

RESUMO

A inibição fotodinâmica antimicrobiana (IFDa) baseia-se na ativação de uma substância fotoabsorvedora (FA) por uma fonte de luz com comprimento de onda específico gerando efetores biológicos na presença do oxigênio molecular, resultando na morte da célula. No presente estudo, avaliou-se a eficácia da IFDa utilizando o corante azul de toluidina (TBO) e o diodo emissor de luz (LED) emitindo a 630 nm, em diferentes amostras de *Trichophyton rubrum* e de *Paracoccidioides brasiliensis*. Realizaram-se curvas de morte, quantificaram-se as espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxinitrito (ONOO[•]) e óxido nítrico (NO[•]) e determinou-se o perfil de susceptibilidade de *T. rubrum* a ciclopiroxolamina e de *Paracoccidioides*, nas condições de não melanizado e melanizado, ao itraconazol e à anfotericina B. Padronizou-se um modelo murino de dermatofitose por *T. rubrum* e avaliou-se *in vivo* a aplicabilidade da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) no tratamento da doença experimental. Após a obtenção das condições ótimas da IFDa para cada espécie de fungo observamos que tais parâmetros em conjunto foram fungicidas, com redução superior a 98% do crescimento em *T. rubrum* e de 99,95% em *Paracoccidioides*. A análise das curvas de morte revelou que, de um modo geral, a IFDa reduziu de forma significativa a viabilidade das células fúngicas em menor tempo do que os tratamentos empregando os fármacos. Provavelmente essas diferenças ocorreram devido aos diferentes mecanismos de ação de cada tratamento antifúngico. A quantificação de ROS, ONOO[•] e NO[•] demonstrou que a produção desses radicais é importante na atividade fungicida da IFDa e poderia explicar a redução da viabilidade das células em menor espaço de tempo comparativamente àquele gasto pelos antifúngicos convencionais. As análises *in vivo* confirmaram a eficácia da terapia fotodinâmica em reduzir a carga fúngica sem provocar danos significativos ao tecido adjacente. Esses resultados são inovadores e sugerem a IFDa como uma ferramenta útil para o tratamento das dermatofitoses. Finalmente, nas células melanizadas de *Paracoccidioides*, observou elevação dos valores de MIC frente a drogas antifúngicas convencionais, e maior taxa de sobrevivência a IFDa, o que pode alterar a eficácia dos tratamentos.

Palavras chave: Inibição (e terapia) fotodinâmica antimicrobiana, *T. rubrum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, estresse oxidativo e nitrosativo, redução da carga fúngica.

ABSTRACT

The antimicrobial photodynamic inhibition (aPI) is a treatment that involves the use of a photosensitizer (PS) and a source of light. When this process occurs at presence of molecular oxygen different biological effectors are generated, resulting in the cell death. In the present study the effectiveness of aPI using toluidine blue (TBO) as PS and LED, 630 nm, as a source of light against a set of samples of *T. rubrum* and of *Paracoccidioides brasiliensis* was evaluated. Time kill curves were performed; production of reactive oxygen species (ROS), peroxynitrite (ONOO[•]) and nitric oxide (NO[•]) after aPI were quantified and susceptibility profiles of *Trichophyton rubrum* to ciclopiroxolamine and of *Paracoccidioides brasiliensis*, in nonmelanized and melanized conditions, to itraconazole and amphotericin B were determined. In addition, the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy to reduce the fungal burden at skin in an animal model of dermatophytosis by *T. rubrum* was evaluated. The results showed that aPI on optimized conditions was fungicidal, reducing up to 98% of *T. rubrum* and 99.95% of *Paracoccidioides* growth. The time kill curve assays showed that aPI reduced the fungal viability faster than the treatment with conventional antifungal drugs. This probably occurred because of the mechanism of action of each treatment. The generation of ROS, ONOO[•] and NO[•] during aPI was important to reduce the fungal viability. The *in vivo* analysis showed that photodynamic therapy was efficient in reducing the fungal burden in the skin without causing significant damage on the surrounding tissue. These results are pioneer and suggest that aPI could be a useful approach for the treatment of dermatophytosis. Lastly, our results showed that melanized *Paracoccidioides* cells were more resistant to antifungal treatments than nonmelanized cells, confirming previous evidences that melanin can alter the efficacy of conventional drugs and to aPI.

Key-words: Antimicrobial inhibition (or therapy) photodynamic, *T. rubrum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, oxidative and nitrosative stress, fungal burden reduction.