

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAMIRES DE OLIVEIRA SILVA

PAPEL DA GLICOSE NA INATIVAÇÃO DE *Candida albicans*
NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

São Paulo, SP

2020

TAMIRES DE OLIVEIRA SILVA

**PAPEL DA GLICOSE NA INATIVAÇÃO DE *Candida albicans*
NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título de Doutora em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Renato Araujo Prates

São Paulo, SP

2020

Oliveira-Silva, Tamires.

Papel da glicose na inativação de *Candida albicans* na terapia fotodinâmica antimicrobiana. / Tamires de Oliveira Silva. 2020.

45 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof. Dr. Renato Araujo Prates.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Azul de metileno. 3. *Candida albicans*. 4. Antimicrobiano. 5. Bombas de efluxo.

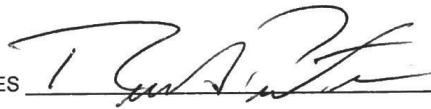
São Paulo, 28 de fevereiro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

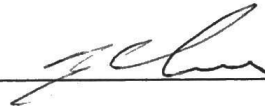
Aluno (a): Tamires de Oliveira Silva

Título da Tese: "Glicose na inativação de *candida albicans* na terapia fotodinâmica antimicrobiana"


Presidente: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



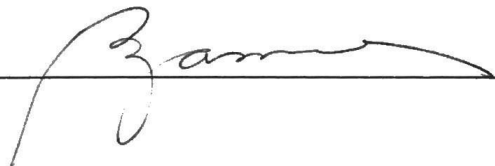
Membro: PROF^a. DR^a. ADRIANA LINO SANTOS FRANCO



Membro: PROF^a. DR^a. PATRICIA APARECIDA DA ANA



Membro: PROF^a. DR^a. STELLA REGINA ZAMUNER



Dedico este trabalho a minha madrinha,
Kátia de Oliveira Albuquerque - *in
memoriam* - seu amor e incentivo
persistem.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todos os desafios que me foram colocados ao longo desse período de estudos. Sem eles, definitivamente, não teria evoluído.

Agradeço a minha mãe Miriam, que sempre acredita em mim e nos meus sonhos e a minha irmã, que sempre me manda mensagens de apoio.

Agradeço ao meu sobrinho, Gustavo Henrique Silva Mendes, por ser uma das minhas maiores motivações de vida. Quando está muito difícil, é a pessoa que vem a minha mente e me faz tirar forças de onde for.

Agradeço a minha doguinha Sandy que foi minha companheira nessa fase, diminuindo as tensões e enchendo meus dias de alegria.

Ao meu orientador, Renato Prates, pelos 7 anos de parceria da iniciação científica ao doutorado.

Agradeço a Cíntia Leal e Letícia Heineck por terem feito parte dessa jornada, pelo apoio, carinho e amizade constante.

Aos meus amigos Renan Baldaia e Rachel Dalmaso que me deram muito suporte neste período. Agradeço a Talita Lopez, Zenildo Silva, Cecília Lee e Marcela Moro pela amizade e parceria.

Agradeço a equipe técnica, sempre solícita e educada, com certeza fizeram toda diferença no desenvolvimento desse projeto. Em especial, a Núbia e Haryanne por todo suporte que deram no decorrer dos experimentos.

Agradeço a Prof^a Dra. Christiane Pavani e a Helenice por todo suporte durante os ensaios de UPTAKE e RNO.

Agradeço aos meus alunos de iniciação científica: Fernanda Brosco, Ramon Barbosa, Maria Eduarda, Felipe Souza, Pâmela Palucci e Sarah Orsoni, pela dedicação, vocês foram fundamentais para essa pesquisa.

Aos professores do Programa de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde por todo aprendizado.

Aos meus alunos da graduação e aos funcionários da Universidade Nove de Julho.

Agradeço, especialmente, a Universidade Nove de Julho por permitir completar esse ciclo de estudo da graduação ao doutorado.

Por fim, agradeço por todas as pessoas que de forma indireta ou direta puderam contribuir para a realização deste trabalho.

“Somos el grito de las que ya no tienen voz”

- Ni Una Menos

RESUMO

A *Candida albicans*, na presença da glicose pode aumentar a quantidade de fotossensibilizador intracelular e a quantidade de inativação celular em cepas resistentes. Porém, como esse fungo evoluiu com as mesmas vias de repressão catabólicas de seu ancestral, a *S. cerevisiae*, essa característica herdada contribui para a repressão da captação de glicose quando a glicose é abundante. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o papel das diferentes concentrações de glicose no comportamento antimicrobiano da terapia fotodinâmica em *Candida albicans*. Para melhor entendimento dos processos fotodinâmicos o estudo foi desenvolvido com as em cepas de *Candida albicans* ATCC10231, YEM14 (selvagem) e YEM 15 (resistente). Foram realizados (1) ensaios microbiológicos para investigação da inativação celular, (2) uptake para verificar a captação do fotossensibilizador e mensuração das espécies reativas de oxigênio para verificar se houve degradação. As cepas foram submetidas a tratamento sem glicose, com 1mM e 20mM de glicose associado ao azul de metileno 100uM. Para irradiação, foi utilizado um equipamento LED (Light emitted diode) desenvolvido na UNINOVE pelo Prof. Dr. Alessandro Deana do Programa de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde. O equipamento emite luz central em 660 nm e foi ajustado para produzir potência radiante de 473 mW e as amostras foram irradiadas nos tempos de 1, 3 e 6 minutos. No ensaio microbiológico, a concentração de 1mM foi a mais eficiente na inativação celular para todas as cepas. Sobre a capacidade de incorporação do fotossensibilizador, todas as cepas apresentaram melhor resultado de incorporação com 1mM de glicose. No que tange a formação de espécies reativas de oxigênio, a presença da glicose não causou degradação e nem afetou a formação das espécies. Podemos concluir que maiores concentrações de glicose podem ativar os genes de repressão mas um concentração mínima apropriada pode favorecer a aPDT em *C.albicans* mesmo em cepas resistentes.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Antifúngicos, Fotossensibilizadores, Resistência Microbiana, Glicose.

ABSTRACT

Candida albicans, in the presence of glucose, can increase the amount of intracellular photosensitizer and the amount of cell inactivation in resistant strains. However, as this fungus evolved with the same catabolic repression pathways as its ancestor, *S. cerevisiae*, this inherited characteristic contributes to the suppression of glucose uptake when glucose is abundant. Therefore, the objective of this work is to evaluate the role of different glucose concentrations in the antimicrobial behavior of photodynamic therapy in *Candida albicans*. For a better understanding of the photodynamic processes, the study was developed with *Candida albicans* strains ATCC10231, YEM14 (wild) and YEM 15 (resistant). (1) microbiological tests were carried out to investigate cell inactivation, (2) uptake to verify the uptake of photosensitizer and measurement of reactive oxygen species to check for degradation. The strains were submitted to treatment without glucose, with 1mM and 20mM of glucose associated with 100uM methylene blue. For irradiation, an LED (Light emitted diode) equipment developed at UNINOVE by Prof. Dr. Alessandro Deana of the Biophotonics Program Applied to Health Sciences. The equipment emits central light at 660 nm and was adjusted to produce radiant power of 473 mW and the samples were irradiated at 1, 3 and 6 minutes. In the microbiological assay, the concentration of 1mM was the most efficient in cell inactivation for all strains. Regarding the photosensitizer incorporation capacity, all strains showed a better incorporation result with 1mM of glucose. Regarding the formation of reactive oxygen species, the presence of glucose did not cause degradation or affect the formation of species. We can conclude that higher concentrations of glucose can activate the repression genes but an appropriate minimum concentration can favor aPDT in *C.albicans* even in resistant strains.

Keywords: Photodynamic Therapy, Antifungals, Photosensitizers, Microbial Resistance, Glucose.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1** os transportadores que conferem o fenótipo de resistência multi-drogas (mdr) são encontrados nas famílias abc e mfs. A superfamília abc abrangem proteínas transmembrana, que utilizam a energia resultante da hidrólise de atp, para transportar diferentes moléculas pelas membranas biológicas. Em relação a família mfs, o transporte de drogas para o exterior celular acontece por meio de antiporte com íons hidrogênio (h+), portanto são dependentes da força próton-motriz^(36,39)..... 20
- figura 2** diagrama de Jablonski: a molécula do fotossensibilizador (ps) é excitado pela luz, portanto, os elétrons saltam do estado fundamental para o estado singleto. A partir disso, pode ocorrer um decaimento por fluorescência ou fosforescência por meio do ics (cruzamento intersistemas). Mas, também, o elétrons podem atingir o estado tripleto(mais longo) e a partir disso transferir a energia para o meio gerando a formação de espécies reativas de oxigênio através das reações do tipo i e tipo ii..... 23
- figura 3** as amostras foram irradiadas em uma placa de titulação de 24 poços com equipamento led (light emitted diode) desenvolvido na univove pelo prof. Dr. Alessandro deana do programa de biofotônica aplicada às ciências da saúde 28
- figura 4** resultados de morte bacteriana após a terapia fotodinâmica em experimentos realizados utilizando c. Albicans atcc10231 (a), yem 14 (b) e yem 15 (c) + am na presença de glicose 0 mm, 1mm e 20 mm 32

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 CEPAS DE CANDIDA ALBICANS UTILIZADAS(6)	27
TABELA 2 PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS ⁽⁷⁵⁾	28

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-ALA	5-aminolevulínico
ABC	<i>Cassete de ligação de ATP</i>
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
CaHgt4	Sensor de glicose
C. albicans	<i>Candida albicans</i>
CDR1	<i>Multidrug efflux transporter.</i>
Cdr1p	<i>Multidrug efflux transporter.</i>
CDR2	<i>Multidrug efflux transporter.</i>
Cdr2p	<i>Multidrug efflux transporter.</i>
CgSnf3	Sensor de glicose
Crabtree negativo	Fungos oportunistas (respiração)
Crabtree positivo	Fungos não-oportunistas (fermentação)
ERG11	<i>14α-demethylase</i>
FS	Fotossensibilizador
J	Joules
L	LED
LED	Diodo emissor de luz
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MEP	<i>Microbial efflux pumps</i>
MIC	Concentração inibitória mínima
mM	Mili-molar
MSF	<i>Major Facilitador Superfamily</i>
mW	Mili-Watts
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDT	Terapia Fotodinâmica
RPM	Rotações por minutos
ScGpr1	Receptor de glicose
ScRgt2	Sensor de glicose
ScSnf3	Sensor de glicose
SDS	dodecilsulfato de sódio
SODs	Enzimas superóxido dismutase
SRR	<i>Sugar Receptor-Repressor</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
λ	Comprimento de onda
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação

Sumário

Sumário	14
1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	15
1.1 <i>Candida albicans</i>	16
1.2 Glicose, sua captação e atividade metabólica fúngica	17
1.3 Resistência a antimicrobianos e sistemas de efluxo	19
1.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	21
1.4.1 Mecanismo de Ação.....	21
1.4.2 Espécies Reativas Oxigênio.....	23
1.4.3 Azul de Metileno (AM).....	24
1.4.4 Associação da Glicose e aPDT	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 Gerais	26
2.2 Específicos.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
3.1 Preparação do Inóculo	27
3.2 Irradiação e Parâmetros	28
3.3 Preparação do Fotossensibilizador.....	28
3.4 Preparação da Glicose	29
3.5 Divisão dos Grupos	29
3.5.1 Ensaio Microbiológico	29
3.5.2 Ensaio de Espectroscopia óptica (UPTAKE).....	29
3.5.3 Ensaio para Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)	29
3.6 Ensaio Experimentais	30
3.6.1 Microbiológico.....	30
3.6.2 Espectroscopia óptica (UPTAKE).....	30
3.6.3 Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Microbiológico	32
4.2 Espectroscopia óptica (UPTAKE).....	34
4.3 Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	35
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	40

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

As infecções fúngicas tem sido um grave problema de saúde pública. Isso se deve, entre outros fatores, ao uso exacerbado de antimicrobianos que têm selecionado cepas que contribuem para o fenômeno de resistência microbiana aos fármacos. A *Candida albicans* (*C.albicans*), por exemplo, têm causado infecções recidivantes apresentando baixa resposta ao tratamento convencional. Além disso, está frequentemente associada a infecções severas em pacientes imunossuprimidos aumentando a gravidade do problema.

Nesse contexto, surge a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), uma fototerapia que associa luz, corante (fotossensibilizador) e oxigênio para formar espécies citotóxicas denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Há evidências de que a aPDT é uma eficiente estratégia para inativação de *C. albicans*, no entanto, cepas resistentes podem diminuir a eficiência dessa terapia ao realizar o efluxo do fotossensibilizador.

Nos estudos de Suzuki *et al* (2017) e Oliveira-Silva *et al* (2019), foram avaliados a associação da glicose ao FS na aPDT. Tais estudos sugerem que a presença da glicose, utilizada no metabolismo da *C. albicans*, podem favorecer a incorporação do FS, uma vez que sua presença pode ativar mais de 20 transportadores de hexoses que este fungo possui.

No entanto, Broxton *et al* (2018), investigou o comportamento da *C. albicans* na presença glicose e descobriu que esse fungo possui características ancestrais que podem afetar o seu metabolismo. O estudo contribui no entendimento de que a concentração da glicose influencia na captação ou repressão desta molécula.

Sendo assim, o objeto de estudo desse trabalho é investigar o papel da glicose na aPDT em diferentes concentrações no tratamento de cepas resistentes e não-resistentes.

1.1 *Candida albicans*

As infecções fúngicas invasivas aumentaram consideravelmente nas últimas décadas tornando-se um grave problema de saúde pública^(1,2). A *Candida albicans* é um fungo comumente comensal, mas desequilíbrios imunológicos podem permitir que este micro-organismo penetre tecidos e cause infecções. Sua patogenicidade está associada à virulência da cepa e às condições do hospedeiro pois fatores como diabetes, uso de antibióticos, terapias antineoplásica e AIDS podem aumentar a susceptibilidade à infecções fúngicas⁽³⁾. *Candida albicans* é a espécie de levedura patogênica mais comum, representando cerca de 60% de todas as leveduras isoladas em amostras clínicas^(4,5).

Conforme o estudo de Medeiros *et al.*⁽⁴⁾ (2019), a candidemia tem sido considerada um problema de saúde pública com alta mortalidade. No estudo foram avaliados 68 episódios de candidemia sendo observada uma incidência média de 2,23 episódios/1000 internações e uma taxa de mortalidade em 55 dias de 55,9%. As espécies mais prevalentes foram *Candida albicans* (35,3%), *Candida tropicalis* (27,4%), *Candida parapsilosis* (21,6%) e *Candida glabrata* (11,8%). Maiores taxas de mortalidade foram observadas nos casos de candidemia por *C. albicans* (61,1%) e *C. glabrata* (100%)⁽⁴⁾.

Espécies de *Candida* podem ser encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população humana por comensalismo, ou seja, sem causar efeitos prejudiciais ao hospedeiro⁽¹⁰⁾. No entanto, a *C. albicans* é uma espécie oportunista que, na ineficiência do sistema imune, pode infectar diferentes nichos de seu hospedeiro humano como a mucosa do trato respiratório superior, incluindo também, garganta e mucosa oral, bem como o trato gastrointestinal. Elucidar a micologia de *C. albicans*, bem como seus aspectos morfo-químicos, torna possível o desenvolvimento de terapias de combate a doenças como a candidíase e a candidemia⁽¹¹⁾.

Microrganismos comensais se convertem patogênicos quando os mecanismos de defesa do hospedeiro encontram-se comprometido. Dessa forma, a *C. albicans* está associada, frequentemente, a mortalidade de pacientes com AIDS, transplantados e com queimaduras severas. Além disso, *C. albicans* também possui alta capacidade de adesão a biomateriais utilizados na fabricação

de próteses articulares, vasculares, cateteres, lentes e implantes. Incluindo, portanto, no rol de pacientes susceptíveis a infecções por *C. albicans*, pacientes portadores de diferentes tipos de próteses. Consequentemente, a *C. albicans* também têm sido responsável por uma parcela significativa das infecções nosocomiais de alta morbimortalidade^(10,12,13).

A patogenicidade de *C. albicans* também está associada a sua virulência, ou seja, a diversos fatores inerentes ao próprio fungo que agem concomitantemente afim de superar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Entre tais fatores estão a capacidade de aderência às células epiteliais, ao dimorfismo, a sua variada capacidade de crescimento (blastoporos, pseudo-hifas e hifas), a produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lisofosfolipases), produção de endotoxinas e a configuração de sua parede celular^(10,14,15).

As recentes investigações sobre o genoma diplóide de *C. albicans* têm sido conduzida por estudos de microevolução genômicas de curto prazo em isolados clínicos. Tais estudos têm evidenciado (I) o acúmulo de mutações pontuais, (II) os eventos de perda de heterozigozidade cromossômica em larga escala e (III) mudanças ploidianas com importantes consequências para a resistência aos medicamentos e adaptação ao hospedeiro^(11,16,17).

1.2 Glicose, sua captação e atividade metabólica fúngica

A *C. albicans* têm capacidade de adaptar-se ao metabolismo de seu hospedeiro de acordo com o nutriente disponível, motivo o qual pode causar infecções em diferentes nichos. Tal fungo pode se difundir e maturar-se tanto sob condições de abundância de nutrientes como de escassez. Para *C. albicans*, os açúcares são nutrientes de suma importância e, com a variação da concentração de açúcar nos diferentes nichos do hospedeiro, distintos sistemas de sensores de açúcar estão presentes neste fungo⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

A glicose é a fonte de carbono preferida de muitas espécies e atua fundamentalmente no metabolismo onde a glicose age como um ligante para receptores e como substrato para transportadores⁽²¹⁾. O fungo *Saccharomyces cerevisiae*, do qual a *C. albicans* divergiu há 300 milhões de anos, tem sido

usado como modelo para a identificação desses sistemas de detecção de açúcar. A glicose é um nutriente importante capaz de gerar energia metabólica por meio dos processos de glicólise, fermentação e fosforilação oxidativa. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* se desenvolveram para usar a glicose com finalidades diferentes, como fermentação e respiração.

Em *S. cerevisiae*, os principais sistemas de detecção de glicose são: (I) as proteínas do tipo transportador ScSnf3 e ScRgt2, (II) receptor acoplado à proteína G ScGpr1 e (III) a via receptor-repressor de açúcar (SRR)^(20,22,23). No primeiro sistema, as duas proteínas do tipo transportador, ScSnf3 e ScRgt2, identificam os níveis de glicose e induzem diferentes genes transportadores de hexoses. Da mesma forma, *C. albicans* detecta a glicose por intermédio das proteínas CaHgt4 e CgSnf3 e induz os genes dos transportadores hexoses. No que se refere ao segundo mecanismo de detecção de glicose em *S. cerevisiae*, o receptor acoplado à proteína G ScGpr1 causa a ativação da via cAMP / PKA, resultando em captação da glicose. Os principais componentes desse sistema de sensor de glicose também são conservados em *C. albicans*. Porém, nesta via, supõe-se que o que se liga ao CaGpr1 não são açúcares, mas lactato e metionina^(18,21,24–26).

Em relação ao terceiro mecanismo, a via SRR garante a repressão da respiração aeróbica e a repressão do uso de fontes alternativas de carbono. Dada a presença de glicose no interior da célula, ocorre a repressão dos genes responsáveis da gliconeogênese e respiração através da repressão da glicose^(24,27). Este fenômeno afeta também a expressão dos genes envolvidos na uso de fontes alternativas de carbono dificultando o uso de outros tipos de açúcares quando a glicose está presente^(20,27,28).

Os fungos utilizam a glicose de formas distintas, o efeito Crabtree explica que os fungos não-oportunistas metabolizam a glicose por fermentação reprimindo a respiração aeróbia, como no caso da *S. cerevisiae* ^(12,24,29,30). Mas esse efeito Crabtree não se aplica a todas as leveduras como, por exemplo, a fungos oportunistas, como a *C. albicans*. Nessa levedura, a glicose não reprime a respiração mas, como evoluiu com as mesmas vias de repressão catabólicas de *S. cerevisiae*, essa característica herdada contribui para a repressão da captação de glicose quando a glicose é abundante^(18,19,26,29,31).

A repressão por glicose pode ser caracterizada como um controle de expressão gênica na etapa de transcrição, que ocorre quando as células são submetidas a diferentes concentrações de glicose. Esse sistema é fundamental para que ocorra: a utilização de dissacarídeos, o metabolismo de galactose, a respiração, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, a utilização de diferentes fontes de carbono, a gliconeogênese, o ciclo do glioxilato e a β -oxidação^(32,33).

Não obstante ao amplo estudo do tema, os mecanismos por qual a repressão da glicose ocorre não estão completamente esclarecidos. É interessante pontuar que as proteínas da cascata de repressão por glicose estão relacionadas com distintas funções celulares. É compreendido que os genes reprimidos pela glicose não possuem uma única via regulatória e, portanto, podem estar presentes vias acessórias que se diferenciam com a função celular a qual o gene está envolvido. O gatilho por qual as células detectam a glicose ainda não foi identificado, em contrapartida, existem evidências de que a concentração de glicose é mais importante do que o fluxo de consumo de glicose no fenômeno de repressão por glicose^(32,33).

1.3 Resistência a antimicrobianos e sistemas de efluxo

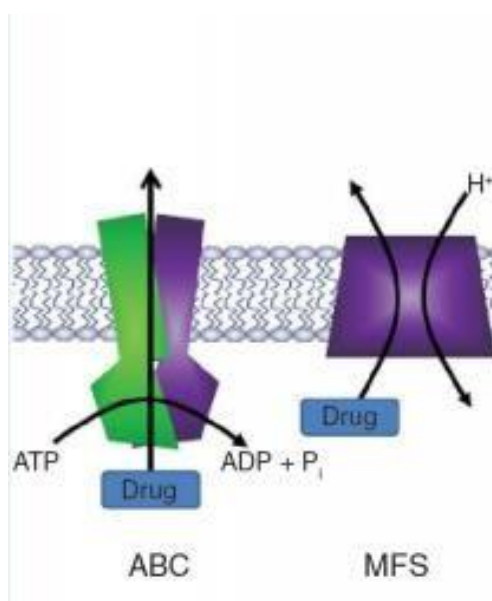
Alves *et al*⁽³⁴⁾. (2018), cita que os antifúngicos tópicos e sistêmicos, como os polienos e azóis, têm sido utilizados no tratamento convencional de candidíase, porém, podem levar à hepatotoxicidade e à resistência microbiana⁽³⁴⁾. De acordo com Pinto *et al*⁽¹⁾. (2019), o fluconazol é o antifúngico mais empregado no tratamento de infecções por *Candida sp.*. No entanto, seu uso indiscriminado ao longo das últimas décadas pode ter selecionado cepas resistentes. Esse cenário aliado aos insistentes casos de recidivas, elevou a atenção para o problema da resistência antifúngica^(14,35,36).

O conceito de resistência clínica aos antifúngicos descreve a falha de uma terapia antifúngica que causa persistência ou progressão de uma infecção⁽³⁷⁾. Esse fenômeno está relacionado à redução da captação da droga (redução da permeabilidade da membrana) e a ejeção da droga (via bombas de

efluxo - *Microbial efflux pumps* - MEP) por meio de alterações no gene ERG11 e a resistência à múltiplas drogas (MDR)^(2,7,38,39).

No que se refere a MDR, este é um mecanismo que se caracteriza pelo desenvolvimento de resistência a fármacos não relacionados a aquele que foi administrado^(40,41). Em *Candida spp.* esse fenômeno envolve duas superfamílias de proteínas que podem atuar como bombas de efluxo de fármacos, a *ATP binding cassette superfamily* (ABC), no qual os transportadores são energizados pela hidrólise de ATP, e, a *Major Facilitator Superfamily* (MFS), onde os transportadores são energizados pelo gradiente de prótons que existe na membrana celular^(42,43) Figura 1.

Figura 1 Os transportadores que conferem o fenótipo de resistência multi-drogas (MDR) são encontrados nas famílias ABC e MFS. A superfamília ABC abrangem proteínas transmembrana, que utilizam a energia resultante da hidrólise de ATP, para transportar diferentes moléculas pelas membranas biológicas. Em relação a família MFS, o transporte de drogas para o exterior celular acontece por meio de antiporte com íons hidrogênio (H⁺), portanto são dependentes da força próton-motriz^(36,39).



Os sistemas de efluxo são grandes famílias de proteínas transportadores que realizam a comunicação entre meio intracelular com o meio extracelular com a finalidade de captar nutrientes e íons^(44,45). Além disso, as bombas de efluxo têm a função de eliminar agentes metabólitos danosos a célula e estão presentes em todas as espécies bacterianas e fúngicas^(40,44,46). No entanto, fármacos e substâncias xenobióticas igualmente podem ser substratos e, assim, serem bombeados para fora da célula^(39,47).

Os genes localizados nos cromossomos ou plasmídeos são responsáveis por codificar a *ATP binding cassette superfamily* (ABC) ^(7,48–50). Um problema que chama a atenção é que alguns antimicrobianos atuam como substratos aumentando a expressão destes genes^(6,39). Esses fármacos são frequentemente empregados na prática clínica, como os aminoglicosídeos, a eritromicina, a cloranfenicol, a trimetropim, a fluoroquinolonas, alguns β -lactâmicos e a tigeciclina^(51,52).

Foram descobertos 28 genes correlacionados a 28 proteínas dos transportadores do tipo ABC, desses, apenas 2 (dois) estão correlacionados ao efluxo de fármacos^(53,54). O aumento da transcrição dos genes CDR1 e CDR2 que codifica os transportadores Cdr1p e Cdr2p dessa superfamília, são responsáveis pela resistência aos azóis. Apesar da importância desse sistema de transportes para a viabilidade celular, a superexpressão desses sistemas causa resistência microbiana^(2,7,36,39,48,54).

Dentre as superfamílias de transportadores, as do tipo ABC englobam os transportadores que modificam mais frequentemente os padrões de absorção dos fármacos^(37,39). Os transportadores da família ABC são ATP-dependente, ou seja, obtém energia da hidrólise do ATP para bombear substâncias pela membrana celular contra o gradiente de concentração^(2,54,55). Em geral, as proteínas da família ABC atuam como bombas, no entanto, alguns poucos integrantes dessa superfamília agem como canais^(44,47,55).

1.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

1.4.1 Mecanismo de Ação

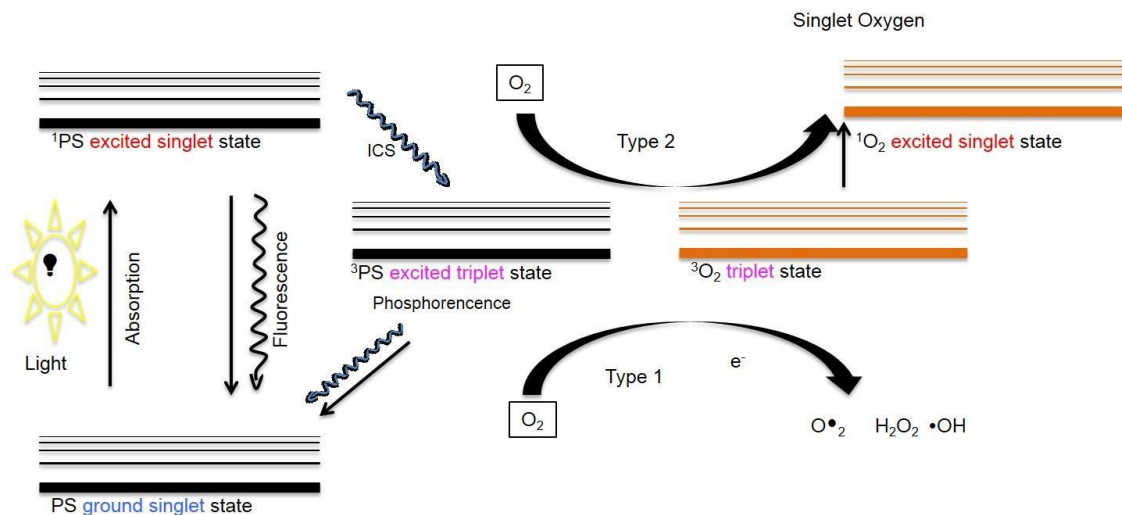
Conforme Bujdáková⁽³⁵⁾(2016), o contexto de resistência antifúngica e as complicações associadas ao uso de medicamentos convencionais, fazem da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) uma alternativa para a inativação de *Candida* e para o tratamento de infecções fúngicas ⁽³⁵⁾. Ainda nesse contexto, a explicação mais clara dos mecanismos de resistência antifúngica, em especial da resistência à azóis, envolve a super expressão de bombas de efluxo⁽³⁷⁾.

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy* ou aPDT) é baseada no uso de um corante não tóxico, designado fotossensibilizador (FS) e luz no espectro visível na presença de oxigênio. Desta combinação surgem as espécies citotóxicas, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROS) que são capazes de causar danos letais às células fúngicas^(56,57).

A luz empregada na terapia necessita de um comprimento de onda adequado ressonante à molécula do FS. Isso porque essa interação do FS com a radiação resulta na adição de energia à molécula que passa a estar sensibilizada⁽⁵⁸⁾. Ocorre então a excitação dos elétrons do FS onde há a mudança para o estado excitado denominado singleto. Na sequência pode ocorrer um rápido decaimento radioativo (fluorescência), não radioativo (conversão interna sem calor) ou pode alcançar o estado tripleto via cruzamento intersistemas. O estado excitado tripleto apresenta o tempo de vida mais longo, sendo assim, a molécula do FS pode perder a energia restante por via emissão fosforescente⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. A partir do cruzamento intersistemas pode ocorrer, também, os foto-processos Tipo I e Tipo II, considerados oxigênio-dependentes⁽⁶²⁾.

A reação do Tipo I está relacionada com a transferência de elétrons do estado tripleto para a produção de EROS como o radical superóxido, hidroxila e derivados de lipídios. A reação do Tipo II envolve transferência de energia do estado tripleto ao oxigênio molecular para produção do oxigênio singleto, que pode oxidar muitas moléculas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, e levar a citotoxicidade⁽⁶²⁾(Figura 2).

Figura 2 Diagrama de Jablonski: a molécula do fotossensibilizador (PS) é excitado pela luz, portanto, os elétrons saltam do estado fundamental para o estado singleto. A partir disso, pode ocorrer um decaimento por fluorescência ou fosforescência por meio do ICS (cruzamento intersistemas). Mas, também, o elétrons podem atingir o estado tripleto(mais longo) e a partir disso transferir a energia para o meio gerando a formação de espécies reativas de oxigênio através das reações do TIPO I e TIPO II.



As taxas de reações fotossensibilizador-substrato e fotossensibilizador-oxigênio determinam a ocorrência de reação do tipo I ou do tipo II, isso porque os reagentes disputam o estado tripleto do corante. A molécula do FS no estado tripleto pode decair ou transferir a energia para o meio, a depender, da velocidade do processo de cruzamento intersistemas, da velocidade e da concentração de supressores do estado tripleto ou denominados, “*quenchers*”, supressores de fluorescência⁽⁶³⁾. Sendo assim, para o processo ser eficiente em qualquer meio, é necessário que a molécula do FS possua alto rendimento quântico para estado tripleto, maior tempo de vida para permitir a troca de energia ou elétrons entre a molécula e o substrato ou o oxigênio molecular^(58,64,65).

1.4.2 Espécies Reativas Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio em algum nível têm capacidade deletéria em estruturas biológicas. Inclusive, o oxigênio é amplamente conhecido por sua toxicidade em microrganismos anaeróbios muito embora seu efeito letal seja menos conhecido em organismos aeróbios^(58,66). A redução parcial da

estrutura do oxigênio é que confere o caráter tóxico das espécies reativas de oxigênio⁽⁶³⁾. Dentre tais reduções há o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH). Com frequência são denominados como “radicais livres”, no entanto, este termo não é apropriado uma vez que não necessariamente apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada^(61,67).

A aPDT antimicrobiana tem como objeto a ação das EROS sob microorganismos procariontes, eucariontes e vírus. As espécies citóxicas afetam múltiplos componentes celulares por meio de sua reatividade. Os danos podem ser por oxidação ou redução dos componentes celular como (I) a intercalação do fotossensibilizador na base guanina, (II) a degradação lipídica e (III) a inibição da síntese de proteínas⁽⁶⁸⁾.

1.4.3 Azul de Metileno (AM)

O AM é empregado na aPDT pois possui características interessantes para uso. É um fotossensibilizador com banda absorção entre 500 e 700nm, com picos de absorção máxima em dois pontos: 609 e 668 nm⁽⁶⁸⁾. Muito embora possua uma ampla banda de absorção, fatores como solvente e concentração do FS podem afetar esse espectro⁽⁶³⁾. O AM ou cloreto de metiltionínio, é o cloreto de 3,7 bis (dimetilaminofenotiazina) que, na forma anidra, apresenta massa molecular de 319,86 g/mol e, em meio a sais inorgânicos, forma dímeros^(68,69).

O AM apresenta alto rendimento quântico de cruzamento entre sistemas, favorecendo maiores concentrações de oxigênio singlete, importante para indução de inativação celular em aPDT. Além disso, apresenta baixa citotoxicidade no escuro além de ser economicamente viável⁽⁷⁰⁾.

1.4.4 Associação da Glicose e aPDT

Conforme Suzuki et al⁽²⁰⁾. (2017), a *C. albicans* detecta a glicose, induzindo uma regulação positiva dos transportadores de membrana que podem facilitar a captação de FS na célula. Em seu estudo foi avaliado os efeitos da glicose na captação do AM na cepa ATCC 10231 e sua influência na eficiência

da aPDT quando combinados LED vermelho e AM com irradiação de 3, 6, 9, 12, 15 e 18 min. Os resultados mostraram que a glicose foi capaz de aumentar a captação de AM em células de *C. albicans*⁽²⁰⁾.

De acordo com o estudo de Oliveira-Silva et al⁽⁵⁷⁾. (2019), a associação de glicose na concentração de 50mM à aPDT não afetou o efeito de morte para as cepas de *C. albicans* ATCC 10231, YEM 12, YEM 13 e YEM 14. No entanto, a superexpressão dos transportes da família ABC causou efeito protetor às células fúngicas diminuindo a captação de AM e aumentando sobrevivência ao desafio fotodinâmico na presença da glicose⁽⁵⁷⁾.

Muito embora a associação da glicose com a aPDT seja pouco investigada, sabe-se que, em *C. albicans*, esse nutriente é substrato para as bombas de efluxo da família ABC. O gatilho por qual *C. albicans* detecta a glicose ainda não foi identificado mas as vias de repressão catabólicas parece contribuir para a repressão da captação de glicose quando esse nutriente é abundante^(18,19,26,29,31). Com base nos estudos da glicose com a aPDT em *C. albicans* e os novos esclarecimentos sobre o metabolismo deste fungo, faz-se necessário investigar como diferentes concentrações podem favorecer a inativação das células fúngicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

O objetivo deste trabalho foi investigar qual o efeito que as diferentes concentrações de glicose possuem no comportamento antimicrobiano da terapia fotodinâmica em *Candida albicans*.

2.2 Específicos

- 2.2.1 Investigar o comportamento do *Candida albicans* utilizando a terapia fotodinâmica com azul de metileno e LED na presença e na ausência de glicose.
- 2.2.2 Investigar o comportamento do *Candida albicans* utilizando a terapia fotodinâmica com azul de metileno e LED na presença e na ausência de glicose com as bombas de efluxo ativadas.
- 2.2.3 Avaliar a quantidade de espécies reativas de oxigênio que são formadas utilizando AM e glicose com concentrações diferentes.
- 2.2.4 Avaliar a quantidade de AM que o *Candida albicans* absorve utilizando diferentes concentrações de glicose.

4. METODOLOGIA

Para elucidar a associação da glicose com a aPDT em *C. albicans*, foram utilizadas 2 (duas) concentrações de glicose (1mM e 20mM) além do controle (0 glicose). Também foram selecionadas 3 (três) cepas distintas: ATCC 10231, YEM14 e YEM15. Sendo a cepa YEM 15 superexpressora de transportadores do ABC, um mecanismo de resistência importante. Foram realizadas ensaios microbiológicos, espectroscopia óptica (UPTAKE) e mensuração das espécies reativas de oxigênio (RNO).

3.1 Preparação do Inóculo

Foram utilizadas 3 cepas de *Candida albicans* (TABELA 1). As cepas foram obtidas de estudos anteriores e permanecem armazenadas sob refrigeração, no laboratório de Pesquisa da Biofotônica Aplicadas às Ciências da Saúde, São Paulo, Brasil. As leveduras foram cultivadas aerobicamente em ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37 °C por 24h^(57,71,74).

Tabela 1 Cepas de *Candida albicans* utilizadas(6)

Cepa	Característica
ATCC 10231	Isolado de paciente com broncomicose
YEM 14	Tipo selvagem para YEM15
YEM 15	Aumento da expressão do transporte ABC

O inóculo de *Candida albicans* foi preparado com a colheita de leveduras puras crescidas em placas de Petri com ágar *Sabouraud* e suspensas em solução salina fosfata tamponada (PBS) em pH 7,2 (Figura 3). As suspensões foram realizadas em (1) PBS, (2) PBS + Glicose 1mM e (3) PBS + Glicose 20mM. As suspensões de células foram medidas visualmente em tubo de ensaio e a transmitância ajustada em 70%, para obtenção de uma concentração de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL^(57,74,75).

3.2 Irradiação e Parâmetros

Foi utilizado um equipamento LED (Light emitted diode) desenvolvido na UNINOVE pelo Prof. Dr. Alessandro Deana do Programa de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde (Figura 3). O equipamento emite luz central em 660 nm e foi ajustado para produzir potência radiante de 473 mW^(57,75,76).

Figura 3 As amostras foram irradiadas em uma placa de titulação de 24 poços com equipamento LED (Light emitted diode) desenvolvido na UNINOVE pelo Prof. Dr. Alessandro Deana do Programa de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde



As amostras foram irradiadas de cima para baixo em uma placa de titulação de 24 poços e alíquotas foram colhidas nos tempos 0, 1, 3 e 6 minutos (Figura 3). Foi selecionada uma área de 2,8 cm² para irradiação, sendo cada poço irradiado individualmente em placa de 24 poços. Os parâmetros de irradiação são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 Parâmetros de irradiação utilizados nos experimentos⁽⁷⁵⁾

Potência radiante (mW)	473		
Irradiância (mW/cm²)	166		
Tempo de exposição (s);	60	180	360
Exposição radiante (J/cm²)	10	30	60

3.3 Preparação do Fotossensibilizador

A solução de azul de metileno foi preparada realizando a diluição do pó em água destilada na concentração de 10mM e filtrado em uma membrana

estéril. O fotossensibilizador foi adicionado à suspensão microbiana na proporção de 1/100, o que resultou em uma concentração final de 100 μM ^(20,57).

3.4 Preparação da Glicose

O preparo da solução-estoque de glicose foi realizado pela diluição do pó em PBS na concentração de 50 mM. Após ser homogeneizado em um vortex, foi filtrado em uma membrana estéril. Soluções de 1mM e 20mM foram preparadas a partir da solução-estoque e PBS^(20,29,57).

3.5 Divisão dos Grupos

3.5.1 Ensaio Microbiológico

Para o ensaio microbiológico, onde foi verificado a fotoinativação do fungo, as suspensões de leveduras foram divididas nos seguintes grupos de tratamentos: (1) Controle, (2) Luz (+L-FS), (3) PDT 0 (-L+FS), (4) PDT 1 (+L+FS+1min), (5) PDT 3 (+L+FS+3min) e (6) PDT 6 (+L+FS+6min). O experimento foi realizado em triplicata em suspensões com 0 glicose, 1mM glicose e 20mM glicose.

3.5.2 Ensaio de Espectroscopia óptica (UPTAKE)

Para o ensaio de UPTAKE, onde foi investigado a incorporação do FS, foram analisados os seguintes grupos: (1) PBS+AM, (2) *C.albicans* +PBS+AM (3) *C.albicans* + 1mM Glicose + AM, (4) *C.albicans* + 20mM Glicose + AM.

3.5.3 Ensaio para Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Neste ensaio foram analisados a quantidade de EROS nos seguintes grupos: (1) PBS+AM, (2) 1mM Glicose + AM e (3) 20mM Glicose + AM.

3.6 Ensaios Experimentais

3.6.1 Microbiológico

Foram preparados inóculo de *C. albicans* ($T\%=73\pm 4\%$) em (1)PBS, (2)1mM glicose e (3)20mM glicose como anteriormente descrito nos itens 3.1 e 3.4. As suspensões com glicose foram incubadas com *C.albicans* por 90 min expostas por 10 min a concentrações 100 μM de AM(20,57). Nos grupos sem glicose, não houve o período de incubação de 90 min (ausência de glicose) e mas a suspensão também foi exposta por 10 min a concentrações 100 μM de AM. Amostras foram removidas para diluição seriada e quantificação, com o intuito de verificar a toxicidade de AM nestas concentrações e tempo de contato. Posteriormente, as amostras foram irradiadas com laser ($\lambda=660\text{ nm}$) por 1,3 e 6 minutos conforme descrito no item 3.2. Após a irradiação, as amostras seguiram para quantificação microbiológica conforme protocolo anteriormente descrito^(6,71).

3.6.2 Espectroscopia óptica (UPTAKE)

A técnica de absorção baseia-se na capacidade de um cromóforo absorver radiação em um comprimento de onda definido⁽⁷⁷⁾. Medidas espectroscópicas de absorção são úteis como formas de caracterizar o fotossensibilizador em questão e utilizar essas características para quantificar sua presença e efeito em sistemas biológicos⁽⁷⁷⁾. A espectroscopia de absorção óptica do AM foi realizada através da preparação do inóculo. Utilizamos uma cubeta de quartzo com espessura de 2mm, foi adicionado 300 μL da solução (conforme os grupos experimentais descritos no item 3.5.2) e 300 μL de dodecilsulfato de sódio 5%(SDS). O equipamento, SHIMADZU UV-1800 *Spectrophotometer*, incidiu um feixe luminoso na solução e através de um sensor foi possível observar o resultado da absorção. Cada comprimento de onda é subtraído pelo último, para todos, e, realizada a razão dímero (610nm) e monômero (664nm). O ensaio foi realizado respeitando os mesmos tempos que os experimentos microbiológicos e repetidos 3 vezes.

3.6.3 Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A formação de ERO foi avaliada por quantificação dos valores de absorvância de RNO sob irradiação laser em $\lambda=660$ nm, com intervalos de tempo de 0 a 480 segundos de irradiação em 166 mW/cm^2 (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). A molécula ρ -dimetilamina (RNO) foi adicionado na concentração final de $13,3 \mu\text{M}$ e a absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro óptico (Biospectro 220, WMED, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda $\lambda_{\text{max}}=440$ nm. O RNO degrada-se na presença de ERO e sua absorção em $\lambda=440$ nm diminui com sua degradação (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**)⁽⁷⁸⁾.

3.6.4. Análise Estatística

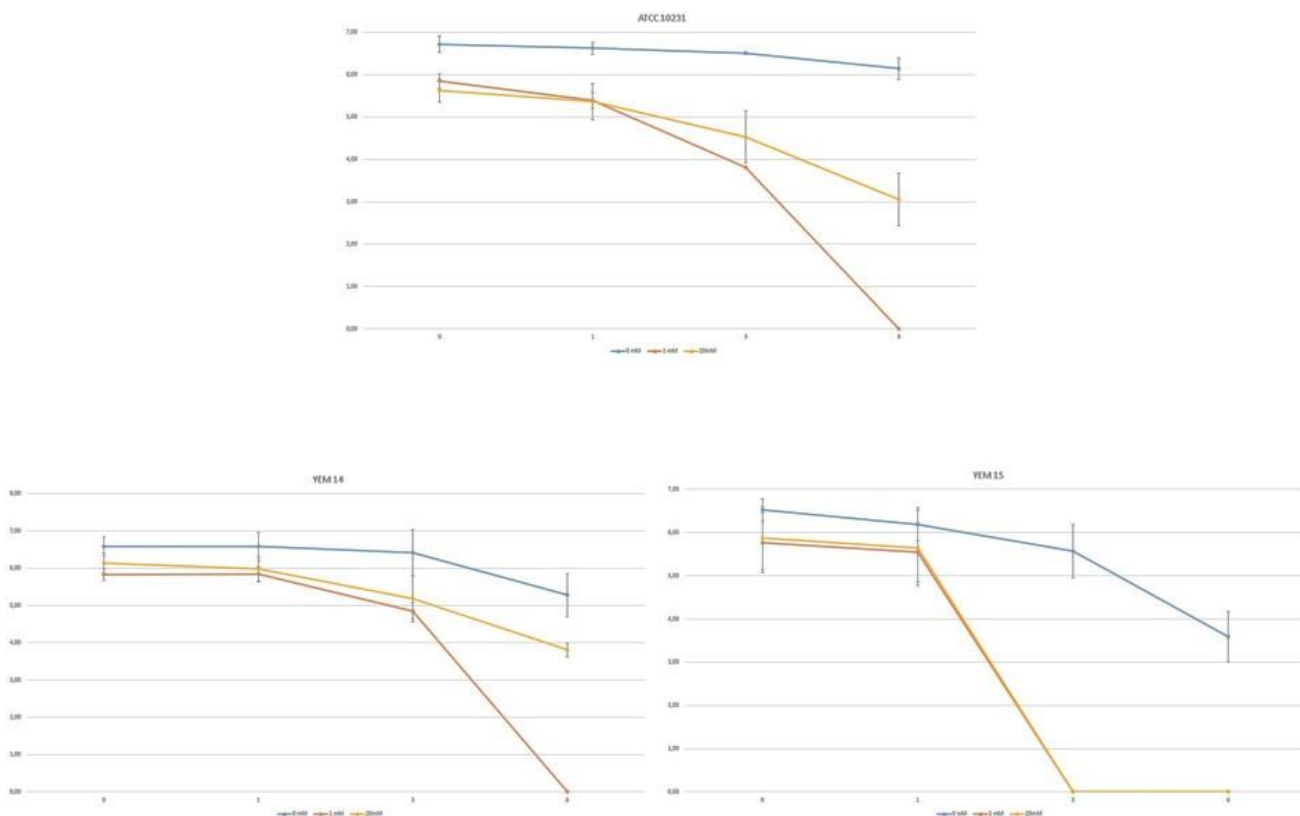
As unidades formadoras de colônia foram contadas e todas as amostras foram submetidas à análise estatística utilizando o teste de variância one-way (ANOVA). A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey e a significância ajustada em 5%⁽⁷⁾.

4. RESULTADOS

4.1 Microbiológico

Independentemente da ausência ou presença de quaisquer concentração de glicose, não foi observada nenhuma toxicidade no escuro assim como nenhum efeito antimicrobiano da luz do LED (660 nm) sem o fotossensibilizador AM. No entanto, para todos os experimentos, a associação da luz com AM demonstrou efeito germicida sobre as suspensões em leveduras e a morte foi proporcional a energia entregue.

Figura 4 Resultados de morte bacteriana após a terapia fotodinâmica em experimentos realizados utilizando *C. albicans* ATCC10231 (A), YEM 14 (B) e YEM 15 (C) + AM na presença de glicose 0 mM, 1mM e 20 mM.



Os resultados dos padrões de morte celular para *C. albicans* ATCC 10231 podem ser observados na FIGURA 4 (A). O grupo sem glicose, não sofreu alteração até 3 minutos de irradiação. A inativação microbiana somente foi observada no decorrer de 6 min de irradiação com a redução de aproximadamente 1 log. No entanto, na presença de 1mM de glicose, a inativação microbiana foi observada já a partir de 1 min de irradiação com o decréscimo de aproximadamente 1 log. Com 3 minutos de irradiação observamos a redução de 2 logs e, notadamente, um aumento acentuado do efeito fotodinâmico aos 6 min de irradiação com redução total chegou a 6 logs. Com a concentração de 20mM, é possível observar um comportamento semelhante ao grupo 1mM até 1min de irradiação. No entanto, aos 3 minutos, o grupo 20mM demonstrou menor efeito de morte de celular. Com 6 minutos, há uma redução microbiana de aproximadamente 2logs.

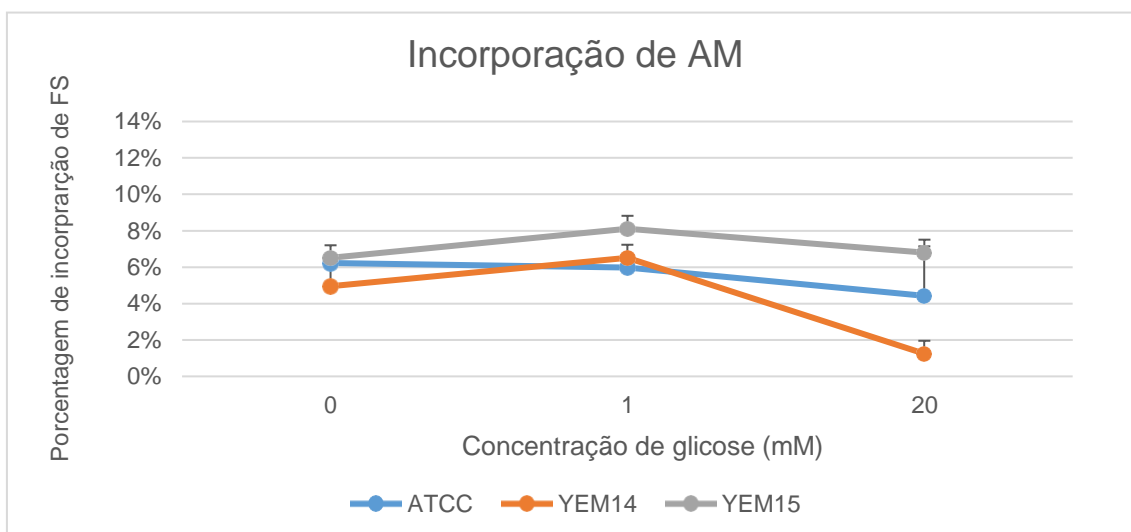
Na FIGURA 4(B), podemos observar os resultados dos padrões de morte celular de *C. albicans* YEM 14 na ausência de glicose e com glicose em duas concentrações: 1mM e 20mM. Na ausência de glicose não houve inativação até 3 min de irradiação, ao passo que, aos 6 minutos ocorreu a redução de quase 2 logs. Para 1mM de glicose, aos 3 min houve a redução de 1 log e aos 6 minutos a redução de 6 logs. Com 20mM, aos 3 min houve um decréscimo de 1 log e aos 6 min, 2 logs.

Na FIGURA 4(C), temos os resultados dos padrões de morte celular de *C. albicans* YEM 15, super expressora de transportadores ativos da família ABC. Sem glicose, a cepa apresentou inativação celular crescente a partir de 1 min, com a redução de 1 log aproximadamente. Com 3 min, mais um redução de aproximadamente 1 log e aos 6 min, aproximadamente 4 logs. Na presença da glicose, independentemente da concentração, foi alcançada a inativação total a partir de 3 min de irradiação.

4.2 Espectroscopia óptica (UPTAKE)

Observamos em nossos resultados (Figura 5) que a cepa ATCC 10231 incorporou de azul de metileno independentemente da quantidade de glicose. A cepa YEM14, por outro lado, apresentou um pico de absorção com 1mM de glicose, atingindo 6% de incorporação. Com 20mM, no entanto, ocorreu um significativo decréscimo na incorporação de AM, <2%. A cepa YEM 15, apresentou a melhor performance, especialmente com 1mM de concentração. Em uma análise geral, podemos observar que todas as cepas apresentaram melhor resultado de incorporação com 1mM de glicose.

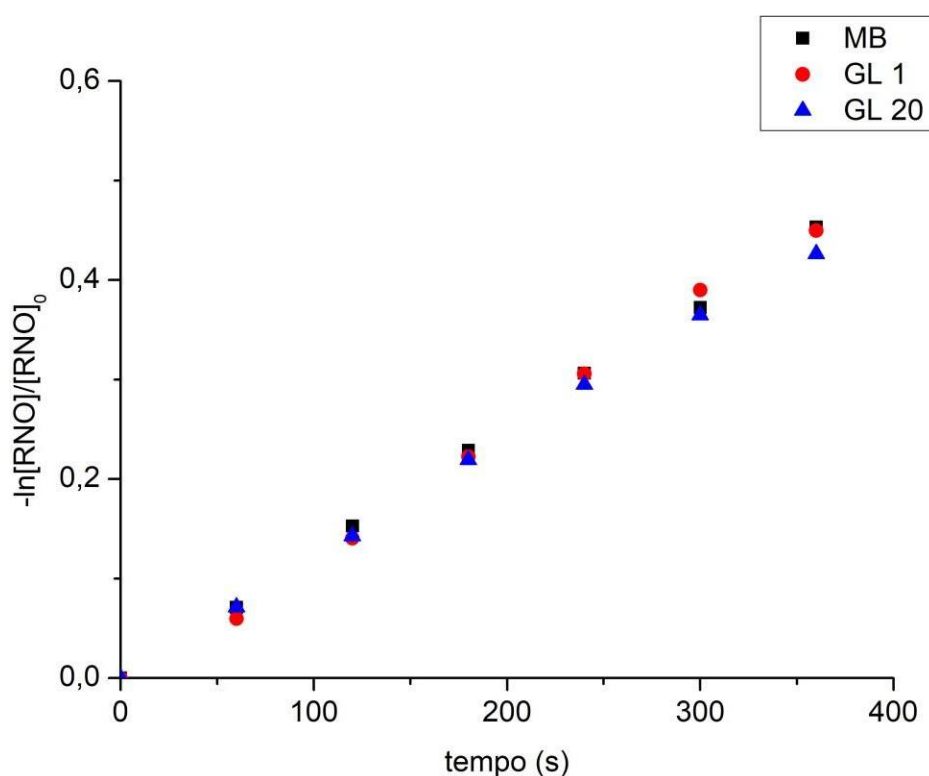
Figura 5 Quantificação da incorporação do AM em *Candida albicans*.



4.3 Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A formação de espécies reativas de oxigênio é citada como o principal fator citotóxico na PDT. Contudo, tal produção de ERO é influenciada pelos parâmetros de irradiação de forma que, diferentes tempos de irradiação resultam em diferentes quantidades de morte celular. As respostas na formação de ERO foram mensuradas e foi evidenciado que elas também dependem da intensidade e do tempo de irradiação (Figura 6). Sob a intensidade testada, a absorvância do NO a 440 nm diminuiu e tempos de exposição prolongados geraram maior formação de ERO. Por outro lado, a mesma fluência determinou diferentes quantidades de ERO nos diferentes regimes de irradiação, com maior tempo de irradiação e maior produção de espécies reativas de oxigênio tóxicas para os microrganismos. Ficou evidenciado que a presença da glicose não afetou a produção de ERO.

Figura 6 Mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)



5. DISCUSSÃO

Os resultados da inativação microbiana demonstram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma alternativa terapêutica promissora em *Candida albicans* em suspensão. Foi evidenciado uma melhor performance da fototerapia ao associarmos a glicose ao azul de metileno. No entanto, podemos observar que esse performance varia com as características de cada cepa e a concentração de glicose.

No estudo de Suzuki *et al* (2017), a incubação do fotossensibilizador com 50mM de glicose em biofilmes de *Candida albicans* permitiu maior absorção de azul de metileno. Dessa forma, em um estudo anterior, investigamos os efeitos da glicose na terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Candida albicans* em suspensão utilizando, também, 50mM de glicose. No entanto, foi observado que em cepas não resistentes, essa concentração não apresentou nenhum efeito sobre a morte celular. E, em cepas resistentes, como a YEM 15 que super expressa bombas de efluxo da família ABC, a presença de glicose parece ter estimulado um efeito protetivo nas células fúngicas, uma vez que na concentração de 50mM a fotoativação microbiana foi pouco efetiva.

Porém, um novo dado na literatura lançou luz sobre essa investigação preliminar. O estudo publicado por Broxton *et al* (2018), investigou como a *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* utilizam a glicose para realizar fermentação e/ou respiração. De acordo com o autor, a *Saccharomyces cerevisiae* quando na presença da glicose, a utiliza para fermentação e reprime a respiração. A isso o autor denominou de efeito Crabtree positivo, comum em fungos não-oportunistas. Por outro lado, o comportamento da *Candida albicans* na presença da glicose é antagonista a *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que utiliza a glicose para respiração. Esse comportamento é descrito como Crabtree negativo e encontra-se presente em fungos oportunistas. Sabendo que tais fungos apresentam uma ancestralidade, ficou claro que apesar das distintas características citadas, a *Candida albicans* herdou as mesmas vias de repressão da *Saccharomyces cerevisiae*. Sendo assim, a *Candida albicans* também expressa repressão da respiração celular a depender da concentração de glicose no meio.

A partir disso, pudemos entender que a concentração de 50mM, utilizado em nosso estudo anterior, possivelmente estimulou a repressão da respiração celular em *Candida albicans*. Este cenário e, conseqüentemente, a repressão dos genes que ativam os transportadores de hexoses, vai de contrapartida a proposta de associar a glicose ao fotossensibilizador buscando uma maior efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana. Dessa forma, para o presente estudo, diminuimos 50 vezes a concentração de glicose da concentração utilizada no estudo anterior. Com isso, buscamos uma concentração mínima, mas efetiva, para sensibilizar os genes que ativam os transportadores em *Candida albicans*. Para que pudéssemos entender melhor o papel da glicose na fotoinativação, ficou estabelecido as concentrações de glicose de 1mM e 20mM (um valor intermediário entre 1mM e 50mM), além dos grupos controle, e, portanto, sem glicose.

Nos dados que se referem ao ensaio microbiológico, ficam evidentes que nas cepas ATCC 10231 e YEM14, a incubação com 1mM de glicose favoreceu a quantidade morte celular. Esse dado foi consoante ao estudo de Broxton et al (2018) e com a hipótese apresentada por este estudo. Ao apresentar menos morte celular com 20mM, podemos perceber que a partir de uma determinação concentração de glicose, a *Candida albicans* reprime os genes transportadores, diminuindo também a eficiência da fotoinativação.

Por outro lado, na cepa resistente, YEM 15, a inativação celular foi eficiente tanto com 1mM de glicose como com 20mM. Ao comparamos a quantidade de morte celular quando a mesma terapia foi realizada sem glicose, percebemos que, a presença da glicose foi determinante para a terapia fotodinâmica ser efetiva. Por outro lado, de acordo com o estudo anterior, a concentração de 50mM não é efetiva para essa cepa. De modo que, as características dessa cepa favorece a utilização de distintas concentrações de glicose na inativação fotodinâmica mas, assim como as outras cepas, concentrações mais elevadas causam repressão dos transportadores e, por conseguinte, menos morte celular.

Os resultados do ensaio de incorporação do fotossensibilizador vão de encontro aos dados microbiológicos. Podemos observar que, em todas as cepas, a concentração de 1mM favoreceu maior captação de azul de metileno pela

célula fúngica. Sendo assim, essa concentração permite uma modulação do efeito fotodinâmico em *Candida albicans* em suspensão. Isso pode ocorrer porque ao utilizar a glicose como fonte para seu metabolismo e, assim, para realização da respiração celular, uma maior quantidade de azul de metileno é incorporada pela célula fúngica.

Para que a inativação pela terapia fotodinâmica antimicrobiana ocorra é necessário a formação das espécies reativas de oxigênio. Uma preocupação evidenciada no estudo anterior, com 50mM, pois acreditava-se na possibilidade da glicose degradar o fotossensibilizador e assim afetar a formação de tais espécies. Portanto, realizamos o ensaio para mensurar as espécies reativas de oxigênio e elucidar este ponto. Os resultados demonstram que a glicose, independente da concentração, não afeta a formação das espécies reativas de oxigênio. Com ou sem glicose a formação das espécies reativas de oxigênio foram análogos e proporcionais a energia entregue.

Com base nos resultados encontrados neste presente estudo e nas informações encontradas na literatura, a glicose é uma alternativa para aumentar a inativação fotodinâmica de *Candida albicans*. Porém, é imprescindível que a concentração de glicose seja adequada as características da cepa, uma vez que, uma concentração elevada, pode suprimir a fotoativação do fungo.

6. CONCLUSÃO

Dentro dos limites da metodologia utilizada, podemos concluir que a concentração de glicose em associação ao azul de metileno na terapia fotodinâmica antimicrobiana é determinante na inativação de *Candida albicans* resistentes e não-resistentes. Uma concentração elevada de glicose predispõe o fungo a reprimir os genes que ativam os transportadores de hexoses diminuindo a incorporação do fotossensibilizador. No entanto, a presença ou ausência de glicose, ao que se refere a formação das espécies reativas de oxigênio, não é afetada.


REFERÊNCIAS

1. Pinto ANACC, Rocha DAS, Moraes DCDE. *Candida albicans* Clinical Isolates from a Southwest Brazilian Tertiary Hospital Exhibit MFS-mediated Azole Resistance Profile. 2019;91:1–10.
2. Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GP, Hamblin MR. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. 2011;(April):1525–32.
3. Alves F, de Oliveira Mima EG, Passador RCP, Bagnato VS, Jorge JH, Pavarina AC. Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2017 May 9;32(4):815–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-017-2177-y>
4. Medeiros P De, Patri A, Melo V De, Bento O, Ba L, Neto B, et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. 2019;
5. Arendrup MC, Maiken VII, Arendrup C, Fursted K, Gahrn- B, Jensen IM, et al. *Candida* and *Candidaemia* Susceptibility and Epidemiology. 2011;1–32.
6. Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GP, Hamblin MR. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(7):1525–32.
7. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1995 Nov;39(11):2378–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8585712>
8. Otzen T, Wempe EG, Kunz B, Bartels R, Lehwerk-Yvetot G, Hänsel W, et al. Folate-Synthesizing Enzyme System as Target for Development of Inhibitors and Inhibitor Combinations against *Candida albicans* - Synthesis and Biological Activity of New 2,4-Diaminopyrimidines and 4'-Substituted 4-Aminodiphenyl Sulfones. *J Med Chem*. 2004;47(1):240–53.
9. Yu Q, Xiao C, Zhang K, Jia C, Ding X, Zhang B, et al. The Calcium Channel Blocker Verapamil Inhibits Oxidative Stress Response in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2014;177(3–4):167–77.
10. Geraldino T, Vito E de, Custódio L, Conchon-Costa I, Gaziri L, Felipe I, et al. Increased tumour necrosis factor- α production, higher mannose receptor activity and ability to kill *Candida* by concanavalin-A-activated macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;59(II):11–17.
11. Bacelo KL, Regina K, Ferreira JC, Candido RC. Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. 2009;468–74.

12. King RD, Lee JC, Morris AL. Adherence of *Candida albicans* and Other *Candida* Species to Mucosal Epithelial Cells. 1980;27(2):667–74.
13. Kohnen W, Kolbensschlag C, Teske-keiser S, Jansen B. Development of a long-lasting ventricular catheter impregnated with a combination of antibiotics. 2003;24:4865–9.
14. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1995 Oct;8(4):462–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665465>
15. Rauceo JM, Armond R De, Otoo H, Kahn PC, Klotz SA, Gaur NK, et al. Threonine-Rich Repeats Increase Fibronectin Binding in the *Candida albicans* Adhesin Als5p. 2006;5(10):1664–73.
16. Li Q, Liu J, Shao J, Da W, Shi G. Decreasing Cell Population of Individual *Candida* Species Does Not Impair the Virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata* Mixed Biofilms. 2019;10(July):1–12.
17. Espinel-ingroff A, Cantón E. *y Microbiología Clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2011;29(Supl 2):3–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70002-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70002-7)
18. Ende M Van, Wijnants S, Dijck P Van, Brown NA, Hall RA. Sugar Sensing and Signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. 2019;10(January):1–16.
19. Thomson GJ, Hernon C, Austriaco N, Rebecca S, Belenky P, Bennett RJ. Metabolism-Induced Oxidative Stress and DNA Damage Selectively Trigger Genome Instability in Polyploid Cells. 2018;1–61.
20. Suzuki LC, Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Yoshimura TM, Silva TO, et al. Glucose modulates antimicrobial photodynamic inactivation of *Candida albicans* in biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2017 Mar;17:173–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.12.003>
21. Towle HC. Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. 2005;16(10).
22. Furlaneto MC, Góes HP, Perini HF, Dos Santos RC, Furlaneto-Maia L. How much do we know about hemolytic capability of pathogenic *Candida* species? *Folia Microbiol (Praha)* [Internet]. 2018 Jul;63(4):405–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29335820>
23. Talattof Z, Azad A, Zahed M, Shahradnia N. Antifungal Activity of Xylitol against *Candida albicans*: An in vitro Study. *J Contemp Dent Pract* [Internet]. 2018 Feb 1;19(2):125–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29422459>
24. Carlson M. Glucose repression. :202–7.
25. Tomé FM, Paula Ramos L De, Freire F, Pereira CA, de Oliveira ICB, Junqueira JC, et al. Influence of sucrose on growth and sensitivity of *Candida albicans* alone and in combination with *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*

- [Internet]. 2017 Aug;32(6):1237–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28389898>
26. Broxton CN, He B, Bruno VM, Culotta VC. HHS Public Access. 2019;1–14.
 27. Nielsen J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. 2015;(March):1–8.
 28. Cláudio L, Tiemy I, Araujo R, Padiál C, Mateus T, Oliveira T, et al. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Glucose modulates antimicrobial photodynamic inactivation of *Candida albicans* in biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2017;17:173–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.12.003>
 29. Broxton CN, He B, Bruno VM, Culotta VC. A role for *Candida albicans* superoxide dismutase enzymes in glucose signaling. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018 Jan;495(1):814–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.084>
 30. Overgrowths CP, Herbert B, Crabtree G. Clx. the carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. 1928;8–11.
 31. Broxton CN, Culotta VC. SOD Enzymes and Microbial Pathogens : Surviving the Oxidative Storm of Infection. 2016;8–13.
 32. Marques WL, Raghavendran V, Ugarte B. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. 2015;1–48.
 33. Leonel L, Carvalho M, Marques B, Zamuner S, Alberto-Silva C, Costa MS, PT SC. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.026>
 34. Alves F, Pavarina AC, Mima EG de O, McHale AP, Callan JF. Antimicrobial sonodynamic and photodynamic therapies against *Candida albicans*. *Biofouling* [Internet]. 2018 Apr 21;34(4):357–67. Available from: <http://doi.org/10.1080/08927014.2018.1439935>
 35. Bujdaková H. Management of *Candida* biofilms: state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future Microbiol* [Internet]. 2016;11(2):235–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26849383>
 36. Prasad R, Nair R, Banerjee A. Multidrug transporters of *Candida* species in clinical azole resistance. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2019;132(July):103252. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103252>
 37. Prasad R, Banerjee A, Khandelwal NK, Dhamgaye S. The ABCs of *Candida albicans* multidrug transporter Cdr1. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2015;14(September):EC.00137-15. Available from: <http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.00137-15>
 38. Kourtesi C, Ball AR, Huang Y, Jachak SM, Mariano DA, Khondkar P, et al. Microbial Efflux Systems and Inhibitors : Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. 2013;34–52.

39. Ernst R, Kueppers P, Stindt J, Kuchler K, Schmitt L. Multidrug efflux pumps : Substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps – first come , first served ? 2010;277:540–9.
40. Chen Z, Shi T, Zhang L, Deng M, Huang C, Hu T, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett* [Internet]. 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.010>
41. El-awady R, Saleh E, Hashim A, Soliman N, Dallah A. The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. 2017;7(January):1–15.
42. Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2007 Jul;88(1):16–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S101113440700067X>
43. Costa C, Dias PJ, Sá-correia I, Teixeira MC. MFS multidrug transporters in pathogenic fungi : do they have real clinical impact ? 2014;5(May):1–8.
44. Theodoulou FL, Kerr ID. ABC transporter research : going strong 40 years on. 2015;1033–40.
45. Greene NP, Kaplan E, Crow A, Koronakis V. Antibiotic Resistance Mediated by the MacB ABC Transporter Family: A Structural and Functional Perspective. 2018;9(May).
46. Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. 2015;9(February):1–9.
47. Locher KP. RE V IE W Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. 2016;23(6).
48. Cytometry HF, Haynes MK, Garcia M, Peters R, Waller A, Tedesco P, et al. Chapter 16. 1700.
49. Maria T, Fogac S, Coletti DA, Freitas LM De, Marisa A, Almeida F, et al. Optimization of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Biofilms by Inhibiting Efflux Pump. 2017;XX(Xx):1–8.
50. Strain F. Impact of Farnesol as a Modulator of Efflux Pumps. 2019;00(00):1–8.
51. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, et al. Mini-Review *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. 2019;(2007):3211–7.
52. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. 2005. 20–51 p.
53. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret P V, Keniya M V, et al. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2009 Apr 1;22(2):291–321. Available from: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00051-08>
54. Holmes AR, Lin Y, Niimi K, Lamping E, Keniya M, Niimi M, et al. ABC

- Transporter Cdr1p Contributes More than Cdr2p Does to Fluconazole Efflux in Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Clinical Isolates . 2008;52(11):3851–62.
55. Higgins CF. ABC TRANSPORTERS: From Microorganisms to Man. 1992;67–113.
 56. Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, Denis TGS, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. 2012;3(April):1–16.
 57. Oliveira-silva T De, Alvarenga LH, Lima-leal C, Godoy-miranda B, Carribeiro P, Cláudio L, et al. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Candida albicans* in the presence of glucose. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2019;27(April 2018):54–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.032>
 58. Núñez SC, Garcez S, Kato T. Effects of ionic strength on the antimicrobial photodynamic efficiency of methylene blue. 2014;595–602.
 59. WAINWRIGHT, M. Non-Porphyrin Photosensitizers in Biomedicine. *Chem Soc Rev*. 1997;25(1996):1997.
 60. Baptista S, Cadet J, Mascio P Di, Ghogare AA, Hamblin MR, Lorente C, et al. Type I and II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways †. 2016;
 61. Nuñez SC, Yoshimura TM, Ribeiro MS, Junqueira HC, Maciel C, Coutinho-neto MD, et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. 2015;
 62. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2004 May;3(5):436–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122361>
 63. Núñez SC. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul orto-toluidina com relação a eficiência fotodinâmica. 2007.
 64. Grossweiner LI. Photodynamic therapy *Photodynamic therapy*. 2011;51(1995).
 65. Kelly M. New Trends in Photobiology (Invited Review) Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. 1993;21:103–24.
 66. Baptista A, Sabino CP, Núñez SC, Miyakawa W, Martin AA, Ribeiro MS. Photodynamic damage predominates on different targets depending on cell growth phase of *Candida albicans*. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2017;177:76–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.013>
 67. Phaniendra A, Babu D. Free Radicals : Properties , Sources , Targets ,

- and Their Implication in Various Diseases. 2015;30(1):11–26.
68. AM S. Efeitos da Terapia Fotodinâmica mediada por laser de emissão vermelha e azul de metileno em vaginite induzida por " *Candida albicans* " Efeitos da Terapia Fotodinâmica mediada por laser de emissão vermelha e azul de metileno em vaginite induzida por " *Cand.* 2013.
 69. Machado-de-sena RM, Corrêa L, Kato IT, Prates RA, Ribeiro MS. Photodynamic therapy has antifungal effect and reduces inflammatory signals in *Candida albicans* -induced murine vaginitis. 2014;
 70. DINO SANTESSO GABRIELLI. Eficiência fotodinâmica dos fenotiazínicos em mitocôndrias e células tumorais. 2007.
 71. Prates RA, da Silva EG, Yamada, Jr. AM, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. In: Hamblin MR, Waynant RW, Anders J, editors. Proc of SPIE [Internet]. 2008. p. 684606. Available from: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.763059>
 72. Lyon JP, Rezende RR, Rabelo MP, de Lima CJ, Moreira LM. Synergic Effect of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Surfactants in the Inhibition of *Candida albicans*. *Mycopathologia* [Internet]. 2013 Feb 28;175(1–2):159–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-012-9601-4>
 73. Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2010 May 5;25(3):385–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-009-0706-z>
 74. Prates RA, Silva EG, Yamada AM, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. *Laser Phys* [Internet]. 2009 May 26;19(5):1038–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S1054660X09050284>
 75. Ferreira LR, Sousa AS, Alvarenga LH, Deana AM, de Santi MEOS, Kato IT, et al. Antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* pre-treated by fluconazole delayed yeast inactivation. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2016 Sep;15:25–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.05.002>
 76. Sousa AS, Prates RA, de Santi MESO, Lopes RG, Bussadori SK, Ferreira LR, et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of the radiant energy and photosensitizer charge. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2016 Jun;14:111–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.03.004>
 77. Pavani C. " Porfirinas tetracatiônicas alquiladas : Sistemas porfirínicos fotossensibilizadores para uso em t erapia fotodinâmica do câncer de

- pele ." 2009;
78. Prates RA. Avaliação dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica sobre Leveduras Patogênicas. Universidade de São Paulo; 2010.
 79. Irena Maliszewska, Dominika Wawrzyńczyk, Wanarska1 E. The effect of glucose and human serum on 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. 2019;