

TERAPIA FOTODINÂMICA COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVO-VAGINAL

M. E. S. O. Santi, R. A. Prates, R. G. Lopes, A. S. Sousa, L. R. Ferreira e A. M. de Ana

Departamento de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde- UNINOVE, São Paulo

e-mail: mesimoes@uol.com.br

Resumo: As infecções vulvovaginais são causadas em grande parte pelo fungo *Candida albicans*, que afeta 75% das mulheres pelo menos uma vez, representa grande desafio na prática clínica. O objetivo desse estudo é avaliar a eficácia da PDT como tratamento de infecções vaginais causadas por *C. albicans* em modelo experimental. Foram testados três fotossensibilizadores: azul de metileno, verde malaquita e protoporfirina PpNeTNI. Analisados os dados pós tratamento com PDT + azul de metileno, observou-se que houve decréscimo na população fúngica estabelecida quando comparada ao grupo controle, de aproximadamente uma ordem de grandeza. Como $p = 0,0389$. Apesar do verde malaquita, não possuir um efeito fotodinâmico expressivo ($p = 0,3482$), ele retardou o crescimento do fungo, demonstrando que apresenta um efeito fungistático importante. O terceiro fotossensibilizador utilizado, conhecido como PpNetNI é uma protoporfirina recentemente sintetizada. Neste trabalho PpNetNI foi utilizado pela primeira vez em uma infecção induzida e teve a maior redução no número de UFC, em comparação com o grupo controle, dentre todos os fotossensibilizadores estudados.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, fotossensibilizados, *Candida albicans*.

Abstract: Vulvovaginal candidiasis affects 75% of all women at least once during lifetime and still represents a challenge in gynecological practice, since patients take long antibiotic periods and frequently fall in new episodes soonly after treatment. Photodynamic Therapy is considered a new therapeutical approach treating fungal vaginal infections. The aim of this study was to investigate the efficiency of photodynamic therapy against yeast cells in a murine model, using three different photosensitizers: methylene blue, malachite green and Porphirin PpNeTNI. On methylene blue treated group, we had statistical significant yeast decrease. Malachite green also demonstrated an important fungistatic mechanism. In this study, porfirin PpNetNI was tested in animal model for the first time and seems to be an important agent in PDT therapy.

Keywords: photodynamic therapy, photosensitizer, *Candida albicans*.

Introdução

As infecções vulvovaginais representam a queixa mais comum na prática ginecológica, ou seja, são o principal motivo que leva as mulheres ao consultório do ginecologista, quer no sistema público quanto na medicina privada [1]. Dentre estas, a candidíase vulvovaginal é a segunda mais frequente [2]. Essa infecção genital é tipicamente causada pelo fungo *Candida spp* e afeta 70-75% das mulheres pelo menos uma vez durante sua vida reprodutiva, sendo que 40-50% dessas mulheres experimentarão pelo menos um episódio de recorrência. Em 5-8 % das mulheres, observaremos mais de três episódios de candidíase vulvovaginal no prazo de um ano, condição que determina a candidíase vulvovaginal de repetição [3]. Extrapolando as estatísticas de Fidel para a população brasileira, baseados em dados populacionais (IBGE 2010), atualmente cerca de 75.000.000 mulheres em nosso país usam drogas antifúngicas para tratar corrimentos vaginais pelo menos uma vez ao ano. Dessas, cerca de 5.000.000 usam as mesmas drogas de duas a três vezes ao ano e estarão susceptíveis a seus custos e aos seus efeitos colaterais.

A relevância desta doença baseia-se tanto em sua alta incidência, como no desconforto clínico que provocam, marcados por corrimento vaginal abundante, prurido vulvar e vaginal intensos, ardência genital e sintomas urinários. A magnitude de sua sintomatologia pode causar impactos negativos na qualidade de vida, desempenho no trabalho, comportamento sexual e conduzir a estresse psicológico. Calcula-se que seu diagnóstico e tratamento, somados à perda de produtividade no trabalho, resultem em custo aproximado de um bilhão de dólares por ano nos Estados Unidos e geraram mais de 13 milhões de prescrições de antifúngicos na década de 1990 [4]. Essa é a estimativa de custo mais precisa encontrada pelos autores. No Brasil, a dificuldade de notificação de doenças infecciosas e o uso de medicações sem prescrição médica dificultam ainda mais a acurácia desses dados.

O tratamento convencional é feito através de drogas antifúngicas derivadas de imidazólicos. A principal limitação no tratamento baseia-se no fato do medicamento de escolha utilizado (Fluconazol na dose de 150 mg via oral) tratar-se de uma droga fungistática e não fungicida, resultando em frequente recidiva da sintomatologia após a suspensão do tratamento [5].

Esse projeto busca preencher uma lacuna no tratamento da vulvovaginite de repetição, utilizando o recurso da terapia fotodinâmica. Pacientes com essa doença, especialmente aquelas cuja utilização do antifúngico seja contra-indicada, certamente se beneficiarão dessa alternativa terapêutica, que poderá causar forte impacto na saúde pública.

Materiais e Métodos

Esse estudo foi protocolado no CEUA da UNINOVE sob número 0025/2013. Adotamos modelo experimental de candidíase vulvovaginal em camundongas previamente demonstrado na literatura [6].

Os animais foram tratados com valerato de estradiol 2 mg/mL diluído em óleo de sésamo filtrado, injetado no subcutâneo 72 horas antes a indução da vaginite e repetidos semanalmente, até o término do ensaio experimental, para permitir estabelecimento de uma infecção vaginal persistente.

O modelo de infecção foi desenvolvido com a cepa *Candida albicans* ATCC 90028 cultivada a partir de uma matriz em AGAR SABORAUD DEXTROSE (Acumedia^R Lot 105961B exp may.2017) pH final $5,6 \pm 0,2$ a 25°C sob condições aeróbicas a 37°C com 24 h de antecedência ao início do experimento.

O inóculo foi preparado em tubo Falcon estéril com 7,0 mL de PBS (*sterile phosphate buffered saline solution*), homogeneizado em vortex. A turbidez da suspensão foi medida em espectrofotômetro a 540 nm para obter suspensão celular com densidade óptica de 0,16 (1×10^6 a 2×10^6 UFC/ml).

A inoculação vaginal foi realizada 72 h após a primeira administração do valerato de estradiol, por meio da deposição de uma alíquota de 50 μl (10^8 UFC/ml) na vagina de cada animal.

Alíquotas de 50 μL de fotossensibilizador foram depositadas no canal vaginal das camundongas, com as seguintes concentrações: 100 μM para o azul de metileno, 2 mM para o verde malaquita e 10 μM para a porfirina PpNeTNI.

Para os fotossensibilizadores Azul de Metileno e Verde Malaquita, que possuem uma banda de absorção na região de 660 nm, foi utilizado laser com comprimento de onda compatível e irradiação no introito vaginal (figura 1).



Figura 1: Irradiação introito vaginal

No caso do fotossensibilizador PpNeTNI (porfirina), a banda de absorção localiza-se na região de 630 nm, portanto foi utilizado o LED para irradiação (única fonte disponível neste comprimento de onda). A irradiação com o LED foi feita de maneira trans-abdominal,

conforme figura 2.



Figura 2 : Irradiação trans - abdominal

Os parâmetros espectroscópicos e os de irradiação utilizados podem ser observados na tabela 1. A metodologia de irradiação deve-se aos equipamentos disponíveis e adequou-se às condições fotofísicoquímicas dos fotossensibilizadores.

Tabela 1: parâmetros espectroscópicos e de irradiação utilizados:

| Parâmetro | Laser | LED |
|--|------------------|-----------------|
| Comprimento de onda central (nm) | 660,52 | 626.37 |
| Largura espectral (FWHM) (nm) | 0,71 | 17.4 |
| Modo de operação | Contínuo | |
| Potência radiante média (mW) | 84 | 335 |
| Polarização | Aleatório | |
| Tamanho do feixe no tecido alvo (cm ²) | 0.01 | 2.84 |
| Irradiância no tecido alvo (mW/cm ²) | 8400 | 118 |
| Tempo de exposição (s) | 720 | 720 |
| Exposição radiante (J/cm ²) | 6048,0 | 85.1 |
| Energia radiante (J) | 60,48 | 241.2 |
| Técnica de aplicação | Introito vaginal | Trans-abdominal |
| Número de sessões | 1 | 1 |
| Energia irradiante total (J) | 60,48 | 241.2 |

Resultados e discussão

Após a quantificação do número de UFCs em cada placa de cada animal, foi obtido o logaritmo da contagem, cuja média pode ser observada na figura 3.. Os logaritmos dos dados apresentam uma distribuição log-normal, portanto será utilizada a estatística para dados paramétricos.

Ao analisar-se os dados pós tratamento com PDT + azul de metileno, observa-se que houve decréscimo na população fúngica estabelecida quando comparada ao grupo controle, de aproximadamente uma ordem de grandeza. Como $p = 0,0389$, podemos afirmar que, ao nível de significância de 0,05, há indícios de diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

De fato, os trabalhos experimentais *in vitro* disponíveis na literatura com similaridade da concentração utilizada para esse fotossensibilizador e similaridade dos parâmetros de irradiação demonstram boa concordância com os resultados aqui apresentados [7].

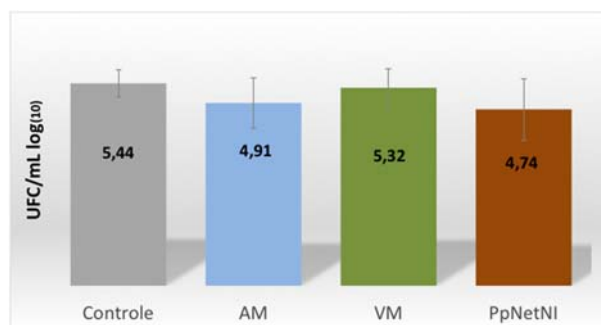


Figura 3 - Médias \pm EP dos grupos estudados.

Além dos parâmetros de irradiação influenciarem na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica, os resultados demonstram que características específicas estabelecidas na infecção *in vivo*, nas relações entre a infecção por esse agente e o hospedeiro como, por exemplo, a organização da *Candida albicans* em biofilmes, contribuem para diminuir a eficácia da PDT em relação a trabalhos *in vitro* [8].

Fotossensibilizadores que tenham uma maior penetração ou afinidade à biofilme, e que gerem outras espécies reativas, que não o oxigênio singlete. O fotossensibilizador Verde Malaquita, bem como porfirinas de um modo geral, possuem esta duas características.

Considerações especiais precisam ser feitas quando analisamos as curvas pós tratamento com Verde Malaquita. À primeira leitura das placas após 24 horas de incubação, não observou-se nenhum crescimento de colônias, mesmo nas menores diluições. Porém, em uma segunda leitura 36 horas após o tratamento, mantidas as condições de incubação, observou-se o aparecimento de UFC.

Apesar do Verde Malaquita não possuir um efeito fotodinâmico expressivo ($p = 0,3482$), ele retardou o crescimento do fungo, demonstrando que apresenta um efeito fungistático importante. Em experimento independente realizado pelo grupo, foi observado inibição de crescimento de *C. albicans*, quando incubado na presença de Verde Malaquita, mesmo que em pequenas concentrações e na ausência de luz.

O terceiro fotossensibilizador utilizado, conhecido como PpNetNI é uma porfirina recentemente sintetizada. Neste trabalho PpNetNI foi utilizado pela primeira vez em uma infecção induzida. Apesar das poucas informações disponíveis a respeito do comportamento de PpNetNI, porfirinas de modo geral possuem bons efeitos fotodinâmicos [9].

A mostra de terapia fotodinâmica onde foi utilizado PpNetNI teve a maior redução no número de UFC, em comparação com o grupo controle, dentre todos os fotossensibilizadores estudados. Observa-se portanto

que houve decréscimo significativo na população fúngica estabelecida quando comparada ao grupo controle, $p = 0,0493$ podemos afirmar que, ao nível de significância de 0,05, há indícios de diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

Conclusões

Os dados obtidos com o grupo controle refletem nossas condições técnicas e metodológicas de reproduzir o modelo experimental descrito na literatura.

Embora o Verde Malaquita exista comercialmente há algumas décadas, sendo inclusive muito utilizado como evidenciador de biofilme em mucosa oral, até onde sabemos, o primeiro estudo *in vivo* em mucosa vaginal visando descontaminação biológica foi realizado neste trabalho, portanto mais trabalhos são necessários para estabelecer sua viabilidade no uso em mucosa vaginal de humanos. Os resultados preliminares demonstram que tamanho amostral mostrou-se insuficiente e sua concentração inibitória mínima também requer maiores estudos, porém devido à seu efeito fungistático, este fotossensibilizador apresenta-se como uma alternativa que pode tornar-se viável, e será fruto de mais investigação pelo grupo.

A utilização da Protoporfirina PpNetNI como fotossensibilizador, utilizada também de maneira inédita neste trabalho, mostrou-se promissora. Porém, por ser um fármaco recente, a literatura ainda carece de estudo de seus efeitos colaterais.

Há portanto a necessidade de uma análise mais profunda dos efeitos da terapia fotodinâmica em mucosa vaginal, tanto de seus efeitos fungicidas como de seus efeitos deletérios no hospedeiro.

Referências

- [1] FEUERRSCHUETTE, O. H. M., SILVEIRA, F.K., FEUERSCHUETTE, I., CORREA, T., GRANDO, L., TREPANI, A.. A Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. FEMINA. Vol. 38, n. 2, 31-36, (2010).
- [2] SOBEL, J.D.. *Vulvovaginal Candidosis*. THE LANCET, Vol. 369, June 9, (2007). Disponível em <<http://www.thelancet.com>> (acesso em 29/3/2014).
- [3] SOBEL, J.D.. *Vulvovaginal Candidosis*. THE LANCET, Vol. 369, June 9, (2007). Disponível em <<http://www.thelancet.com>> (acesso em 29/3/2014).
- [4] KENT, H.L.. Epidemiology of vaginitis. AM J OBSTET GYNECOL, 165: 1168-76. (1991).
- [5] SOBEL, J.D., WIEFENFELD, H., MARK, M., PENY, D., THOMAS, H., ROMPALO, A., MALCOLM, S., LIVENGOOD, C., BENSON, H., JAMES, V., EDWARDS, J., PANZER, H.. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. N ENGL J MED, 351(9):876-83. (2004).

- [6] FIDEL, P.L., LYNCH, M.E. and SOBEL, J.D.:
Candida specific cellmediated immunity is demons
- [7] PRATES, R.A., YAMADA, A., SUZUKI, L.,
HASHIMOTO, M., CAI, S., GOUW-SOARES, S.,
GOMES, L., RIBEIRO, M..Bactericidal effect of
malachite green and red laser on *Actinobacillus acti-*
nomycetemcomitans. JOURNAL OF PHOTO-
CHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY. 86:70-76.
(2007).
trable in mice with experimental vaginal candidiasis.
INFEC. IMMUN. 61:1990-1995. (1993).
- [8] PRATES, R.A., SILVA, E.G., YAMADA JR.,
A.M., SUZUKI, L.C., PAULA, C.R., RIBEIRO,
M.S.. Light parameters influence cell viability in an-
tifungal photodynamic therapy in a fluence and rate
fluence-dependent manner. LASER PHYSICS,
2009, vol. 19, No. 5. Pp. 1038-1044.
- [9] CALZAVARA-PINTON, P., ROSSI, M., SALA, R.,
VENTURINI, M.. Photodynamic Antifungal
Chemotherapy. PHOTOCHEMISTRY AND PHO-
TOBIOLOGY. (2012).