingolipídios (SAN-BLAS, 1993).

A virulência do Pb está relacionada com a presença da  $\alpha$ -1,3-glucana na superfície externa da parede celular. Amostras do fungo, mantidas em cultivos por períodos prolongados, tornam-se pouco patogênicas para animais de laboratório, em razão da substituição da  $\alpha$ -1,3-glucana por galactomananas. Quando incubadas em meio de cultivo enriquecido com soro bovino fetal, estas amostras podem recuperar o teor de  $\alpha$ -1,3-glucana e se tornar virulentas novamente (TELLES, 1987).

O α-glucano é um polissacarídeo da parede celular que tem sido constantemente associado com um aumento de virulência em várias estirpes e fungos isolados; ao que parece, mascarando os componentes da parede celular

do fungo. O  $\alpha$ -1,3-glucana e  $\beta$ -1,3-glucana são relatados por participar do dimorfismo e de estar envolvidos em aspectos de virulência do *Pb*. Estudos realizados em *Pb* isolados sugeriram que  $\alpha$ -1,3-glucano protege o fungo contra enzimas digestivas dos leucócitos e macrófagos do hospedeiro. Ao considerar a parede celular do *Pb* como um fator de virulência foi sugerido que os fagócitos humanos podem produzir  $\beta$ -glucanase. Esta última é capaz de digerir o único  $\beta$ -1,3-glucano presente na parede celular das formas de micélio do fungo. Assim, a transformação do fungo nas formas de levedura, no início da infecção, iria evitar a ação de enzimas fagocíticas no agente, provocando o parasitismo de *Pb* (TELLES, 1987).

A parede celular fúngica é composta principalmente por  $\alpha$ -glucanas,  $\beta$ -glucanas, N-acetilglucosamina e manoproteínas, resultando numa carga elétrica global negativa (DE GROOT; RAM; KLIS, 2005).

A parede celular, além de ser um fator de resistência antifúngica, produz várias enzimas, tais como: proteases, elastases, colagenases, fosfolipases, ureases, condroitinases e hialuronidases. Hialuronidase e condroitina sulfatase são consideradas fatores de virulência, para espalhamento ou para penetração nos tecidos; favorecendo a capacidade de infectar organismos (ASSIS et al., 2003).

A melanina não representa uma única substância, mas um grande grupo de diversas substâncias, todas com propriedades similares, presentes em diversos organismos. Em geral, são macromoléculas formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, hidrofóbicas e carregadas negativamente. Suas prováveis funções em fungos patogênicos humanos incluem: proteção contra raios ultravioleta (UV); radiação gama; temperaturas extremas; enzimas hidrolíticas; agentes oxidantes; metais pesados; e diversos outros componentes tóxicos. Alguns fungos acumulam melanina na parede celular constitutivamente, enquanto outros necessitam de L-dopa para produzir o pigmento (GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2014).

O fungo *Pb* melanizado contribui com a sua virulência por reduzir a fagocitose de macrófagos alveolares e peritoniais, melhorando a resistência das

células fúngicas ante o sistema imune do hospedeiro. Também diminui a susceptibilidade antifúngica para vários antifúngicos, comumente utilizados no tratamento da doença (GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2014).

O mecanismo de aumento da sobrevida de células melanizadas de leveduras de *Pb* é, em parte, devido ao fato de que a melanização protege o fungo contra lesões mediadas por nitrogênio ou oxigênio e derivados de radicais livres; também, aumenta a resitência ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), bem como ao hipoclorito (BALTAZAR et al., 2015).

### 2.2 Paracoccidioidomicose

A PCM é uma micose sistêmica endêmica para a América Latina e América do Sul, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) (LACAZ et al., 2002) e pode ser fatal se não tratada (PRADO et al., 2009). No Brasil, a PCM é um grave problema de saúde pública e é a causa mais importante de morte entre as micoses sistêmicas em pacientes imunodeprimidos (PRADO et al., 2009; SHANKAR et al., 2011). O agente etiológico da PCM são fungos dimórficos que apresentam uma forma filamentosa a 25 °C e leveduriformes a 37 °C, pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* (MATUTE et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007). O dimorfismo térmico é uma estratégia de sobrevivência para resistir ao ambiente do hospedeiro, a qual inclui secreção de proteases e síntese de melanina. Tais fatores de virulência contribuem para a proteção de células de levedura das agressões ambientais (MATUTE et al., 2006; PATENTE et al., 2008).

PCM é a oitava causa de morte no Brasil considerando as doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas (COUTINHO et al., 2002). O Estado do Paraná apresentou 53,2 % das mortes por PCM registradas na região Sul do Brasil, correspondendo à quinta causa de óbitos por doenças dessa natureza. É, também, onde está registrada a maior taxa de mortalidade (FORNAJEIRO et al., 2005).

A PCM se encaixa no grupo das doenças infecciosas consideradas "negligenciadas", principalmente por receber pouca atenção; tanto das instituições envolvidas em termos de políticas de saúde pública, como da indústria farmacêutica (MARTINEZ, 2010).

Inicialmente acreditava-se que a PCM era uma micose mucocutânea, porque, frequentemente, essas lesões eram o único sintoma clínico, a partir da qual se sugeriu a teoria patogênica traumática. Nesta, o agente era introduzido por trauma, com fragmentos vegetais utilizados para limpeza dentária no meio rural. Contudo, estudos com animais em laboratório não comprovaram esta teoria; isto porque as lesões em mucosa oral eram, geralmente, precedidas ou acompanhadas por lesões pulmonares (CONTI-DIAZ, 2007; LACAZ et al., 2002).

A infecção por *Pb* se dá através da via respiratória, pela inalação de propágulos de *Pb* que alcançam o parênquima pulmonar. Transformam-se em leveduras no tecido do hospedeiro, adaptadas à temperatura corporal; sendo assim, não transmissível de pessoa a pessoa (FRANCO et al., 1987; MEDOFF; PAINTER; KOBAYASHI, 1987). A partir dos pulmões, o fungo pode se disseminar por todo o corpo, causando lesões nos órgãos internos e na pele. As infecções podem ocorrer, acidentalmente, por inoculação direta (FRANCO et al., 1987).

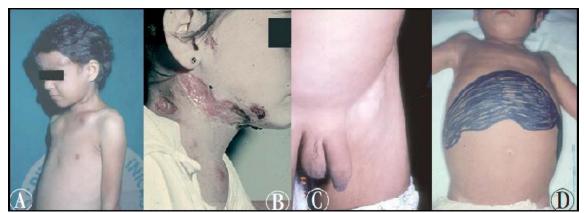
Uma vez no organismo, o fungo passa a se multiplicar por brotamento múltiplo. O fungo, na forma de levedura, pode ser eliminado por células do sistema autoimune, ou persistir e se multiplicar produzindo lesão tecidual. A evolução e as consequências da infecção vão depender da interação de fatores relacionados ao fungo, como virulência, composição antigênica e a resistência do hospedeiro (CALICH et al., 1985).

A PCM apresenta-se sobre duas formas clínicas distintas, a infecção e a doença. A infecção ocorre de forma assintomática, geralmente, em indivíduos saudáveis que residiram, em alguma época, em áreas endêmicas, ou que tenham lesões residuais inativas de *Pb*. Estes indivíduos possuem reatividade ao teste intradérmico com paracocciodiodina (RESTREPO, 1993).

Clinicamente, as lesões podem manifestar-se em diferentes formas, ou permanecerem assintomáticas no indivíduo infectado por longos períodos de tempo. Agrupando-se os sinais e os sintomas da PCM, a doença pode apresentar-se sob a forma de dois padrões principais:

- a) Forma aguda ou juvenil (subaguda): normalmente severa, de evolução rápida, afetando, predominantemente, jovens de ambos os sexos; compromete, principalmente, células do sistema retículoendotelial;
- b) Forma crônica ou adulta: com instalação lenta, gradual, observada, com maior frequência, em indivíduos adultos (entre 30 a 50 anos); as mulheres são menos afetadas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A forma aguda ou subaguda (juvenil) representa cerca de 3 a 5 % dos casos, com incubação por curtos períodos (semanas a meses). Afeta, principalmente, crianças e jovens de ambos os sexos, consistindo na forma mais grave e com pior prognóstico. Esta forma afeta, principalmente, o sistema retículoendotelial e a principal manifestação clínica é a síndrome linfoproliferativa febril. Esta síndrome caracteriza-se por um desenvolvimento rápido, com envolvimento osteoarticular e de órgãos como fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea (Figura 5) (SINDRIN; MOREIRA, 1999).



**Figura 5 -** Crianças apresentando a forma aguda da paracoccidioidomicose (PCM). a) Presença de abscessos em regiões frontal e clavicular, resultantes do acometimento osteoarticular; b) Criança do sexo feminino apresentando importante acometimento linfático abscedado; c) Linfoadenomegalia inguinal; d) Acometimento linfático abdominal com ascite e hepatoesplenomegalia

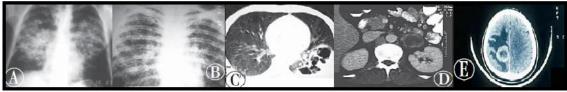
Fonte: Shikanai-Yasuda et al. (2006).

A forma crônica (adulta), representando 90 % dos casos, possui longo período de incubação (meses a anos), surgindo, com maior frequência, em homens, com idade superior a 30 anos (Figura 6). A forma crônica apresenta alta frequência de envolvimento pulmonar; se desenvolve a partir do complexo primário ou da reativação de um foco quiescente. Pode permanecer na forma

unifocal (localizada), ou sofrer disseminação para outros órgãos, ou tecidos na forma multifocal. Assim, causa lesões secundárias em membranas, mucosas, pele, linfonodos, glândulas adrenais e encéfalo (Figura 7) (BRUMMER et al., 1993; SANTO, 2008).



**Figura 6 -** Aspectos clínicos da forma crônica da paracoccidioidomicose (PCM). (a) Lesões cutâneas papulosas e úlcero-crostosas em face, resultantes de disseminação hematogênica; (b) Acometimento perioral e mentoniano; (c) Linfonodos cervicais e submandibulares fistulizados; (d) Lesão vegetante com bordos irregulares em região perianal Fonte: Shikanai-Yasuda et al. (2006).



**Figura 7 -** Exames de imagem (Raios-X e Tomografia Computadorizada), demonstrando o envolvimento pulmonar e do Sistema Nervoso Central na paracoccidioidomicose a) Raios-x simples mostrando imagem em "asa de borboleta"; b) Opacidades nodulares e micronodulares difusas; c) Tomografia de pulmão apresentando múltiplas cavitações; d) Aumento bilateral de adrenais; e) O envolvimento do sistema nervoso central evidencia imagens de aspecto hipodenso e com realce de contraste em forma de anel Fonte: Shikanai-Yasuda et al. (2006).

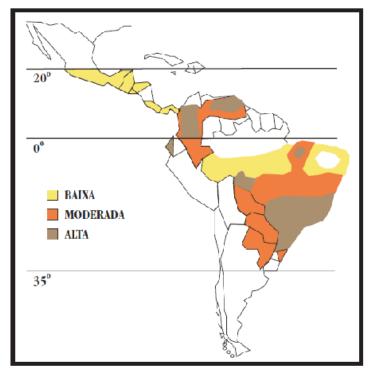
A inserção da doença como um grave problema de saúde pública reside no fato de acometer, principalmente, homens na fase mais produtiva da vida; visto que 84,75 % dos casos ocorrem entre 30 e 59 anos, atingindo, principalmente, trabalhadores rurais (COUTINHO et al., 2002).

### 2.2.1 Epidemiologia

A PCM é considerada uma micose restrita à América Latina, com distribuição geográfica limitada do México até a Argentina (COUTINHO et al., 2002). Mesmo nesta área endêmica, a distribuição da micose é heterogênea. Estima-se que exista, aproximadamente, 10 milhões de pessoas infectadas, com

o Brasil abrangendo cerca de 80 % dos casos relatados, seguido da Venezuela, Colômbia e Argentina (RESTREPO; MCEWEN; CASTANHEDA, 2001).

A maior incidência de casos no Brasil ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (COUTINHO et al., 2002). Entretanto, esse mapa de distribuição (Figura 8) tem se modificado ao longo das últimas décadas; pelo aumento do número de pacientes diagnosticados com PCM nas regiões Centro-Oestes e Norte. Provavelmente, este fato ocorreu em razão da descentralização do diagnóstico; e de fatores provenientes da abertura de novas fronteiras agrícolas, como desmatamento, ruralização e revolvimento do solo (RESTREPO; MCEWEN; CASTANHEDA, 2001).



**Figura 8 -** Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose. Cada cor representa a intensidade de incidência Fonte: Shikanai-Yasuda et al. (2006).

Em áreas endêmicas da doença, a incidência estimada é de, aproximadamente, um a três casos clínicos para cada 100 mil habitantes por ano (COUTINHO et al., 2002). Já a taxa de mortalidade situa-se em cerca de 1,45 para cada um milhão de habitantes, sendo considerada a oitava causa de

mortalidade entre as doenças infectoparasitárias crônicas. A taxa de letalidade situa-se entre dois a 23 % (SANTO, 2008).

A incidência da PCM é desigual entre os sexos, com o predomínio de 80 a 90 % dos casos do sexo masculino, chegando à relação de 15 homens para uma mulher infectada em áreas endêmicas. Porém, estes dados não apresentam relação com o grau de exposição dos mesmos, uma vez que estudos indicam que ambos os sexos apresentam contato similar com o patógeno (RESTREPO et al., 1984).

Essa discrepância pode ser justificada devido à existência de receptores para estrogênio na membrana citoplasmática do *Pb*. Altas concentrações de estrógeno funcionam como inibidores dose-dependentes, suprimindo a conversão à forma parasitária do fungo (RESTREPO et al., 1984; ARISTIZÁBAL et al., 1998).

Admite-se que o solo seja o reservatório natural do *Pb*, tornando os trabalhadores rurais os mais atingidos por este fungo, devido ao contato direto. Estes trabalhadores, geralmente, estão inseridos em estratos sociais de menor nível socioeconômico; muitas vezes, são levados a uma menor preocupação com os sintomas, diagnóstico tardio e pior prognóstico (MARTINEZ; MOYA, 1992). Estudo dirigido por Espunhardi et al. (2010) verificaram que 86 % dos pacientes com PCM eram moradores da zona rural e 14 % atualmente moram na zona urbana, mas moraram ou tiveram contato com a zona rural. No entanto, o fungo pode afetar também, habitantes de áreas suburbanas e até áreas urbanas, em diferentes profissões (BITTENCOURT; OLIVEIRA; COUTINHO, 2005).

A predisposição de indivíduos com índices de alcoolismo em adquirir micoses vem sendo observada para fungos como candidíase, criptococose e esporotricose. O alcoolismo, desnutrição e tabagismo podem estar ligados à patogenia da doença. Martinez e Moya (1992) afirmaram que mais de 50 % dos pacientes diagnosticados com PCM faziam uso de bebidas alcoólicas diariamente. Já o tabagismo aparece com uma frequência de 90 % nos pacientes com a doença (PANIAGO et al., 2003).

A ocorrência de PCM em crianças varia de 2 a 3 casos da doença para cada mil casos em adultos. Essa baixa ocorrência em crianças deve-se, provavelmente, ao fato das crianças entrarem menos em contato com o fungo em suas atividades diárias; e ao longo período de latência da PCM, de tal modo que a infecção adquirida na infância manifestar-se-ia, como doença, anos mais tarde (MARTINEZ, 2006). Apesar de, aproximadamente, 10 a 50 % dos habitantes de zonas endêmicas serem expostos ao agente da PCM, apenas uma pequena parte desenvolve alguma manifestação clínica da doença (FAVA; FAVA-NETTO, 2006).

As reais prevalência e incidência da PCM não são possíveis de ser estabelecidas com dados totalmente precisos, em razão desta micose não ser uma doença de notificação compulsória. Os dados disponíveis são obtidos a partir de publicações da literatura e registros hospitalares, os quais não representam o número total de pessoas infectadas (PANIAGO et al., 2003; CAMPOS et al., 1998).

# 2.2.2 Diagnóstico

Existem diversas metodologias para o diagnóstico da PCM, mas o método considerado padrão-ouro é a identificação de elementos fúngicos de *Pb*; através de técnica direta, com exame a fresco de espécimes clínicos, como escarro análise de pus ou biópsia tecidual (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Dentre as técnicas sorológicas ou indiretas, a imunodifusão (ID) persiste como a mais utilizada principalmente pela simplicidade do teste, pela boa confiabilidade nos resultados e pela ausência da necessidade de equipamentos de alto custo. Outras técnicas sorológicas têm sido utilizadas em centros de referência, como a de contraimunoeletroforese (CIE), *Enzime Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), e *Immunoblotting* (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

### 2.2.3 Tratamento

Os medicamentos antifúngicos possuem variados mecanismos de ação que afetam tanto a síntese de componentes da membrana como o ergosterol, afetando a permeabilidade da membrana como interfere nos mecanismos de síntese de ácidos nucléicos - comprometendo o crescimento e a divisão celular (KATHIRAVAN et al., 2012). Os fármacos que comprometem a integridade da membrana celular dos fungos são fungicidas, já os que interferem no desenvolvimento e na divisão celular fúngica são tidos como fungistáticos (HAWSER et al., 1999).

O tratamento da PCM é feito à base de sulfamídicos e/ou fármacos antifúngicos. As drogas utilizadas com mais frequência são: itraconazol, cetoconazol, sulfametoxazol, trimetropim e anfotericina B (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O medicamento anfotericina B, composto isolado do ascomiceto *Streptomyces spp*, foi o primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento de pacientes com micoses profundas, no ano de 1958; sendo utilizado nos casos mais graves da PCM. Tal droga é nefrotóxica e apresenta muitos efeitos colaterais adversos, o que implica em longos períodos de internamento hospitalar para a sua utilização. É administrado por via endovenosa e atua mediante ligação ao ergosterol da membrana plasmática da célula fúngica; por sua vez, forma poros que altera a sua permeabilidade, o que leva à morte do fungo (LACAZ; SAMPAIO, 1958; CAMPOS et al., 1984).

Os fármacos da classe dos azólicos atuam bloqueando a síntese de ergosterol, o principal lipídio da membrana plasmática da célula fúngica; a síntese de ácidos nucléicos, o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA); e a organização dos microtúbulos. Interferem tanto no controle osmótico da célula, quanto no processo de divisão celular. Os três representantes dessa classe de medicamentos têm sido utilizados com sucesso no tratamento da PCM: cetoconazol, itraconazol e fluconazol (HABIF, 2005; MARTINEZ, 2006).

O medicamento itraconazol é a melhor opção terapêutica para o controle das formas leves e moderadas da PCM em menor período de tempo. Além disso,

apresenta facilidade na administração oral, em dose única, menor taxa de recidivas e reações adversas, os quais favorece a adesão ao tratamento; é eleito como tratamento de primeira escolha na atualidade (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Estudo realizado por Granzoto et al. (2013) demonstrou que o itraconazol, comparado a outros antifúngicos, obteve melhores resultados na diminuição da carga fúngica dos tecidos; e aumento à sobrevivência de ratos e camundongos infectados por *Pb*.

A duração do tratamento depende do grau de imunossupressão e desnutrição do paciente, da virulência do inóculo de *Pb* e do antifúngico utilizado (ARAÚJO et al., 2009). Porém, o Consenso Brasileiro de PCM descreveu esquemas de tratamento da PCM (formas leves a moderadas), as quais variam de seis a 12 meses para a forma leve e de 12 a 24 meses para a forma moderada (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Os principais desafios terapêuticos da PCM são a longa duração e a alta frequência de recaídas, sequelas e efeitos colaterais medicamentosos (MENDES, 2009).

Como para diversas outras infecções fúngicas, o tratamento medicamentoso para PCM persiste como desafio não totalmente resolvido. Para tanto, há a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos, bem como terapias alternativas ou complementares as existentes (ALMEIDA et al., 2012).

Uma terapia alternativa que tem sido indicada para o tratamento de infecções localizadas (bacterianas e fúngicas) com resistência aos antibióticos convencionais, nos últimos anos, é a TFD (TEGOS et al., 2008; ROSA et al., 2015).

# 2.3 Terapia fotodinâmica (TFD)

A TFD refere-se à destruição molecular, por luz visível, em presença de um FS. Quando irradiado, por uma luz visível de comprimento de onda adequado e na presença de oxigênio celular, leva à produção de EROS. Este, por sua vez, resulta em uma sequência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que

geram produtos fototóxicos danosos à célula-alvo, causando a morte do microorganismo que se encontra ligado ao FS (PERUSSI, 2007).

Para tal terapia ser eficaz, três componentes são essenciais: a fonte de luz, o FS e o oxigênio. O FS deve ser biologicamente estável e eficaz fotoquimicamente, ou seja: tenha características fotofísicas favoráveis, como alto rendimento quântico de formação de tripletes, de oxigênio singlete e pequena constante de supressão destes; possua absorção na janela fototerapêutica (600-800 nm); seja solúvel em meio fisiológico, o que facilitará a aplicação da droga; tenha farmacocinética favorável e fácil eliminação pelo organismo, evitando fotossensibilidade prolongada; deve apresentar o mínimo de toxicidade para as células normais; deve ser inerte na ausência de luz; e a sua administração deve ser localizada (BONNETT; MARTINEZ, 2001; UCHOA; BAPTISTA, 2007). Um FS frequentemente utilizado é o AM (Figura 9), a qual consiste numa molécula plana, catiônica, anfipática e tricíclica, com um átomo de nitrogênio quaternário. Esta molécula apresenta eficiência fototóxica (SOUSA et al., 2010; LYON et al., 2011).

Figura 9 - Fórmula estrutural do azul de metileno (AM)

Esta terapia possui vantagens e especificidade elevada, principalmente devido à aplicação exata da luz, à natureza relativamente não invasiva e a menor quantidade de efeitos secundários (VAN RIJT; SADLER, 2009). A produção de EROS depende da concentração do FS usado na TFD, da dose de luz irradiada e da localização do FS no tecido-alvo (TOREZAN; NIWA; FESTA, 2009).

O desenvolvimento de resistência por microorganismos à TFD é um evento improvável de ocorrer, uma vez que esta é considerada um processo típico de interação multialvo. Esta é uma das diferenças entre a TFD e a maioria

dos agentes antifúngicos convencionais. Numerosos estudos demonstraram que TFD é altamente eficaz na destruição de fungos *in vitro* (LAMBRECHTS; AALDERS; MARLE, 2005; LYON et al., 2011; FREIRE et al., 2015).

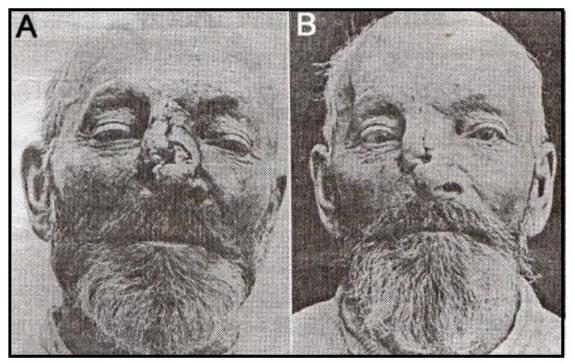
A TFD antimicrobiana tem emergido como um importante coadjuvante na inativação de vários microorganismos patogênicos, incluindo isolados clínicos resistentes às drogas (COSTA et al., 2011). A resistência microbiana aos antifúngicos é um fenômeno em crescimento, o que faz da TFD uma ferramenta promissora, uma vez que a mesma induz danos na membrana, no DNA e nas mitocôndrias (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; MIMA et al., 2012).

### 2.3.1 História da terapia fotodinâmica

O estudo do processo fotodinâmico teve início com um viés na compreensão da fisiopatologia da porfiria. Esta doença é decorrente de falhas genéticas ou adquiridas, as quais levam ao acúmulo de pigmentos porfirínicos nas mucosas e derme. Por sua vez, os pigmentos quando expostos à luz desencadeiam processos fotobiológicos cáusticos e, consequentemente, erupções (UCHOA; BAPTISTA, 2007).

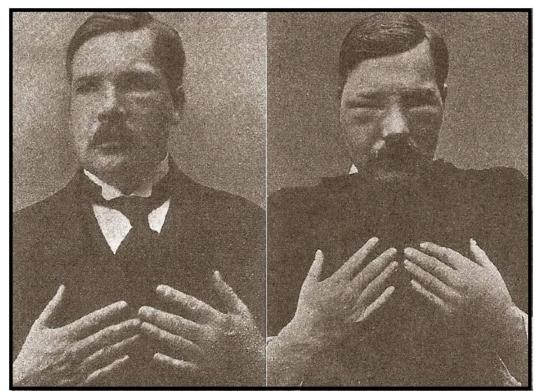
As primeiras aplicações da TFD tiveram origem em civilizações antigas, sendo que estas utilizavam o processo fotodinâmico para tratar doenças de pele, como o vitiligo. Porém, o desenvolvimento da fase moderna tem como marco os estudos realizados na universidade de Munique por Oscar Raab. Ele estudou a ação fotodinâmica na morte do *Paramecium* em 1900 e Friedrich Betz Meyer com hematoporfirina IX, em 1912 (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

Foram Tappeiner e Jesionek, em 1903, que fizeram a primeira aplicação clínica, através da utilização da eosina, no tratamento de carcinomas humanos. Em 1905, eles descreveram os resultados do primeiro tratamento, em seis pacientes com câncer de pele facial (Figura 10). Este tratamento foi realizado usando uma solução de 1 % de eosina e exposição à luz solar. Após um período de 12 meses de tratamento, quatro dos seis pacientes apresentaram remoção total dos tumores, enquanto os outros dois apresentaram remoção parcial (STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998; UCHOA; BAPTISTA, 2007).



**Figura 10 -** Paciente com câncer de pele tratado por H. Tappeiner e H. Jesionek, com solução de eosina a 1% em 1905. a) Antes do tratamento; b) Depois do tratamento Fonte: Uchôa e Baptista (2007).

Em 1909, Hasselbach demonstrou que a fotorreação era dependente de oxigênio. Em 1908, foi o início do primeiro experimento em que se evidenciava a fototoxidade com hematoporfirina. Neste estudo, o composto foi injetado de forma intravenosa em cobaias, com subsequente exposição à luz solar. O resultado foi a apresentação de reações dependentes do FS e da incidência luminosa. Foi hipotetizado que o efeito primário da TFD estava associado com os danos de vasos periféricos. No entanto, a correlação entre os elementos básicos da TFD foi comprovada, em definitivo, em 1912, por Friedrich Betz Meyer, já que neste experimento Meyer autoinjetou 200 mg de hematoporfirina dissolvida em hidróxido de sódio a 0,1 mol/L. Durante os dois primeiros dias, Meyer manteve-se ao abrigo da luz e não sofreu nenhum processo inflamatório. Ao terceiro dia, se expôs à luz solar e observou processos inflamatórios (Figura 11). Como resultado da incidência luminosa, ocorreu formação de edema e hiperpigmentação, sendo estes sintomas cessados após ausência do estímulo luminoso. Com o experimento, Meyer demonstrou de forma definitiva que a ação era dependente da luz e de um FS (NUÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).



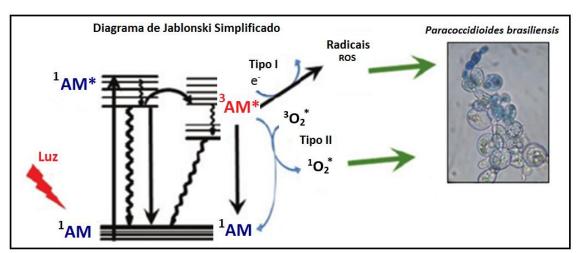
**Figura 11 -** Friedrich Betz Meyer antes da aplicação de hematoporfirina IX (à esquerda). Meyer três dias depois da aplicação de hematoporfirina IX, com um dia de exposição à luz solar (à direita) Fonte: Uchoa e Baptista (2007).

Desta forma, o autor encerrou, de forma inequívoca, a hipótese dos efeitos serem atribuídos à ação da luz, ou meramente químicos do pigmento utilizado (NUÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

### 2.3.2 Mecanismos de ação

A TFD combina um FS e uma fonte de luz para induzir uma reação fototóxica, a qual faz com que ocorra a morte da célula. O oxigênio molecular é necessário para desencadear a reação fototóxica e, assim, para que ocorra a ação fotodinâmica. Durante a TFD, a luz emitida da fonte, em comprimento de onda adequado, irá excitar o FS, o qual gerará dois tipos de reações, o tipo I e o tipo II. Na reação de tipo I, ocorre a transferência de elétrons entre o FS e as moléculas biológicas, resultando na produção de radicais livres, tais como: superóxido; hidroperóxidos; radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As reações do tipo II são resultantes de uma transferência de energia, a qual

leva à excitação do FS para um estado triplete (Figura 12) (GAD; ZAHRA; FRANCIS, 2004; BALTAZAR et al., 2013). O oxigênio singlete é um poderoso oxidante que reage com vários componentes celulares, resultando em dano celular, tais como a necrose ou a apoptose (PLAETZER et al., 2009; OBSTOY et al., 2016).



**Figura 12 -** Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismo de ação em TFD. Mecanismo Tipo I (EROS) e Tipo II (Oxigênio Singlete) de fotossensibilização, sendo: ¹AM no estado fundamental; ¹AM\* primeiro estado excitado singleto, cruzamento intersistema; e ³AM\* primeiro estado tripleto. Fonte: Adaptado pelo autor (2017)

Moléculas reativas de oxigênio causam danos irreparáveis aos componentes celulares, levando à morte celular. A escolha da fonte de luz deve ser baseada na banda de absorção do FS. Por outro lado, a eficácia clínica de TFD depende da dosimetria complexa, a qual está associada com fatores, tais como: dose total de luz ou tempo de exposição à luz; e modo de entrega da luz (AGOSTINIS; BERG; CENGE, 2011; MACIEL et al., 2016).

O mecanismo de inativação do fungo na TFD é completamente diferente do que à associada com agentes antifúngicos. A TFD produz radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, tal como o oxigênio singlete (¹O₂), o que conduz ao dano celular, à lise da membrana e à inativação de proteínas. Embora a maioria dos agentes antifúngicos iniba a biossíntese de ergosterol, principal lipídio nas membranas dos fungos, as espécies reativas de oxigênio, geradas por TFD, promovem danos na parede celular e na membrana. Isto permite que o FS se transloque para dentro da célula. Uma vez no interior da célula, as

espécies oxidantes geradas pela excitação da luz causa fotodanos às organelas celulares internas e, por consequência, a morte celular (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; MACIEL et al., 2016).

A análise do EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) gerados após TFD reforça a afirmação de que, independente do microrganismo, a TFD reduz a viabilidade celular de uma forma não específica, impedindo o surgimento de cepas resistentes a essa modalidade de tratamento (CALZAVARA et al., 2012; BALTAZAR et al., 2013, 2015).

Atualmente, muitos FS's estão sendo testados e utilizados como agentes antimicrobianos. Como as membranas de micro-organismos são sempre carregadas negativamente, o FS carregado positivamente incorpora ou penetrara de forma mais eficiente, sendo mais eficazes na TFD. O AM, FS carregado positivamente, é um dos mais utilizados no trabalho experimental e em aplicações clínicas (TARDIVO et al., 2005; NUÑEZ et al., 2015).

Akilov et al. (2006), em um estudo *in vitro*, pesquisaram a influência da carga elétrica molecular e da estrutura do FS na resposta fototóxica na *Leishmania*. A atividade fotodinâmica dos FS's com carga elétrica positiva (catiônicos), como o AM, foi maior aos com carga elétrica negativa (aniônicos). Este fato se dá em razão da carga elétrica negativa da membrana do parasita, ou seja, os FS's catiônicos, os quais pela forte interação seriam mais eficazes aos com carga elétrica negativa. Esta carga elétrica negativa é resultado de componentes da membrana, como o lipofosfoglicano (LPG).

O AM, uma molécula anfifílica, catiônica e fenotiazínica, com um espectro de absorção forte na região do vermelho, é um marcador celular potente. Após a interação com a membrana, o AM se internaliza, apresentando afinidade pelas mitocôndrias. Ele tem sido empregado em uma variedade de aplicações, incluindo a TFD (HE et al., 2009). O elevado rendimento quântico do AM na geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, além de ser excitável na janela terapêutica (600-900 nm), faz com que esse FS tenha uma boa atuação em TFD. Por outro lado, os efeitos catalíticos de nicotinamida-adenina-dinucleótideo (NADH) e fosfato de nicotinamida adenina dinucleótideo (NADPH) de transformar o AM ao leuco-AM, em condições fisiológicas, tornam a utilização clínica do AM dificultada. Isto

porque há uma propensão para uma rápida alteração química, quando aplicado sistemicamente (TARDIVO et al., 2005; MOREIRA, 2012; KARIMINEZHAD; HABIBI; MIRZABABAYI, 2015). O AM é geralmente convertido, por aceitar elétrons de NADH/NADPH no ambiente biológico, formando azul leucometileno incolor, que tem atividade fotodinâmica insignificante (TANG et al., 2008; SEONG; KIM, 2015).

O AM é um composto metacromático, o que significa que o seu espectro de absorção é dependente da concentração. Tal FS forma dímeros ou agregados, diretamente proporcional à concentração do corante. A dimerização aumenta a força iônica e pode, também, se alterar na presença de interfaces carregadas, dependendo da relação entre o corante e a interface. Monômeros de AM e dímeros apresentam comportamentos fotoquímicos diferentes. Agregados de AM inclinam-se para reações de transferência de elétrons (tipo I), enquanto que os monômeros tendem a envolver-se em reações de transferência de energia (tipo II) (SEVERINO et al., 2003; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003; NUÑEZ et al., 2015).

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas, Pesquisa e Extensão (LACEPE) e Laboratório de Microbiologia Experimental (LME) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), em Cascavel-PR; e no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), em São Paulo-SP.

### 3.1 Suspensão de Pb

Foram utilizadas células leveduriformes de *Pb* da cepa 18 (*Pb*18), cultivadas em meio de cultura sólido à base de ágar de infusão de cérebro e coração (BHI), enriquecido com soro fetal bovino, no Laboratório de Microbiologia Experimental da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, para a realização da suspensão de *Pb*.

A suspensão celular foi obtida fazendo-se o uso de solução salina tampão fosfato (PBS) esterilizada, juntas da qual foram adicionadas quantidades aleatórias de massa de Pb, em recipientes de 3 mL. Posteriormente, foram homogeneizadas por agitador de frascos, durante 60 s, em 300 rpm e contadas em câmara de contagem de Neubauer. Aguardou-se cinco minutos para a sedimentação, antes de se realizar a contagem. Foram obtidas as concentrações celulares das suspensões, pelo cálculo do número médio de células nos quadrantes da câmara, dividido por quatro, multiplicado pelo fator de diluição multiplicado por 10.000. Após a contagem, foram feitas diluições, até a obtenção de diluições contendo o número de leveduras viáveis a serem utilizadas no experimento. As suspensões foram submetidas ao teste de viabilidade e somente aquelas com resultado acima de 90 % foram utilizadas no estudo. O teste de viabilidade celular foi realizado pelo método do azul de tripan, um corante vital aniônico (carga elétrica negativa), que devido sua carga o mesmo não interage com as células, que também possuem carga negativa, a menos que a membrana esteja danificada. Desta forma, as células que excluem o corante são teoricamente viáveis. Já as que permanecem coradas estão inviáveis (FRESHNEY, 1987). Foi retirada uma pequena alíquota de cada suspensão

celular, na qual foi adicionado azul de *tripan* (na proporção 1:1, para posterior contagem ao microscópio óptico.

## 3.2 Solução de AM

A solução estoque de AM de 0,01 Molar, foi realizada pela solubilização do AM em álcool etílico, a qual foi diluída em PBS posteriormente, de acordo com a concentração desejada.

#### 3.3 Teste de citotoxicidade do AM

A realização de testes para a avaliação da citotoxicidade do corante AM em diferentes concentrações ocorreu de acordo com os procedimentos a seguir: a) Preparo da suspensão de *Pb* contendo 10<sup>5</sup> células leveduriformes por mL e solução de AM nas concentrações descritas a seguir; b) Preparo de placas de Petri, contendo meio de cultura sólido à base de ágar, de infusão de cérebro e coração (BHI), enriquecido com soro fetal bovino.

O fungo foi incubado na solução do FS por cinco minutos, nas concentrações de: 12,5 μM (0,125 % álcool etílico); 25 μM (0,25 % álcool etílico); 50 μM (0,5 % álcool etílico) e 150 μM (1,5 % álcool etílico). Decorrido o tempo de incubação, a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por três minutos. Em seguida, foi retirado o sobrenadante e prosseguiu-se à lavagem com solução salina, repetindo o procedimento por três vezes, até a suspensão resultante tornar-se límpida. Isso garantiu que fosse retirado o corante não incorporado ao micro-organismo.

Na sequência foi retirada uma alíquota de 50 µL, semeada em placa de Petri em triplicata, as quais foram mantidas em estufa a 36 °C por dez dias. Posteriormente, foi avaliado o número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) resultantes (Figura 13).

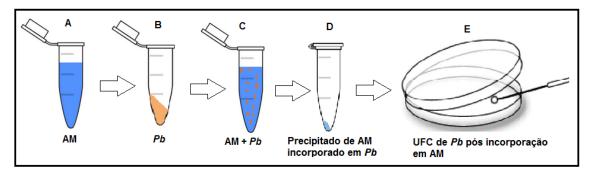


Figura 13: Desenho experimental do teste de citotoxicidade do AM na ausência de irradiação com luz. Onde A representa o corante AM, B suspenção celular de *Pb*, C suspensão celular de *Pb* incubado em AM, D precipitado pós lavagem de *Pb* incorporado em AM e E cultura de *Pb* pós incorporação de AM.

Fonte: : Adaptado pelo autor a partir de: http://www.clker.com/clipart-closed-eppendorf-tube-with-pellet.html, acesso dia 22 mar. 2018.

### 3.4 Espectros de absorção

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro (ultravioleta visível) Shimadzu (UV-2401-PC), em cubetas de quartzo, com caminho óptico de um centímetro. Foi preparada suspensão contendo o microorganismo, em seguida, incubada em solução fisiológica, contendo o corante na concentração de 25 µM, em diferentes tempos.

Decorrido o período, a solução foi centrifugada a 3000 rpm por dois minutos, retirado o sobrenadante e colocado em cubeta de quartzo para análise no espectrofotômetro. O ensaio realizado em triplicata.

#### 3.5 Testes de fototoxicidade

A avaliação da fototoxicidade se deu após leveduras de *Pb* serem irradiadas por luz *laser* na ausência e na presença de FS exógeno. Foi feito um preparado de suspensão de *Pb*, padronizado em câmara de Neubauer, a uma concentração de 10<sup>4</sup> células/mL.

Foi realizado o preparo de placas de Petri, contendo meio de cultura a base de ágar, de infusão de cérebro e coração (BHI) enriquecido com soro fetal bovino. Foi realizado o preparo de solução salina de AM a 25 µM, tendo por base a solução estoque solubilizada em álcool etílico.

Em seguida, em tubos tipo *eppendorf*, foi realizada a irradiação das leveduras, na ausência de FS exógeno. Para isso, se utilizou equipamento de *laser* modelo Laserpulse (IBRAMED, Amparo, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm, operando a uma potência de 30 mW, área de emissão de 0,04 cm<sup>2</sup>. As células foram irradiadas nas doses de 20 J (por 40 s); 40 J (por 80 s) e 100 J (por 200 s).

Após a irradiação, o conteúdo foi centrifugado a 3000 rpm. Em seguida, foi retirado o sobrenadante e colhida uma alíquota de 50 μL a qual foi semeada em placa de Petri, em triplicata, previamente preparada. Estas foram mantidas em estufa, a 36 °C, por 10 dias, nas quais posteriormente foi realizada a avaliação do número de UFC/mL formadas (Figura 14).

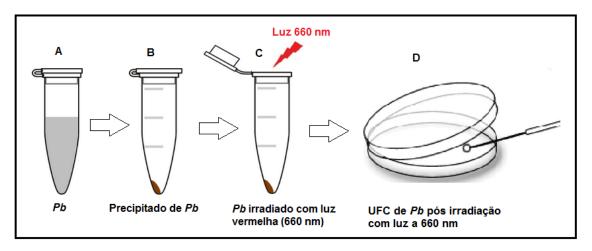


Figura 14: Desenho experimental do teste de fototoxicidade da irradiação com luz a 660 nm. Onde A representa leveduras de Pb, B precipitado de Pb, C irradiação do precipitado de Pb com luz vermelha a 660 nm e D UFC de Pb pós irradiação a 660 nm.

Fonte: : Adaptado pelo autor a partir de: http://www.clker.com/clipart-closed-eppendorf-tube-with-pellet.html, acesso dia 22 mar. 2018.

Em seguida, as leveduras foram irradiadas na presença do AM, constituindo assim, grupos de TFD. Para isso, as células foram incubadas em solução contendo o corante AM, na concentração de 25 μM (0,25 % álcool etílico), por cinco minutos. Decorrido o tempo de incubação, a solução contendo FS + *Pb* passou por um processo de centrifugação, a 3000 rpm, por três minutos. Em seguida, era retirado o sobrenadante e realizada a lavagem com solução salina, por três vezes, para a retirada do corante não incorporado ao fungo.

Posteriormente, em tubos tipo *eppendorf*, foi realizada a irradiação com *laser* modelo Laserpulse (IBRAMED), operando no comprimento de onda de 660 nm, a uma potência de 30 mW e área de emissão de 0,04 cm², nas seguintes doses: 20 J (por 40 s), 40 J (por 80 s) e 100 J (por 200 s). Logo após a irradiação, foi coletada uma alíquota de 50 µL da solução, a qual foi semeada em placa de Petri, em triplicata. Estas foram mantidas em estufa, a 36 °C, por 10 dias, para posterior avaliação do número de UFC/mL a serem comparadas com o controle (Figura 15).

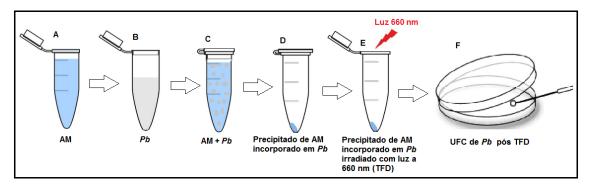


Figura 15: Desenho experimento do teste de fototoxicidade da irradiação com luz a 660 nm associado ao AM (TFD). Onde A representa solução de AM a 25  $\mu$ M (0,25 % álcool etílico), B suspensão de leveduras de Pb, C suspensão de Pb incubado em AM, D precipitado pós lavagem de AM incorporado em Pb, E precipitado de AM incorporado em Pb irradiado com luz vermelha a 660 nm (TFD) e F UFC de Pb pós TFD.

Fonte: Adaptado pelo autor a partir de: http://www.clker.com/clipart-closed-eppendorf-tube-with-pellet.html, acesso dia 22 mar. 2018.

### 3.6 Teste de incorporação e internalização do FS

A incorporação e internalização do FS (AM) no *Pb* foi determinada por microscopia por fluorescência com resolução confocal. Foram preparadas suspensões contendo o micro-organismo, em seguida incubados em solução contendo o corante na concentração de 25 μM, por cinco minutos. Decorrido esse período, a suspensão foi lavada por três vezes com solução fisiológica, para que o FS não internalizado fosse eliminado. Para obtenção das imagens, foi preparado um esfregaço delgado com a suspensão contendo o fungo, em lâmina de microscopia, sobre a qual foi colocada uma lamínula. Para a obtenção

das imagens, foi utilizado microscópio de Fluorescência Confocal LSM 510 da marca Zeiss com objetiva de 100 vezes.

# 3.7 Caracterização do oxigênio singlete (1O2)

O ¹O₂ foi caracterizado através do seu decaimento no infravermelho próximo (a 1270 nm) e o espectro de emissão registrado de 1200 a 1320 nm. As medidas diretas foram realizadas através dos transientes de emissão em 1274 nm, em um espectrofluorímetro resolvido no tempo (Edinburgh Instruments, Scotland) com a detecção no infra-vermelho próximo através de uma fotomultiplicadora modelo R5509 da Hammamatsu (Japão). A excitação da amostra foi feita por um laser Nd-YAG com um sistema OPO (Rainbow, Quantel, USA).

#### 3.8 Tratamento dos dados

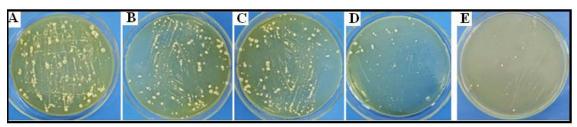
As variáveis numéricas foram tabuladas em plataforma Excel (Microsoft Office). Posteriormente, foram analisadas por testes estatísticos de Anova e Tukey Multiple Comparison Test, utilizando o software BioEstat 5.0. O nível de significância foi de 5 % com valor fixado em *p-value* < 0,05. Para a plotagem dos gráficos ilustrativos dos resultados, utilizou-se o software OriginPro 8.5. Já para o processamento das imagens obtidas por microscopia confocal, utilizou-se o software LSM Image Browser.

# **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados são apresentados por tópicos para tornar didática a apresentação.

### 4.1 Teste de citotoxicidade

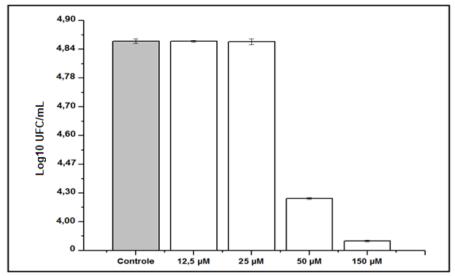
O crescimento de leveduras de *Pb*, no teste de citotoxicidade, após serem incubadas em AM em diferentes concentrações, sem serem irradiadas por uma fonte de luz, estão ilustradas nas imagens da Figura 16.



**Figura 16 –** Unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) obtidas ao teste de citotoxicidade do azul de metileno (AM), quando incubado em solução contendo *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*). a) Controle (leveduras não incubadas em AM); b-e) Fungo incubado em solução de AM à 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 150  $\mu$ M, respectivamente Fonte: Dados do autor (2017).

A placa A representa o controle; em B, C, D e E, o desenvolvimento do fungo quando incubado em soluções de AM, a 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 150  $\mu$ M, respectivamente.

O número de unidades formadoras de colônia de *Pb* que se desenvolveram no ensaio de citotoxicidade do AM, em diferentes concentrações, estão representadas graficamente na Figura 17.



**Figura 17 -** Representação gráfica da citotoxicidade de suspensão contendo *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) + azul de metileno (AM), em diferentes concentrações. O resultado aponta redução do número de UFC/mL nas concentrações de 50 e 150  $\mu$ M (p < 0,01)

Fonte: Dados do autor (2017).

Não se observou diferença significativa em relação ao controle e entre si, as concentrações de AM de 12,5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M. Já para as soluções de AM a 50  $\mu$ M e 150  $\mu$ M houve diferenças significativas, ao serem comparadas ao controle (leveduras não incubadas no AM). Essas concentrações, quando comparadas entre si, também apresentaram diferença significante (p < 0,01). Verificou-se, também, uma redução no desenvolvimento de UFC/mL de 95,4 % e 75,1 %, quando o fungo foi incubado a 150  $\mu$ M e 50  $\mu$ M, respectivamente.

O ensaio foi realizado com o intuito de determinar a toxicidade do AM nas leveduras de *Pb*. Utilizou-se para isso, diferentes concentrações de AM, objetivando identificar as concentrações não tóxicas ao fungo, quando não irradiadas por uma fonte de luz. Uma vez que o FS não deve apresentar citotoxicidade na ausência de luz, este gera oxigênio singlete quando irradiado com luz em comprimento de onda adequado (CELLI et al., 2010; SEONG et al., 2015).

Diversos estudos na literatura avaliaram a toxicidade de corantes FS na ausência de luz, relatando a ausência de efeitos citotóxicos (ZOLFAGHARI et al., 2009; KASHEF; ABADI; DJAVID, 2012; VILELA et al., 2012). Esses resultados vão de encontro ao observado no presente estudo.

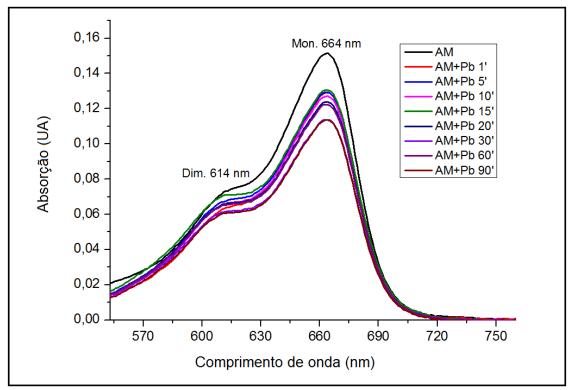
Porém, Rosa et al. (2015) demonstraram em seu estudo que o uso isolado de AM, na concentração de 0,1 mg/mL, reduziu o número de células de *Staphylococcus aureus*, em comparação ao controle. Evidenciaram, portanto, o efeito bactericida. Efeitos semelhantes foram apresentados por Peloi et al. (2008) e Junqueira et al. (2010), utilizando o mesmo corante (AM). No presente estudo, observou-se, que o AM apresentou-se tóxico, quando incorporado em leveduras de *Pb*. Porém, foi verificada que essa citotoxicidade está relacionada à concentração do corante. Isto porque o desenvolvimento de UFC/mL a 150 μM foi reduzido em 95,4 %, em comparação ao controle; e em 75,1 %, quando se utilizou a concentração de 50 μΜ. Desta forma, não foi observada diferença significativa no desenvolvimento de UFC/mL em relação ao controle, quando se utilizou concentrações mais baixas do FS (12,5 μM e 25 μΜ).

O AM é um corante FS muito utilizado para TFD, sendo excitado pela luz vermelha, com pico de absorção máxima a 664 nm. A (a) toxicidade mínima desse corante às células humanas; (b) sua capacidade de produzir elevados rendimentos quânticos de oxigênio singlete; (c) sua atividade antifúngica e antibacteriana; (d) além de ser de baixo custo e de fácil aquisição, faz com que o AM desperte grande interesse como agente antimicrobiano ativado fotodinamicamente (XU et al., 2009; ROSA et al., 2015; SBEGHEN et al., 2015).

Diante destas vantagens e pela excassez de trabalhos utilizando-se como alternativa terapêutica a TFD na PCM, se optou pela utilização deste importante FS. Através dos ensaios realizados no presente estudo, verificou-se que a toxidade do corante está relacionada à sua concentração. Foi demonstrado que soluções de AM a 25 µM não apresentaram toxicidade em leveduras de *Pb*, sendo então, concentração utilizada como padrão nos ensaios fotodinâmicos.

### 4.2 Espectroscopia de absorção

Os espectros de absorção obtidos, após a análise dos sobrenadantes, de suspensões contendo AM + *Pb*, em tempos distintos, estão ilustrados na Figura 18.

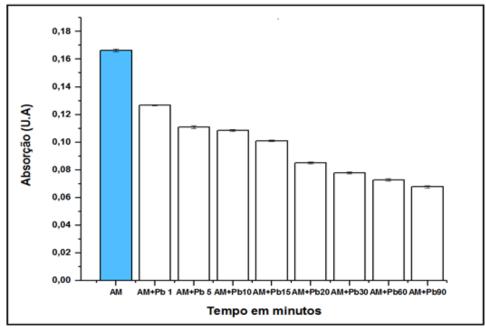


**Figura 18 -** Espectro UV - visível (sobrenadante) de solução de AM a 25  $\mu$ M, e de suspensões de AM + Pb nos tempos 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 minutos. Pico de absorção máxima do monômero e dímero de AM, obtidos à 664 nm e 614 nm respectivamente. Fonte: Dados do autor (2017).

Verificou-se, desta maneira, a formação de monômeros e dímeros de AM, com picos de absorção máxima em 664 nm e de 614 nm, respectivamente. Observou-se também, o predomínio de monômeros em relação aos dímeros de AM. Notou-se, que logo após a incubação do FS ao fungo, ocorreu redução imediata na densidade óptica do sobrenadante da suspensão. Observou-se que essa redução segue de forma progressiva e sutil, nos tempos de cinco a 15 minutos, intensificando-se aos 20 e 30 minutos. Ocorre o decaimento, de forma mais expressiva, em relação aos tempos anteriores, das densidades ópticas observadas após decorridos 60 e 90 minutos do início da incubação, do FS ao *Pb*. Observou-se também, nos últimos dois tempos testados, uma sobreposição de seus espectros, em decorrência de uma tendência de saturação das leveduras ao corante AM.

As densidades ópticas médias, obtidas no pico de absorção máxima do manômero de AM (25 μM) (por análise em espectrofotômetro de absorção, dos sobrenadantes de soluções de AM e suspensões contendo AM + *Pb*,

imediatamente após a incubação do FS ao fungo e nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 s) estão ilustradas graficamente na Figura 19.

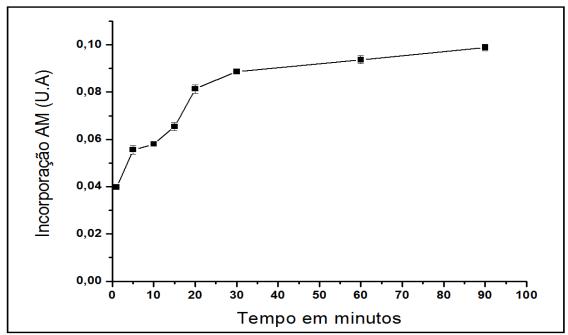


**Figura 19 -** Representação gráfica da densidade óptica média, obtida por espectroscopia de absorção de varredura, do sobrenadante de soluções de AM a 25  $\mu$ M e suspensões contendo AM (25  $\mu$ M) + *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*), nos tempos de 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 minutos. Verificou-se diminuição da densidade óptica do sobrenadante das suspensões contendo AM + *Pb*, a medida que se aumenta o tempo de incubação, formando uma curva sinuosa descendente

Fonte: Dados do autor (2017).

Observou-se diferença estatística significativa (p < 0,01), quando comparados os valores obtidos nas soluções de AM aos encontrados nas suspensões contendo AM + *Pb*, em tempos distintos. Não houve significância, quando comparados entre si, os grupos de suspensões cujo tempo de incubação foi de cinco e 10 minutos, sendo os demais valores significantes entre si (p < 0,01). Verificou-se, também, a formação de uma curva sinuosa, de caráter decrescente, à medida que aumentou o tempo de incubação do AM ao patógeno.

A taxa de incorporação do AM pelas leveduras de *Pb* foi determinada pela diferença da densidade óptica, entre o pico de absorção máxima do monômero de AM a 664 nm; e o valor obtido, neste mesmo comprimento de onda, do sobrenadante da suspensão celular contendo AM + *Pb*. A curva de incorporação, formada pelos diversos tempos testados, está representada na Figura 20.



**Figura 20 -** Representação da curva de incorporação do azul de metileno (AM) em leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*), após incubação em tempos distintos (1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 minutos). A curva foi determinada pela diferença da densidade óptica, entre o pico de absorção máxima do AM a 664 nm e o valor obtido, neste mesmo comprimento de onda, do sobrenadante da suspensão celular contendo AM + *Pb* O AM é imediatamente incorporado pelas leveduras, formando uma curva de caráter ascendente até os 30 s de incubação, tendendo a uma estabilização nos tempos seguintes

Fonte: Dados do autor (2017).

Verificou-se que a incorporação do AM pelo fungo se dá logo após sua incubação, com a taxa de incorporação observada aos cinco minutos, equivalendo a 57 % daquela observada aos 90 minutos. A curva formada pelos tempos testados segue adquirindo um caráter ascendente até os 30 minutos, tendendo, a partir de então, a uma estabilização.

A parede celular fúngica fornece estrutura e proteção para a célula e é composta, principalmente, por α-glucanas, β-glucanas, N-acetilglucosamina e manoproteínas; isto resulta em uma carga global negativa. A interação entre o AM e a parede do fungo é essencial para a eficiência da TFD (DE GROOT; RAM; KLIS, 2005). Diante disso, tornou-se necessário verificar como se dá a interação do corante com a estrutura de leveduras de *Pb*. Utilizou-se, nesse estudo, o AM, uma vez que o mesmo apresenta baixa toxidade celular ao escuro; elevado rendimento quântico na geração de  $^{1}$ O<sub>2</sub>; ser excitado na janela terapêutica (600-900 nm); e por sua carga positiva permitir a ligação eficaz com a parede celular, carregada negativamente (TANG et al., 2008; SEONG; KIM, 2015).

Os estudos fotofísicos tiveram início através da análise dos espectros de absorção do sobrenadante, de suspensões contendo AM + Pb (ver Figura 18, anteriormente), obtidos através de espectroscopia UV-visível. Buscou-se, assim, analisar as características fotofísicas da solução de AM a ser utilizada nos experimentos, bem como analisar a taxa de incorporação do corante ao fungo, em relação ao tempo de incubação. Estes procedimentos visaram avaliar o melhor parâmetro de pré-irradiação a ser adotado nos grupos de TFD. Em sua análise, foi observada a formação de dímeros e monômeros de AM, com prevalência destes. Observou-se, também, que o AM, ao entrar em contato com as leveduras de Pb, é imediatamente incorporado, evidenciando-se, portanto, grande afinidade do fungo pelo FS. Já aos cinco minutos de incubação, ocorreu 57 % da incorporação do AM, sendo utilizado como parâmetro de tempo de préirradiação dos ensaios fotodinâmicos. Essa incorporação segue, de forma ascendente, até os 30 minutos, tendendo a uma estabilização nos tempos seguintes. A incorporação do FS é tão importante quanto a formação de oxigênio singlete; sendo que a mesma é um fator dependente da interação do FS com sistemas biológicos, principalmente com a membrana (UCHOA; BAPTISTA, 2007). Este fato é em razão da carga negativa da membrana do parasita, por conta de alguns componentes da mesma, como o lipofosfoglicano, o qual favorece a interação com FS's catiônicos como o AM (AKILOV et al., 2006).

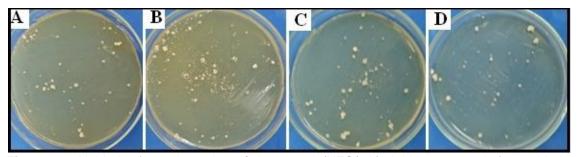
A dimerização provoca redução no rendimento quântico de fluorescência e favorece reações de transferência de elétrons (JUNQUEIRA et al., 2002). Ocorre, portanto, favorecimento do mecanismo do tipo I, quando há dímeros de AM. Já para o caso de monômeros, há transferência de energia do AM para o oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete, seguindo o mecanismo tipo II. Dessa forma, dependendo do estado de agregação do AM, este FS pode tanto atuar pelo mecanismo tipo I, quanto pelo tipo II (SEVERINO et al., 2003). Diante disso, pelas características apresentadas pela solução de AM utilizada nesse estudo, é permissível inferir que houve o predomínio de reações do tipo II, pela maior presença de monômeros de AM.

A análise dos espectros de absorção, obtida através do sobrenadante de suspensões contendo AM + *Pb*, permitiu observar que houve incorporação do

FS pelas leveduras de *Pb*. Porém, essa constatação não é capaz de demonstrar como ocorre essa interação FS-fungo. Por isso, torna-se necessária a realização de outros experimentos para melhor compreensão dos processos envolvidos nesse estudo.

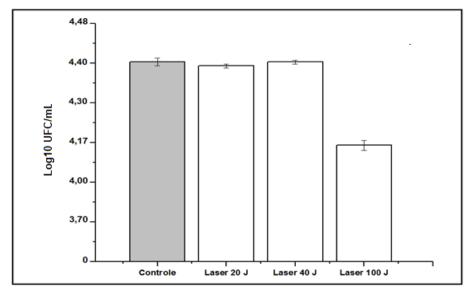
### 4.3 Teste de fototoxicidade

Leveduras de *Pb* foram submetidas ao teste de fototoxicidade, no qual as mesmas foram irradiadas com *laser* a 660 nm, na ausência do corante AM. As UFC/mL de *Pb* que se desenvolveram nesse teste estão ilustradas na Figura 21. A placa A representa o controle; e B, C e D, os grupos irradiados a 20 J (por 40 s), 40 J (por 80 s) e 100 J (por 200 s), respectivamente.



**Figura 21 –** Unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) obtidas no teste de fototoxidade, quando leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* foram irradiadas com *laser* à 660 nm na ausência de fotossensibilizador exógeno. a) Controle; b-d) Grupos irradiados a 20 J (por 40 s), 40 J (por 80 s) e 100 J (por 200 s), respectivamente Fonte: Dados do autor (2017).

O número de UFC/mL de *Pb* que se desenvolveram ao teste de fototoxicidade, no qual leveduras de *Pb* foram irradiadas com *laser* a 660 nm, na ausência do AM, estão representadas graficamente na Figura 22.



**Figura 22 -** Representação gráfica do ensaio de fototoxicidade utilizando suspensão contendo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), irradiada com *laser* em 660 nm em diferentes doses. Somente foi observada diferença estatisticamente significante (p < 0,01), o grupo irradiado a 100 J Fonte: Dados do autor (2017).

Observou-se que o grupo irradiado a 100 J (por 200 s) obteve uma redução no desenvolvimento de UFC/mL de 41,7 %, em relação ao controle. Esta diferença foi significativa (p < 0,01), entre as doses testadas e em relação ao controle. Já os grupos que receberam doses de 20 J (por 40 s) e 40 J (por 80 s), não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, e entre si.

Tornou-se necessário, no desenvolvimento do presente estudo, verificar os efeitos causados pela aplicação da luz *laser*, a 660 nm, em diferentes doses de irradiação, na ausência de FS exógeno. Objetivou-se, dessa forma, obter-se resultados de aplicações isoladas da luz, para posterior comparação com os resultados obtidos em grupos, nos quais houve a combinação do FS com o *laser*.

Rosa et. al. (2015) utilizaram um *laser* de baixa potência, com comprimento de onda de 660 nm, porque essa fonte de luz vermelha (630-700 nm) é amplamente utilizada em TFD. Isto porque em razão dos seus comprimentos de onda relativamente longos, o *laser* pode, efetivamente, penetrar nos tecidos biológicos. A literatura tem relatado que a interação entre essas fontes de luz e os FS's que absorvem este comprimento de onda, tais como o AM, pode resultar em destruição microbiana significativa (PELOI et al., 2008; SIMONETTI et al., 2011). Rosa et al. (2015), a fim de determinar a atividade bactericida a aplicação do *laser* de 660 nm, submeteram o micro-

organismo testado à luz *laser* isolada; utilizando-se os mesmos parâmetros aos utilizados nos grupos de TFD. Foram observadas reduções no número de UFC/mL de *Staphylococcus aureus* em relação ao controle, mostrando a existência de um pequeno efeito bactericida. Isso ocorre porque algumas células bacterianas e fúngicas são conhecidas por sintetizar níveis elevados de porfirinas endógenas, as quais atuam como FS endógenos. Hajin, Salih e Rassan (2010) também relataram resultados semelhantes, nos quais foi observada uma redução no número de UFC/mL de *Staphylococcus aureus* apenas com a aplicação do laser. Tais hipóteses, podem não estarem relacionadas aos resultados obtidos no presente estudo. Uma vez que, só houve redução no número de UFC de *Pb* quando as leveduras foram irradiadas à 100J.

Porém, em alguns estudos, aparecem resultados divergentes, em que a aplicação somente do *laser* não resultou em nenhuma diferença na redução microbiana, em comparação ao grupo controle (PELOI et al., 2008; LIMA et al., 2009; MIYABE et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; SIMONETTI et al., 2011).

A terapia *laser* de baixa potência apresenta propriedades antiinflamatórias, analgésicas e de biomodulação. O *laser*, em vários comprimentos de onda, é absorvido por cromóforos específicos em fungos, os quais podem induzir o estresse e a inibição de seu crescimento (VERMA; MAHESHWARI; SINGH, 2012). Por outro lado, o efeito fungicida tem sido atribuído ao *laser* pelo efeito bioestimulante, fototérmico ou efeito fotodinâmico, induzido por cromóforos endógenos presentes nos fungos (MAVER; MRAVAK; JEROLIMOV, 2005).

No presente estudo, no qual foi realizada a aplicação somente da luz *laser*, a 660 nm, sobre leveduras de *Pb*, observou-se que houve redução no número de UFC/mL em 41,7 %, somente quando se utilizou a dose de irradiação de 100 J. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle, quando se utilizou as doses de 20 J e 40 J. Demonstrou-se, dessa forma, que não existiu uma relação direta com o tempo de exposição, ou dose de energia empregada.

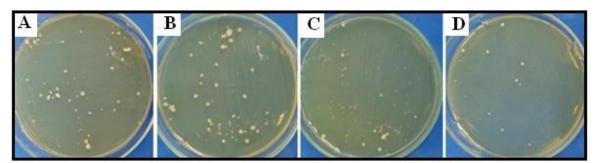
A melanina é uma estrutura granular que absorve luz no comprimento do UV visível e perto do infravermelho, no espectro eletromagnético. Esta estrutura

desempenha funções relacionadas à proteção, quanto à exposição prolongada da luz, absorvendo e espalhando a luz; além de desempenhar vários papéis antioxidantes (LIU; SIMON, 2003; HENNESSY et al., 2005).

Porém, Chiarelli-Neto et al. (2011), através de constatações obtidas por ressonância nuclear magnética, verificou que a melanina, ao ser irradiada com luz visível, de forma prolongada, sofre fotoxidação pelo oxigênio singlete; isto leva à alterações em sua estrutura química, passando a gerar essa espécie reativa de oxigênio. Nessas condições, a melanina pode desencadear danos em vez de mecanismos de proteção. Tal fenômeno, pode estar relacionado aos resultados obtidos no presente estudo, no qual houve redução no número de UFC/mL somente quando se irradiou as leveduras de *Pb*18 com dose de 100 J.

## 4.4 Teste de morte celular por efeitos fotodinâmicos

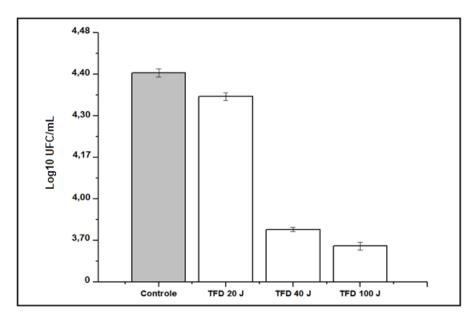
Leveduras de *Pb* após serem incubadas em solução contendo AM, na concentração de 25 µM (0,25 % álcool etílico), foram irradiadas com *laser*, a 660 nm, constituindo, assim, grupos de TFD. O número de UFC/mL de *Pb* que se desenvolveram após o teste estão ilustradas na Figura 23.



**Figura 23 –** Unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) obtidas após a irradiação de suspensão contendo *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) + azul de metileno (AM), a uma concentração de 25 μM (0,25 % álcool etílico), com *laser* a 660 nm. a) Controle; b-d) Crescimento de leveduras, após receberem doses de 20 J, 40 J e 100 J, respectivamente Fonte: Dados do autor (2017).

A placa A representa o controle; e B, C e D, o crescimento de células leveduriformes, após receberem doses de 20 J, 40 J e 100 J, respectivamente.

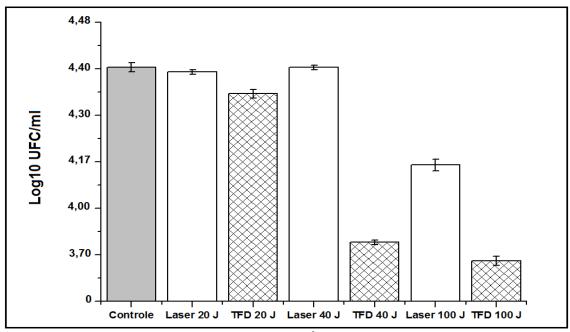
O número de UFC/mL que se desenvolveu após as leveduras de *Pb* serem submetidas à ação fotodinâmica, mediada pelo AM, a 25 µM, está representado graficamente na Figura 24.



**Figura 24 -** Representação gráfica do efeito fotodinâmico em suspensão contendo *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) + azul de metileno (AM), a 25  $\mu$ M (0,25 % álcool eílico), em diferentes doses de irradiação *laser*. Os resultados apontam diferença estatisticamente significante (p < 0,01) entre os grupos irradiados, quando comparados entre si e ao controle (não tratado).

Observou-se diferença significativa (p < 0,01) entre os grupos controle e irradiados, bem como quando se compara os grupos de TFD entre si. Foi encontrada uma redução de 11,3 %, 74,9 % e 82,8 %, nos grupos que receberam doses de 20 J (por 40 s), 40 J (por 80 s) e 100 J (por 200 s), respectivamente.

A representação gráfica comparativa do desenvolvimento de UFC/mL de *Pb*, após realização de testes de fototoxicidade, nos quais, leveduras de *Pb* foram irradiadas com *laser* a 660 nm, na ausência e na presença de AM (TFD) está ilustrada graficamente na Figura 25.



**Figura 25 -** Representação gráfica comparativa dos grupos irradiados na ausência e na presença do azul de metileno (AM). Observa-se que nos grupos onde as leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) foram irradiadas na ausência do FS, somente houve redução no número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) quando se utilizou a dose de irradiação de 100 J. Já, para as leveduras que foram submetidas à TFD, esta redução, em relação ao controle, se deu em todas as doses testadas

Fonte: Dados do autor (2017).

Verificou-se que as leveduras irradiadas a 100 J, na ausência do AM, apresentaram redução no número de UFC/mL de Pb em relação ao controle, sendo essa diferença significativa (p < 0,01). Os grupos irradiados a 20 J e a 40 J não diferiram do controle. Todos os grupos que foram submetidos à TFD obtiveram diferença estatisticamente significante em relação ao controle e entre os mesmos (p < 0,01). A representação gráfica demonstra, também, que os grupos submetidos à TFD apresentaram resultados mais expressivos na redução do número de UFC/mL de Pb, quando comparados aos valores que foram apresentados pela aplicação isolada do laser.

Os resultados demonstrados no presente estudo evidenciaram notável redução no número de UFC/mL de *Pb* que foram submetidas à TFD, mediada pelo AM. Verificou-se que sua eficácia esteve relacionada, diretamente, à dose de energia empregada. Quando se utilizou a dose de 40 J, houve uma redução no número de UFC/mL de 74,9 %, em relação ao controle. Já quando a dose de energia empregada foi de 100 J, a redução foi de 82,8 %. A diferença nos resultados que foram observados, quando se utilizou a dose de 100 J em

comparação a 40 J, foi uma redução no número de UFC/mL de apenas 7,9 %. Embora significativa, é uma diferença pouco expressiva, pela quantidade de energia empregada, duas vezes e meia maior. Dessa forma, a dose de 40 J destacou-se, por ser o melhor parâmetro empregado na redução do número de UFC/mL de *Pb* submetidas à TFD (Figura 24).

Nos últimos anos, a TFD tem sido proposta como um tratamento alternativo para infecções localizadas bacterianas e fúngicas que se apresentam resistentes aos antibióticos convencionais (TEGOS et al., 2008; ROSA et al., 2015). Esta terapia possui vantagens e especificidade elevada, principalmente em razão da aplicação exata da luz, da natureza relativamente não invasiva e da menor quantidade de efeitos secundários (VAN RIJT; SADLER, 2009).

O desenvolvimento de resistência à TFD por micro-organismos é um evento improvável de ocorrer, uma vez que esta é considerada um processo típico de interação multialvo. Esta é uma das diferenças entre a TFD e a maioria dos agentes antifúngicos convencionais. Numerosos estudos demonstraram que a TFD é altamente eficaz na destruição de fungos *in vitro* (LAMBRECHTS; AALDERS; MARLE, 2005; LYON et al, 2011; FREIRE et al., 2015).

Sousa et al. (2016), realizaram estudo para investigar a fotoinativação de Candida albicans em biofilme, usando os FSs AM à 50 µM e protoporfirina IX (10 µM), ambos irradiados com LEDs à 660 nm e 630 nm respectivamente, com duração que variou de 2 a 10 minutos. Verificaram que a TFD utilizando como FS o AM reduziu significativamente, em 96 %, a quantidade de UFC após 10 minutos de irradiação, e que o efeito não é dependente do tempo de irradiação, contrariando os resultados observados em nossos experimentos. Verificou-se, no presente estudo, nos ensaios de citotoxicidade do AM em leveduras de Pb (Figura 11), que a concentração de 50 µM mostrouse tóxica com redução de 75,1 % no desenvolvimento de UFC/ml de Pb em relação ao controle. Sendo válido destacar, que leveduras de Pb são maiores e apresentam parede celular mais espessas do que as medidas encontradas em celulas de Candida albicans (CASSONE; SIMONETTI; STRIPOLI, 1973; FRANCO et al., 1994). Observaram, também, ausência de efeito da protoporfirina IX . Acreditam que provavelmente, as cargas negativas dos

proteoglicanos presentes na matriz extracelular repeliram as cargas negativas do FS, impedindo assim a sua difusão nas células. Independentemente da sua elevada eficiência, a protoporfirina foi incapaz de penetrar na matriz extracelular aniónica, assim, seria capaz de inativar as células de *Candida albicans* presentes no biofilme (CHABRIER-ROSSELÓ et al., 2010; SOUSA et al., 2010; ANDRADE et al., 2013).

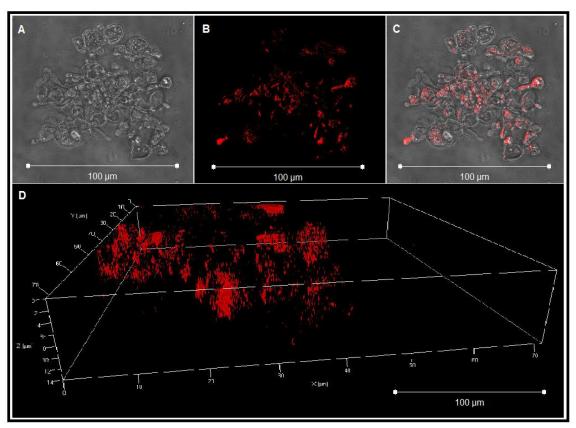
Almeida et al. (2012) realizaram experimentos para verificar a eficácia do corante 5,10,15,20-tetraquis (1-metil-4-piridinio) porfirina (TMPyP), uma porfirina catiônica, na inibição fotodinâmica do *Pb*. Os autores concluíram que a terapia é eficaz, sofrendo relação direta ao tempo de irradiação/dose, aumentando a eficiência à medida que se eleva esse parâmetro.

No presente estudo, utilizando AM à 25 μM, tendo como fonte de luz a irradiação laser a 660 nm, irradiando em doses diferentes, obteve-se diferença significante, em relação ao controle (não tratado), em todas as doses testadas. Sendo que os mesmos, ao contrário do observado por Sousa et al. (2016), é dependente do tempo de irradiação. Onde foi demonstrado uma otiminização dos efeitos à medida em que se aumentou o tempo de irradiação da suspensão contendo AM + Pb. Indo ao encontro, com os resultados demonstrados por Almeida et al. (2012), no tratamento do Pb utilizando uma porfirina catiônica.

Ao se comparar os resultados obtidos nos grupos em que as leveduras de *Pb* foram irradiadas com luz *laser*, na ausência de FS exôgeno, com os obtidos na presença do corante AM, observou-se que: os valores obtidos nos grupos de TFD foram bem mais eficazes aos observados somente com a irradiação do *laser*, sem a presença do FS. Demonstrou-se, desta forma, a presença e a eficácia dos efeitos fotodinâmicos obtidos pela excitação do AM, em suspensão contendo leveduras de *Pb*. Isto demonstra que a TFD consiste numa importante modalidade terapêutica, no tratamento de micoses induzidas por este patógeno.

### 4.5 Microscopia por fluorescência com resolução confocal

Leveduras de *Pb* incubadas em solução de AM, a 25 µM (0,25 % álcool etílico), posteriormente foram analisadas por microscopia de fluorescência com resolução confocal, nas quais as micrografias resultantes constam na Figura 26. Em A micrografia de fase, demonstra um agrupamento de leveduras de *Pb*; em B, observa-se a fluorescência do corante AM incorporado às leveduras de *Pb*; e em C, micrografia em merge, demonstrando a sobreposição das micrografias de fase (A) e fluorescente (B). Em D, imagem tridimensional (3D).



**Figura 26 –** *Paracoccidioides brasiliensis*: Micrografia de fase (A), micrografia de fluorescência (B) e micrografia em merge (C), em (D) imagem tridimensional (3D) do micro-organismo incubado com azul de metileno (AM) a 25  $\mu$ M (0,25 % álcool etílico) (aumento de 1000x). Escala: 100  $\mu$ m. Excitação no comprimento de onda de 635 nm e emissão no comprimento de onda de 685 nm, os quais correspondem ao máximo de absorção e emissão do AM Fonte: Dados do autor (2017).

Objetivou-se demonstrar, de forma mais clara e fidedigna, a interação do AM às leveduras de Pb, foi obtido micrografias de fluorescência confocal (Figura 26). Uma vez que, o FS ao ser irradiado na janela terapêutica, absorve um fóton,

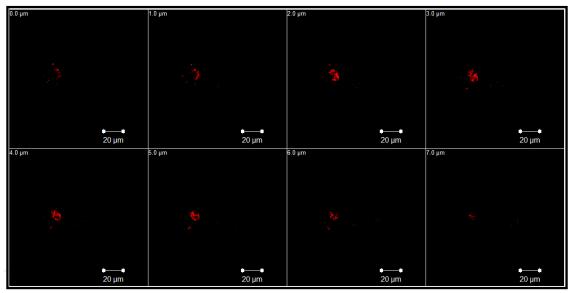
após a absorção o FS passa para o estado excitado sem alteração da sua multiplicidade de spin, estado singlete excitado (FS\*), que pode decair para o seu estado fundamental (FS) através da emissão de fluorescência (DAI et al., 2010). Dessa forma, conseguimos demonstrar de forma mais clara, que o AM possui a capacidade de se incorporar nas leveduras de *Pb*. O tornando dessa forma, um importante FS para gerar efeitos fotodinâmicos (UCHOA; BAPTISTA, 2007).

É possível verificar, através da análise da micrografia de fluorescência confocal (Figura 26), que o FS se incorpora na levedura de *Pb*. Isso se deve à atração eletrostática existente entre a parede celular negativa e a molécula do AM positiva (AKILOV et al., 2006). A parede celular torna-se, por conseguinte, um dos locais de geração dos efeitos fotodinâmicos, ocorridos após estimulação do FS por uma fonte de luz com comprimento de onda adequado.

Pereira et al. (2011) avaliaram os efeitos da TFD na viabilidade de biofilmes simples, duplos e de três espécies formadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Os autores verificaram que as reduções para biofilmes de uma única espécie foram maiores às observadas para multiespécies. Biofilmes consistem em organizações de micro-organismos, onde os mesmos encontram-se sobrepostos uns aos outros, o que pode ter interferido na incorporação do FS. Justificou-se, assim, os resultados descritos por Pereira et al. (2011). No presente estudo, *in vitro*, sobre a incorporação do AM no *Pb*, foi verificado que as leveduras apresentam uma grande afinidade entre si. Isto favorece a formação de grandes agrupamentos de células, mesmo em concentrações reduzidas de *Pb*. Ao analisar as imagens confocais, notouse que a incorporação não ocorria de forma homogênia, a qual pode estar relacionada à formação desses agrupamentos celulares. Por sua vez, isso pode ter interferido no processo de incorporação do corante ao fungo e, por consequência, limitado os resultados da TFD, nos ensaios realizados *in vitro*.

Leveduras de *Pb*, incubadas em solução de AM, a 25 µM (0,25 % álcool etílico), foram submetidas ao teste de internalização do FS, através de microscopia de fluorescência confocal. Os planos confocais estão ilustrados na

Figura 27. Nesta se evidenciam, através da fluorescência do FS, em cortes sucessivos de 1 µm, a internalização do corante AM nas leveduras de *Pb*.



**Figura 27 –** *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) incubado em solução de azul de metileno (AM), a 25 μM (0,25 % álcool etílico). Planos confocais (Escala: 20 μm) obtidos por microscopia de fluorescência confocal. Excitação no comprimento de onda de 635 nm e a Emissão no comprimento de onda de 685 nm, os quais correspondem ao máximo de absorção e emissão do AM

Fonte: Dados do autor (2017).

Através das micrografias de fluorescência com resolução confocal (Figura 26), foi possível visualisar a incorporação do corante à levedura de *Pb*. A obtenção de planos confocais de 1 µm, foi capaz de se demonstrar, de forma bem evidente, que o corante AM foi capaz de internalizar na levedura de *Pb* (Figura 24).

Atualmente, muitos FS's estão sendo testados e utilizados como agentes antimicrobianos. Como as membranas de micro-organismos são sempre carregadas negativamente, os FS's carregados positivamente incorporam ou penetraram de forma mais eficiente, sendo, assim, mais eficazes na TFD. O AM, carregado positivamente, é um dos FS's mais utilizados em trabalhos experimentais e em aplicações clínicas (TARDIVO et al., 2005; NUÑEZ et al., 2015).

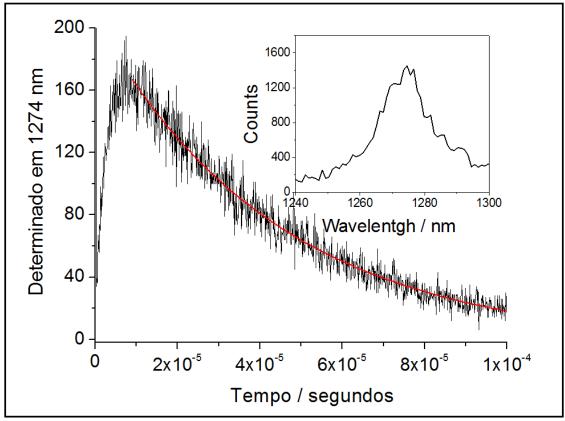
O AM, uma molécula catiônica, é altamente potente para se incorporar na membrana celular e, em seguida, se internalizar na mitocôndria (TARDIVO et al., 2005; MOREIRA, 2012; KARIMINEZHAD HABIBI; MIRZABABAYI, 2015). Estas

organelas contêm uma variedade de proteínas em sua membrana, a qual confere uma carga elétrica negativa. A seletividade deste FS pela mitocôndria pode ser determinada pela lipofilicidade e pela carga; esta última, por ser positiva, é atraída porque o ambiente eletroquímico é negativo na matriz mitocondrial (GABRIELLI et al., 2004). Este fato pode tornar essa organela como um dos destinos do corante, ao ser absorvido para o interior da levedura de *Pb*.

O elevado rendimento quântico do AM, na geração de oxigênio singlete, faz com que esse FS tenha uma boa atuação na TFD. Por outro lado, os efeitos catalíticos de NADH e NADPH fazem com que esse FS seja convertido no meio biológico; forma-se, por conseguinte, azul leucometileno incolor, o qual tem atividade fotodinâmica insignificante (TANG, 2008; SEONG; KIM, 2015). A rápida propensão do AM de sofrer essa alteração química limita sua utilização clínica (MOREIRA, 2012; KARIMINEZHAD; HABIBI; MIRZABABAYI, 2015). A análise dos planos confocais, obtidos por microscopia confocal, permitiu visualizar, através da fluorescência do AM que o mesmo se encontra internalizado na levedura de *Pb*. Uma vez fluorescente no interior da célula, o mesmo está ativo, desenvolvendo atividades fotofísicas que culminaram na geração de efeitos fotodinâmicos; e que levaram à morte das leveduras de *Pb* submetidas à TFD.

## 4.6 Geração e decaimento de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

A suspensão celular de *Pb* incubadas em solução de AM, a 25 μM (0,25 % álcool etílico), foram submetidas à análise de geração e pico de formação de oxigênio singlete. O espectro de emissão de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> foi determinado com o máximo em 1274 nm, característico da espécie. O transiente de decaimento exponencial do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> foi detectado no comprimento de onda de 1274 nm e pelo tempo de vida da espécie. O teste foi realizado em água deuterada (Figura 28).



**Figura 28 -** Transiente de emissão a 1274 nm em água deuterada ( $D_2O$ ). Inserções: espectro de emissão do decaimento do oxigênio singlete  $^1O_2$  de incorporação do azul de metileno (AM) no *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb).  $\lambda_{exc}$  = 664 nm; 10 Hz; 5 mJ/pulso. Fonte: Dados do autor (2017).

A internalização do FS, demonstrada por cortes de microscopia confocal, evidenciou através da fluorescência do AM que o mesmo encontra-se ativo e gerando efeitos fotofísicos. Portanto, encontra-se na forma de mônomero, uma vez que dímeros apresentam redução do rendimento quântico de fluorescência (JUNQUEIRA et al., 2002). Confirmou-se o que foi observado, nos espectros de absorção do sobrenadante de suspensões contendo AM + *Pb*, os quais foram ilustrados pela Figura 18; nessa, foi demonstrado o predomínio de mônomeros de AM em relação aos dímeros. Os mônomeros favorecem o mecanismo do tipo II, no qual ocorre a transferência de energia, resultando na geração de  $^{1}O_{2}$  (SEVERINO et al., 2003). Corroborou-se, dessa forma, os resultados que foram demonstrados na Figuras 28, os quais comprovam a geração desse potente oxidante fotodinâmico.

Moléculas reativas de oxigênio causam danos irreparáveis aos componentes celulares, levando à morte celular. Embora, na maioria dos casos,

os FS's são ativados por luz vermelha, a escolha da fonte de luz deve ser baseada na absorção do FS. Por outro lado, a eficácia clínica da TFD depende de dosimetria complexa, que está associada a alguns fatores, tais como dose total de luz ou tempo de exposição à luz; e modo de entrega da luz (AGOSTINIS; BERG; CENGEL, 2011; MACIEL et al., 2016).

O mecanismo de inativação do fungo na TFD é completamente diferente a associada com agentes antifúngicos. A TFD produz radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, tal como o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, o qual conduz ao dano celular, lise da membrana e a inativação de proteínas. Embora a maioria dos agentes antifúngicos iniba a biossíntese de ergosterol (o principal lipídio nas membranas dos fungos), as espécies reativas de oxigênio geradas por TFD promovem danos na parede celular e na membrana. Uma vez no interior da célula, as espécies oxidantes geradas pela excitação da luz causam fotodanos às organelas por consequência, (DONNELLY; celulares internas e. morte celular MCCARRON; TUNNEY, 2008; MACIEL et al., 2016).

Os mecanismos de ação do AM, geralmente observados nas vias fotoquímicas, são reações do tipo II, em que a energia triplete é transferida para o oxigênio, formando oxigênio singlete (¹O₂); e do tipo I, em que um radical semirredutor é formado por agentes de redução, os quais doam um elétron para o AM, em seu estado triplete (JUNQUEIRA et al., 2002; TARDIVO et al., 2005). O AM absorve a energia, diretamente, a partir de uma fonte de luz que, em seguida, transfere para o oxigênio molecular, para criar uma forma de oxigênio ativo, o ¹O₂. O ¹O₂ é extremamente eletrofílico e capaz de oxidar diretamente duplas ligações ricas em elétrons, em moléculas biológicas e macromoléculas. O AM tem sido descrito como um FS eficaz para a utilização em tratamentos de TFD (SAHU et al., 2013; NANASHIMA; NAGAYASU, 2015).

O <sup>1</sup>O<sub>2</sub> é um poderoso oxidante que reage com vários componentes celulares, resultando em dano celular, tais como a necrose ou a apoptose (PLAETZER et al., 2009; OBSTOY et al., 2016). Sbeghen et al. (2015) em seu estudo, verificaram que células apoptóticas foram encontradas, em maior frequência, em lesões de animais tratados com TFD, utilizando como FS o AM, irradiado por LED, do que nas lesões dos animais que não foram tratados. Desta

forma, se pode sugerir que esses resultados estão relacionados com a oxidação das mitocôndrias, resultando na morte do micro-organismo. É, portanto, um alvo provável de interação do AM, uma vez que tais organelas apresentam atração eletrostática pelo corante em razão de sua carga elétrica negativa.

Demonstrou-se através da obtenção do espectro de emissão de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> que esse poderoso oxidante é gerado quando se irradia a suspensão contendo AM + *Pb*; ao observar o predomínio da formação de monômeros de AM, vistos nos espectros de absorção obtidos em soluções contendo AM + Pb; e, sabendo-se que os mesmos geram reações que resultam na formação de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, podemos sugerir que reações do tipo II predominaram na destruição do patógeno.

A eficácia da TFD como um agente fungicida e bactericida foi demonstrada por diversos autores, mesmo que pouco é conhecido ainda sobre o seu mecanismo de ação contra fungos dimorfos e a influência da melanina sobre os efeitos da TFD (ALMEIDA et al., 2012; BALTAZAR et al., 2013, 2015).

A melanina é considerada um fator de virulência de alguns fungos patogênicos. Com base em suas propriedades antifagocíticas e antioxidantes, são importantes para a proteção das células fúngicas de diferentes estressores ambientais (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; CUNHA et al., 2010). Células de leveduras não melanizadas foram mais susceptíveis à TFD às células melanizadas, sugerindo que a melanina pode alterar a eficácia da TFD (PRATES et al., 2013; BALTAZAR et al., 2015).

Baltazar et al. (2015) realizaram um estudo para verificar a influência da melanina em grupos de *Paracoccidioides spp*. melanizados e não melanizados, submetidos à TFD, utilizando como FS o azul de toluidina (TBO). Os autores concluíram que a melanina produzida pelos *Paracoccidioides spp* provavelmente atua como um fator de proteção durante a TFD. A melanina produzida pelos fungos alterou a eficácia da TFD *in vitro*. Além disso, seus resultados mostraram que o pigmento funciona como um supressor de EROS e óxido nítrico (NO), mas não de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Os autores sugeriram que ONOO<sup>-</sup> pode ser o principal radical responsável pela morte de fungos após a TFD. Porém, nesse estudo, não se avaliou a geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, importante oxidante relatado em diversos estudos, como o principal agente gerador dos efeitos fotodinâmicos que

culminam na morte celular. No estudo realizado foi demonstrado a presença dessa espécie reativa de oxigênio, o que nos permite inferir, que o mesmo seja um dos geradores dos efeitos fotodinâmicos que culminaram na morte das leveduras de Pb submetidas ao tratamento por terapia fotodinâmica.

Os baixos níveis de EROS e NO\* apresentados pelas células melanizadas demonstraram que a melanina pode agir como uma supressora de radicais livres, protegendo a levedura de *Paracoccidioides sp* da morte causada por EROS e ERNS (tais como NO\*) (SILVA et al., 2009; BALTAZAR et al., 2015). No entanto, essa observação não é verdadeira para o ONOO-, o que indica que a melanina é incapaz de eliminar esse radical; trata-se de uma poderosa espécie reativa que poderia diminuir drasticamente a viabilidade dos fungos (BALTAZAR et al., 2013; RADI, 2013).

Baltazar et al. (2015) demonstraram que a melanina é capaz de mudar o pico de absorvância da TBO, o qual leva à perda de ressonância com a luz LED, reduzindo a quantidade de TBO ativada; consequentemente, diminuindo a produção de EROS e ERNS após a TFD. No presente experimento, utilizando o AM, pertecente à mesma familia do TBO, ou seja, um FS fenotiazínico, é provável que o AM também sofra essa influência na geração de EROS e ERNS em consequência da presença da melanina na parede do *Pb*. Isso pode, dessa forma, estar limitando a ação de alguns radicais livres gerados pelos mecanismos fotodinâmico presentes na TFD.

Almeida et al. (2012) realizaram experimentos para verificar a eficácia do corante 5,10,15,20-tetraquis (1-metil-4-piridinio) porfirina (TMPyP), uma porfirina catiônica, na inibição fotodinâmica do *Pb*. Seus resultados mostraram que os tempos de exposição mais longos e as concentrações de porfirina mais elevadas aumentaram a eficácia contra o *Pb*. Demonstraram, também, que o efeito fototóxico do TMPyP dependeu da fluidez, bem como da concentração do FS. Esses resultados são suportados por estudos anteriores que mostraram que outros FS's, tais como AM, Photoditazine, Photofrin e TBO, também funcionam de uma forma dependente da concentração (ZEINA; GREENMAN; PURCELL, 2001; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

Os resultados de Almeida et al. (2012) mostraram que a concentração de TMPyP necessária para matar eficazmente as células de *Pb* (50 µM) foi 10 vezes mais elevada a necessária para matar *Candida albicans* (5 µM) (QUIROGA; ALVAREZ; DURANTINI, 2010). A maior concentração de porfirina necessária pode estar relacionada com o tamanho das células de *Pb* (40-50 µm), maior que as células de *Candida albicans* (10-12 µm). Além disso, a parede mais espessa do *Pb* (200-600 nm), em comparação com a de *Candida albicans* (200-270 nm), pode influenciar a quantidade de FS requerido para induzir o dano oxidativo à célula (CASSONE; SIMONETTI; STRIPOLI, 1973; FRANCO et al., 1994). Tais resultados vão ao encontro dos observados na presente pesquisa, porém, utilizando-se como FS o corante fenotiazínico AM. Entretanto, na realização dos ensaios, optou-se pela utilização de apenas uma concentração do FS; essa foi previamente determinada por não apresentar toxicidade, quando não excitadas por uma fonte de luz emitida em comprimento de onda que corresponda à absorção do corante.

Para proteger as células dos danos causados pelos radicais livres e reagentes relacionados, os organismos desenvolveram vários mecanismos de defesa; estes rápida e eficientemente removem as EROS do ambiente intracelular. Enzimas antioxidantes, como a primeira linha de defesa, metabolizam estes reagentes tóxicos em subprodutos inócuos. Para entender a resposta das células de *Pb* ao tratamento por TFD, Almeida et al. (2012) utilizaram-se do Teste Quantitativo em Tempo Real da Cadeia de Polimerase (qRT-PCR). O teste foi utilizado para analisar os níveis de transcrição de enzimas antioxidantes, antes e após o tratamento da TFD. Os níveis de expressão de quatro genes foram analisados: citocromo *c* peroxidase (CCP), peroxirredoxina (*hyr1*), superóxido dismutase (*sod*) e catalase A (*cat*).

A CCP é uma enzima chave no controle das concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As peroxidases clássicas oxidam vários substratos, incluindo aminas aromáticas, fenóis e lignina, enquanto que a CCP é uma peroxidase específica, com baixa afinidade por estes substratos. A CCP localiza-se no espaço intermembranar mitocondrial, onde protege o organismo dos danos causados por altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ERNAM; VITELLO, 2002). Como esperado, a expressão

de CCP em células de Pb submetidas ao tratamento com TFD foi estatisticamente diferente a do controle (p < 0,05). Nos resultados obtidos por Almeida et al. (2012), houve uma redução na expressão de CCP nas células de Pb, após o tratamento com TFD, com 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de TMPyP.

A *hyr1*, também chamada de tiorredoxina peroxidase ou antioxidante tiol específico, reduz o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o peroxinitrito e uma vasta gama de hidroperóxidos de alquilo orgânico (ROOH), em água e o álcool correspondente (WOOD; SCHRODER JR.; POOLEL, 2003). Esta enzima antioxidante abundante tem uma seqüência primária altamente conservada e está presente em uma grande variedade de organismos (CAMPOS et al., 2005). A análise transcricional mostrou que a *hyr1* foi sobre-expressa nas células de *Pb*, após o tratamento com TFD, com 25 μM e 50 μM de TMPyP; mas foi subexpressa após tratamento com 10 μM de TMPyP (DAI et al., 2010).

A *sod* converte o ânion superóxido (O<sub>2</sub>-) em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um oxidante biológico menos potente, o qual é ainda decomposto por *cat* em água e oxigênio no solo (AHN, 2006). Almeida et al. (2012) mostraram que houve um aumento na expressão de *sod* e *cat* em células de *Pb* tratadas com TFD, com TMPyP, a 25 μM e 50 μM. Porém, houve redução na expressão, quando tratado com 10 μM de TMPyP. Além da transcrição aumentada de enzimas antioxidantes, observouse uma elevada mortalidade de células de *Pb* após 60 min (432 J) de tratamento com TFD. Sugeriram, assim, que os níveis de transcrição aumentados eram inadequados para proteger contra o estresse oxidativo.

Os experimentos realizados por Almeida et al. (2012), de forma pioneira, contribuíram para o início do entendimento dos mecanismos fotodinâmicos envolvidos no tratamento por TFD da PCM. Porém, torna-se necessário dar seguimento a esse estudo, utilizando outros FS's como o AM, para verificar se as constatações dos autores se confirmamam, como mecanismos fotodinâmicos padrões, diante do *Pb*.

Santos et al. (2017) realizaram um estudo para verificação da eficácia da TFD, *in vitro*, em leveduras de *Pb* e em pacientes acometidos com PCM oral. Os autores utilizaram como FS o TBO, em uma concentração de 37,5 mg/L,excitado com *laser* a 660 nm; avaliaram a produção de EROS, sendo verificada geração

significativa de radicais hidroxila (OH<sup>-</sup>)e hipoclorito (CIO<sup>-</sup>), após a excitação do FS com dose em torno de 90 J. Estes radicais desempenharam importante papel na redução do número de UFC/mL de *Pb.* Os autores verificaram, também, uma redução dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes submetidos à terapia.

Ribeiro et al. (2017) utilizando os mesmos parâmetros apresentados no estudo anterior, observaram resultados clínicos semelhantes, em pacientes com PCM oral. Já nos experimentos realizados *in vitro*, utilizando como FS o AM, pertencente à mesma familia do TBO, obteve-se resultados compatíveis aos observados por Santos et al. (2017). Porém, analisando a geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, apontado como um dos principais geradores de efeitos fotodinâmicos que promovem a ação antimicrobiana.

Diante dos resultados apresentados pelo presente estudo, subsidiou-se o entendimento dos mecanismos envolvidos na TFD, como: tempo de incubação pré-irradiação; concentração ideal não tóxica do AM; e melhor compreensão da relação dose de energia/resultado. Acredita-se dessa forma, estar-se contribuindo com a popularização da TFD, como um importante tratamento alternativo da PCM. Isto porque além de apresentar notável eficácia na redução de UFC/mL de *Pb*, a TFD possui outros atrativos como baixo custo, não apresenta efeitos colaterais e não desenvolve resistência por parte do microorganismo.

## **5 CONCLUSÕES**

O presente estudo demonstrou que o AM apresentou efeitos citotóxicos em leveduras de *Pb* e que essa citotoxicidade está relacionada à sua concentração. Nas concentrações de AM testadas, ao teste de citotoxicidade do corante em leveduras de *Pb*, sem serem irradiadas, concentrações superiores a 25 μM mostraram-se tóxicas ao fungo. O FS apresentou grande afinidade pelas leveduras de *Pb*, sendo incorporado e internalizado logo após sua incubação. O AM apresentou fluorescência no interior das leveduras, evidenciando, assim, que o mesmo encontrou-se ativo fotodinamicamente, levando a geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Este último foi uma das vias que culminaram na morte das leveduras de *Pb*, submetidas à TFD, sendo que sua eficácia está relacionada diretamente à dose de energia empregada. Foi verificada uma redução de 74,9 % no número de UFC das leveduras submetidas à dose de 40 J, sendo essa a dosimetria ideal para essa terapêutica. A hipótese (H<sub>1</sub>) de estudo foi confirmada. Desta forma, essa terapia demonstrou ser uma importante alternativa no tratamento de lesões presentes na PCM.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K.A. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011. doi: 10.3322/caac.20114.

AKILOV, O.E.; KOSAKA, S.; O'RIORDAN, K.; SONG, X.; SHERWOOD, M.; FLOTTE, T.J.; FOLEY, J.W.; HASAN, T. The Role of Photosensitizer Molecular Charge and Structure on the Efficacy of Photodynamic Therapy against *Leishmania* Parasites. **Chemistry & Biology.**, v. 13, n. 8, p. 839-847, 2006. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.06.008.

ALMEIDA, F.P. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 5, p. 125-141, 1930.

ALMEIDA, L.M.; ZANOELO, F.F.; CASTRO, K.P.; BORISSEVITCH, I.E.; SOARES, C.M.A.; GOLÇALVES, P.J. Cell Survival and Altered Gene Expression Following Photodynamic Inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 992-1000, 2012. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01112.x.

ALMEIDA, S.M.; QUEIROZ, T.F.; TEIVE, H.A.; RIBEIRO, C.E.; WERNECK, L.C. Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratory findings. **Journal Infection**, v. 48, n. 2, p. 193-198, 2004. doi.org/10.1016/j.jinf.2003.08.012.

ANDRADE, M.C.; RIBEIRO, A.P.; DOVIGO, L.N.; BRUNETTI, I.L.; GIAMPAOLO, E.T.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Effect of different pre-irradiation times on curcumim-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilmes of *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 2, p. 200-210, 2013. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.10.011.

ARAÚJO, S.A.; PRADO, L.G.; VELOSO, J.M.; PEDROSO, E.R.P. Case of recurrent Paracoccidioidomycosis: 25 years after initial treatment. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 394-396, 2013. doi.org/10.1590/S1413-86702009000500017.

ARISTIZÁBAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in

vivo inhibition in females. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, 1998.

ASSIS, C.M.; GANDRA, R.F.; GAMBALE, W.; SHOMIZU, M.T.; PAULA, C.R. Biosynthesis of chondroitinase and hyaluronidase by different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 479-481, 2003. doi: 10.1099/jmm.0.04933-0.

BALTAZAR, L.; RAY, A.; SANTOS, D.; CISALPINO, P.; FRIEDMAN, A.; NOSANCHUK, J.D. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiol**ogy, v. 6, p. 1-11, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00202.

BALTAZAR, L.D.M.; SOARES, B.M.; CARNEIRO, H.C.; AVILA, T.V.; GOUVEIA, L.F.; SOUZA, D.G.; FERREIRA, M.V.; PINOTTI, M.; SANTOS, D.D.A.; CISALPINO, P.S. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum: in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 354-361, 2013. doi: 10.1093/jac/dks414.

BITTENCOURT, J.I.M.; OLIVEIRA, R.M.; COUTINHO, Z.F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1856-1864, 2005. doi.org/10.1590/S0102-311X2005000600035

BONNETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleachin of sensitisers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9513-9547, 2001. doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00952-8.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An Update. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, p. 87-117, 1993.

CALICH, V.L.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 66, n. 5, p. 585-594, 1985.

CALZAVARA, P.P.; ROSSI, M.T.; SALA, R.; VENTURINI, M. Photodynamic antifungal chemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 512-522, 2012. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01107.x

CAMPOS, E.G.; JESUINO, R.S.; DANTAS, A.S.; BRIGIDO, M.M.; FELIPE, M.S.S. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 2, p. 409-429, 2005.

CAMPOS, E.P.; SARTORI, J.C.; HETCH, M.L.; FRANCO, F. Clinical and Serologic features of 47 patients with Paracoccidioidomycosis treated by Amphotericin B. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 26, n. 4, p. 212-217, 1984. doi.org/10.1590/S0036-4665198400040000.

CAMPOS, M.V.S.; PENNA, G.O.; CASTRO, C.N.; MORAES, M.A.P.; FERREIRA, M.S.; SANTOS J.B. Paracoccidioidomycosis at Brasilia'suniversity hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 168-172, 2008. doi.org/10.1590/S0037-86822008000200007

CASSONE, A.; SIMONETTI, N.; STRIPOLI, V. Ultrastructural changes in the wall during germ-tube formation from blastospores of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v. 77, p. 417-426, 1973.

CELLI, J.P.; SPRING, B.Q.; RIZVI, I.; EVANS, C.L.; SAMKOE, K.S.; VERMA, S.; POGUE, B.W.; HASAN, T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2795-2838, 2010. doi: 10.1021/cr900300p

CHABRIER-ROSSELÓ, R.; GIESSELMAN, B.R.; JESÚS-ANDINO, F.J.; FOSTER, T.H.; MITRA, S.; HAIDARIS, C.G. Inhibition of electron transport chain assembly and function promotes photodynamic killing of *Candida*. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 99, n. 3, p. 117-125, 2010. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.03.005.

CHIARELLI-NETO, O.; PAVANI, C.; FERREIRA, A.S.; UCHOA, A.F.; SEVERINO, D.; BAPTISTA, M.S. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanina. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 6, p. 1195-1202, 2011. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.013.

CONTI-DIAZ, I.A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 131-134, 2007. doi.org/10.1590/S0036-46652007000200014

COSTA, A.C.; CAMPOS, V.M.R.; PEREIRA, C.A.; SILVA, E.S.H.; BELTRAME, M.J.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythosine and LED mediated photodynamic therapy. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 11, p. 1299-1305, 2011. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.05.013.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C. Paracoccidioidomycosis: mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, v. 5, p. 1441-1454, 2002. Doi: 10.1590/S0102-311X2002000500037

CUNHA, M.M.; FRANZEN, A.J.; SEABRA, S.H.; HERBST, M.H.; VUGMAN, N.V.; BORBA, L.P.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 2-9, 2010. doi: 10.1186/1471-2180-10-80

DAI, T.; TEGOS, G.P.; ZHIYENTAYEV, T.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 1, p. 38-44, 2010. doi: 10.1002/lsm.20887

DE GROOT, P.W.; RAM, A.F.; KLIS, F.M. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 8, p. 657-675, 2005. doi.org/10.1016/j.fgb.2005.04.002

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005. doi: 10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 380-387, 2003. doi: 10.1038/nrc1071.

DONNELLY, R.F.; MCCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008. doi: 10.1016/j.micres.2007.08.001.

ERNAM, J.E.; VITELLO, L.B. Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1597, p. 193-220, 2002.

ESPUNARDI, K.C.; SOUZA, V.C.; FILHO, R.B.; FILHO, M.A. Eficácia do controle farmacológico da paracoccidioidomicose no município de Cacoal – RO. **Uningá Review**, v. 3, n. 4, p. 56-64, 2010.

FAVA, S.D.C.; FAVA-NETTO, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Revista Instituto de Medicina** Tropical de São Paulo, v. 40, n. 3, p. 1-13, 1998. doi.org/10.1590/S0036-46651998000300005

FRESHNEY, R.. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techinique. P. 117, 1987.

FORNAJEIRO, N.; MALUF, M.L.F.; TAKAHACHI, G.; SVIDZINSKI, T.I.E. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidioidomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 191-193, 2005.

FRANCO, M.C.S.; LACAZ, A.; RESTREPO, M.; DEL NEGRO, D. *Paracoccidioides brasiliensis* ultra structural findings. **Paracoccidioidomycosis**, v. 36, p. 27-44, 1994.

FRANCO, M.F.; MONTENEGRO, M.R.G.; MENDES, R.; MARCOS, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p.129-132, 1987.

FREIRE, F.; BARROS, P.P.; ÁVILA, D.S.; BRITO, G.N.B.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. **Laser in Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 1511-1518, 2015. doi: 10.1007/s10103-015-1747-0.

GABRIELLI, D.; BELISLE, E.; SEVERINO, D.; KOWALTOWSKI, A.J.; BAPTISTA, M,S. Binding Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227-232, 2004. doi: 10.1111/j.1751-1097.2004.tb00389.x

- GAD, F.; ZAHRA, T.; FRANCIS, K.P. Targeted photodynamic therapy of established soft tissue infections in mice. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 451-458, 2004. doi: 10.1039/b311901g.
- GESSLER, N.N.; EGOROVA, A.S.; BELOZERSKAYA, T.A. Melanin Pigments of Fungi under Extreme Environmental Conditions (Review). **Biochemistry and Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 105-113, 2014. doi: 10.1134/S0003683814020094
- GRANZOTO, D.S.; VITALI, L.H.; MARTINEZ, R. Efficacy of voriconazole in experimental rat Paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 79-83, 2013. doi.org/10.1590/0037-868216432013.
- HABIF, T.P. **Dermatologia clínica:** Guia colorido para diagnóstico e tratamento. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005.
- HAJIN, K.I.; SALIH, D.S.; RASSAN, Y.Z. Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 5, p. 743-748, 2010. doi: 10.1007/s10103-010-0803-z.
- HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 43, n. 3, p. 411-413, 1999.
- HE, X.; WU, X.; WANG, K.; SHI, B.; HAI, L. Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous *in vivo* imaging and photodynamic therapy. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5601-5609, 2009. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.030.
- HENNESSY, A.; OH, C.; DIFFEY, B.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; REES, J. Eumelanin and pheomelanin concentrations in human epidermis before and after UVB irradiation. **Pigment Cell Research**, v. 18, n. 3, p. 220-223, 2005. doi: 10.1111/j.1600-0749.2005.00233.x
- JUNQUEIRA, H.C.; SEVERINO, D.; DIAS, L.G.; GUGLIOTTI, M.S.; BAPTISTA, M.S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. **Physical Chemistry Physics**, v. 4, n. 11, p. 2320-2328, 2002. doi: 10.1039/B109753A

JUNQUEIRA, J.C.; RIBEIRO, M.A.; ROSSONI, R.D.; BARBOSA, J.O.; QUERIDO, S.M.R.; JORGE, A.O.C. Antimicrobial photodynamic therapy: photodynamic antimicrobial effects of malachite green on *Staphylococcus*, Enterobacteriaceae and *Candida*. **Photomedicine and Laser Surgery.**, v. 28, n. 1, p. 67-72, 2010. doi: 10.1089/pho.2009.2526.

KARIMINEZHAD, H.; HABIBI, M.; MIRZABABAYI, N. Nanosized ZSM-5 will improve photodynamic therapy using Methylene Blue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, v. 148, p. 107-112, 2015. doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.013

KASHEF, N.; ABADI, G.R.S.; DJAVID, G.E. Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and multi drug resistant Escherichia coli. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 1, p. 11-15, 2012. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.11.004

KATHIRAVAN, M.K.; SALAKE, A.B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P.B.; WATODE, R.P.; MUKTA, M.S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. *In:* FRANCO M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 1-4.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS. J.E.C.; VACARI-HEINS, E.M.; MELLO, N,T. Paracoccidioidomicose. *In:* LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de Micologia médica**; 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACAZ, C.S.; SAMPAIO, S.A.P. Tratamento da Blastomicose Sul-Americana com Anfotericina B. Resultados Preliminares. **Revista Paulista de Medicina**, v. 52, p. 443-450, 1958.

LAMBRECHTS, S.A.; AALDERS, M.C.J.; MARLE, J.V. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, 2005. doi: 10.1128/AAC.49.5.2026–2034.2005

- LIMA, J.P.M.; SAMPAIO, M.M.A.; BORGES, F.M.; TEIXEIRA, A.H.; STEINER, O.C.; NOBRE, S.M. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. **European Journal of Oral Sciences**, v. 117, n. 5, p. 568-574, 2009. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00662.x.
- LIU, Y.; SIMON, J.D. Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 6, p.606-618, 2003. doi: 10.1046/j.1600-0749.2003.00098.x
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das Hyphoblastomycoses americanas". **Brazil-Medico, Revista Semanal de Medicina e Cirurgia**, v. 22, n.13, p.121-124; n.15, p.141-144, 1908.
- LYON, J.P.; MOREIRA, L.M.; MORAES, P.C.; SANTOS, F.V.; RESENDE, M.A. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. **Mycoses**, v. 5, p. 265-271, 2011.
- MACIEL, C.M.; PIVA, M.R.; RIBEIRO, M.A.G.; SANTOS, T.S.S.; RIBEIRO, C.F.; FILHO, P.R.S.M. Methylene Blue Mediated Photodynamic Inactivation Followed by Low Laser Therapy versus Miconazole Gel in the Treatment of Denture Stomatitis. **Journal of Prosthodontics**, v. 25, n. 1, p. 28-32, 2016. doi:10.1111/jopr.12284
- MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.
- MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 43, n. 4, p. 480, 2010. doi.org/10.1590/S0037-86822010000400034
- MARTINEZ, R.; MOYA, M.J. Therelation ship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. **Revista de Saúde Publica**, v. 26, n. 1, p. 12-16, 1992. doi.org/10.1590/S0034-89101992000100003
- MATUTE, D.R.; MCEWEN, J.G.; MONTES, B.A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J.T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NINO-VEJA, G.; TAYLOR, J.W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*

- as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006. doi: 10.1093/molbev/msj008
- MAVER, B.M.; MRAVAK, S.M.; JEROLIMOV, V. Effect o low level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. **Photomedicine and Laser Surgery.**, v. 23, n. 3, p. 328-332, 2005. doi.org/10.1089/pho.2005.23.328
- MEDOFF, G.; PAINTER, A.; KOBAYASHI, G.S. Mycelial to yeast phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 9, p. 4055-4060, 1987.
- MENDES, R.P. Paracoccidioidomicose. *In:* ROCHA, M.O.C.; PEDROSO, E.R.P. **Fundamentos em Infectologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2009
- MIMA, E.G.; 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. doi: 10.1089/pho.2011.3022
- MIMA, E.G.; VERGANI, C.E.; MACGADO, A.L.; MASSUCATO, E.M.; COLOMBO, A.L.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: arandomized clinical trial. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 10, p. 380-388, 2012. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03933.x
- MIYABE, M.; JUNQUEIRA, J.C.; COSTA, A.C.B.P.; JORGE, A.O.C.; RIBEIRO, M.S.; FEIST, I.S. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 3, p. 230-234, 2011. doi.org/10.1590/S1806-83242011005000006
- MOREIRA, L.M.; LYON, J.P.; ROMANI, A.P.; SEVERINO, D.; RODRIGUES, M.R.; OLIVEIRA, H.P.M. Phenotiazinium dyes as photosensitizers (PS) in photodynamic therapy (PDT) in: Spectroscopic Properties and Photochemical Mechanisms. Chapter 14. **Intech Open Access Publisher**. p. 392-422, 2012. doi: 10.5772/48087
- NANASHIMA, A.; NAGAYASU, T. Current Status of Photodynamic Therapy in Digestive Tract Carcinoma in Japan. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, n. 2, p. 3434-3440, 2015. doi: 10.3390/ijms16023434

- NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003. doi: 10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x
- NUÑEZ, S.C.; RIBEIRO, M.S.; GARCEZ, A.S. **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia**. 1. ed. São Paulo: Elsevier, 2013.
- NUÑEZ, S.C.; YOSHIMURA, T.M.; RIBEIRO, M.S.; JUNQUEIRA, H.C.; MACIEL, C.; NETO, M.D.C.; BAPTISTA M.S. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology**, v. 150, p. 31-37, 2015. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.03.018
- OBSTOY, B.; SALAUN, M.; BOHN, P.; VERESEZAN, L.; SESBOUE, R.; THIBERVILLE, L. Photodynamic therapy using methylene blue in lung adenocarcinoma xenograft and hamster cheek pouch induced squamous cell carcinoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p.109-114, 2016. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.03.003
- ORTH, K.; BECK, G.; GENZE, F.; RUCK, A. Methylene blue mediated photodynamictherapy in experimental colorectal tumors in mice. . **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 57, n. 2-3, p. 186-192, 2000. doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00105-6
- PANIAGO, A.M.M.; AGUIAR, J.I.A.; AGUIAR, E.S.; CUNHA, R.V.; PEREIRA, G.R.O.; LONDERO, A.T.; WANKE, B. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 455-459, 2003. doi.org/10.1590/S0037-86822003000400004
- PARENTE, J.A.; BORGES, C.L.; BAILAO, A.M.; FELIPE, M.S.; PEREIRA, M.; ALMEIDA, S.C.M. Comparison of transcription of multiple genes during mycelia transition to yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals insights to fungal differentiation and pathogenesis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 259-273, 2008. doi: 10.1007/s11046-007-9078-8
- PELOI, L.S.; SOARES, R.R.S.; BIONDO, C.E.G.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of lightemitting diode light on cell growth inhibition by methylene blue. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 2, p. 231-237, 2008.

PEREIRA, C.A.; ROMEIRO, R.L.; COSTA, A.C.B.P.; MACHADO, A.K.S.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Susceptibility of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an *in vitro* study. **Lasers in Medical Science**, v. 26, n. 3, p. 341-348, 2011. doi: 10.1007/s10103-010-0852-3

PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007. doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009. doi: 10.1007/s10103-008-0539-1

PRADO, M.; SILVA, M.B.; LAURENTI. R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: review from 1996-2006. **Memórias do Instituto Osvaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009. doi: 10.1590/S0074-02762009000300019

PRATES, R.A.; FUCHS, B.B.; MIZUNO, K.; NAQVI, Q.; KATO, I.T.; RIBEIRO, M.S.; MYLONAKIS, E.; TEGOS, G.P.; HAMBLIN, M.R. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2013. doi.org/10.1371/jornal.pone.0054387

QUIROGA, E.D.; ALVAREZ, M.G.; DURANTINI, N. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic action of 5,10,15,20-tetra (4-N methylpyridyl) porphyrin in different media. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 123-131, 2010. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00725.x

RADI, R. Peroxynitrite a stealthy biological oxidant. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 37, p. 26464-26472, 2013. doi: 10.1074/jbc.R113.472936

RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle. **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus

Paracoccidioides brasiliensis: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346-353, 1984.

RESTREPO, M.A. Infection agents and pathogenesis. *In:* MURPHY, J.W.; FREIDMAN, H.; BENDINELLI, M. **Fungal infection and immune responses.** New York and London: Plenum Pres, 1993. p. 251-276.

RESTREPO, M.A. Paracoccidioidomycosis. *In*: DISMUKES, W.E.; PAPPAS, P.G.; SOBEL, J. **Clinical Mycology**. New York, Oxford: University Press, 2003. p. 328-345.

RIBEIRO, C.M.; CAIXETA, C.A.; CARLI, M.L.; SPERANDIO, F.F.; MAGALHÃES, S.E.M.; PEREIRA, A.C.; HANEMANNA, J.A.C. Photodynamic inactivation of oral paracoccidioidomycosis affecting woman with systemic lupus erythematosus: An unusual case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.**, v. 17, p. 160-163, 2017. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.12.006

ROSA, L.P.; SILVA, F.C.; NADER, S.A.; MEIRA, G.A.; VIANA, M.S. Antimicrobial photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilms in bone specimens using methylene blue, toluidine blue ortho and malachite green: An *in vitro* study. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 5, p. 675-680, 2015. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.02.010

SAHU, A.; CHOI, V.I.I.; HYUN, L.; TAE, G. Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 26, p. 6239-6248, 2013. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.066

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 31, p. 99-113, 1993.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v. 165, p. 183-195, 2008. doi: 10.1007/s11046-007-9040-9

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; RODRIGUEZ, L.E.; CASTRO, C.J. A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. **Acta Científica Venezolana**, v. 38, p. 202-211, 1987.

SANTO, A.H. Tendência da mortalidade relacionada à Paracoccidioidomicose, estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 21, p. 313-324, 2008. doi.org/10.1590/S1020-49892008000500003

SANTOS, L.F.M.; MELO, N.B.; CARLI, M.L.; MENDES, A.C.S.C.; BANI, G.M.A.C.; VERINAUD, L.M.; BURGER, E.; MORAES, G.O.I.; PEREIRA, A.A.C.; BRIGAGÃO, M.R.L.; HANEMANN, J.A.C.; SPERANDIO, F.F. Photodynamic inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis* helps the outcome of oral paracoccidiodomycosis. **Lasers in Medical Science**, v. 32, p. 921-930, 2017. doi: 10.1007/s10103-017-2193-y

SBEGHEN, M.R.; VOLTARELLI, E.M.; CAMPOS, T.G.; KIMURA, E.; ARISTIDES, S.M.A.; HERNANDES, L.; CAETANO, W.; HIOKA, N.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Topical and Intradermal Efficacy of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Light Emitting Diode in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Journal of Laser in Medical Sciences**, v. 6, n. 3, p.106-111, 2015. doi: 10.15171/jlms.2015.03

SEONG, D.Y.; KIM, Y.J. Enhanced photodynamic therapy efficacy of methylene blue-loaded calcium phosphate nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 146, p. 34-43, 2015. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.02.022

SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H.C.; GUGLIOTTI, M.; BAPTISTA, M.S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited states properties of methylene blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 5, p. 459-468, 2003. doi: 10.1562/0031-8655(2003)0770459IONCIO2.0.CO2

SHANKAR, J.; RESTREPO, A.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.2, p. 296-313, 2011. doi: 10.1128/CMR.00062-10.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; FILHO, F.Q.T.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SILVA, M.B.; THOMAZ, L.; MARQUES, A.F.; SVIDZINSKI, A.E.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants

and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 644-648, 2009. doi.org/10.1590/S0074-02762009000400019

SIMONETTI, O.; CIRIONI, O.; ORLANDO, F.; ALONGI, C.; LUCARINI, G.; SILVESTRI, C. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy with a single treatment of RLP068/CI in an experimental model of *Staphylococcus aureus* wound infection. **BJD**, v. 164, n. 5, p. 987-995, 2011. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10232.x

SINDRIN, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e laboratoriais da micologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999.

SOUSA, A.S.; PRATES, R.A.; SANTI, M.E.; LOPES, R.G.; BUSSADORI, S.K.; FERREIRA, L.R.; DEANA, A.M. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of theradiant energy and photosensitizer charge. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 14, p. 111-114, 2016. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.03.004

SOUSA, R.C.; JUNQUEIRA, J.C.; ROSSONI, R.D.; PEREIRA, C.A.; MUNIN, E.; JORGE, A. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachita green and lowpower laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2010. doi: 10.1007/s10103-009-0706-z

STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrinbased photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998. doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00015-5

TABORDA, C.P.; DA SILVA, M.B.; NOSANCHUK, J.D.; TRAVASSOS, L.R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a mini review. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 331-339, 2008. doi: 10.1007/s11046-007-9061-4

TANG, W.; XU, H.; PARK, E.J.; PHILBERT, M.A.; KOPELMAN, R. Encapsulation of Methylene Blue in Polyacrylamide Nanoparticle Platforms Protects its Photodynamic Effectiveness. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 2, p. 579-583, 2008. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.066

TARDIVO, J.P.; DEL GIGLIO, J.P.; OLIVEIRA, C.S.D.S.; GABRIELLI, H.C.; JUNQUEIRA, D.B.; SEVERINO, D.; FÁTIMA, D.T.; BAPTISTA, M.S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.

TEGOS, G.P.; MASAGO, K.; AZIZ, F.; HIGGINBOTHAM, A.; STERMITZ, F.R.; HAMBLIN, M.R. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3202-3209, 2008. doi: 10.1128/AAC.00006-08.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C; CARVALHO, M.J; FERNANDES, L.; PAES, H.C; HAHN, R.C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M.S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273-283, 2009. doi: 10.1016/j.ympev.2009.04.005

TELLES, F.Q. Aspectos Ultraestruturais da Parede Celular do *Paracoccidioides brasiliensis* nas Fases Micelial e Leveduriforme. **Revista Patologia Tropical**, v. 16, n. 01, p. 47-94, 1987.

TOREZAN, L.; NIWA, A.B.M.; FESTA, N. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445-459, 2009. doi.org/10.1590/S0365-05962009000500002

UCHOA, A. F.; KNOX, P. P.; TURCHIELLE, R.; SEIFULLINA, N.; BAPTISTA, M. S. Singlet oxygen generation in the reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. **European Biophysics Journal**, v. 37, n. 6, p. 843-850, 2008. doi: 10.1007/s00249-008-0287-y.

UCHOA, A.F.; BAPTISTA, M.S. Terapia Fotodinâmica: Mecanismos e Perspectivas de Desenvolvimentos de Novos Fotossensibilizadores. **Jornal Brasileiro de Laser**, p. 10-23, 2007.

USACHEVA, M.N.; TEICHERT, M.C.; BIEL, M.A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 71, n. 1-3, p. 87-98, 2003.

- VALLE, A.C.F.; COSTA, R.B.L. Paracoccidioidomicose. *In:* BATISTA, R.S.; IGREJA, R.P.; GOMES, A.D.; HUGGINS, D.W. **Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitarias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2001. p. 934-958.
- VAN, R.S.H.; SADLER, P.J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1089-1097, 2009. doi: 10.1016/j.drudis.2009.09.003
- VERMA, S.K.; MAHESHWARI, S.; SINGH, R.K. Laser in dentistry: an innovative tool in modern dental practice. **National Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 3, n. 2, p.124-132, 2012. doi: 10.4103/0975-5950.111342.
- VILELA, S.F.G.; JUNQUEIRA, J.C.; BARBOSA, J.O.; MAJEWSKI, M.; MUNIN, E.; JORGE, A.O.C. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 6, p. 704-710, 2012. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.12.002.
- VILLAR, L.A; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, n. 5, p. 269-276, 1998.
- WOOD, Z.A.; SCHRODER, J.R.; POOLEL, B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxin. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 32-40, 2003. doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00003-8
- XU, Y.; YOUNG, M.J.; BATTAGLINO, R.A.; MORSE, L.R.; FONTANA, C.R.; PAGONIS, T.C. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 11, p. 1567-1572, 2009. doi: 10.1016/j.joen.2009.08.002.
- ZEINA, B.J.; GREENMAN, W.M.; PURCELL, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 144, p. 274-278, 2001.
- ZOLFAGHARI, P.S.; PACKER, S.; SINGER, M.; NAIR, S.P.; BENNETT. J. *In vitro* killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 27, 2009.