

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA
SAÚDE

Maria Eugenia Simões Onofre De Santi

TERAPIA FOTODINÂMICA PARA TRATAMENTO
DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL EM MODELO
EXPERIMENTAL COM CAMUNDONGAS

São Paulo, SP

2014

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

MESTRADO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIA EUGENIA SIMÕES ONOFRE DE SANTI

**TERAPIA FOTODINÂMICA PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE
VULVOVAGINAL EM MODELO EXPERIMENTAL COM CAMUNDONGAS**

Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho -
UNINOVE, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biofotônica Aplicada às Ciências da
Saúde

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Melo
de Ana

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Araujo
Prates

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Maria Eugênia Simões Onofre de Santi

Terapia fotodinâmica para tratamento de candidíase vulvovaginal em modelo experimental com camundongas. / Maria Eugênia Simões Onofre de Santi, 2014

86 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.

Orientador (a): Prof. Dr. Alessandro M. de Ana.

1. PDT. 2. Laser. 3. Candida.

CDU 615.831

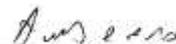
São Paulo, 04 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): MARIA EUGÊNIA SIMÕES ONOFRE DE SANTI

Título da Dissertação: "TERAPIA FOTODINÂMICA PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL EM MODELO EXPERIMENTAL COM CAMUNDONGAS"

Presidente: PROF. DR. ALESSANDRO MELO DE ANA



Membro: PROFA. DRA. JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA



Membro: PROF. DR. MARCELO TAVARES OLIVEIRA



RESUMO

Candidíase vulvovaginal é a segunda mais comum infecção ginecológica e afeta 75% das mulheres pelo menos uma vez durante seu período reprodutivo. A candidíase vulvovaginal recorrente representa um desafio à prática ginecológica, uma vez que muitas pacientes experimentam recorrências imediatamente após finalizarem um tratamento. A terapia fotodinâmica (PDT) é considerada uma abordagem terapêutica no tratamento de infecções fúngicas. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia da PDT em vulvovaginite causada por *Candida albicans* em modelo animal. Testamos dois fotossensibilizadores: Azul de metileno e uma protoporfirina: PpNetNI, combinados com fontes de luz adequadas. A análise microbiológica foi realizada imediatamente e sete dias após o tratamento e a análise histológica do canal vaginal foi realizada até quatro horas após o tratamento. A contagem fúngica foi reduzida em 1 log₁₀ após a aplicação da PDT para os dois fotossensibilizadores testados e se manteve após sete dias. A análise histológica demonstrou uma redução no influxo neutrofílico nos grupos tratados e nenhum efeito colateral deste tratamento foi observado. Em conclusão, o tratamento com os dois fotossensibilizadores produziu efeitos antimicrobianos no modelo animal e a PDT pode ser considerada uma abordagem terapêutica para diminuir a infecção fúngica no canal vaginal.

Palavras chave: antifúngico, antimicrobiano, laser, *Candida albicans*, candidíase vulvovaginal, ativação fotodinâmica, azul de metileno, fotossensibilizador, protoporfirina.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis is the second most common cause of vaginal infection and it affects 75% of all women at least once during their lifetime. Recurrent vulvovaginal candidiasis represents a challenge to gynecological practice, since some patients frequently experience re-occurrences shortly after antifungal treatment. Antimicrobial photodynamic therapy (PDT) is considered a therapeutically approach in treating fungal infections. The aim of this study was to investigate the efficiency of PDT against yeast infection in animal model. We tested two photosensitizers, methylene blue and PpNetNI combined to light sources. Microbial analysis was performed following treatment and seven days later, and histological examination of vaginal tissue was performed after PDT treatment. PDT inactivated yeast cells and it reduced in 1 log₁₀ for both photosensitizers used and these low-fungal counts were maintained follow 7 days. Histological analysis showed an inhibition of neutrophil influx process in PDT groups and no side effects on tissue was observed. In conclusion, two PDT managements produced antimicrobial effects in this mice infection model and PDT can be considered as potential therapeutic approach to decrease fungal counts in vaginal infection.

Keywords: antifungal, laser, *Candida albicans*, vulvovaginal candidiasis, photodynamic inactivation, methylene blue, protoporphyrin.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista aos meus pais Conceição e Mário, minha origem. Ao meu marido, Pedro, meu amor e alicerce. Às minhas filhas Clara e Lucia, minhas luzes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Nove de Julho, UNINOVE, pela bolsa de mestrado.

Ao Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, pela estrutura de excelência em ensino e pesquisa.

Aos professores do Programa por propiciarem um ambiente de estímulo ao estudo e pesquisa.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Alessandro Melo de Ana e Prof. Dr. Renato Araujo Prates, pelo aprendizado, exemplo de espírito investigativo e ético em pesquisa; e, principalmente, por serem vetores de uma experiência transformadora. Minha sincera e eterna gratidão.

Aos colegas do Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, pelo auxílio e parceria. Em especial, agradeço à amiga e mestranda Rubia Garcia Lopes, pela lealdade, generosidade e dedicação; sobretudo por me acompanhar nas intermináveis horas de experimentos.

Às alunas do Programa de Iniciação Científica, pela colaboração nos experimentos. Em especial a Isabella Reis, pela documentação de imagens.

Aos funcionários do Laboratório de Pós-graduação, em especial à Ângela Batista Santos, pela ajuda e apoio constantes, acompanhados de seu sorriso franco.

Aos professores Prof. Dr. Marcelo Tavares Oliveira e Profa. Dra. Cristiane Miranda França, pelas preciosas contribuições na Banca de Qualificação.

À professora Profa. Dra. Cristiane Miranda França pelo apoio e acolhimento, em especial pelo auxílio na análise histológica dos dados.

Às secretárias do Programa, Ligia Barbosa do Nascimento, Camila Camarão Esteves e Andréia Roberto Miyasaki, pela disponibilidade e paciência.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
TERMO DE APROVAÇÃO	Erro! Indicador não definido.
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
DEDICATÓRIA.....	vii
AGRADECIMENTOS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.1 CANDIDÍASE VULVO-VAGINAL.....	1
1.1.1 Dados epidemiológicos	1
1.1.2 Infecção vulvovaginal por <i>Candida albicans</i> – Etiopatogenia e virulência	2
1.1.3 Manifestações clínicas da candidíase vulvovaginal.....	3
1.1.4 Tratamento convencional.....	3
1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA COMO PROPOSTA PARA TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL.....	4
1.2.1 Histórico da PDT.....	4
1.2.2 Mecanismo e ação da PDT.....	7
1.3. JUSTIFICATIVA	8
1.4 HIPÓTESE	9
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	11
3.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	11
3.3 PROCEDIMENTO PARA INDUÇÃO DA VAGINITE	12
3.4 PROCEDIMENTO E PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO	14
3.5 DILUIÇÃO E PLAQUEAMENTO	17

3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	17
4. RESULTADOS: Artigo submetido para a revista PloS One	19
Disclosure -	35
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
5.1. TRABALHOS FUTUROS	38
6. REFERÊNCIAS.....	39
7. APÊNDICES	42
7.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	42
7.2 PATENTE: DISPOSITIVO E MÉTODO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronograma dos grupos de estudo.....	12
Figura 2 - Inoculação com uma alíquota de 50 µl de PBS contaminada com <i>Cândida</i> (10 ⁶ UFC/ml).....	13
Figura 3 - a) Introdução do fotossensibilizador no canal vaginal das camundongas. b) Tempo pré irradiação de 10 min em posição com decúbito elevado	14
Figura 4 - Potência espectral das fontes luminosas utilizadas(colocar as referências das curvas e das figuras das moléculas	16
Figura 5 - a) irradiação com laser no introito vaginal e b) irradiação com LED trans- abdominal	16
Figura 6 - Alíquotas de 10 µl de lavado vaginal escorridas em placas de Petri	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Revisões sistemáticas onde constam o termo 'PDT'	6
Tabela 2 - Parâmetros radiométricos da fonte luminosa utilizada nos experimentos com os fotossensibilizadores azul de metileno (laser) e com PpNeTNI (LED)...	15
Tabela 3 - Análise das mudanças micro-estruturais e quantificação do infiltrado inflamatório.....	18

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 CANDIDÍASE VULVO-VAGINAL

1.1.1 Dados epidemiológicos

As infecções vulvovaginais representam a queixa mais comum na prática ginecológica, ou seja, são o principal motivo que leva as mulheres ao ginecologista, quer no sistema público quanto na medicina privada. (FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Dentre estas, a candidíase vulvovaginal (fúngica) é a segunda mais frequente infecção ginecológica, precedida em ocorrência apenas pelas vaginoses bacterianas (SOBEL, 2007). Sua relevância baseia-se tanto na alta incidência, como no desconforto clínico que provocam. Na prática clínica, nota-se que a magnitude de sua sintomatologia pode causar impactos negativos na qualidade de vida, desempenho no trabalho, comportamento sexual e conduzir a estresse psicológico.

O manejo terapêutico da candidíase vulvovaginal, marcado pela alta recorrência dessas infecções, permanece um desafio aos ginecologistas. É provável que os dados epidemiológicos publicados, principalmente nos artigos brasileiros, possam estar subestimados pela inacurácia do diagnóstico e por não se tratar de uma infecção notificada aos sistemas de saúde. Os dados mais recentes disponíveis na literatura datam do início da década de 90, onde estimou-se que seu diagnóstico e tratamento, somados à perda de produtividade no trabalho, resultaram em custo aproximado de um bilhão de dólares por ano nos Estados Unidos e ali geraram mais de 13 milhões de prescrições de antifúngicos na década de 1990 (KENT, 1991).

A infecção genital é tipicamente causada pela *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, observa-se mais de três episódios de candidíase vulvovaginal no prazo de um ano, condição que determina a candidíase vulvovaginal de repetição (FIDEL, 2007).

Propagando-se as estatísticas de Fidel para os dados demográficos da população brasileira (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. Destas, 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 candidíase vulvovaginal afeta mulheres em qualquer idade, especialmente na idade reprodutiva. Não é seletiva quanto à classe sócio-econômica ou condições nutricionais prévias. Estudos de prevalência indicam que *Candida ssp* pode ser isolada de esfregaços vaginais em 20% de mulheres saudáveis assintomáticas (SHIOZAWA, et al. 2007).

1.1.2 Infecção vulvovaginal por *Candida albicans* – Etiopatogenia e virulência

Candida ssp é o patógeno oportunista mais comum na espécie humana. Cerca de 85 - 95% das cepas isoladas na vagina pertencem à espécie *C. albicans*. As demais podem ser: *C. glabrata* (10 a 20% das candidíases vaginais); *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, embora outras espécies possam gerar a mesma condição clínica. Porém as vaginites causadas pelas espécies *Candida albicans* e *Candida não albicans* são clinicamente indistinguíveis entre si (SHIOZAWA, 2007).

Candida albicans pode compor a microbiota normal na orofaringe, vulva, vagina, pele e fezes. Podem instalar-se como comensais ou patógenos, a depender de mudanças ambientais no hospedeiro. Entretanto os mecanismos envolvidos nessa patogenicidade ainda não estão completamente esclarecidos. A microbiota vaginal normal é rica em *Lactobacillus* produtores de peróxido de hidrogênio, precursores do ácido láctico, que acarreta uma acidez adequada (pH 4,5) do ambiente vaginal, dificultando a proliferação de patógenos, porém *Candida* prolifera em ambiente ácido, desde que um equilíbrio agente/hospedeiro permita sua permanência. (SOBEL, 2007).

Os blastoconídeos representam a forma fenotípica responsável pela transmissão vaginal e colonização assintomática da vagina. As formas germinativas, produtoras de micélios (pseudohifas) são mais encontradas nas vaginites sintomáticas. Ambos (blastoconídeos e pseudohifas) são capazes de invadir epitélios de superfície (SOBEL, 2007).

A colonização vaginal predispõe aderência das hifas em seu epitélio. A capacidade da *Candida albicans* em formar hifas e pseudohifas, em aderir à superfície dos epitélios e secretar enzimas hidrolíticas parece constituir fatores importantes para explicar a virulência dessa levedura. As manoproteínas da superfície da levedura são sua ferramenta de aderência e a virulência será garantida por suas enzimas proteolíticas, toxinas e fosfolipases (SOBEL, 2007).

1.1.3 Manifestações clínicas da candidíase vulvovaginal

Ao contrário do estado da arte que se apresenta na prática clínica, os sinais e sintomas das candidíases vulvovaginais não são patognomônicos dessa infecção e o diagnóstico não pode ser baseado apenas no exame físico (SOBEL, 2007).

Prurido vulvovaginal e leucorréia (corrimento) parecem ser as manifestações clínicas mais presentes e sugestivas desse tipo de infecção. A leucorréia pode variar de características: pode ser mais fluida e esbranquiçada ou espessa e esverdeada. Comumente, também observa-se placas brancas ou branco-esverdeadas aderidas às paredes vaginais, com aparência de "nata de leite" (SOBEL, 2007).

O intenso processo inflamatório subsequente acarreta rubor local, queimação e ardência, que podem estender-se da mucosa à região perineal e intercrural. A ardência pode acarretar subseqüentes sintomas urinários, como disúria e polaciúria.

Os sinais e sintomas descritos podem variar de intensidade. Com frequência, promovem desconfortos que levam a paciente à perda de produtividade, impactando sua vida social, profissional e sexual. Estresse psicológico pode advir de seu difícil manejo terapêutico, quando recidivante. Embora esse quadro clínico não esteja associado a nenhum grau de mortalidade, suas recorrências associam-se à intensa morbidade (ILKIT, 2011).

1.1.4 Tratamento convencional

Os antifúngicos derivados azólicos, em diferentes dosagens e variedade de formulações estão disponíveis na prática clínica, dentre eles o Butoconazol, Clotrimazol, Fenticonazol e Terconazol. Tais medicamentos são bem tolerados e parecem controlar satisfatoriamente episódios **únicos** de candidíase vulvovaginal. Taxas de cura clínica para esses agentes usados de forma tópica estão em torno de 80 - 90 % (SOBEL, 2007).

A dificuldade permanece no manejo das candidíases vulvovaginais de repetição. Um tratamento bem sucedido impõe regime inicial de supressão clínica com antifúngico oral, como fluconazol 150 mg, seguido de um tratamento de manutenção, que se repete quinzenalmente por três meses (FEUERRSCHUETTE et al., 2010).

A principal limitação no sucesso do tratamento baseia-se no fato do medicamento de escolha utilizado (Fluconazol) tratar-se de uma droga fungistática e não fungicida, resultando em frequente recidiva da sintomatologia após a suspensão do mesmo (SOBEL et al., 2004).

Outras limitações baseiam-se em pacientes intolerantes a esse medicamento, bem como em contra-indicações de seu uso como gravidez e lactação (LOPEZ-RANGEL, VAN ALLEN, 2005).

Apesar de ser uma droga bem tolerada, pode causar efeitos adversos como: náuseas; vômitos; diarreia e dor abdominal. Sintomas menos frequentes são tontura; sonolência; cefaleia; perda de apetite e dor epigástrica. Sintomas mais raros: delírio; distúrbios psiquiátricos; crises convulsivas; leucopenia e trombocitopenia. É descrita sua toxicidade hepática, marcada clinicamente por: hepatite aguda; colestase e insuficiência hepática fulminante (DONDERS et al., 2010).

Nem sempre o médico ginecologista está familiarizado com as importantes interações medicamentosas que podem ocorrer na concomitância do uso do fluconazol com uma gama muito ampla de outros medicamentos. Dentre elas, cita-se contraindicação formal, como é o caso do fluconazol associado à terfenadina (risco de cardiotoxicidade, causando: arritmia cardíaca severa; taquicardia ventricular e fibrilação), derivados do ergot tiordazina (risco de náuseas, vômitos e isquemia vaso-espática).

Interações de grau moderado podem levar à neurotoxicidade (ciclosporina), efeitos hipoglicemiantes (hipoglicemiantes orais como tolbutamida e glipizida) ou aumentar os efeitos tóxicos dos fármacos em associação, como é o caso da nifedipina e da prednisona (Oliveira, 2009).

1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA COMO PROPOSTA PARA TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

1.2.1 Histórico da PDT

Chama-se terapia fotodinâmica (do inglês *photodynamic therapy* – PDT) à forma de fototerapia baseada na utilização de substâncias com propriedades

fotossensibilizadoras nos tecidos biológicos e ativação dessas pela presença da luz (PRATES et al., 2009).

A luz vem sendo utilizada para tratamento de doenças desde a antiguidade. Há relatos de seu uso por gregos, chineses e indianos para tratamento de doenças de pele, como psoríase e mesmo câncer. O médico grego Herodotus (sec I) foi o pai da helioterapia, acreditando na importância da exposição à luz do sol como restauração da saúde (ACKROID et al., 2001).

Nos séculos XVIII e XIX na França, a luz solar foi usada no tratamento de reumatismo, tuberculose, edemas e outras condições. Mas, somente no início do século XX, a fototerapia foi desenvolvida pelo dinamarquês Niels Finsen, que descreveu sucesso no tratamento da varíola utilizando luz vermelha, o que lhe rendeu um prêmio Nobel de Medicina, em 1903.

No que diz respeito mais especificamente à Terapia Fotodinâmica, o primeiro relato data de 1900. Prime, neurologista francês, descreveu a administração endovenosa de um fotossensibilizador em humanos e seus efeitos deletérios nas áreas da pele expostas à luz solar.

Oscar Raab, um estudante de medicina, sob orientação de seu professor, Von Tappeiner, em Munique, também em 1900, observou os efeitos da combinação da acridina vermelha e luz na inviabilização de paramécios causadores de malária. Demonstrou que a eficácia dessa combinação era superior ao do uso isolado da acridina. Também descobriu as propriedades da fluorescência como indutor dessa toxicidade. Postulou que esse efeito seria decorrente da transferência de energia da luz à substância química (fotossensibilizador), semelhante ao que ocorre no processo de fotossíntese (ACKROID et al., 2001).

Posteriormente, em 1907, Von Tappeiner e Jodlbauer introduziram o termo “ação fotodinâmica” para descrever tal processo.

Em 1924, Policard observou a característica fluorescência vermelha da hematoporfirina no sarcoma de um rato iluminado com luz ultravioleta. Essas porfirinas são atóxicas, mas tornam-se tóxicas ao tecido na presença de luz visível e oxigênio (MACHADO, 2000).

Em Tokio, Japão, 1966, Lipson apresentou num congresso internacional, o relato de um caso de câncer de mama com tratamento empregando irradiação de luz visível e derivados da hematoporfirina. Porém, esse trabalho não teve continuidade.

Em 1976, Weishaupt e colaboradores descreveram as espécies reativas de oxigênio geradas por oxidação e redução, a partir da transferência de energia do fotossensibilizador, como os agentes citotóxicos responsáveis pela ação antimicrobiana e tumoral da PDT (MACHADO, 2000).

Na última década, a terapia fotodinâmica vem sendo utilizada no tratamento de várias doenças, objetivando a morte celular de agentes infecciosos ou de células tumorais.

Em pesquisa realizada na base de dados Cochrane, verificamos as revisões sistemáticas disponíveis até a presente data na literatura (disponível em <http://www.sumaries.cochrane.org>, consultado em 27/04/2014), identificamos 13 meta-análises em diferentes situações clínicas que citam a PDT como recurso terapêutico. Delas, sete sustentam evidências de sua superioridade terapêutica quando comparada às outras técnicas disponíveis. As demais, embora ainda não sustentem essa evidência, sugerem que isso possa se dar ao longo do tempo, quando essa técnica for mais difundida e seus parâmetros dosimétricos melhor definidos. Esses dados foram dispostos na tabela 1.

Tabela 1 - Revisões sistemáticas onde constam o termo 'PDT'

Tema da Revisão Sistemática	Observações	Ref
PDT para papilomatose respiratória recorrente		Lieder 2012
PDT para tratamento de degeneração macular	PDT diminuiu o risco da perda da visão nesses pacientes	Wolmard 2009
Tratamento de Esôfago de Barret	PDT eficaz para reduzir a displasia	Rees 2013
Tratamento de doença de Bowens (dermatite pré cancerosa)	PDT promove poucas sequelas cicatriciais.	Bath-Hextall 2013
Intervenções para queratose actínica	PDT promove melhor aparência cosmética	Gupta 2012
Intervenções para Leishmaniose cutânea do Velho Mundo		González 2012

Sem evidências para comparativo de dif. Intervenções para doença Paget vulvar	Desafio tratar lesões ainda não visíveis.	Edey 2013
Intervenções para tosse em pacientes com câncer	Necessário melhorar a qualidade dos estudos envolvidos	Molassiotis 2010
Intervenções para carcinoma de células basais da pele	PDT bem aplicada para evitar cicatrizes	Bath-Hextall 2008
Esteróides com propriedades antiangiogênicas para degeneração macular	Não têm ação melhor que a PDT	Geltzer 2013
Tratamento tópico de lesões cutâneas induzidas por papilomavírus	PDT pouco conhecida e há pouca evidência para sua eficácia	Kwok 2012
Tratamentos para alopecia areata, alopecia total e alopecia universal	Sem evidência quando comparada com corticosteróides orais	Delamere 2008
Tratamentos para hemangiomas cutâneos em infantes e neonatos		Leonardi-Bee 2012

Fonte: <http://www.sumaries.cochrane.org>.

Além disso, os estudos de PDT como agente fungicida em ensaios *in vitro* com *C. albicans* mostram que esta modalidade de terapia tem um grande potencial para o tratamento de candidíase vaginal, foco de nossas investigações (TIANHONG et al., 2012).

1.2.2 Mecanismo e ação da PDT

Ao mencionarmos o termo PDT (*photodynamic therapy*), já subentendemos a utilização de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras, na presença do oxigênio e da luz, com parâmetros de irradiação específicos, ou seja, dentro das bandas de absorção de cada fotossensibilizador.

Porém, o entendimento desses princípios, escolha dos fotossensibilizadores adequados, sua concentração ideal, tempo ótimo de exposição a esses agentes e parâmetros compatíveis de irradiação exige um aprofundamento multidisciplinar, que vem sendo foco de muitos estudos nos últimos 20 anos.

De forma geral, após a irradiação, a molécula do fotossensibilizador passa para um estado excitado e, ao voltar para seu estado fundamental, transfere energia para as moléculas do em torno, gerando espécies reativas de oxigênio resultando em situações de oxidação e redução, a saber: radical superóxido; peróxido de hidrogênio; radical hidroxila e oxigênio singlete. Estas espécies, por sua vez, ocasionam efeitos deletérios em moléculas biológicas. Isoladamente, nem o fotossensibilizador nem a luz tem a capacidade de produzir o efeito deletério ao sistema biológico (PRATES et al., 2009).

O mecanismo específico da destruição fúngica, objeto de nosso estudo, baseia-se na capacidade do oxigênio singlete gerado no processo de estimulação fotoquímica ser capaz de perfurar a membrana do fungo, atingir seu citoplasma e nele ocasionar danos oxidativos às organelas, como mitocôndrias e lisossomos, levando à morte celular (PRATES et al., 2007).

1.3. JUSTIFICATIVA

Na prática clínica, o tratamento com agentes antifúngicos imputa às pacientes portadoras de candidíase vulvovaginal de repetição alto custo financeiro e biológico.

O custo biológico está relacionado à hepatotoxicidade dessas drogas, à interação medicamentosa e ao fato da droga de escolha não “curar” a paciente, apenas controlar sua manifestação clínica aguda. Na interpretação da paciente, a recidiva da infecção indica que o tratamento não foi bem indicado, ou algo na sua conduta a fez recontaminar-se .

Utilizamos um modelo animal como primeiro passo para preencher essa lacuna no tratamento da vulvovaginites de repetição, através do 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.

1.4 HIPÓTESE

A hipótese de nosso estudo, baseada nos princípios e fundamentos físico-químicos envolvidos na interação entre fonte de luz, fotossensibilizador e oxigênio, é que a terapia fotodinâmica possa ser eficaz no tratamento das candidíases vulvovaginais, minimizando seus sintomas clínicos.

As hipóteses experimentais são:

H₀: A utilização da terapia fotodinâmica não diminui o número de unidades formadoras de colônias (UFC) oriundas da infecção fúngica.

H₁: A utilização da terapia fotodinâmica diminui o número de unidades formadoras de colônias (UFC) oriundas da infecção fúngica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da PDT sobre *Candida albicans* e infiltrado inflamatório na candidíase vulvovaginal experimental em modelo de camundongas, utilizando dois fotossensibilizadores: azul de metileno e porfirina PpNetNI.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Através de nossos grupos experimentais *in vivo* e posterior análise estatística, pretendemos:

- a) Avaliar a associação entre a utilização da PDT com o fotossensibilizador Azul de Metileno e a diminuição do número de unidades formadoras de colônias (UFC) imediatamente após sua aplicação.
- b) Avaliar a associação entre a utilização da PDT com o fotossensibilizador Porfirina PpNetNI e a diminuição do número de unidades formadoras de colônias (UFC) imediatamente após sua aplicação.
- c) Avaliar a associação entre a utilização da PDT com o fotossensibilizador Azul de Metileno e a diminuição do número de unidades formadoras de colônias (UFC) sete dias após sua aplicação.
- d) Avaliar a associação entre a utilização da PDT com o fotossensibilizador Porfirina PpNetNI e a diminuição do número de unidades formadoras de colônias (UFC) sete dias após sua aplicação.
- e) Avaliar os efeitos adversos da utilização da PDT na mucosa vaginal das camundongas utilizadas no experimento por análise histológica
- f) Comparar o infiltrado inflamatório do grupo controle aos grupos tratados, imediatamente após a aplicação da PDT, através de análise histomorfométrica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNINOVE sob número An0025/2013 em 16/08/20013.

3.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para compor a metodologia desse estudo, foram utilizadas 44 camundongas BALB/C, fêmeas, com 6 a 8 semanas de vida, massa corporal $22,5 \pm 2,5$ g, mantidas no biotério da UNINOVE. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas apropriadas, em condições adequadas de higienização, temperatura ambiente (25°C), umidade relativa (40%), luminosidade controlada com ciclos de 12h (claro/escuro) com comida e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em nove grupos experimentais:

(Figura 1).

- **Grupo controle Padrão – GCP** – Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento e sofreram eutanásia. Tiveram a mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n=3).
- **Grupo controle 1 – GC1** – Foi induzida a candidíase vaginal e os animais não foram submetidos a nenhum tratamento. Foi obtido lavado vaginal para análise microbiológica. Sofreram eutanásia e tiveram as mucosas vaginais dissecadas para análise histomorfométrica (n=8).
- **Grupo PDT AM 0** – Foi induzida a candidíase vaginal e os animais foram submetidos à terapia fotodinâmica, sendo utilizado como fotossensibilizador o azul de metileno. Foi obtido lavado vaginal para análise microbiológica imediatamente após a aplicação da PDT. Sofreram eutanásia e tiveram as mucosas vaginais dissecadas para análise histomorfométrica (N=6).

- **Grupo PDT Porfirina PpNeTNI** – Foi induzida a candidíase vaginal e os animais foram submetidos à terapia fotodinâmica, sendo utilizada a PpNeTNI como fotossensibilizador. Foi obtido lavado vaginal para análise microbiológica imediatamente após a aplicação da PDT. Sofreram eutanásia e tiveram as mucosas vaginais ressecadas para análise histomorfométrica (n=5).
- **Grupo PDT AM 7** – Foi induzida a candidíase vaginal e os animais foram submetidos à terapia fotodinâmica, sendo utilizado como fotossensibilizador o azul de metileno. Porém, o lavado vaginal para análise microbiológica foi obtido 7 dias após a aplicação da PDT(n=4).
- **Grupo PDT Porfirina PpNeTNI 7** – Foi induzida a candidíase vaginal e os animais foram submetidos à terapia fotodinâmica, sendo utilizada a PpNeTNI como fotossensibilizador. Porém, o lavado vaginal para análise microbiológica foi obtido 7 dias após a aplicação da PDT(n=6).

3.3 PROCEDIMENTO PARA INDUÇÃO DA VAGINITE

Para esse estudo, adotamos modelo experimental de candidíase vulvovaginal em camundongas previamente demonstrado na literatura (FIDEL et al., 1993). A figura 1 mostra o cronograma dos grupos experimentais

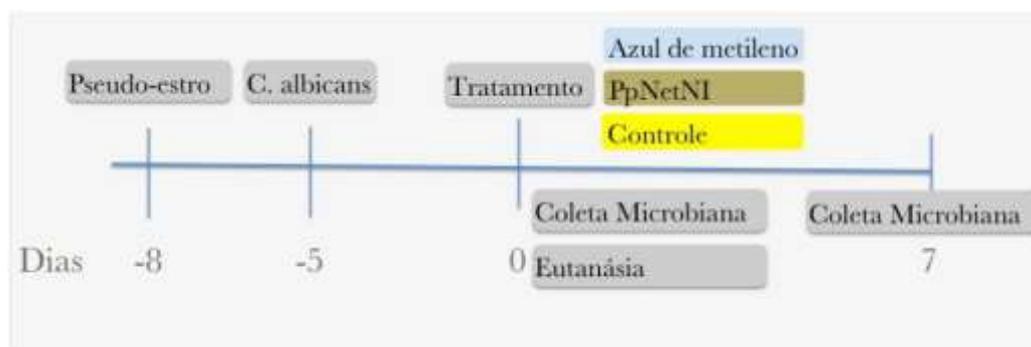


Figura 1 - Cronograma dos grupos de estudo.

Para induzir estado de pseudo-estro e permitir estabelecimento de uma infecção vaginal persistente 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.

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 horas após a primeira administração do valerato de estradiol, por meio da deposição de uma alíquota de 50 μl (10^6 UFC/ml) na vagina de cada animal, conforme pode ser observado na Figura 2.



Figura 2 - Inoculação com uma alíquota de 50 μl de PBS contaminada com *Cândida* (10^6 UFC/ml)

Para o procedimento de inoculação, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina 80 mg/Kg e xilasina 10 mg/Kg.

3.4 PROCEDIMENTO E PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO

Alíquotas de 50 μ l de fotosensibilizador foram depositadas no canal vaginal das camundongas, com concentrações específicas para cada fotossensibilizador: 100 μ M para o azul de metileno e 10 μ M para a porfirina PpNeTNI. As mesmas permaneceram em decúbito elevado por 10 minutos para estabelecimento do tempo de pré-irradiação, conforme pode ser observado na Figura 3.

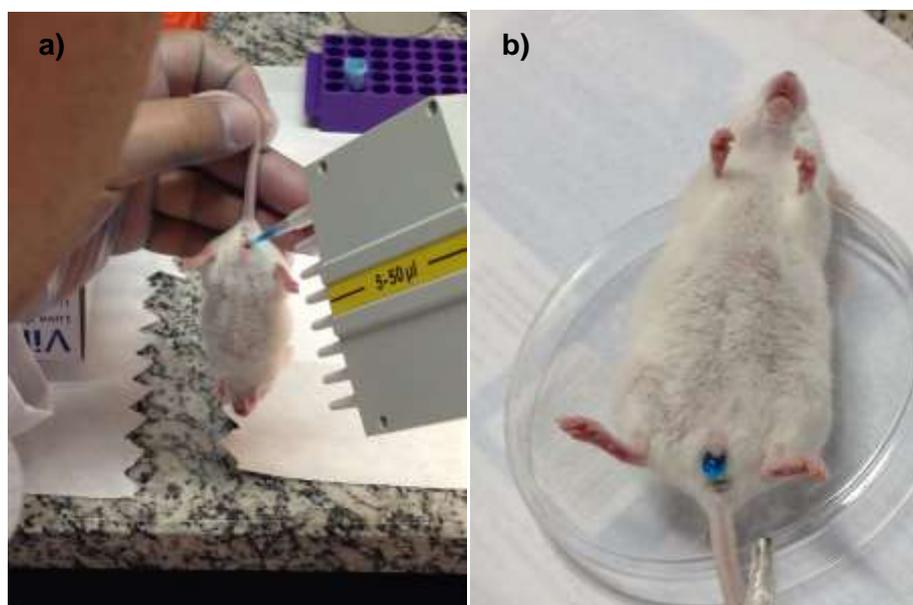


Figura 3 - a) Introdução do fotossensibilizador no canal vaginal das camundongas. b) Tempo pré irradiação de 10 min em posição com decúbito elevado

Em função das diferentes bandas de absorção dos fotossensibilizadores e dos equipamentos disponíveis, diferentes parâmetros de irradiação foram adotados para as camundongas onde utilizamos azul de metileno e porfirina, a saber:

Tabela 2 - Parâmetros radiométricos da fonte luminosa utilizada nos experimentos com os fotossensibilizadores azul de metileno (laser) e com PpNeTNI (LED).

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	Randomizado	
Diâmetro de abertura (cm ²)	0,01	2,84
Irradiância na abertura (mW/cm ²)	8400	118
Tempo de exposição (s)	720	720
Exposição radiante (J/cm ²)	6048	85
Energia radiante (J)	60,48	241,2
Técnica de aplicação	Transvaginal	Trans-abdominal
Número de sessões	1	
Energia total irradiada (J)	60,48	241,2

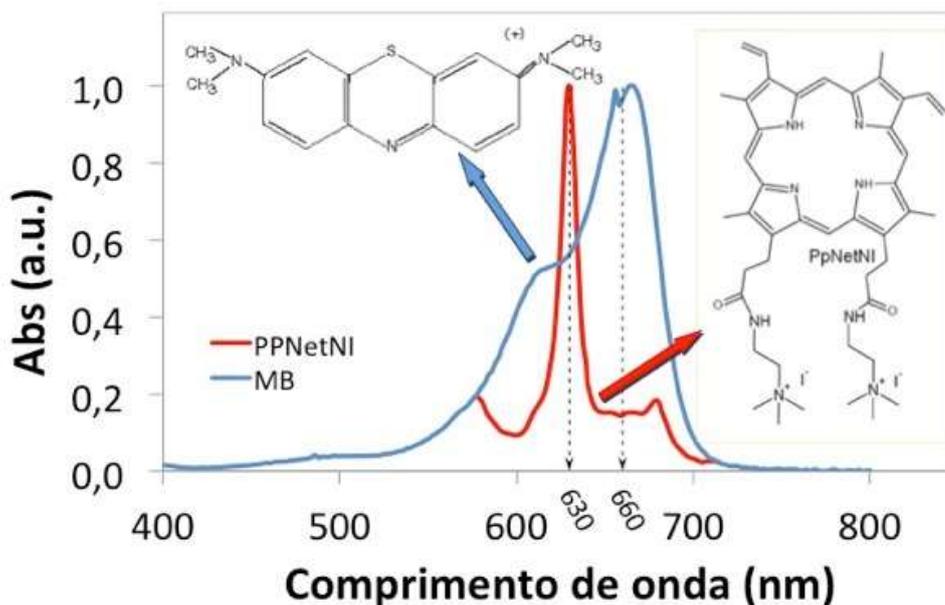


Figura 4 - Potência espectral das fontes luminosas utilizadas

Nos grupos onde foi utilizado o fotossensibilizador Azul de Metileno, a irradiação deu-se introduzindo a ponteira laser no introito vaginal. No grupo onde foi utilizada a PpNetNI, a irradiação foi transabdominal, conforme pode ser observado na figura 5 a.

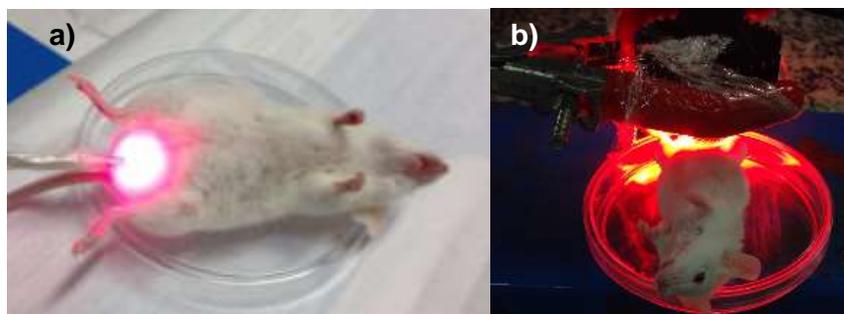


Figura 5 - a) irradiação com laser no introito vaginal e b) irradiação com LED trans-abdominal

Devido às especificidades de cada fonte luminosa, a irradiação foi feita em dois sítios diferentes. Em tecidos biológicos, a região vermelha do espectro eletromagnético encontra-se na chamada "janela de transmissão", portanto, no caso da irradiação trans-abdominal, é esperado que a irradiação atinja uma boa profundidade de penetração, excitando desta maneira o fotossensibilizador. Ademais, a potência radiante do LED foi superior à do laser, compensando desta maneira as perdas decorrentes do espalhamento e absorção de luz pelo tecido.

3.5 DILUIÇÃO E PLAQUEAMENTO

Obtivemos confirmação da infecção fúngica mediante a recuperação do lavado vaginal das camundongas, 5 dias após a inoculação das cepas. As fêmeas foram novamente anestesiadas intraperitonealmente com solução ketamina 80 mg/Kg e xilasina 10 mg/Kg. Um volume de 50 μ l de solução salina tamponada foi introduzido no canal vaginal com auxílio de micropipetas e aspirado repetidamente por 10 vezes.

Alíquotas de 20 μ l dessa solução foram pipetadas em placa de 96 poços que continham 180 μ l de solução salina tamponada, com a finalidade de compor os critérios de diluição utilizados no cálculo estatístico. As suspensões de leveduras foram diluídas de forma serial para configurar diluições 10^{-1} a 10^{-3} vezes a concentração original (Jett, 1997).

Alíquotas de 10 μ l foram escorridas em triplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (Acumedia^R Lot 105961B exp may.2017), conforme pode ser observado na Figura 6. Posteriormente foram encubadas a 37⁰ C por 24 horas, período que precedeu a contagem das UFC/ml,

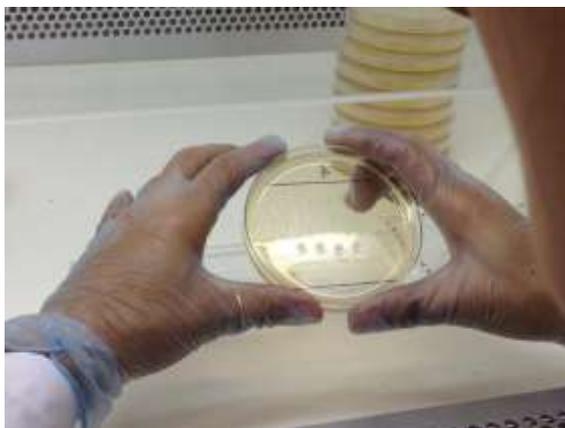


Figura 6 - Alíquotas de 10 μ l de lavado vaginal escorridas em placas de Petri

3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico intraperitoneal e os canais vaginais removidos e armazenados em paraformaldeído a 10% tamponado, para posterior análise histológica.

Foram realizados cortes histológicos longitudinais do canal vaginal. Para contemplar nossos objetivos, avaliamos se houve mudanças estruturais decorrentes de possíveis efeitos deletérios da aplicação da luz e também quantificamos o infiltrado inflamatório. Foi adotado o modelo proposto por Black (1999), conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise das mudanças micro-estruturais e quantificação do infiltrado inflamatório.

Escore	Infiltrado neutrofílico	Mudanças micro-estruturais
0	Nenhum neutrófilo presente	Nenhuma mudança: vasos sanguíneos circulares bem definidos, fibroblastos da mucosa alinhados.
1	Leve: 1- 10 neutrófilos presentes na luz, 1- 5 microabscessos presentes na camada epitelial.	Mudança moderada: vasos contraídos ou arranjo caótico de fibroblastos.
2	Moderado: numerosos neutrófilos na luz, numerosos microabscessos, neutrófilos presentes na submucosa.	Mudança severa: depleção de fibroblastos, necrose na submucosa.
3	Severo: grande formação de abscesso, capa de microabscessos na camada córnea, numerosos neutrófilos na submucosa.	-

4. RESULTADOS: ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA PLOS ONE



The screenshot displays the Editorial Manager interface for PLOS ONE. The user is logged in as 'Author' with the username 'prestara'. The page shows a list of submissions for the author, with one submission displayed:

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
Action Links	PCN2-D-14-46293	Antimicrobial photodynamic therapy as a new approach against vulvovaginal candidiasis	Nov 2 2014 11:05AM	Manuscript Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display: 10 results per page.

[Go to Author Main Menu](#)

PLOS ONE

Antimicrobial photodynamic therapy as a new approach against vulvovaginal candidiasis

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Antimicrobial photodynamic therapy as a new approach against vulvovaginal candidiasis
Short Title:	aPDT on Candida Vaginitis
Corresponding Author:	Renato Araujo Prates, PhD., DDS. Universidade Nove de Julho - UNINOVE São Paulo, SP BRAZIL
Keywords:	antifungal, laser, photosensitizer, Candida albicans, vulvovaginal candidiasis, photodynamic inactivation, methylene blue, protoporphyrin
Abstract:	Vulvovaginal candidiasis is the second most common cause of vaginal infections and it affects 75% of all women at least once during their lifetime. Recurrent vulvovaginal candidiasis represents a challenge to gynecological practice, since some patients frequently experience re-occurrences shortly after antifungal treatment. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is considered a therapeutically approach in treating fungal infections. The aim of this study was to investigate the efficiency of aPDT against yeast infection in animal model. We tested two photosensitizers, methylene blue and PpNetNI combined to light sources. Microbial analysis was performed following treatment and seven days latter, and histological examination of vaginal tissue was performed after aPDT treatment. Yeast cells were inactivated by aPDT and it reduced in 1 log ₁₀ for both photosensitizers used and these low-fungal counts were maintained follow 7 days. Histological analysis showed an inhibition of neutrophil influx process in aPDT groups and no side effects on tissue was observed. In conclusion, two aPDT managements produced antimicrobial effects in this mice infection model and aPDT can be considered as potential therapeutic approach to decrease fungal counts in vaginal infection.
Order of Authors:	Maria Eugênia Simões O. de Santi Rúbia Garcia Lopes Renato Araujo Prates, PhD., DDS. Aline S. Sousa Luis Rodolfo Ferreira Sandra Kalil Busadori Adjaci Fernandes Uchoa Cristiane Miranda França Alessandro Melo Deana
Suggested Reviewers:	Yingying Huang, MD, PhD Instructor, Wellman Center for Photomedicine YHUANG13@PARTNERS.ORG
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	The author(s) received no specific funding for this work



UNINOVE

Universidade Nove de Julho

Phone :+55 (011) 3385-9222

Rua Vergueiro, 235/249 – Liberdade – São Paulo – SP – Brasil

CEP 01504-001

pratesra@uninove.br or pratesra@gmail.com

November 02, 2014.

Editor-in-Chief

PloS One

Dear Editor,

We are pleased to send our manuscript " Antimicrobial photodynamic therapy as a new approach against vulvovaginal candidiasis" to be appreciated as a potential paper for PloS One. Our study aimed to investigate the effects of antimicrobial photodynamic therapy on induced vaginal candidiasis in mice. Our preliminary results will be presented on SPIE West Photonics on February 2015. This study presents for the first time a protoporphyrin especially designed and its ability to inactivate *Candida albicans* in a mice model. Our results indicate that aPDT is a promising therapy for fungal vaginitis since it is able to reduce fungal infection and inflammatory signals.

Thank you very much

Sincerely,

The authors

Antimicrobial photodynamic therapy as a new approach against vulvovaginal candidiasis

Maria Eugênia S. O. de Santi^{1,2}, Rúbia G. Lopes¹, Renato A. Prates^{*1,3}, Aline S. Sousa¹, Luis Rodolfo Ferreira¹, Sandra Kalil Busadori^{1,3}, Cristiane Miranda França^{1,3}, Adjaci Fernandes Uchoa^{4,5} e Alessandro M. Deana^{1,6}

¹ Biophotonics Department, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

² Medical School, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

³ Dentistry School, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

⁴ Biochemical Department of Chemical Institute, São Paulo University, São Paulo, Brazil

⁵ Biomedical Engineering, Camilo Castelo Branco University (UNICASTELO), São José dos Campos, Brazil

⁶ Information Technology Department, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Renato Araujo Prates

Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde -
Universidade Nove de Julho.

Rua Vergueiro, 235/249 – Liberdade - São Paulo, SP - Brasil

Zipcode: 01504-001

Telephone: +55 (11) 3385-9222

E-mail: pratesra@uninove.br or pratesra@gmail.com

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis is the second most common cause of vaginal infections and it affects 75% of all women at least once during their lifetime. Recurrent vulvovaginal candidiasis represents a challenge to gynecological practice, since some patients frequently experience re-occurrences shortly after antifungal treatment. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is considered a therapeutically approach in treating fungal infections. The aim of this study was to investigate the efficiency of aPDT against yeast infection in animal model. We tested two photosensitizers, methylene blue and PpNetNI combined to light sources. Microbial analysis was performed following treatment and seven days later, and histological examination of vaginal tissue was performed after aPDT treatment. Yeast cells were inactivated by aPDT and it reduced in 1 log₁₀ for both photosensitizers used and these low-fungal counts were maintained follow 7 days. Histological analysis showed an inhibition of neutrophil influx process in aPDT groups and no side effects on tissue was observed. In conclusion, two aPDT managements produced antimicrobial effects in this mice infection model and aPDT can be considered as potential therapeutic approach to decrease fungal counts in vaginal infection.

Keywords – antifungal, laser, photosensitizer, *Candida albicans*, vulvovaginal candidiasis, photodynamic inactivation, methylene blue, protoporphyrin.

Introduction

Vaginal infections are the most common trouble in gynecology practice. They generate 10 million doctor visits per year in the United States [1]. Vulvovaginal candidiasis is the second most common cause of vaginal infections, after bacterial vaginitis. The accurate incidence of symptomatic candidiasis is underestimated, since it is not a reportable disease. It affects 75% of all women at least once during their lifetime and about 40-50% of these patients will experience at least one recurrence [2,3]. Recurrent vulvovaginal candidiasis, defined as four or more episodes in a 12 months period, affects 5% of all symptomatic patients [2]. Usually, the treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis requires long periods of antibiotics use and patients often experience recurrences soon after treatment, thereby it still represents a challenge in gynecological practice. Moreover, there are contraindications to fungicidal usage, another issue in clinical care. In Brazil, nowadays, 5,000,000 women will take antifungal drugs at least four times per year and will be susceptible to their side effects. Financial costs involved also must be considered. Foxman *et al.* [2] estimated that about US\$ 1 billion per year in the USA alone is expended in the diagnosis, treatment and lost productivity due to symptomatic vaginal infections [2]. The indiscriminate use of antimicrobial agents leads to increased fungal resistance and a sharp public health concern. The magnitude of symptomatology can impact quality of life, work performance, sexual behavior and lead to psychological stress.

Candida albicans is a dimorphic fungus commonly found in the commensal flora of human gastrointestinal and genitourinary tracts. If host defenses are modulated and/or the organism becomes modulated by environmental factors, symptomatic infections can ensue. Between 85 and 95% of yeast isolated from the vagina belong to the *Candida albicans* species [2,4-7]. The second most common is *Candida glabrata* [6]. Virulence factors require yeast adherence to vaginal epithelial cells. It is now suggested that

susceptibility to infection is associated with an aggressive inflammatory response while resistance is non-inflammatory [6]. It is possible that there are genetic predispositions to symptomatic infection. Mannan-binding lectin (MBL) is a phospholipid that binds to *Candida* cells protecting women from developing infection. It also activates the complement system [4], leading to inflammatory patches. MBL gene polymorphism has been proposed to explain why certain women are more often affected to recurrent infections than others. Symptomatic vaginitis is related to several risk factors, such as: pregnancy – pH modification due to hormonal changes can lead to fungal proliferation. Use of contraceptives – same physiopathology as pregnancy; diabetes mellitus – due to glycogen increase; sequential antibiotic use – changes in normal flora can unbalance host defense; behavioral factors linked to sexual activity - type of clothing and sanitary napkins and feminine hygiene products, by the same mechanisms [7]. How asymptomatic colonization can lead to symptomatic vaginitis is still not fully understood. Common symptoms are intense pruritus, vaginal discharge (cottage-cheese-like), vaginal soreness, irritation, vulvar burning, dysuria and dyspareunia and often lead to decreased quality of life, impacting on overall sexual and reproductive health. It is not considered a sexually transmitted disease, but sometimes partners can be affected, especially in poor immunologic conditions, such as HIV.

Antifungal drugs are highly effective in the treatment of vulvovaginal candidiasis and it can be used topically or with systemic drugs delivery. However, the available antifungal drugs are not able to kill *candida* cells, and its mandatory effect is to hold yeast proliferation blocking cell wall synthesis [4]. Treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis is based on the repeated use of Fluconazole, an azole antifungal, with oral intake of 150 mg bimonthly for 6-12 months is the most frequent dosage. Although it brings some relief, patients often experience symptoms re-occurrences soon after treatment. Recurrence appears in 30% to 40% of treated patients immediately after cessation of the antifungal treatment. Within 6 weeks following the therapy, between

25% and 40 % of women who do not have symptoms will have positive cultures with the identical *Candida sp.* strain that was identified before the symptomatic episode [5]. An adverse drug interaction with cisapride, anticoagulant drugs, hypoglycemics, antacid drugs can lead to arrhythmia (QT prolongation). Side effects such as nausea, vomiting, stomach pain, headache, dizziness, and hair loss are reported. Rarely, irregular heartbeat, fainting and severe dizziness can be seen. Serious liver disease is also described, as severe stomach or abdominal pain, persistent nausea/vomiting, jaundice, dark urine and unusual tiredness. Allergic reaction is rare, but include rash, itching, throat swelling and apnea. In pregnant women, it can be teratogenic [4] and it is secreted in human milk at concentrations similar to plasma, thus the use of fluconazole in lactating mothers is not recommended. Another concern to this intake is fungal resistance; fluconazole-resistant *C. albicans* is considered rare, but indicates an emerging problem.

Due to the current limitations in the drug-based treatment of vulvovaginal candidiasis, along with its high prevalence, there is still a need for viable new options of clinical control of symptomatic patients. In this scenario, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is considered a new therapeutic approach [8]. Antimicrobial PDT is based on the triple interaction of a harmless photosensitive drug (photosensitizer), a low intensity light, and the molecular oxygen dissolved in the tissues [8-10]. The excitation of the photosensitizers (PS) to its triplet state can create an environment to form reactive oxygen species (ROS) with massive cytotoxic activity [11,12]. This photochemical reaction can lead to microorganism inactivation and death of tumor cells [13]. The photodynamic effect depends mainly on the type and concentration of the PS employed, combined with the irradiation parameters to activate the PS [8,10,14,15]. At least four parameters should be considered in this interaction: a) Non-or low-toxicity of the PS in the dark; b) efficiency of the therapy regime in form ROS; c) cell membrane permeability of PS; and d) fast body elimination after treatment.

In this work, we present an *in vivo* *Candida albicans* vaginitis model to investigate the effect of aPDT with two photosensitizers.

Material and Methods

Mice

Forty female BALB-c mice with 20 to 25 g of body mass were used. All animals were housed on a 12h light and 12-h dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. The experimental procedures were approved by the Ethic Committee on Animal Use (CEUA-UNINOVE) protocol number 00025/2013.

Mice were anesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) by intraperitoneal injection before the procedures. Estrus was induced to provide persistent vaginitis, by the weekly subcutaneous injection of 0,1 mg/mL estradiol valerate. Vaginal inoculation of *C. albicans* was performed 3 days after pseudo estrus and then aPDT was performed 5 days following fungal inoculation [9,16].

Candida albicans vaginitis

Candida albicans ATCC 90028 were cultivated from agar Saboraud dextrose (Acumedia, Lansing, USA) under aerobic conditions for 24 h before the inoculation. Cells in blastoconidia form were suspended in phosphate buffered saline solution (PBS) at a concentration of 2×10^7 colony forming units (CFU) per milliliter [9]. Mice were intravaginally inoculated with 50 μ L of the blastoconidia suspension following 3 days of estrogen injection.

Antimicrobial Photodynamic Therapy PDT

Five days following yeast inoculation, animals were treated and then divided in the following groups:

Control group – 50 μ L of PBS solution was inoculated in the vaginal canal and no treatment was performed. Vaginal wash was performed for microbiological analysis in

day "0" (n=8) and 7 days later (n=7). On day 0, mice were euthanized and their vaginal canals were removed for histological analysis.

Methylene Blue (MB) group – 50 μ L of 100 μ M MB solution (Sigma, was inoculated into vaginal canal. Animals were irradiated with $\lambda = 660$ nm laser (Photolase III, DMC, São Carlos, Brazil) with the tip placed on the entrance of vaginal canal (N=6). After treatment, mice had vaginal wash for microbiological analysis and then they were euthanized for histological analyses (day "0"). Another group (N=5) was treated by MB mediated aPDT at day 0 and then it was washed to microbiological analysis 7 days later.

Dimethyl-8,13-divinyl-3,7,12,17-tetramethyl-21H,23H-porphyrin-2,18-bis[-N,N,N-trimethyl-3-(propanoylamino) propane-1-ammonium] (PpNetNI) ($C_{46}H_{64}I_2N_8O_2$) [17] – 50 μ L of 10 μ M PpNetNI solution was inoculated into vaginal canal. Animals were irradiated with LED in a device placed transabdominally (N=6). After treatment, mice had vaginal wash for microbiological analysis and they were euthanized for histological analyses (day "0"). Another group (N=5) was treated by PpNetNI mediated PDT at day 0 and then it was washed to microbiological analysis 7 days later.

Irradiation parameters

Since each photosensitizer has a different absorption peak (as shown in figure 1 [17,18]), two light sources were used as following: a) Commercial laser device (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brazil) with peak emission resonant with MB $\lambda = 660$ nm absorption band; and b) one custom made LED system with peak emission at $\lambda = 630$ nm PpNetNI absorption band (Q4) [17]. The irradiation parameters were detailed on Table 1.

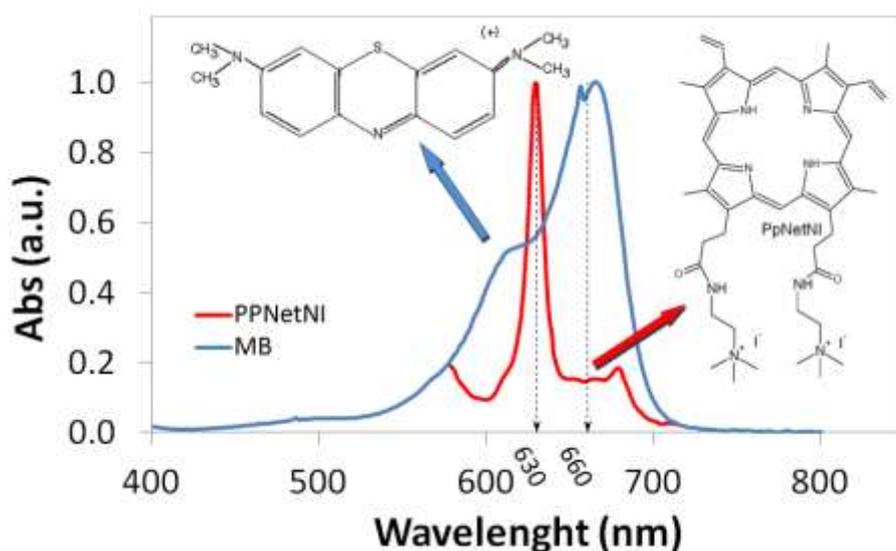


Figure 1 – Absorbance spectra of the photosensitizers (MB [18] and PpNetNI [17]). Y-axis shows absorbance (a.u). Charges of photosensitizer molecules used in this study

Table 1 - The spectral features of light sources and its parameters. Intravaginal for MB group and Transabdominal for PpNetNI group. The best way to deliver the light to the vaginal canal is by inserting the light head inside the vaginal canal. This is feasible with a laser system but it is impossible to insert the LED in it, thus irradiation took place at two sites: intra-vaginal (laser) and trans-abdominal (LED)

Parameters	Laser	LED
Center wavelength (nm)	660.52	626.37
Spectral bandwidth (FWHM) (nm)	0.71	17.4
Operating mode	Continuous wave	
Average radiant power (mW)	84	335
Polarization	Random	
Aperture diameter (cm ²)	0.01	2.84
Irradiance at aperture (mW/cm ²)	8400	118
Exposure duration (s)	720	720
Radiant exposure (J/cm ²)	6048	85
Radiant energy (J)	60.48	241.2
Application technique	Vaginal entrance	Trans-abdominal
Number of treatment sessions	1	

Total energy irradiance (J)	60.48	241.2
-----------------------------	-------	-------

Due to the irradiation site, the longer optical path that the LED light has to undergo before achieving the vaginal canal is partially compensated by the higher power of this device, therefore similar results were expected.

Microbiological analysis and Statistics

Yeast content was accessed by vaginal wash with 50 μ L PBS. Fungal suspensions from vaginal wash were serially diluted in PBS to give dilutions of 10^{-1} to 10^{-3} times the original concentration. Ten microliter aliquots of each group were streaked onto Sabouraud chloramphenicol agar plates in triplicates and incubated at 37°C overnight for colonies count [19] and transformed to colony forming units (CFU) per mL. Normal distribution was verified by Shapiro-Wilk test. Thereby, an analysis was applied in order to compare each treated group and control group.

For this study, we assumed that statistical significance would occur only if the number of CFU on the PDT groups were smaller than the control groups, thus the one-tailed testes were applied. With that hypothesis one-tailed t-test was used to compare the groups' means and, in order to maintain the global significant level at $\alpha = 0.05$, all p -values were corrected by the Hyan - Holm stepdown Bonferroni procedure.

Histological analysis

To perform histological analysis, longitudinal sections of vaginal canal were obtained, fixed and stained by hematoxylin eosin (H&E) stain. T

A score was adopted to observe micro-structural change [16], as well as quantify inflammatory cells through neutrophilic influx, as shown in table 2. Ten fields were

observed in each slide in a Microscope (Eclipse Ni-U, Nikon, Melville, USA) with objective (10x) and ocular (10x) resulting in 100 times of magnification. The scores were recorded and tested using the Mann-Whitney test and group comparison with p -value ($p < 0.05$) was considered significantly different.

Table 2 - Neutrophilic influx and Micro-structural changes observed on histological slides. The fields were scored as following

Score	Neutrophilic influx	Micro-structural changes
0	no neutrophils present	No change: well-defined circular blood vessels, submucosal fibroblasts are layered.
1	Mild: 1- 10 neutrophils present in the lumen, 1- 5 micro-abscesses present in epithelial layer.	Moderate change: vessels are constricted or oval from edema, fibroblasts are arranged chaotically
2	Moderate: numerous neutrophils in lumen, numerous micro-abscesses, neutrophils present in submucosa.	Severe change: depletion of fibroblasts, necrosis in submucosa.
3	Severe: large abscess formation, microabscess coat cornified epithelial layer, numerous neutrophils in submucosa	

Results

The microbiological count shows that the model of *C. albicans* infection was established and yeast recovered from vaginal wash was $5.17 \pm 0.63 \text{ Log}_{10}$ (CFU/mL) for control group. The PDT treatments show a reduction of fungal amount in 1 Log_{10} for MB ($p=0.020$) and PpNetNI ($p=0.018$) as well. Following 7 days from the treatment, the amount of yeast recovered was $4.19 \pm 0.21 \text{ Log}_{10}$ (CFU/mL) for MB ($p=0.041$) and $4.37 \pm 0.48 \text{ Log}_{10}$ (CFU/mL) for PpNetNI ($p=0.035$), both significantly differ from the control group (fig. 2).

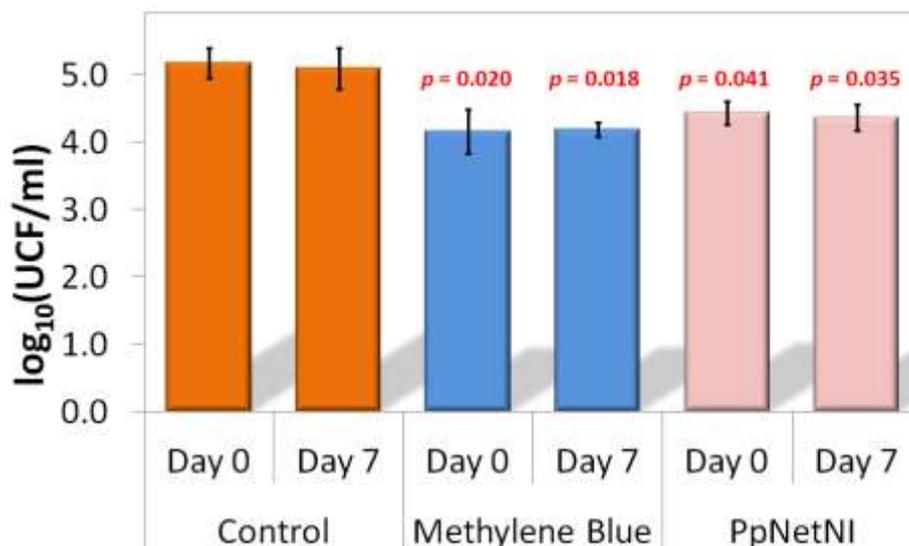


Figure 2 – Effect of antimicrobial photodynamic therapy on *C. albicans* inactivation. Each column represents the mean of Log_{10} (CFU/mL) of recovered yeast. Bars are SEM. p -values were corrected by the Hyan - Holm stepdown Bonferroni procedure

The histological analysis presented an intense inflammatory response in the proximal area of vagina and the epithelium of cervix womb showed neutrophil infiltrate for all groups (control, MB, and PpNetNI). On the other hand, aPDT groups presented a decrease in neutrophil infiltrate in the entrance and medial area of the mice vagina (fig. 3). No differences could be observed for the fibroblast organization and necrotizing areas following aPDT, thus no side effect was observed.

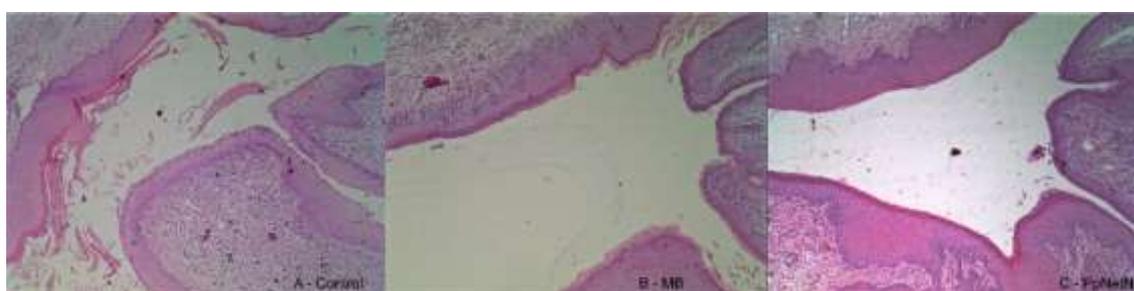


Figure 3 – Histological section of tree slides with: (A) Control group - *Candida* vaginal infection induced and without any treatment, It can be observed neutrophil infiltrate on epithelial and formation of micro abscess; (B) MB group; (C) PpNetNI group

The comparison between control group and MB showed a rate of 45% of neutrophil infiltrate against 26% for MB and 30% from PpNetNI (fig. 4).

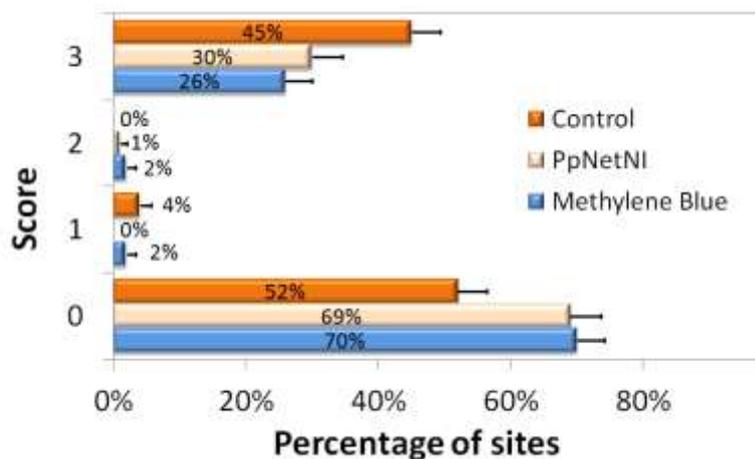


Figure 4 – The Frequency of Scores Attributed to vaginal slides with Regard to the Extent of Inflammatory Response. Ten fields per slide were counted and Control group present significant statistical difference to MB group ($p=0.041$) and to PpNetNI ($p=0.027$) as well

Discussions

Many manuscripts have previously described aPDT effects on fungal cells of health interest [8-10,13-15,20,21]. In this study, however, we investigated the interaction among antimicrobial action of aPDT and the changes in inflammatory response in vaginal environment and host defense 7 days after treatment. Although variations in the radiation parameters and photosensitizer may influence on the outcome of the photodynamic therapy, specific characteristics of the *in vitro* infection, such as the organization of the *Candida albicans* in biofilms, plays an important role to decrease the effects of aPDT [8,9,14]. Methylene blue is a low-cost but efficient photosensitizer with low toxicity for human and animals. Thus, its use in this murine model produced a significant reduction in yeast amount following aPDT ($p=0.020$). Seven days after the procedure, *C. albicans* were still incapable of raising the number of cells in the infected site ($p = 0.041$), thus aPDT was effective also after one week.

The photosensitizer PpNetNI was recently synthesized and in this work we present the first results using it for biological decontamination in an *in vivo* model. Despite a few information available regarding PpNetNI [17], porphyrins usually present highly efficient photodynamic effect [20,21]. The PpNetNI was used with a $\lambda = 630$ nm high power LED to obtain a significant reduction in the amount of fungal viability immediately after the application ($p=0.018$). Besides, after seven days of the procedure, the amount of colonies was still diminished in comparison with the control group ($p = 0.035$). As long as aPDT in day 0 did not offer fungi eradication, yeasts were incapable of re-colonize the microenvironment within seven days.

Moreover, the fungicide effect of aPDT occurred but it may produce a biomodulation effect caused by low-level light that could also modulate neutrophil inflammatory infiltrate. It was observed in the histological analysis that a large formation of micro-abscess was present. Micro-abscess coat confined to epithelial layer and a number of neutrophils were present in connective tissue on 45% of the control sites, against only 26% and 30% on aPDT groups with MB and PpNetNI, respectively. While about 70% of the aPDT samples were free of neutrophils, only 52% of the sites in control group presented the same conditions. In addition, the symptomatology of infection is related to the host response to the infection [22]. Since the mice were euthanized soon after the procedure, these results demonstrated an immediately modulatory effect of the light therapy on the inflammatory process. It is important to note that the aPDT did not produce a swelling effect on vaginal tissue, mainly because ROS was formed in vaginal cavity and not in connective tissue.

By extrapolating these findings to the clinical practice, the use of aPDT as an alternative treatment (or associated to Fluconazole) for vaginal candidiasis could, in theory, decrease infection and minimize symptoms soon after the procedure. However, new finds are required to elucidate the role of light in vaginal inflammatory process against candida vaginitis and the association of aPDT with classical antifungal treatments.

Conclusions

In conclusion, aPDT produced no changes at the micro-structural level of vaginal mucosa. The use of aPDT as a therapeutical option to decrease fungal counts in vaginal infection on a candidiasis model resulted in significant reduction of the amount of *C. albicans*. Both photosensitizers were effective to decrease infection after seven days.

Disclosure - No potential conflicts of interest relevant to this study were reported.

References

1. Kent HL (1991) Epidemiology of vaginitis. Am J Obstet Gynecol 165: 1168-1176.
2. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD (2000) Candida vaginitis: self-reported incidence and associated costs. Sex Transm Dis 27: 230-235.
3. Ferris DG, Dekle C, Litaker MS (1996) Women's use of over-the-counter antifungal medications for gynecologic symptoms. J Fam Pract 42: 595-600.
4. Henic E, Thiel S, Mardh PA (2010) Mannan-binding lectin in women with a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 148: 163-165.
5. Fidel PL, Jr. (2007) History and update on host defense against vaginal candidiasis. Am J Reprod Immunol 57: 2-12.
6. Sobel JD, Chaim W, Nagappan V, Leaman D (2003) Treatment of vaginitis caused by *Candida glabrata*: use of topical boric acid and flucytosine. Am J Obstet Gynecol 189: 1297-1300.
7. Eckert LO, Hawes SE, Stevens CE, Koutsky LA, Eschenbach DA, et al. (1998) Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. Obstet Gynecol 92: 757-765.
8. Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, et al. (2012) Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. Front Microbiol 3: 120.

9. Machado-de-Sena RM, Correa L, Kato IT, Prates RA, Senna AM, et al. (2014) Photodynamic therapy has antifungal effect and reduces inflammatory signals in *Candida albicans*-induced murine vaginitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 11: 275-282.
10. Prates RA, Fuchs BB, Mizuno K, Naqvi Q, Kato IT, et al. (2013) Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* 8: e54387.
11. Huang L, Wang M, Dai T, Sperandio FF, Huang YY, et al. (2014) Antimicrobial photodynamic therapy with decacationic monoadducts and bisadducts of [70]fullerene: in vitro and in vivo studies. *Nanomedicine (Lond)* 9: 253-266.
12. Vecchio D, Dai T, Huang L, Fantetti L, Roncucci G, et al. (2013) Antimicrobial photodynamic therapy with RLP068 kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and improves wound healing in a mouse model of infected skin abrasion PDT with RLP068/CI in infected mouse skin abrasion. *J Biophotonics* 6: 733-742.
13. Hamblin MR, Hasan T (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 3: 436-450.
14. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, et al. (2013) Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 445-451.
15. Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GP, Hamblin MR (2011) Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 66: 1525-1532.
16. Black CA, Eysers FM, Russell A, Dunkley ML, Clancy RL, et al. (1999) Increased severity of *Candida* vaginitis in BALB/c nu/nu mice versus the parent strain is not abrogated by adoptiransfer of T cell enriched lymphocytes. *J Reprod Immunol* 45: 1-18.
17. Uchoa AF, Oliveira CS, Baptista MS (2010) Relationship between structure and photoactivity of porphyrins derived from protoporphyrin IX. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 14: 832-845.
18. Prahl S (<11-02-2014>) Optical Absorption of Methylene Blue. <http://omlc.org/spectra/mb/>: <http://omlc.org>.
19. Jett BD, Hatter KL, Huycke MM, Gilmore MS (1997) Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques* 23: 648-650.

20. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R (2007) Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21: 293-302.
21. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R (2007) Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Clinical results. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21: 439-451.
22. Eick S, Markauskaite G, Nietzsche S, Laugisch O, Salvi GE, et al. (2013) Effect of photoactivated disinfection with a light-emitting diode on bacterial species and biofilms associated with periodontitis and peri-implantitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 10: 156-167.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de a literatura apresentar sólidas evidências de ação antimicrobiana da PDT em *Candida albicans in vitro*, as informações sobre sua aplicabilidade em modelos *in vivo* permanecem escassas. Nosso estudo demonstrou que a PDT é uma terapia eficaz para reduzir a contagem fúngica de *Candida albicans* em modelo experimental animal de vulvovaginite em camundongas imediatamente após a aplicação, e que os dois fotossensibilizadores testados demonstraram-se eficazes nesta tarefa.

Observou-se também que sete dias após o tratamento a contagem de cândida se manteve similar aos níveis observados imediatamente após o tratamento.

A PDT não ocasionou alterações deletérias na micro-estrutura do canal vaginal das camundongas.

5.1. TRABALHOS FUTUROS

Ainda dentro do modelo animal, vislumbramos a realização da eutanásia das camundongas imediatamente e também 3 dias após a aplicação da PDT, com a finalidade de observarmos o início do processo de remodelação inflamatória do hospedeiro frente ao tratamento.

Pretendemos também, a curto prazo, aprofundar a avaliação do infiltrado inflamatório recrutado após a aplicação da PDT, por análise imunohistoquímica.

Uma terceira possibilidade será a identificação e quantificação das espécies reativas de oxigênio envolvidas no processo.

Por fim, baseado nos achados deste trabalho, pretendemos estender essa linha de pesquisa ao tratamento clínico de pacientes com candidíase vulvovaginal de repetição, em cooperação com o Centro de Referência da Saúde da Mulher – Hospital Pérola Byington. Para tanto, um projeto de pesquisa já foi submetido, via Plataforma Brasil, e se encontra em fase de análise pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

6. REFERÊNCIAS

ACKROID, R., KELTY, C., BROWN, N., REED, M.. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY*, 74(5): 656-669, (2001).

CALZAVARA-PINTON, P., ROSSI, M., SALA, R., VENTURINI, M.. Photodynamic Antifungal Chemotherapy. *PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY*. (2012).

CHOW A.W., PERCIVAL-SMITH, R., BARTLETT, K., GOLDRING, A.N., MORRISON, B.. Vaginal colonization of E.coli in healthy women: determination of relative risks by quantitative culture and *multivariate* statistical analysis. *AM J OBSTET GYNECOL* 154:120-26.), (1986).

DONDERS, G., BELLEN, G., AUSMA, J., VERGUTS, L., VANELDERE, J., HINOUL, P., BORGERS, M., JANSENS, D.. The effect of antifungal treatment on the vaginal flora of women with vulvo-vaginal yeast infection with or without vaginosis. *EUR J CLIN MICROBIOL INFECT DIS*. 30:59-63, (2011).

FEUERRSCHUETTE, O. H. M., SILVEIRA, F.K., FEUERSCHUETTE, I., CORREA, T., GRANDO, L., TREPANI, A.. A Candidíase vaginal recorrente: manejo clinico. *FEMINA*. Vol. 38, n. 2, 31-36, (2010).

FIDEL, P.L., LYNCH, M.E. and SOBEL, J.D.: Candida specific cellmediated immunity is demonstrable in mice with experimental vaginal candidiasis. *INFEC. IMMUN*. 61:1990-1995. (1993).

FIDEL, P.L.. History and Update on host defense against vaginal candidiasis. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, 57: 2-12, (2007).

ILKIT, M., GUZEL, A.. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: A mycological perspective. *CRITICAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY*,; 37(3): 250-51, (2011).

KENT, H.L.. Epidemiology of vaginitis. *AM J OBSTET GYNECOL*, 165: 1168-76. (1991).

LOPEZ-RANGEL, E., VAN ALLEN M.I.. Prenatal exposure to fluconazole: an identifiable dysmorphic phenotype. *Birth Defects. Res. A CLIN MOL TERATOL.* 73(11): 919-23, (2005).

MACHADO, A.E.H.. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de aplicação e perspectivas. *QUIMICA NOVA*, 23(2), 237-242, (2000).

OLIVEIRA, M.H.C. *Guia prático de interações medicamentosas*. In: <http://www.ufmt/arquivos..> Acessado em 15/04/2014, (2009).

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 actinomycetemcomitans*. *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY.* 86:70-76. (2007).

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 antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. *LASER PHYSICS*, 2009, vol. 19, No. 5. Pp. 1038-1044.

SHIOZAWA, P., CECHI, D., FIGUEIREDO, M., SEKIGUSHI, L., BAGNOLO, F., LIMA, S.. Tratamento da candidíase vaginal recorrente: revisão atualizada. *ARQ. MED. HOSP. FAC. CIENC. MED. SANTA CASA SÃO PAULO*, 52(2): 48-50. (2007).

SOBEL, J.D., FARO, S., FORCE, R., FOXMAN, B. LEDGER, W., NYIRJESY, P., REED, B., SUMMERS, P.. Vulvovaginal Candidiasis. Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY.* Vol. 178, n. 2, February, (1998).

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).

SOBEL, J.D.. *Vulvovaginal Candidosis*. *THE LANCET*, Vol. 369, June 9, (2007). Disponível em <[http:// www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)> (acesso em 29/3/2014).

TIANHONG, D., FUCHS, B., COLEMAN, J., PRATES, R., ASTRAKAS, C., ST.DENIS T., RIBEIRO, M., MYLONAKIS, E., HAMBLIN, M., TEGOS, G.. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, (2012) 3:1-16.

7. APÊNDICES

7.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Protocolo de Pesquisa referente ao ADENDO 01 do Projeto nº An0025/2013 –

Título do Projeto: USO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL DE REPETIÇÃO

Orientador: Alessandro Melo de Ana

Parecer ao Adendo

A CEUA da UNINOVE em reunião ordinária no dia 24 de junho de 2014 **APROVOU o ADENDO 01 do Projeto An0025/2013** que solicitou o uso de mais **42 camundongos isogênicos BALB/C fêmeas** para o estudo da terapia fotodinâmica como uma alternativa viável que auxilie no tratamento das infecções causadas por *Candida albicans*, a fim de minimizar a alta e repetida exposição a antibióticos, especialmente nos casos em que a medicação de referência é contra indicada.

São Paulo, 24 de junho de 2014.

Prof. Dra. Kátia De Angelis
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho



SOLICITAÇÃO DE ADENDO AO PROJETO 0025/2013, APROVADO EM 16/08/2013

USO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DE CANDIDIASE VULVOVAGINAL DE REPETIÇÃO.

JUSTIFICATIVA

Em 16/08/2013, obtivemos aprovação do CEUA para pesquisa supra citada, com o recebimento fracionado de 51 camundongas BALB/C entre 6 a 8 semanas de vida, de acordo com as especificações do projeto.

Os grupos experimentais foram executados conforme cronograma, com utilização de todos os animais previstos .

Frente aos resultados preliminares obtidos na primeira etapa dos experimentos, nosso grupo optou por ajustes na metodologia de pesquisa, incluindo o estudo de mais dois fotossensibilizadores: verde malaquita e protoporfirina PpNeTNI, sem ocasionar modificações nos objetivos do projeto, não acarretando em nenhum prejuízo ético ao protocolo previamente firmado, a saber: acondicionamento e nutrição dos animais, tipo de anestesia, procedimentos terapêuticos e tipo de eutanásia.

Dessa forma, solicitamos a inclusão de maior numero de animais, a saber :

Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo isogênico	BALB/C	2 meses	22 g		42	42
				TOTAL		42

Os animais serão distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais:

- Grupo Controle Padrão : Os animais não serão submetidos a nenhum procedimento e sofrerão eutanásia antes da indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo Controle 1: Os animais não serão submetidos a nenhum procedimento e sofrerão eutanásia 24 h após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo PDT 1 com verde malaquita : Os animais serão apenas submetidos à terapia fotodinâmica, sendo sensibilizados com verde malaquita, irradiados em dose única durante 300s e sofrerão eutanásia 24 h após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo PDT 7 com verde malaquita: Os animais serão apenas submetidos à terapia fotodinâmica, sendo sensibilizados com verde malaquita irradiados em dose única durante 300s e sofrerão eutanásia 7 dias após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo PDT 1 com protoporfirina PpNeTNI : Os animais serão apenas submetidos à terapia fotodinâmica, sendo sensibilizados com PpNeTNI, irradiados em dose única durante 300 s e sofrerão eutanásia 24 h após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo PDT 7 com protoporfirina PpNeTNI : Os animais serão apenas submetidos à terapia fotodinâmica, sendo sensibilizados com PpNeTNI irradiados em dose única durante 300 s e sofrerão eutanásia 7 dias após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo Controle 7 - Os animais não serão submetidos a nenhum procedimento e sofrerão eutanásia 7 dias após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

Salientamos que a candidíase vaginal não representa uma doença natural nessa espécie, sendo que para induzi-la são necessários procedimentos experimentais como indução de

pseudo-estro e inoculação vaginal de *Candida albicans* (Fidel 2007). Dessa forma e devido às variações que cada grupo experimental possa apresnetar, é necessário que se estabeleça diferentes grupos controle para as diversas etapas do experimento.

TERMO DE RESPONSABILIDADE

(LEIA CUIDADOSAMENTE ANTES DE ASSINAR)

Eu, ALESSANDRO MELO DE ANA, certifico que:

- a) li o disposto na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Assinatura :

São Paulo, 09/06/2014

**Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº An0025/2013**

Título do Projeto: USO DE TERAPIA FOTODINÂMICA COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL DE REPETIÇÃO

Orientador: Alessandro Melo de Ana

Objetivos:

O objetivo deste estudo é propor a terapia fotodinâmica como uma alternativa viável que auxiliem no tratamento dessas infecções, a fim de minimizar a alta e repetida exposição a antibióticos, especialmente nos casos em que a medicação de referência é contra indicada.

Método:**Animais e grupos experimentais**

Para a realização deste estudo serão utilizadas camundongas BALB/C, fêmeas, da, com dois meses de idade e massa corporal $22,5 \pm 2,5$ g, mantidos no biotério da UNINOVE. Os animais serão mantidos em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente (22°C), umidade relativa (40%), luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro) e com comida e água ad libitum.

Os animais serão distribuídos aleatoriamente em 09 grupos experimentais:

- Grupo Controle 0: Os animais não serão submetidos a nenhum procedimento e sofrerão eutanásia antes da indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 3);

- Grupo Controle 1: Os animais não serão submetidos a nenhum procedimento e sofrerão eutanásia 24 h após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo PDT 1: Os animais serão apenas submetidos à terapia fotodinâmica, irradiados em dose única durante 300 s e sofrerão eutanásia 24 h após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo Fluconazol 1: Aos animais será administrado o Fluconazol diariamente e estes sofrerão eutanásia 24 h após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo Fluconazol + PDT 1: Aos animais será administrado o Fluconazol diariamente estes serão submetidos à terapia fotodinâmica, irradiados em dose única durante 300 s. Sofrerão eutanásia 24 h após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo Controle 7: Os animais não serão submetidos a nenhum procedimento e sofrerão eutanásia 7 dias após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo PDT 7: Os animais serão apenas submetidos à terapia fotodinâmica, irradiados em dose única durante 300 s e sofrerão eutanásia 7 dias após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo Fluconazol 7: Aos animais será administrado o Fluconazol diariamente e estes sofrerão eutanásia 7 dias após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

- Grupo Fluconazol + PDT 7: Aos animais será administrado o Fluconazol diariamente estes serão submetidos à terapia fotodinâmica, irradiados em dose única durante 300 s. Sofrerão eutanásia 7 dias após a indução da candidíase. Terão sua mucosa vaginal removida para análise histomorfométrica (n = 6);

Procedimento para indução de vaginite:

Os animais serão tratados com estrógeno para induzir o estado de pseudo-estro e permitir o estabelecimento de uma infecção vaginal persistente. Valerato de estradiol diluído em óleo de sésamo será administrado subcutaneamente, uma vez por semana até o final do ensaio experimental.

O modelo de infecção será desenvolvido com *Candida albicans*. Amostras desta levedura serão cultivadas em placas de Petri contendo agar Sabouraud e incubadas a 37°C por 48h. Para a preparação do inóculo uma massa de células será colhida do meio de cultura e suspensa em tubos contendo PBS (solução salina tamponada com fosfato) pH 7,2. Após a homogeneização em vórtex, a transmitância será medida em espectrofotômetro. A suspensão de células será plaqueada para determinar o número de células utilizadas para induzir a infecção. A inoculação será realizada 72h após a primeira administração do estrógeno por meio da deposição de uma alíquota da suspensão na vagina dos animais. Será utilizada uma concentração de 10^4 céls/mL.

Antes da inoculação, os animais serão anestesiados intraperitonealmente com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A avaliação da infecção fúngica produzida será feita pela observação de sinais clínicos, por cultura microbiológica e por análise histológica do tecido infectado

Procedimento de irradiação laser:

A irradiação laser será realizada utilizando o Photo lase® (DMCs, São Carlos – SP, Brasil), com potência de 100 mW, e comprimento de onda 660 nm.

Para a irradiação laser, os animais serão contidos manualmente e será utilizado a técnica pontual e contato diretamente intravaginal. Desta forma, será aplicado uma energia total de 30 J e tempo de 300 s. O tratamento será iniciado 5 dias após a indução da vaginite e em dose única. Após o período experimental de cada grupo os animais serão eutanasiados por overdose de anestésicos e as mucosas vaginais serão removidos e armazenados em freezer -80 °C.

Avaliação microbiológica:

Será realizada a coleta microbiológica intravaginal por lavagem com PBS e subsequente diluição seriada da amostra. Alicotas serão plaqueadas em agar saboreau dextrose enriquecido com cloranfenicol. As unidades formadoras de colônia (UFC) e quantificadas e comparadas entre si através de análise estatística adequada.

Análise histomorfométrica:

Após a eutanásia, as mucosas vaginais serão cuidadosamente removidos, acondicionadas em frascos e identificadas de acordo com o grupo. Os espécimens serão submetidos ao processamento histológico e corados utilizando hematoxilina eosinam, de modo a quantificar células inflamatórias. A invasão microbiana será quantificada através da técnica de ácido periódico de Schiff (PAS).

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):

Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo isogênico	BALB/C	2 meses	22 g		51	51

Condições de alojamento e nutrição:

Os animais serão mantidos no biotério da UNINOVE – unidade Vergueiro em caixas plásticas apropriadas, num máximo de 6 animais por caixa, a temperatura ambiente (22°C) e luminosidade controlados com ciclo de 12 horas. A comida e água serão *ad libitum* em garrafinhas posicionadas na grade da gaiola, a comida estará disponível na grade da gaiola. O Biotério possui exaustor.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais: não há

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):

FÁRMACOS ANESTÉSICOS

Fármaco	KETAMINA
Dose (UI ou mg/kg)	80 mg/kg massa do animal
Via de administração	Intraperitoneal

RELAXANTE MUSCULAR

Fármaco	XILAZINA
Dose (UI ou mg/kg)	10 mg/kg de massa do animal
Via de administração	Intraperitoneal

Eutanásia:

Descrição	OVERDOSE DE ANESTÉSICOS
Substância, dose, via	Combinado de XILAZINA (10mg/kg de massa do animal) e KETAMINA (80 mg/kg massa do animal) administrado via intraperitoneal. Três vezes a dose administrada para anestesia dos animais.

Pertinência e valor científico do estudo proposto:

- O tratamento com agentes antimicrobianos de forma repetida (três a quatro vezes por ano) nas pacientes portadoras de candidíase vulvovaginal de repetição imputa a estas, alto custo financeiro de tratamento.
- Devido a alta hepatotoxicidade dos antifúngicos utilizados, seu uso prolongado pode resultar em dano hepático na paciente.
- Cepas resistentes a esses agentes antimicrobianos podem ser observadas.
- Algumas contra-indicações farmacológicas impossibilitam o uso desses agentes antimicrobianos, como é o caso de pacientes grávidas e pacientes com comprometimento da função hepática.
- Este projeto busca preencher uma lacuna no tratamento de vulvovaginite de repetição utilizando o recurso da terapia fotodinâmica. Pacientes com esta patologia, especialmente aquelas cuja utilização de um antifúngico seja contra indicada, certamente se beneficiarão desta alternativa terapêutica, que poderá representar um forte impacto na saúde pública.

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

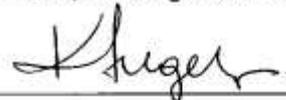
() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

() Não-Aprovado

Comentários:

- 1) Indicar o nome do aluno que participa do trabalho.
- 2) A anestesia é considerada pelo CONCEA como um método de imobilização do animal.
- 3) Favor, enviar relatório final após a finalização do Projeto.

São Paulo, 16 de agosto de 2013



Prof. Dra. Kátia De Angelis
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão de Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA

Tipo de Documento:

Formulário

DIRPA

Página:

2/3

Título do Documento:

Depósito de Pedido de Patente

Código: FQ001

Versão: 01

Procedimento:

DIRPA-PQ006

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: ALESSANDRO MELO DE ANA

6.2 Qualificação: BRASILEIRO CASADO PROFESSOR

6.3 CPF: 29830153860

6.4 Endereço completo: AV ANTÔNIO RAMIRO DA SILVA, 213 - CASA 126 JARDIM DO LAGO SÃO PAULO SP

6.5 CEP: 05397000

6.6 Telefone: (11) 21828000

6.7 Fax: (11) 21828008

6.8 E-mail: remarca@remarca.com.br

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial

Artigo 12 da LPI - período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74)

9.1 Nome: CARLOS DE LENA

9.2 CPF/CNPJ: 27483177853

9.3 API/OAB: 0735 / 42199-SP

9.4 Endereço completo: AV. CÁSPER LIBERO, 383 - 12º ANDAR

9.5 CEP: 01033001

9.6 Telefone: (11) 21828000

9.7 FAX: (11) 21828008

9.8 E-Mail: REMARCA@REMARCA.COM.BR

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão de Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3
	Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		Código:	FQ001
				Versão:	01
				Procedimento:	DIRPA-PQ006

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas);
(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento)

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da união (GRU).	1
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	1
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	12
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	3
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº 5 por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	5
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente a listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Listagem de sequências - Declaração de acordo com a Resolução INPI nº 70/2013.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar): DECLARAÇÃO DE INVENTOR.	1

12. Total de folhas anexadas: 24 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

SÃO PAULO, 03/07/2014

Local e Data

CARLOS DE CENY - APL 0705 (OAB 42190-SP
CPF: 2046917883)

Assinatura e Carimbo

ANEXO DE INVENTORES**Título: DISPOSITIVO E MÉTODO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES****Página : 1**

Nome: RENATO ARAUJO PRATES
Qualificação: BRASILEIRO SOLTEIRO PROFESSOR CNPJ/CPF: 72804521672
Endereço: RUA HARMONIA, 539 - APTO. 51-B
Bairro: SUMAREZINHO Cidade: SÃO PAULO
CEP: 05435000 Estado: SP País: BR
Telefone: (11) 21828000 Fax: (11) 21828008

Nome: MARIA EUGÊNIA SIMÕES ONOFRE DE SANTI
Qualificação: BRASILEIRA CASADA MÉDICA CNPJ/CPF: 17012626810
Endereço: RUA HADDOCK LOBO, 144 - APTO. 111
Bairro: CERQUEIRA CÉSAR Cidade: SÃO PAULO
CEP: 01414000 Estado: SP País: BR
Telefone: (11) 21828000 Fax: (11) 21828008

Nome: CRISTIANE MIRANDA FRANÇA
Qualificação: BRASILEIRA CASADA PROFESSORA CNPJ/CPF: 64120546187
Endereço: AV CONSELHEIRO RODRIGUES ALVES, 948 - APTO. 93
Bairro: VILA MARIANA Cidade: SÃO PAULO
CEP: 04014002 Estado: SP País: BR
Telefone: (11) 21828000 Fax: (11) 21828008

“DISPOSITIVO E MÉTODO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”

[1] INTRODUÇÃO.

[2] O presente relatório descritivo refere-se a uma Patente de Invenção para dispositivo e método para tratamento de vulvovaginite, pertencente ao campo dos equipamentos usados em medicina e destinado a realizar tratamento de vulvovaginite em mucosa vaginal

[3] ESTADO DA TÉCNICA E PESQUISA

[4] Após realização de diferentes pesquisas observou-se a necessidade de se criar um dispositivo que permita o tratamento de vulvovaginite de maneira minimamente invasiva e sem a utilização de medicamentos antimicrobianos de uso interno, de baixo custo e que não exponha o paciente a riscos.

[5] As vulvovaginites, em especial as causadas por infecção por *Candida sp.* representam a mais importante queixa na clínica ginecológica, tanto por sua alta incidência, quanto pelo desconforto de suas manifestações clínicas, caracterizado por prurido vulvo-vaginal intenso, hiperemia local, irritação vulvar, corrimento branco-esverdeado em forma de placas e ardência ao urinar. Trazem repercussões nas diversas esferas da vida das pacientes afetadas: no que diz respeito à intensidade de suas manifestações clínicas, impossibilidade de frequentar o trabalho, exercer adequadamente sua vida sexual e sua vida reprodutiva. Representam também um importante problema econômico, tendo em vista os recursos farmacológicos investidos em seu controle. Em termos estatísticos, essas infecções genitais são o principal motivo que levam as mulheres a procurar o ginecologista. Isso traz um grande impacto financeiro di-

reto, tanto nos custos assistenciais envolvidos, quanto nos custos do tratamento, baseado no uso de drogas fungicidas. Atualmente, são feitas cerca de 10 milhões de consultas/ano somente nos Estados Unidos [1] e a perda de produtividade no trabalho já foi estimada em cerca de um bilhão de dólares na América do Norte. Acredita-se que 75% das mulheres sofram pelo menos um episódio de candidíase sintomática durante sua vida e que 5% dessas tenham essa infecção de forma recorrente, ou seja, ao menos quatro infecções com manifestações clínicas no decorrer de um ano.

[6] Nos casos de vaginites não complicadas, derivados azólicos tópicos ou orais (miconazol, clotrimazol, tioconazol e terconazol) alcançam cura clínica e microbiológica em 80 a 95% em casos agudos na ausência de gravidez, e os poliênicos como nistatina alcançam 70 a 90% [2]. Já nos quadros de candidíase de repetição, é necessário instituir uma terapêutica de fase aguda e, a seguir, um quadro de manutenção, que pode durar de 3 até 6 meses. Em estudo publicado por Sobel et al. [3], concluiu-se que 90,8% das mulheres mantem-se assintomáticas por um prazo de seis meses; 73,2% por um prazo de 9 meses e apenas 42,9% em 12 meses, onde nova terapêutica deverá ser instituída, na vigência de *Candida albicans* na cultura de secreção vaginal.

[7] Assim é que os métodos mais utilizados para o tratamento de vulvovaginitie são a utilização de medicamentos antimicrobianos de forma repetida (três a quatro vezes por ano) nas pacientes portadoras de vaginite o que imputa a estas alto custo financeiro de tratamento. No entanto, algumas contra-indicações farmacológicas impossibilitam o uso desses agentes antimicrobianos, como é o caso

de pacientes grávidas e pacientes com comprometimento da função hepática. Há ainda cepas de micro-organismos resistentes a esses agentes antimicrobianos.

[8] Tendo em vista a alta exposição a agentes farmacológicos demandados pelo manejo clínico desses tratamentos, bem como situações onde exista contra-indicação ao uso dos mesmos (gravidez, intolerâncias medicamentosas, toxicidade hepática, alterações da função hepática, como nas hepatites e hepatomas), novas terapias precisam ser investigadas e propostas para mitigar esses quadros.

[9] Existe, por conseguinte, a necessidade de um dispositivo para auxiliar no tratamento da vulvovaginite de maneira minimamente invasiva, de baixo custo e que não exponha o paciente a riscos.

[10] OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[11] Assim, o objetivo principal da presente invenção é prover um dispositivo e método para irradiação intravaginal com radiação não-ionizante, de modo a auxiliar no tratamento da vulvovaginite, que supere as limitações dos métodos usuais, de modo a suprir a necessidade do estado da técnica.

[12] Outro objetivo é prover um dispositivo e método que proporcione um tratamento minimamente invasivo, sem a utilização de agentes medicamentosos de uso tópico, oral ou injetável, e com alta especificidade, porém podendo eventualmente utilizar agentes foto-sensibilizadores.

[13] Adicionalmente, objetiva-se prover um dispositivo de fácil operação.

[14] Também é objetivo deste prover um dispositivo de baixo custo

de aquisição e que proporcione tratamentos igualmente de baixo custo.

[15] Por fim, outro objetivo é prover um método simples e eficiente de tratamento de vulvovaginite, bem como de demais infecções vulvo-vaginais e/ou demais problemas relacionados à mucosa vaginal.

[16] DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[17] Tendo em vista os problemas e limitações do estado da técnica acima aludido e visando atender aos objetivos relacionados, foi desenvolvido o dispositivo e método para o tratamento de vulvovaginite, objeto da presente patente, dito dispositivo, compreendido, essencialmente: por emissor fonte de emissão de luz que pode emitir radiação eletromagnética compreendida nas regiões visível, infravermelha ou ultravioleta do espectro eletromagnético, que irradia luz sobre o tecido vaginal; por unidade de processamento de dados que controla eletronicamente os emissores de luz; por dispositivos de interface com o usuário, compreendidos: por visor e/ou chaves eletrônicas que controlam a operação do dispositivo; dito emissores de luz apresentam-se montados numa peça de mão e os demais componentes alojados em uma carcaça-central do dispositivo. O dispositivo com tal construção implementa um método compreendido, substancialmente, por irradiar luz sobre o tecido vaginal;

[18] Assim, o presente dispositivo soluciona as limitações e problemas dos dispositivos similares do estado da técnica uma vez que proporciona um tratamento minimamente invasivo e com alta especificidade de vulvovaginite, seja esta de origem fúngica e/ou bacteriana, atendendo assim aos objetivos da invenção.

[19] O presente dispositivo é de fácil operação, conforme é visto

mais adiante neste relatório, atendendo assim outro objetivo da invenção.

[20] O presente dispositivo, em consonância com outros objetivos da invenção, é de baixo custo de aquisição e proporciona um tratamento preciso e igualmente de baixo custo.

[21] LISTA DE FIGURAS

[22] Os desenhos anexos referem-se ao dispositivo e método para tratamento de vulvovaginite, objeto da presente patente, nos quais:

[23] A fig.1 mostra o irradiador intravaginal de tipo com três fileiras de emissores radiais e um emissor frontal (axial) visto em perspectiva, tal que em (A) a peça de mão de secção triangular e o invólucro semitransparente apresentam-se montados um no outro; em (B) é vista a peça de mão separadamente e em (C) o invólucro tomado à parte;

[24] A fig. 2 mostra o irradiador intravaginal de tipo com quatro fileiras de emissores radiais e um emissor frontal (axial) visto em perspectiva, tal que em (A) é vista a peça de mão com secção quadrada e o invólucro semitransparente montados e em (B) e em (C) são vistos a peça de mão e o invólucro semitransparente desmontados um do outro;

[25] A fig. 3 mostra um versão do irradiador intravaginal de tipo com um único irradiador frontal (axial) em perspectiva: em (A) é vista a peça de mão e o invólucro montados; e em (B) e (C) são vistos a peça de mão e o invólucro desmontados;

[26] A fig. 4 mostra uma versão do irradiador intravaginal de tipo com um irradiador frontal (axial) e guia de onda em perspectiva, em (A) com a peça de mão e o guia de ondas montados e em (B) e (C)

6 / 12

desmontados; e

[27] A fig. 5 mostra todo o equipamento formado pelo irradiador intravaginal e pela central de controle e processamento, tal que em (A) e em (B) a central é vista em perspectiva a partir de faces laterais opostas.

[28] DESCRIÇÃO DETALHADA COM BASE NAS FIGURAS

[29] Conforme ilustram as figuras acima relacionadas e é previsto na invenção, o dispositivo, objeto da presente patente, é um dispositivo 1 para ser utilizado na irradiação intravaginal.

[30] A concepção do presente dispositivo leva em consideração:

[31] Que a vulvovaginite é uma doença causada por fungos e/ou bactérias.

[32] A terapia mediada por luz pode inativar microrganismos causadores da vulvovaginite por interação direta da luz com o tecido biológico.

[33] A ação da luz pode ou não ser mediada por um agente fotossensibilizador

[34] Assim, de acordo com objetivo presente desta invenção, a luz emitida pelo dispositivo interage, diretamente ou por meio de um agente fotossensibilizador, com os microrganismos causadores da vulvovaginite, levando os mesmos à apoptose celular ou lise. Deste modo, a colonização pelos microrganismos nocivos é debelada, contendo a infecção.

[35] Com base nesses conhecimentos, adquiridos em pesquisas para o desenvolvimento do dispositivo de irradiação intravaginal 1 (fig. 5), objeto da presente patente, tem-se que dito dispositivo é compreendido, essencialmente: por emissor ou emissores de luz

10, que irradia(m) luz sobre a mucosa vaginal a ser tratada (figs. 1 a 4); e por central de processamento de dados 40 associada ao(s) emissor(es) de luz intravaginal(is) 10 (fig. 5).

[36] O(s) emissor(es) 10 é(são) montado(s) em uma peça de mão 20 (figs. 1, 2, 3 e 4). A peça de mão 20 pode conter um ou mais emissor(es) 10 disposto(s) radialmente, (emissor radial 10) de maneira a irradiar a totalidade da mucosa vaginal (figs. 1 e 2), bem como um ou um único emissor frontal 10' (fig. 3) (emissor axial 10'). Nestes casos, o(s) emissor(es) radial(is) 10, axial 10', montados na peça de mão 20, deverão estar contidos dentro de um invólucro semitransparente 30 de modo a permitir a passagem da luz e não permitir o contato entre as fontes de luz e a parede vaginal; dita peça de mão 20 e invólucro semitransparente 30 definindo configuração selecionada para poder ser introduzida na vagina. Um único emissor axial 10' e um guia de onda 31 para direcionar a luz para dentro do canal vaginal (fig. 4) também pode ser utilizado.

[37] O dispositivo de irradiação intravaginal 1 é formado ainda por central de processamento de dados 40 baseada em unidade de processamento de dados (processador memória) (fig. 5) que controla eletronicamente as fontes de luz e que contém dispositivos de interface com o usuário, compreendidos: por visor 41; botões 42 de controle individual dos emissores; e por chaves liga/desliga 43 que ligam e desligam os emissores de luz. A unidade de processamento e controle, visor, botões circuitos desses componentes e auxiliares dos mesmos e outros dispositivos auxiliares, como fonte; dispositivo de alimentação de energia elétrica dotado de cordão de conexão à rede e outros ficam montados dentro de uma carcaça-central 44,

que tem uma base externa 45 de apoio para a peça de mão 20 quando em desuso e em cujas superfícies ficam montados o visor, as chaves de controle e botão liga-desliga (fig. 5).

[38] Detalhando, o emissor de luz radial 10 e axial 10' pode ser compreendido, por exemplo, por laser de diodo ou de estado sólido ou VECSEL ou microchip ou diodos emissores de luz (LED) ou lâmpadas ou lâmpada com filtros ou qualquer sistema gerador de ondas eletromagnéticas adequado em qualquer região do espectro eletromagnético. Os emissores radiais 10 podem estar dispostos na peça de mão 20 em qualquer posição de modo a irradiar a mucosa vaginal inteira, como, por exemplo, dispostos radialmente e espaçados regularmente por todo entorno da peça de mão 20, ou pode ser previsto um único emissor frontal axial 10' disposto na peça de mão 20 usado com involucro semitransparente 30 ou com um guia de onda 31 ou dito emissor de luz pode ser constituído por um único emissor com configuração selecionada para ser introduzido na vagina.

[39] Dentro das soluções básicas adotadas acima descritas, pleiteia-se que os emissores de luz possam estar dispostos de qualquer outra maneira, mesmo que diferente dos exemplos das fig. 1, 2, 3 e 4.

[40] A unidade de processamento 40 é compreendida por microprocessador, memória e baseada em software adequado.

[41] O visor e as chaves podem ser quaisquer adequados, normalmente usados em saída de vídeo e controle de equipamentos eletroeletrônicos, incluindo sistemas do tipo toque na tela "touch screen".

[42] Quando o dispositivo para irradiação vaginal 1 está em funcionamento tem-se:

[43] A peça de mão 20 (dotada do(s) emissor(es) 10, 10' e recoberta pelo invólucro semitransparente 30) é introduzida na vagina, e os emissores de luz 10, 10' irradiam luz sobre a mucosa vaginal a ser tratada.

[44] Os agentes microbiológicos responsáveis pela vulvo-vaginite, presentes na mucosa vaginal, absorvem a luz diretamente e/ou através de mediadores.

[45] A absorção da luz irradiada, diretamente e/ou por meio de mediadores, induz a apoptose (morte) celular dos agentes microbiológicos supracitados.

[46] O tempo, a potência e a energia luminosa depositada sobre o tecido vaginal poderão ser controlados pelo usuário e observados no visor da central de processamento.

[47] Adicionalmente, devido à alta sensibilidade dos sistemas digitais atuais, o sistema de emissão de luz, do presente dispositivo, pode ser de baixa potência, menor que 1 miliwatt, não causando, portanto, danos ou alterações aos tecidos estudados. Todavia, potências mais altas também podem ser utilizadas por este dispositivo.

[48] Com este equipamento, portanto, será possível irradiar a mucosa vaginal.

[49] O presente dispositivo realiza, portanto, um método para irradiação intravaginal, preferencialmente não ionizante, porém não limitado à esta região do espectro eletromagnético, compreendido, essencialmente: por introduzir a peça de mão no canal vaginal a ser

tratado; ajustar potência luminosa e o tempo do tratamento; selecionar os emissores a serem acionados; irradiar luz na mucosa vaginal.

[50] CAMPO DE APLICAÇÃO

[51] O campo de aplicação do presente dispositivo será em crianças, adolescentes, adultos e animais, bem como em ensaios clínicos e laboratoriais, e servirá para irradiar a mucosa vaginal de maneira minimamente invasiva, de baixo custo e que não exponha o paciente a riscos.

[52] Dentro da metodologia adotada acima, pleiteia-se que o dispositivo e método propostos possam também ser utilizados em tratamentos de problemas relacionados à mucosa vaginal ou como coadjuvante a outras formas de terapia.

[53] Pleiteia-se também que o dispositivo e método proposto possa ser utilizado para o tratamento de vaginites e vaginoses de outras etiologias como, por exemplo mas não limitado à: *Trichomonas Vaginalis*; *Gardnerella* e *Mobiluncus*, bem como infecções herpéticas.

[54] Dentro das soluções básicas adotadas acima descritas, pleiteia-se que possam ser feitas modificações de materiais, dimensões, construções, etapas processuais sem que se fuja do âmbito de proteção solicitado.

[55] Dentro disso, por exemplo, conforme ilustrações, a peça de mão 20 é um corpo alongado que pode ser constituído: por trecho de pega (cabo) 21 da extremidade livre do qual se deriva o cabo elétrico 46 que segue para a unidade de processamento de dados 40; por trecho de base 22 prismático, como, por exemplo, seção tri-

angular (fig. 1) ou secção quadrada (fig. 2), ao longo de cujas superfícies laterais ficam montadas respectivas fileiras de emissores radiais 10 e na superfície de topo um emissor frontal axial 10'. O invólucro semitransparente 30 é cilíndrico tem uma extremidade aberta que se acopla no trecho base 22 e extremidade oposta semiesférica, porém esta extremidade pode possuir outras geometrias. Opcionalmente, pode ser prevista versão dotada somente de um emissor frontal axial 10' (fig. 3) montado na extremidade livre da base 22 da peça de mão 20 e de invólucro semitransparente 30 montado nesta última e que recobre o emissor frontal axial 10').

[56] O dispositivo de irradiação intravaginal 1 de tipo com guia de onda (fig. 4) tem a peça de mão 20 compreendida: pelo cabo 21; por uma curta base cilíndrica 22 em cuja face de topo fica montado um emissor frontal axial 10'; e por um guia de onda tubular 31 com extremidade aberta que se acopla na base 22 e extremidade oposta plana ou esférica ou com qualquer outra geometria que propicie a passagem de luz.

[57] Ao invés do dispositivo ser ligado direto à rede elétrica pode ser ligado a uma base carregadora 110/220v.

[58] O dispositivo pode prever quaisquer outras soluções que propicie irradiar em tecido vaginal.

[59] O dispositivo pode ser provido com uma saída de impressão em papel.

[60] BIBLIOGRAFIA

1. KENT HL. Epidemiology of vaginitis. Am J Obstet Gynecol. 1991;165(4 Pt 2): 1168-76.
2. Jackeline M. ACHKAR and Bettina C. FRIES. Candida Infec-

12 / 12

tions of the Genitourinary Tract. Clin.Microbiol.Rev.2010,23(2):253-72.

3. SOBEL JD Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol. 1985;152:924-935.

REIVINDICAÇÕES

- 1) “DISPOSITIVO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”, caracterizado por emissor ou emissores de luz intravaginal(is) (10), que irradia(m) luz sobre a mucosa vaginal a ser tratada, adequada para induzir a apoptose ou lise (morte) celular de agentes microbianos sendo que tal fonte de luz pode emitir radiação eletromagnética compreendida nas regiões visível, infravermelha ou ultravioleta do espectro eletromagnético; e por central de processamento de dados (40) de controle do(s) emissor(es) de luz intravaginal(is) (10).
- 2) “DISPOSITIVO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por emissor(es) intravaginal(is) de luz (10) montado(s) em uma peça de mão (20) e por invólucro semitransparente (30) montável na peça de mão (20) e que recobre os emissor(es) de luz intravaginal(is) (10); dita peça de mão (20) e invólucro semitransparente (30) dotados de configurações selecionadas para introdução na vagina e este último adequado para permitir a passagem da luz e impedir o contato dos emissor(es) de luz intravaginal(is) (10) com a mucosa vaginal.
- 3) “DISPOSITIVO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”, de acordo com a reivindicação 2 caracterizado por peça de mão (20) que contém um ou mais emissor(es) de luz intravaginal(is) radial(is) (10) que irradiam a totalidade da mucosa vaginal e um único emissor frontal axial (10)’.
- 4) “DISPOSITIVO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”, de acordo com a reivindicação 1, caracte-

rizado por um emissor de luz frontal axial (10)'; por uma peça de mão (20) que tem montado o emissor; e por um invólucro semi-transparente (30) ou um guia de onda (31), que direciona a luz para dentro do canal vaginal, montados na peça de mão (20).

5) "DISPOSITIVO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por um único emissor de luz intravaginal com configuração selecionada para introdução na vagina.

6) "DISPOSITIVO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por central de processamento de dados (40) baseada em unidade de processamento de dados (processador memória) que controla eletronicamente as fontes de luz; por dispositivos de interface com o usuário, compreendidos: por visor (41); botões (42) de controle individual dos emissores; e por chaves liga/desliga (43) que ligam e desligam os emissores de luz; por componentes e auxiliares dos mesmos e outros dispositivos auxiliares, como fonte; dispositivo de alimentação de energia elétrica dotado de cordão de conexão à rede e outros, todos montados dentro de uma carcaça-central (44), que tem uma base externa (45) de apoio para a peça de mão (20) quando em desuso e em cujas superfícies ficam montados o visor, as chaves de controle e botão liga-desliga.

7) "DISPOSITIVO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS", de acordo com as reivindicações 1 ou 2 ou 3 ou 4 ou 5, caracterizado por emissor de luz radial (10) e axial (10)' compreendido: por laser de diodo ou de estado sólido ou VECSEL ou microchip ou diodos emissores de luz (LED) ou lâmpa-

das ou lâmpada com filtros ou qualquer sistema gerador de luz adequado em qualquer região do espectro eletromagnético.

8) “DISPOSITIVO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por central de processamento de dados (40) dotada de visor e chaves quaisquer adequados, normalmente usados em saída de vídeo e controle de equipamentos eletroeletrônicos, incluindo sistemas do tipo toque na tela (touch screen).

9) “DISPOSITIVO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por prover saída de impressão.

10) “MÉTODO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”, realizado pelo dispositivo das reivindicações 1 a 9, caracterizado por introdução da peça de mão (20), contendo emissor(es) de luz intravaginal(is) radial(is) (10) e/ou axial (10)’ e tendo montado invólucro semitransparente (30) ou guia de onda (31), no canal vaginal a ser tratado; ajustar potência luminosa e o tempo do tratamento na central de processamento de dados (40); selecionar os emissores de luz intravaginais (10), (10)’ a serem acionados; irradiar luz na mucosa vaginal.

11) “MÉTODO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”, de acordo com a reivindicação 10 caracterizado por irradiação intravaginal, preferencialmente não ionizante, porém não limitada à esta região do espectro eletromagnético.

1 / 5

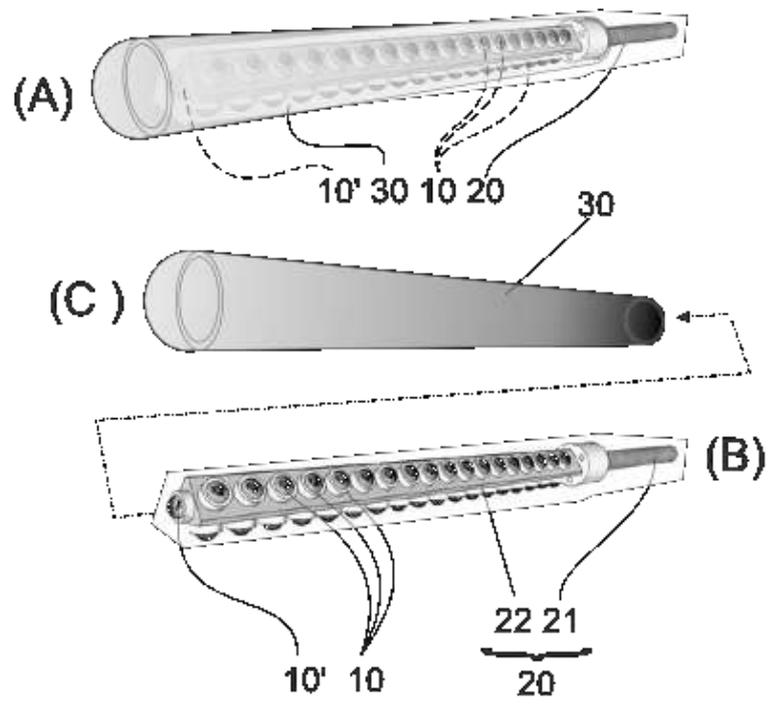


FIG. 1

2 / 5

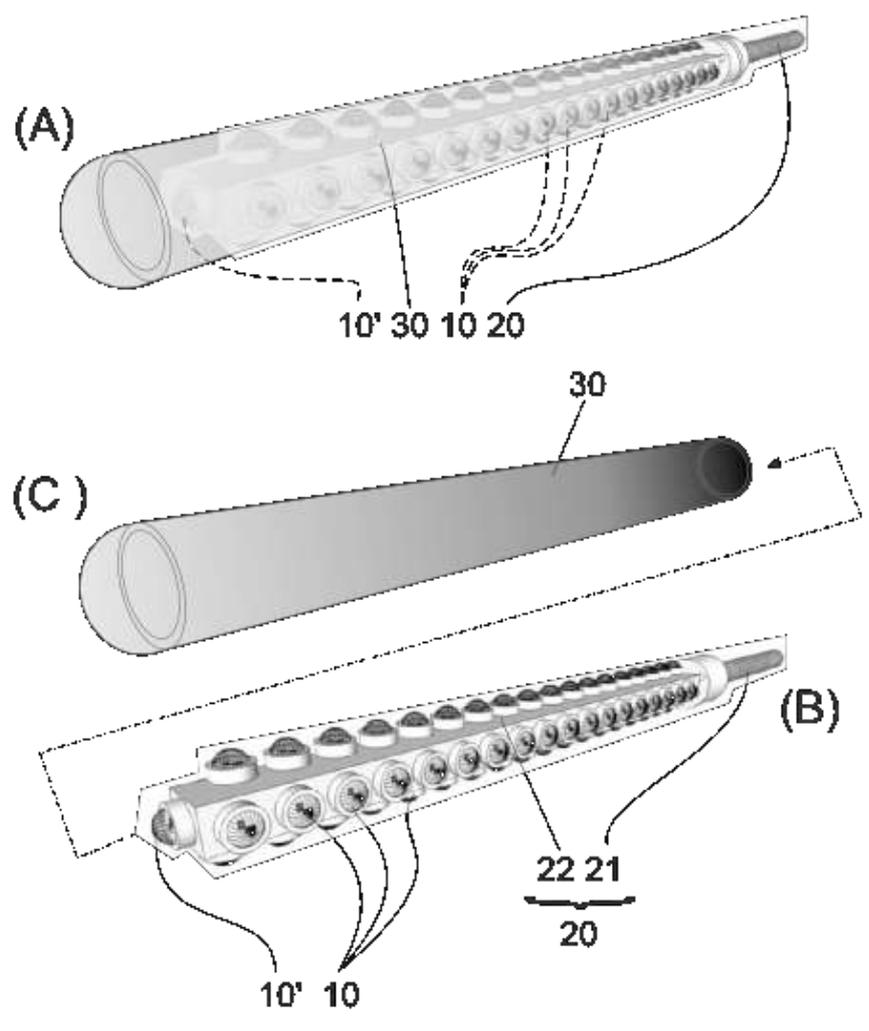


FIG. 2

3/5

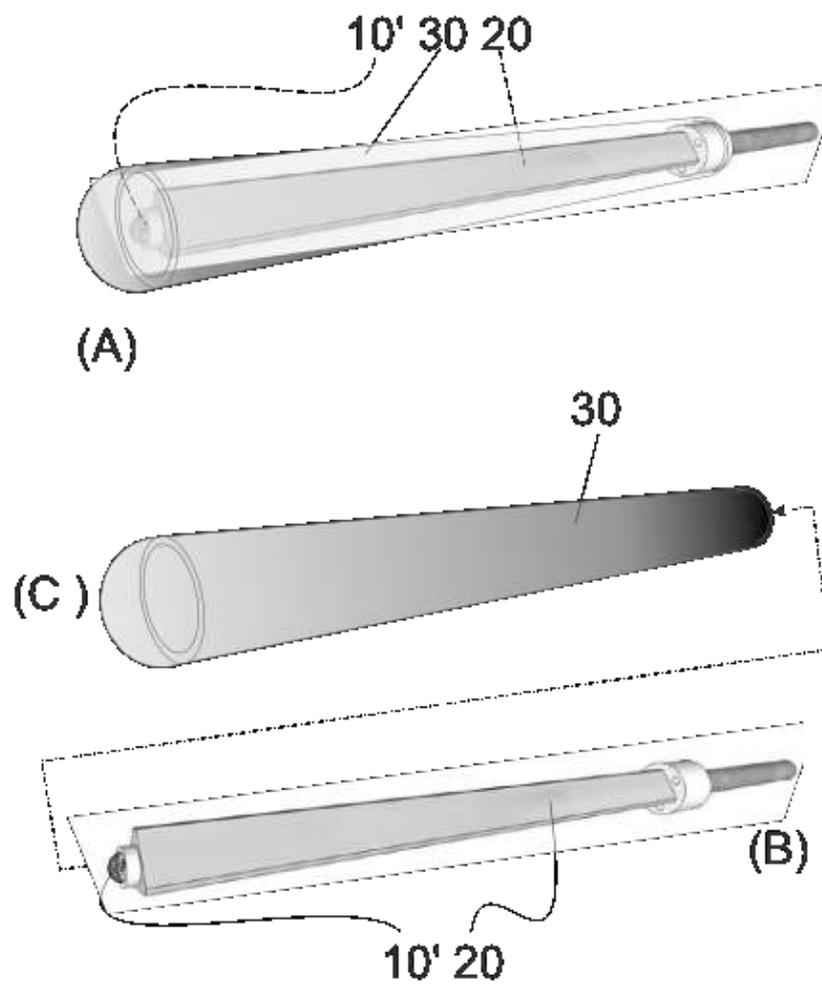


FIG. 3

4 / 5

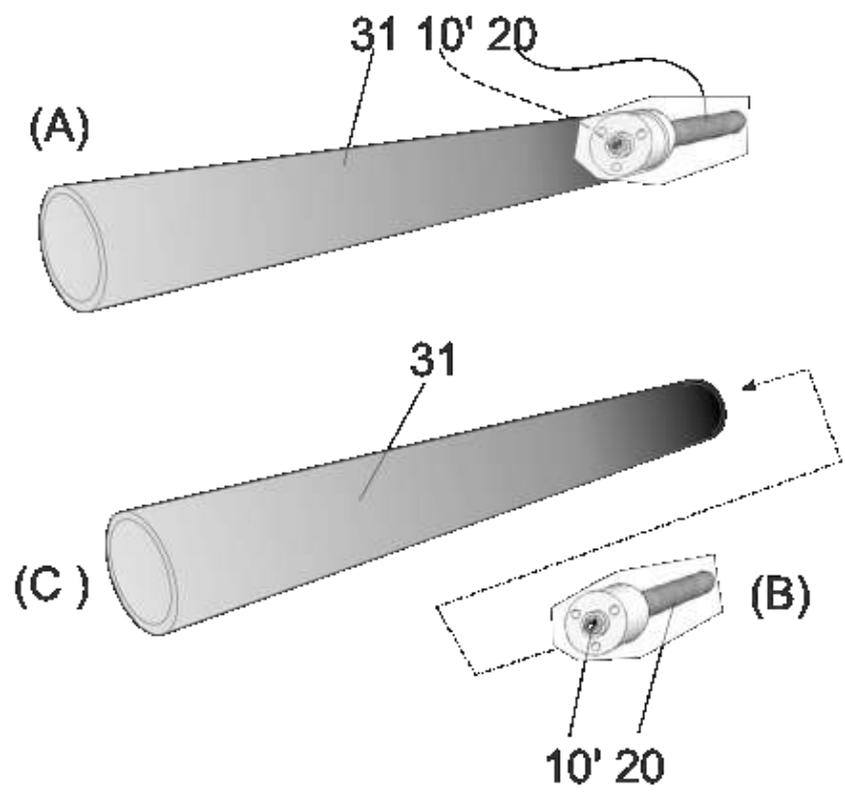


FIG. 4

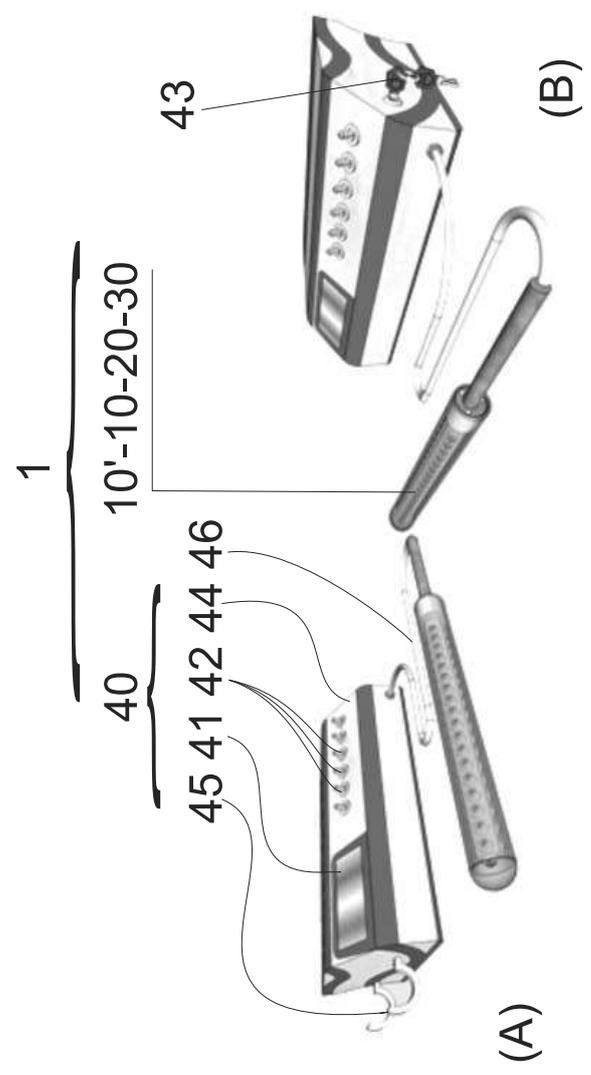


FIG. 5

RESUMO

“DISPOSITIVO E MÉTODO PARA TRATAMENTO DE VULVOVAGINITE E INFECÇÕES VAGINAIS”

O presente resumo refere-se a uma Patente de Invenção para dispositivo e método para tratamento de vulvovaginite, pertencente ao campo dos equipamentos usados em medicina e destinado a realizar tratamento de vulvovaginite em mucosa vaginal, compreendido, essencialmente: por emissor ou emissores de luz intravaginal(is) (10), que irradia(m) luz sobre a mucosa vaginal a ser tratada, adequada para induzir a apoptose (morte) celular de agentes microbianos; e por central de processamento de dados (40) associada ao(s) emissor(es) de luz intravaginal(is) (10).