

## Irradiação a Laser de baixa intensidade sobre cepas de *Candida in vitro*

### Irradiación Láser de baja intensidad en cepas de *Candida*: *In vitro*

### Low-level laser irradiation on *Candida* strains: an *in vitro* study

Eveline Angélica Lira De Souza Sales Rocha, Andreia Medeiros Rodrigues Cardoso, Francisco Ivison Rodrigues Limeira, Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Daliana Queiroga de Castro Gomes

Universidade Estadual da Paraíba. Brasil.

---

#### RESUMO

**Objetivo:** avaliar o efeito de parâmetros específicos da irradiação com laser de baixa intensidade sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 34135) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803).

**Metodologia:** inóculos das três espécies de *Candida* ( $1.5 \times 10^6$  microorganismos/ml) foram irradiadas com um dispositivo laser infra-vermelho de Arsenato de Gálio -AsGa (TwinFlex Evolution, MMO Equipamentos Eletrônicos 660 nm, 0,5 nW), nas doses ( $J/cm^2$ ): 1,2 (10 seg), 3,7 (30 seg), 7,5 (1min) e 15(2 min). Após aplicação, os inóculos foram semeados em placas petri com meio de cultura Sabouraud-Dextrose e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. Depois de 48 horas, realizou-se a quantificação das Unidades Formadoras de Colônias – UFC e analisou-se os dados estatisticamente, através dos Testes de Friedman e Wilcoxon ( $\alpha =0,05$ ). Todos os testes foram realizados em duplicata.

**Resultados:** os valores da mediana (Q25 - Q75) obtidos na quantificação das cepas após irradiação do laser nas doses ( $J/cm^2$ ) 1,2, 3,7, 7,5 e 15 foram respectivamente: 35,23 (9,15-47,64); 6,79 (1,45-6,87); 5,32 (1,39-8,15); 6,10 (1,18-11,86) e 5,13 (0,99-6,25). Estes resultados mostraram diferença

significativa estatisticamente de acordo com a dose aplicada ( $p < 0,05$ ), no entanto, não se identificou o(s) grupo (s) que apresenta diferença significativa dentre os demais, no pós-hoc.

**Conclusão:** a laserterapia de baixa intensidade apresentou efeito inibitório sobre cepas de *Candida*, sendo esta atividade alterada de acordo com a dose irradiada.

**Palavras-chaves:** candida, candidíase oral, terapia a laser de baixa intensidade.

---

## RESUMEN

**Objetivo:** evaluar el efecto de los parámetros específicos de la irradiación con láser de baja intensidad en cepas de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 34135) y *Candida tropicalis* (ATCC 13803).

**Métodos:** los inóculos de las tres especies de *Candida* ( $1,5 \times 10^6$  microorganismos / ml) se irradiaron con un dispositivo láser de infra-rojo de GaAs-arseniato de galio (TwinFlex Evolution, MMO Electronic Equipment 660 nm, 0,5 nW) en la dosis ( $J/cm^2$ ) 1,2 (10 seg), 3,7 (30 seg), 7,5 (1 min) y 15 (2 min). Después de la aplicación, los inóculos se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo de Dextrosa Sabouraud y se incubaron en incubadora bacteriológica a 37 ° C. Después de 48 horas, se produjo la cuantificación de unidades formadoras de colonias - UFC y los datos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon y Friedman ( $\alpha = 0,05$ ). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

**Resultados:** los valores medios (Q25 - Q75) obtenidos en la cuantificación de las cepas después de la irradiación con láser en la dosis ( $J/cm^2$ ) 1,2, 3,7, 7,5 y 15, fueron respectivamente: 35,23 (9,15-47,64) 6,79 (1,45-6,87) 5,32 (1,39 a 8,15) 6,10 (1,18-11,86) y 5.13 (0,99-6,25). Estos mostraron una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la dosis aplicada ( $p < .05$ ), sin embargo, no se identificaron (s) grupo (s) que presenta una diferencia significativa entre otros en lo post-hoc.

**Conclusiones:** el tratamiento con láser de baja intensidad mostró efecto inhibitorio sobre cepas de *Candida*, siendo esta actividad alterada de acuerdo con la dosis irradiada.

**Palabras clave:** candida, candidiasis oral, terapia con láser de baja intensidad.

---

## ABSTRACT

**Objective:** to evaluate the effect of specific parameters of low-level laser irradiation on strains of *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 34135) and *Candida tropicalis* (ATCC 13803).

**Methods:** the inocula of the three *Candida* species ( $1.5 \times 10^6$  microorganisms/ml) were irradiated with a gallium-arsenide (GaAs) infrared laser device (Twinflex Evolution, MMO Electronic Equipment, 660 nm, 0.5 nW) at doses ( $J/cm^2$ ): 1.2 (10 sec), 3.7 (30 sec), 7.5 (1min) and 15 (2 min). Following irradiation, the inocula were grown on Petri dishes containing Sabouraud Dextrose culture medium and then incubated in bacteriological incubator at 37 °C. After 48 hours, it was quantified the number of colony-forming units (CFU) and data were statistically analyzed using Friedman's and Wilcoxon's tests ( $\alpha = 0.05$ ). All tests were performed in duplicate.

**Results:** the median values (Q25 - Q75) gathered in the quantification of the strains after laser irradiation at doses ( $J/cm^2$ ) 1.2, 3.7, 7.5 and 15 were, respectively: 35.23 (9,15-47,64); 6,79 (1,45-6,87); 5,32 (1,39-8,15); 6.10 (1,18-11,86) and 5.13 (0,99-6,25).

---

These results were found to show statistically significant differences according to the dose administered ( $p < 0.05$ ). Nevertheless, it was not possible to identify in the post-hoc tests which group(s) showed significant difference.

**Conclusion:** low-intensity laser therapy showed inhibitory effect on *Candida* strains, and such activity was altered according to the irradiated dose.

**Keywords:** *candida*, candidiasis oral, laser therapy low-level.

---

## INTRODUÇÃO

A eliminação de microrganismos da cavidade oral é fundamental para prevenir o risco de infecções locais e sistêmicas, para isso, muitas substâncias têm mostrado certa eficácia, mas a resistência de alguns microrganismos a determinados medicamentos, ilustra a necessidade de métodos alternativos.

O aumento de casos de infecções causadas por cepas de *Candida* e a conseqüentemente utilização excessiva de antimicrobianos, favoreceu, nas últimas décadas, à resistência dessas leveduras aos agentes antifúngicos convencionais.<sup>1</sup>

Estes microrganismos estão presentes, em grande quantidade, em pacientes HIV positivos e em pacientes submetidos à radioterapia e quimioterapia, condições estas que ocasionam um estado de imunossupressão, predispondo os mesmos a uma maior resistência aos tratamentos convencionais com antifúngicos.<sup>2-3</sup>

Na Odontologia, os lasers são utilizados principalmente como auxiliares na redução de microorganismos.<sup>4-5</sup> Os lasers de alta potência, emitem grandes intensidades luminosas, causando modificações estruturais nos tecidos. E os lasers em baixa potência, associados a corantes, podem levar à morte ou redução dos microrganismos, sem causar danos ao organismo, processo conhecido como Terapia Fotodinâmica (TFD). Mecanismo em que a luz laser ativa um corante depositado no organismo alvo e o sensibiliza em duas vias distintas, seja por meio do sistema redox, promovendo após interação com o meio uma resposta citotóxica, seja pela liberação de energia ocorrida após a radiação que atingiu o corante no organismo alvo, transformando o oxigênio em nível molecular em oxigênio singlete, citotóxico para as bactérias.<sup>6</sup>

Em relação aos efeitos isolados do laser, também foram observadas reduções na quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) de *Candida albicans*, sugerindo uma possível susceptibilidade desta levedura exclusivamente ao laser.<sup>7</sup> Estudos anteriores apresentaram descritivamente uma isolada atividade do laser frente a cepas de *Candida*.<sup>3,7-8</sup> No entanto, diante da alta prevalência de candidíase oral, em razão das condições sistêmicas da população, e crescente disponibilidade de tratamentos com laser sem protocolos específicos, faz-se necessário à realização de novas investigações com testes de hipóteses diferenciadas a respeito da sua atividade antifúngica.

Diante do exposto, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito de parâmetros específicos da irradiação com laser de baixa intensidade sobre cepas de *Candida*, *in vitro*, testando a hipótese de que a atividade antimicrobiana de baixa intensidade se diferencia de acordo com a dose aplicada.

---

## METODOLOGÍA

Realizou-se uma metodologia de abordagem indutiva com procedimento comparativo-estatístico e documentação direta por procedimento laboratorial,<sup>9</sup> desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Para análise da atividade antimicrobiana *in vitro*, foi utilizado um diodo laser Arseneto de Gálio - AsGa (TwinFlex Evolution, MMO Equipamentos Eletrônicos), atuando na faixa espectral do vermelho com comprimento de onda de 660nm correspondente à faixa de comprimento de baixa intensidade, com potência útil de 0,5 mW.

As cepas de referência *Candida albicans* (18804), *Candida tropicalis* (13803) e *Candida krusei* (34135) empregadas foram obtidas no próprio laboratório, reativadas em meio Sabouraud-Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) a 37° C e cultivadas em Agar Sabouraud-Dextrose 4% (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), a 37 ° C durante 48 horas, de acordo com as suas necessidades fisiológicas. O inóculo microbiano foi padronizado de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute*,<sup>10</sup> em espectrofotômetro BIOSPECTRO® com comprimento de onda a 625 nm, em que as referidas suspensões foram diluídas de modo a obter-se uma preparação microbiana com concentração final próxima a 10<sup>6</sup> UFC/mL.

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da quantificação das UFC/mL das cepas fúngicas conforme a técnica empregada por estudo anterior<sup>11</sup> com modificações do *CLSI*.<sup>10</sup> Para tanto, as amostras das cepas foram adequadamente irradiadas, com emissões contínuas e modo de operação pontual, pelo laser de AsGa (660 nm) nas dosimetrias (em J/cm<sup>2</sup>): 1,2 (10 seg), 3,7 (30 seg), 7,5 (1min) e 15 (2 min). Como controle negativo e de crescimento, não se aplicou o laser em uma amostra de cada cepa. Após os ensaios, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram retiradas e semeadas em placas contendo Ágar Sabouraud-Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°, por 48 horas e realizou-se a quantificação. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

Os resultados da contagem foram organizados de acordo com as diferentes doses do laser aplicadas, independente da espécie de *Candida*, e analisados descritivamente e estatisticamente através dos Testes de Friedman e Wilcoxon, com nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ), no software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 17.0.

## RESULTADOS

Os valores obtidos na quantificação de UFC das cepas testadas sob a irradiação do laser de baixa intensidade estão descritos na tabela.

## DISCUSSÃO

O uso de próteses dentárias, deficiências nutricionais, doenças metabólicas, diminuição da imunidade do hospedeiro, lesões em mucosas, higiene oral deficiente, e tratamentos prolongados com antibióticos e corticosteroides são alguns fatores que predis põem o surgimento das candidíases orais.<sup>12</sup>

O tratamento com agentes antifúngicos, tais como nistatina, anfotericina B e fluconazol é capaz de alcançar apenas uma resposta transitória durante o tratamento, em geral, durante 15 dias.<sup>13</sup> As recorrências são muito comuns, considerando-se a etiologia multifatorial das candidíases e o uso generalizado de fungicidas tem resultado no desenvolvimento de espécies resistentes.

Por esses fatores, o laser de baixa intensidade tem sido amplamente divulgado como promissor no tratamento das infecções fúngicas, no entanto, não há um consenso na literatura sobre quais parâmetros para a irradiação a laser seriam mais eficazes na descontaminação fúngica,<sup>3,7,14-15</sup> tornando necessário que sejam realizadas diversas investigações para a elaboração de protocolos clínicos seguros quanto ao uso do laser de baixa intensidade.

Neste estudo, testou-se a ação do laser de baixa intensidade sobre espécies do gênero *Candida* spp., *in vitro*, sem a ativação prévia com um fotoativador, levando em consideração a possível toxicidade das substâncias utilizadas para ativação do laser. Os resultados apresentaram um considerável potencial antifúngico do laser sobre as cepas testadas (Tabela 1), resultante do efeito inibitório do laser no crescimento celular das colônias fúngicas,<sup>7</sup> sendo explicada essa sensibilidade das cepas testadas, na ausência de substância fotossensibilizantes, através da existência de espécies microbianas que contêm naturalmente componentes fotossensíveis endógenos nos seus microorganismos.<sup>16</sup>

**Tabela.** Quantificação das cepas, em UFC x 10<sup>2</sup>, sob a ação do laser de baixa densidade

Dose (J/cm <sup>2</sup> )	Mediana (Q 25 - Q75)	Valor de p
0 (controle)	35,23 (9,15- 47,64) <sup>a</sup>	< 0,05*
1,2	6,79 (1,45- 6,87) <sup>a</sup>	
3,7	5,32 (1,39- 8,15) <sup>a</sup>	
7,5	6,10 (1,18- 11,86) <sup>a</sup>	
15	5,13 (0,99- 6,25) <sup>a</sup>	

Os valores expressos como mediana (Q25-Q75) (n = 3) do número de UFC x10<sup>2</sup>.

\*: Teste de Friedman com  $\alpha=0,05$ . Mesmas letras minúsculas nas colunas indicam nenhuma diferença estatisticamente significativa (Teste Wilcoxon penalizado por 10 combinações com  $\alpha=0,05$ ).

Na análise analítica desses dados, o número de UFC/ml de *Candida* diminuiu conforme aumentava a Dose (J/cm<sup>2</sup>) da irradiação do laser de baixa intensidade, com diferença significativa entre os grupos experimentais avaliados de acordo com a dose empregada (Tabela 1). Mostrando que a atividade antimicrobiana do laser é dose dependente, obtendo melhores efeitos de acordo com o aumento da dose.

No entanto, não se identificou qual grupo experimental apresenta diferença significativa dentre os demais, no teste pós-hoc, fato explicado pelo número

pequeno (3) de espécies de *candida* incluídas no estudo, diminuindo a variabilidade da amostra, para a aplicação do teste. Por isso, ressalta-se que a espécie de *candida* utilizada, foi escolhida de acordo com estudos anteriores<sup>3,17</sup> e, a descrição, na literatura, sobre o maior envolvimento destas espécies de *candida* com a candidíase oral.<sup>18</sup>

Esses resultados descritivos concordaram com estudos anteriores,<sup>3,17</sup> que avaliaram a irradiação com laser de diodo (685 nm) com 28 cm/J em suspensões de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, na presença e na ausência de azul de metileno, e concluíram, até mesmo na ausência de fotossensibilizador, a sensibilidade da espécie *C. tropicalis* ao laser,<sup>3</sup> assim como no estudo do laser arsenieto de gálio e alumínio com um comprimento de onda de 660 nm, potência de saída de 0,035W e área iluminada de 0,38 cm<sup>2</sup> que diminuiu a quantidades de cepas de *C. albicans*.<sup>17</sup>

A laserterapia em estudo *in vivo*, também, apresentou efeito inibitório no crescimento celular das colônias fúngicas.<sup>7</sup> Neste estudo, pacientes foram irradiados na mucosa palatal e na base acrílica da prótese, com tempo de cinco minutos de exposição (830 nm, 3,0 J/cm<sup>2</sup>, 60 mW) e tempo de dez minutos (685 nm, 3,0 J/cm<sup>2</sup>, 30 mW), por 5 dias consecutivos. Avaliou-se, por intermédio do método de *swab* e estimação semiquantitativa do crescimento das colônias em placa com ágar. A inflamação foi avaliada conforme resposta clínica. Após o término do tratamento, ocorreu a diminuição das colônias e da inflamação.<sup>7</sup>

Em contrapartida, outros estudos encontram exclusivamente atividade antifúngica considerável do laser quando associado a substâncias fotoativadoras como azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita.<sup>13,19-20</sup> Sendo importante destacar a dificuldade de comparação entre os achados da literatura, devido às diferentes técnicas empregadas. Esse trabalho buscou suprir essas dificuldades e evitar o viés na avaliação dos resultados. Para tanto, as técnicas empregadas foram baseadas na literatura.

Por se tratar de uma pesquisa *in vitro*, esse estudo apresenta algumas limitações, pois não reproduz condições naturais orais importantes, como aderência celular, formação de biofilme, presença da saliva humana e demais condições inerentes à cavidade oral.<sup>21</sup> Apesar disso, os trabalhos, *in vitro*, têm a vantagem de fornecer dados isolados de variáveis de interesse, sem que haja a interferência de outros fatores (vieses de confundimento). Associado a esses fatores, a incorporação do controle de crescimento ou negativo contribuiu para redução de viés metodológico, comparação entre os protocolos testados e comprovação da viabilidade das cepas testadas.<sup>22</sup>

Sendo assim, novas investigações são necessárias para a determinação de protocolos de utilização da laserterapia de baixa intensidade. De forma que, o prosseguimento dos ensaios laboratoriais considerem a avaliação da atividade antifúngica diante de cepas clínicas e outras linhagens padronizadas empregando técnicas que considerem a aderência celular, a formação de biofilme *in vitro* e a influência da saliva humana.

A terapia a laser de baixa intensidade apresentou efeito inibitório sobre as cepas de *Candida* avaliadas, com atividade diferenciada de acordo com a dose irradiada.

## REFERÊNCIAS

1. Pinto PM, Weikert-Oliveira RCB, Lyon JP. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. obtained from patients with different predisposing factors to candidosis. *Microbiol Res.* 2008;163:579-5.
2. Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20:3-7.
3. Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorde AOC. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B.* 2006;83(1):34-8.
4. Garcez AS, Souza, FR, Núñez SC, Kather JM, Ribeiro MS. Terapia Fotodinâmica em Odontologia - Laser de baixa potência para redução microbiana. *Rev APCD.* 2003;57(3):223-6.
5. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Brugnera Junior A. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: *in vitro* study. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(2):324-30.
6. Gonçalves L. Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
7. Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V. Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 328- 32.
8. Bevilacqua IM, Brugnera Junior A, Nicolau RA. Ação do laser de baixa potência associado à substâncias fotoativadoras na redução de cândidas em meio bucal (Revisão da literatura). In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação: 2011; São José dos Campos. Anais. 2011. p. 1925-8.
9. Lakatos EM, Marconi MA. Fundamentos da metodologia científica. 6ª. ed. São Paulo: Atlas, 2009.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo. 2005;25(1).
11. Silva EJNL, Coutinho Filho WP, Andrade AO, Morante DRH, Hirata Junior R, Coutinho Filho TS *et al.* Efecto antimicrobiano de la terapia fotodinámica sobre *Enterococcus faecalis*, estudio *in vitro*. *Rev Estomatol Hered.* 2011;21(4):185-9.
12. Diniz DN, Macêdo-Costa, MR, Pereira MSV, Pereira JV, Higimo JS. Efeito antifúngico *in vitro* do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. *Rev Odontol UNESP.* 2010;39(3):151-6.
13. Scwingel AR, Barcessat ARP, Nunez SC, Ribeiro MS. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Treatment of Oral Candidiasis in HIV-Infected Patients. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(8):429-32.
14. Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B.* 2007;88(1):16-20.

15. Giroldo LM, Felipe MP, Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci.* 2009;24 (1):109-12.
16. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser irradiation. *Curr Microbiol.* 1992;25: 77-81.
17. Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite Green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci.* 2010;25(3):385-9.
18. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002;78(2):455-9.
19. Junqueira JC, Ribeiro MA, Rossoni RD, Barbosa JO, Querido SMR, Jorge AOC. Photomed Laser Surg. 2010;28 Suppl 1:67-2.
20. Pupo YM, Gomes GM, Santos EB, Chaves L, Michel MD, Kozlowski VA Jr, Gomes OM, Gomes JC. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. *Acta Odontol Latinoam.* 2011;24(2):188-92.
21. Bomfim AR, Coimbra MER, Moliterno LFM. Potencial erosivo dos repositores hidroeletrólitos sobre o esmalte dentário: revisão de literatura. *Rev Bras Odontol.* 2001;58:164-8.
22. Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida spp.* *Rev Odontol UNESP.* 2010;39(3):179-84.

Recibido: 30 de abril de 2013.  
Aprobado: 8 de junio de 2013.

*Andreia Medeiros Rodrigues Cardoso.* Mestrando(a) do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, Paraíba, Brasil. Correo electrónico:andreiamedeiros29@yahoo.com.br