

**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO APÓS
APLICAÇÃO DE LEDs 410nm +- 10nm NA LEVEDURA *Malassezia Restricta*:
ESTUDO EXPERIMENTAL *IN VITRO***

***EVALUATION OF DNA FRAGMENTATION AND OXYGEN REACTIVE SPECIES
AFTER THE APPLICATION OF LEDs 410nm +- 10nm IN THE LEAD MALASSEZIA
RESTRICTA: EXPERIMENTAL IN VITRO STUDY***

Gustavo Palmeira Barreto¹, Rachel Trinchao Schneiberg Kalid Ribeiro²

1. Acadêmico do Curso de fisioterapia da EBMSP – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, ORCID: 0000-0001-7181-9759.

2. Fisioterapeuta Mestrado em Medicina e Saúde Humana (Conceito CAPES 4). Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP, Brasil, Professora Assistente da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, ORCID: 0000-0002-0555-8623

Autor para correspondência: gustavobarreto19.2@bahiana.edu.br

Resumo

Introdução: A levedura *Malassezia* está presente em grande parte dos animais de sangue quente e, no ser humano, está associada às patologias da caspa, pitíriase versicolor e dermatite seborreica. Tais dermatoses afetam não somente o físico como também a condição psicossocial do indivíduo. A fototerapia por diodos emissores de luz (LEDs) tem mostrado efeito antifúngico *in vivo* e *in vitro*, porém os mecanismos de ação mostram-se controversos e seus estudos escassos. **Objetivo:** Avaliar a liberação de espécies reativas de oxigênio após aplicação de LEDs 410nm ±10nm na levedura *Malassezia restricta*. **Material e métodos:** Trata-se de estudo experimental *in vitro*. Inicialmente foram aplicados LEDs 410 nm ± 10 nm em suspensão fúngica de *M. restricta* nas fluências de 61,13 J/cm², 91,70 J/cm² e 183,39 J/cm². O controle negativo não recebeu nenhuma intervenção e o controle positivo consistiu na adição de água oxigenada à suspensão fúngica. As amostras foram avaliadas fotometricamente quanto a produção de oxigênio singlete (1O₂). **Resultados:** O controle negativo (C-) apresentou 2.1% de fluorescência, sem liberação de ERO, o controle positivo (C+) apresentou 25,3% de fluorescência ocorrendo a liberação de ERO, a intervenção com LED nas fluências de 61,13 J/cm², 91,70 J/cm² e 183,39 J/cm² obtiveram, respectivamente, as seguintes fluorescências 1.2%, 1.6% e 2.9%, não havendo liberação relevante de ERO. **Conclusão:** Em conclusão, LEDs 410 nm ± 10 nm não induziram liberação de espécies reativas de oxigênio nas leveduras da espécie *M. restricta in vitro*.

Introdução

As espécies de *Malassezia* representam uma relevante porcentagem dos microbiomas saudáveis da pele, sendo *Malassezia restricta* e *Malassezia globosa* as espécies mais comuns na pele humana. Essas espécies estão relacionadas à ocorrência da caspa e da dermatite seborreica, impactando tanto o bem-estar físico quanto a saúde psicossocial do indivíduo. Essas condições se caracterizam pelo desconforto de prurido e descamação do couro cabeludo ou da pele. A caspa, considerada uma forma branda de dermatite seborreica, afeta cerca de metade da população mundial em algum momento de suas vidas, independentemente de gênero ou etnia.[1–3]

A proliferação da população comensal da *Malassezia* está relacionada com o aumento da atividade das glândulas sebáceas e a geração de sintomas como inflamação do couro cabeludo, irritação e descamação. Concomitante a isso, está ligada ao comprometimento da descamação dos estratos córneos.[4] Com exceção das palmas das mãos e das plantas dos pés, as glândulas sebáceas estão localizadas sobre toda a superfície da pele do corpo humano; contudo, a secreção sebácea e a população de *Malassezia* associada são maiores no couro cabeludo, face, região peitoral e costas.[2,3]

O piritionato de zinco contido em *shampoos* tem sido usado como agente antifúngico de amplo espectro em tratamentos comerciais contra a caspa por mais de 60 anos e seus efeitos inibitórios de crescimento da *Malassezia* são comprovados em estudo experimental. Os métodos baseados na cultura são necessários para o isolamento de cepas específicas e testes fenotípicos, porém, estes testes têm sensibilidade limitada para espécies fastidiosas de *Malassezia*, como *M. restricta* e *M. globosa*.[2]

As leveduras da *Malassezia* são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), e estas desempenham um papel importante na origem da dermatite seborreica e da pitiríase versicolor.[5] Foi observado que a melhora clínica dos pacientes estava associada à redução dos níveis de ERO. [6]

As ERO são moléculas que possuem um elétron livre desemparelhado, como o radical hidroxila (OH), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o oxigênio singlete (O₂) e o óxido nítrico (NO). [5,7] Esses radicais livres, especialmente o radical superóxido, podem ter efeitos citotóxicos (inibição da proliferação celular levando a morte celular ou prejuízos às células). Poucos estudos demonstram o mecanismo de ação de Leds sobre leveduras, especialmente na *M.*

restricta. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo é verificar os efeitos de LEDs 410nm \pm 10nm na função celular da levedura *Malassezia restricta*, no que tange à liberação de espécies reativas de oxigênio.

Os Diodos Emissores de Luz (LEDs) são semicondutores que conduzem uma corrente elétrica e acabam irradiando um feixe luminoso, o LED possui uma diferenciação do laser por possuir uma maior área de distribuição o que impacta em um menor tempo de tratamento. Tendo em vista os parâmetros utilizados do LED temos o: Comprimento de onda, dose (fluência), intensidade (densidade de potência), tempo de irradiação, modo contínuo ou pulsado da onda, e padrões de pulso. Concomitante a isso, a luz propagada possui um comprimento de onda que permeia do ultravioleta ao invisível e ao infravermelho que pode ir de 247 até 1300 nanômetros (nm) e com isso possui as cores mais utilizadas que são: azul (400-470 nm), verde (470-550 nm), Vermelho (630-700 nm), Infravermelho (700-1200nm). O LED possui uma energia liberada que é mensurada em miliwatts, em contrapartida o laser por exemplo, tem essa energia liberada em Watts, porém apresenta o mesmo comprimento de onda, embora os LEDs não liberam energia suficiente para causar danos aos tecidos humanos e não oferecem o mesmo risco de acidentes aos olhos que o laser. [8]

Material e Métodos

Trata-se de estudo experimental *in vitro* para avaliar o efeito antifúngico do Diodo Emissor de Luz (LED) violeta 410 nm \pm 10 nm em leveduras de *Malassezia restricta*, no que tange à liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Este estudo foi realizado no laboratório de pesquisas do Núcleo de Pesquisa e Inovação (NUPI), localizado na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador-Bahia, e no laboratório de microbiologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador-Bahia, de agosto de 2022 a maio de 2023. A pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) (AED7762). Esta pesquisa faz parte de um projeto maior, intitulado **EFEITO ANTIFÚNGICO DO LED 410nm \pm 10nm EM LEVEDURAS DA ESPÉCIE *Malassezia restricta*: ESTUDO EXPERIMENTAL.**

Equipamento LEDs 410 nm \pm 10 nm

O equipamento utilizado foi o cluster **e-light V** da marca DMC EQUIPAMENTOS LTDA® (São Carlos, Brasil), que possui um arranjo de 8 LEDs de cor violeta, com emissão de luz de 410 nm 10 nm e potência de 480 mW por emissor. O equipamento está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Registro 80030810174), Fig 1.

Um suporte modelo 3D RAISE3D-PRO2 (Irvine, CA, EUA) para as placas e para o LED foi construído especialmente para o experimento com o propósito de manter fixa a distância de 3,15cm da superfície paralela do cluster à placa de cultura. Fig 1b. A fim de se obter uniformidade de absorção da luz, a dimensão da placa de Petri utilizada foi de 60 x 15 mm. As fluências $61,13 \text{ J/cm}^2$, $91,70 \text{ J/cm}^2$ e $183,39 \text{ J/cm}^2$ foram obtidas de acordo com o tempo de exposição, 10, 15 e 30 minutos respectivamente.

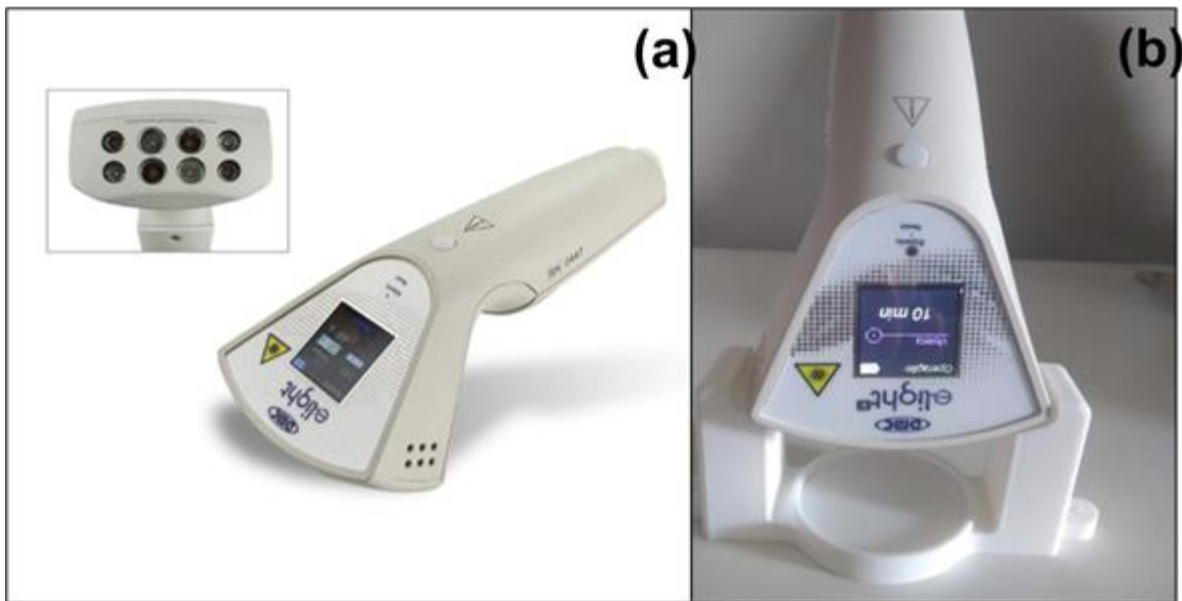


Fig 1. **a)** Equipamento Cluster de LEDs violeta e-light V (DMC, São Carlos-SP, Brasil), **b)** Detalhe mostrando a montagem do equipamento sobre a base para irradiação.

A potência do *spot* central do perfil de irradiação do *cluster* de LEDs na distância utilizada de 3,15 cm (2 W) foi medida usando um medidor de potência modelo PM200F-50 – Coherent, Santa Clara, EUA, com diâmetro do sensor de 5 cm. O valor da irradiância ou densidade de potência (102 mW/cm^2) sobre a placa de Petri irradiada com a cultura, foi calculado através de $I = P/A$, onde P é a potência média medida na região da placa e $A = 19,69 \text{ cm}^2$ correspondendo à área do sensor (diâmetro de 5 cm).

Para o cálculo da fluência foi utilizado $F (\text{J/cm}^2) = I(\text{W/cm}^2) \times t(\text{s})$, onde I é a irradiância

(W/cm^2) e t o tempo de exposição (segundos), para as exposições de 10, 15 e 30 minutos (600, 900 e 1800 s, respectivamente).

Isolados de *Malassezia restricta*

Os isolados de *M. restricta* (M001-2497) foram obtidos de pelo canino de uma fêmea de três anos de idade, semeados em meio de cultura ASD acrescido de 1% do azeite. Os isolados foram gentilmente cedidos pela Dra. Mônica Mattos dos Santos, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Cultura e expansão de isolados da *Malassezia restricta*

Inicialmente, em cabine de segurança biológica classe 2, as leveduras foram semeadas por esgotamento com ajuda de uma alça de microbiologia 10 μ L em placas de Petri estéreis de 90x15mm contendo 20 ml de meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com Cloranfenicol (NEOGEN, Lansing Michigan, Estados Unidos), acrescido de 1% de azeite de oliva extravirgem 0,50% de acidez (Gallo, Abrantes, Portugal). As placas foram em seguida incubadas em estufa Quimis® a $33\pm 2^\circ C$ por 72 horas.

Para a preparação da suspensão de uso, colônias de *M. restricta* bem delimitadas, com formato ovóide foram recuperadas das placas de Petri com alça de microbiologia 10 μ L e colocadas em um tubo de ensaio de vidro 8-mm contendo 4 ml de solução salina 0,85%. As colônias foram ressuspensas em vórtex por 30 segundos e realizada a leitura em turbidímetro DEN-1 (McFarland densitometer, BIOSAN). As suspensões foram ajustadas para a turvação de 0,5 McFarland (McF), equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, e sequencialmente diluídas até 1:1000 (10^{-3}) em triplicata. Brevemente, 1ml da solução 0,5 McF foi transferida para tubos contendo 9ml de solução salina 0,85%.

Experimento de avaliação do LED

A aplicação do LED foi realizada em cabine de segurança biológica, sobre as placas de Petri de 60 x 15mm (CRAL), contendo 5 mL da suspensão de *M. restricta* (10^{-3}). As placas foram submetidas à intervenção do LED 410 nm \pm 10 nm nas fluências de 61,13 J/cm²(T1), 91,70 J/cm²(T2) e 183,39 J/cm² (T3) por 10, 15 e 30 minutos, respectivamente. Por orientação do fabricante, a cada 10 minutos de aplicação foi realizado um intervalo de 5 minutos para o

resfriamento do aparelho. O controle negativo (C-) consistiu em 5mL da suspensão da *M. restricta* em salina que não recebeu nenhum tipo de intervenção.

Avaliação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Com o objetivo de mensurar a existência de espécies reativas de oxigênio nas amostras AS ERO são identificadas usando o canal FITC (Fluorescência) e as células identificadas pelo corante CM-H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator) são quantificadas usando o canal FSC (ângulo de dispersão frontal). As células são detectadas com um gráfico de pontos bidimensional entre o canal FSC e o canal SSC (ângulo de dispersão lateral). Uma segunda porta é gerada por um gráfico FTIC para selecionar células viáveis que são positivas para o ERO. Para mensuração das ERRO foi utilizado um corante padronizado CM-H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator) que exibe um resultado negativo se não houver espécies reativas de oxigênio e positivo caso contrário. As amostras foram lavadas com solução salina estéril e incubadas com CM-H2DCFDA (para coloração ERO) por 20 minutos no escuro em temperatura ambiente com papel alumínio. As amostras foram lavadas e colocadas em tubos de polipropileno. As células foram ressuspensas em 1 mL de diluente isotônico. Pelo menos 10.000 eventos foram registrados usando um analisador de células BD LSRFortessa™ (BD, New Jersey, EUA). As ERO foram identificadas usando o canal FITC (*Fluorescein*). Os resultados foram analisados e descritos por uma especialista da equipe da Fiocruz. O índice de fluorescência considerado foi de acordo com o protocolo de *Parent*.

Resultados

Após análise dos gráficos gerados pela fotometria, percebeu-se que no controle negativo (C-) não ocorreu liberação de ERO, e a fluorescência obtida foi de 2.1%, figura 1. A figura 2 demonstra que houve liberação de ERO no controle positivo (C+), com uma fluorescência de 23.3%.

FACSDiva Version 6.2

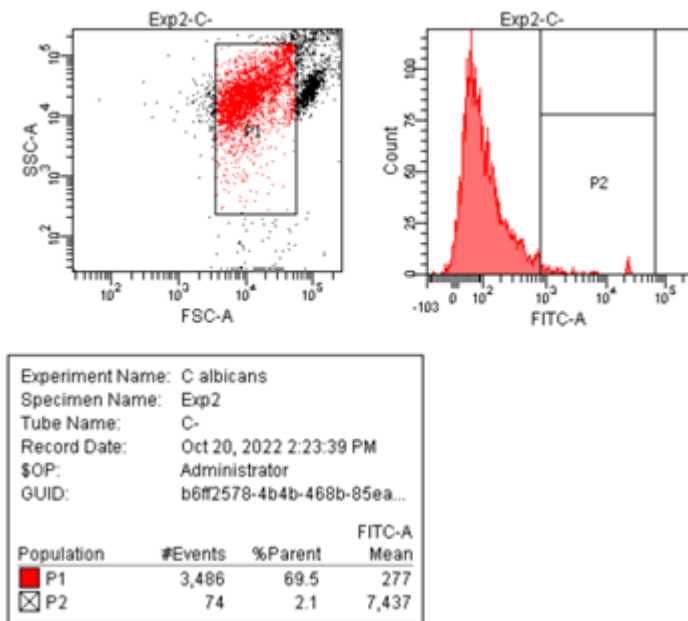


Figura 1 (Controle Negativo C-)

FACSDiva Version 6.2

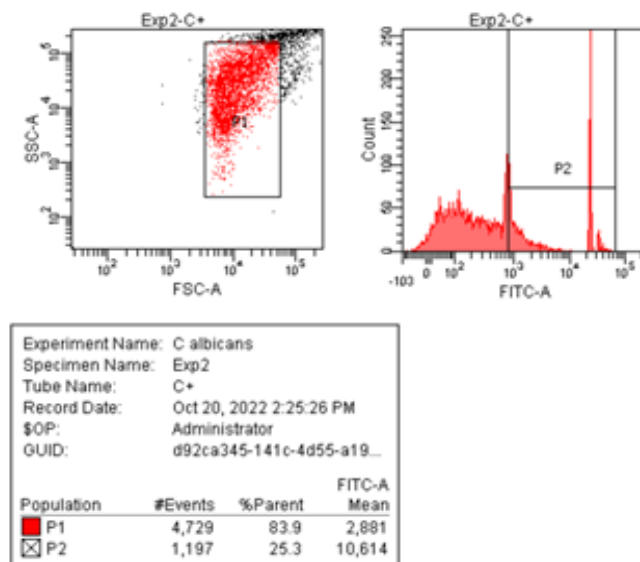


Figura 2 (Controle Positivo C+)

Não houve liberação relevante de ERO nas amostras submetidas aos Leds. As fluorescências obtidas foram de 1.2% sob a fluência de 61,13 J/cm², 1.6% sob a fluência de 91,70J/cm² e , 2.9% sob a fluência de 183,39 J/cm². As figuras 3, 4 e 5 demonstram a liberação de ERO pela *M. Restricta* após aplicação de Leds 410 nm +- 10nm.

FACSDiva Version 6.2

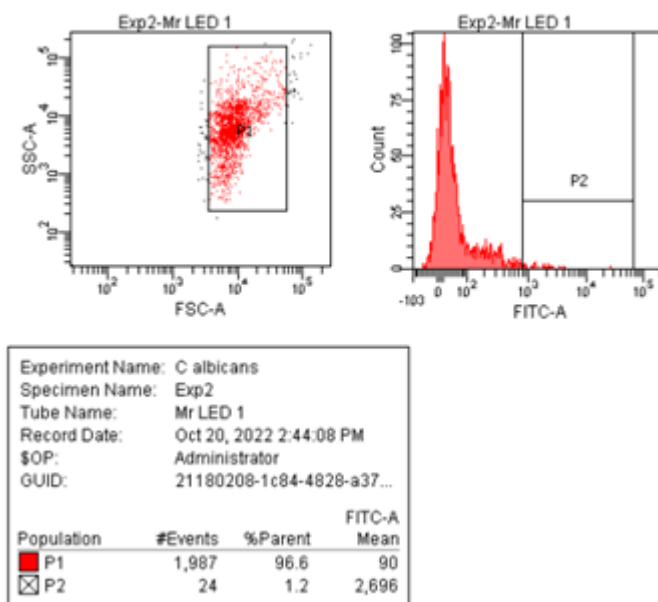


Figura 3 (Intervenção com LED 1 – 10 min)

FACSDiva Version 6.2

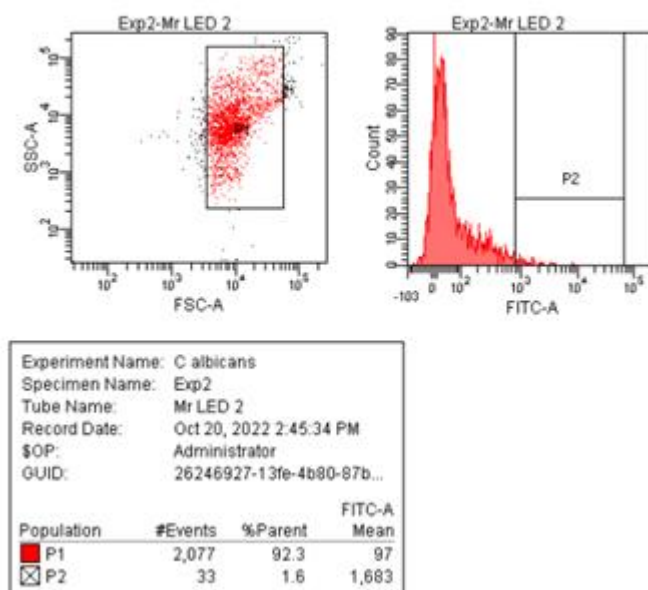


Figura 4 (Intervenção com LED 2 – 15 min)

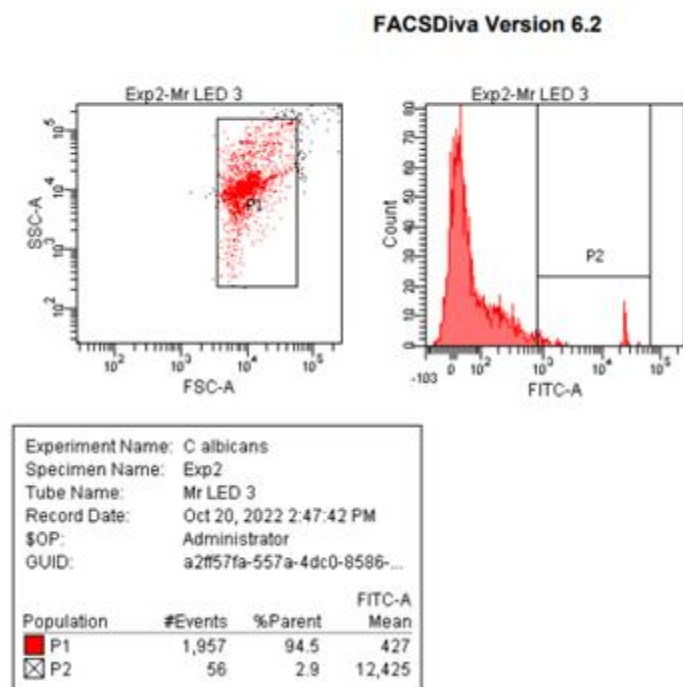


Figura 5 (Intervenção com LED 3 – 30 min)

Discussão

Este estudo demonstrou que LEDs 410nm +- 10 nm nas fluências 61,13 J/cm², 91,70J/cm² 183,39 J/cm² não produzem porcentagem relevante de liberação de ERO pela *M. restricta*. Leds com comprimentos de onda específicos tem efeitos inibidores sobre o crescimento de leveduras de *Malassezia*, estudos relataram o importante papel da *Malassezia* nas doenças cutâneas e a diminuição do número dessas colônias resultou na melhoria das doenças.[6,9] O tratamento com dispositivo LED é referido pela segurança e facilidade de manuseio, em comparação com os medicamentos antifúngicos e melhor referenciado que *shampoo* anticaspa. A luz LED é amplamente utilizada para fins cosméticos ou para o tratamento de doenças cutâneas e vasculares, além da atuação dos LEDs com comprimentos de onda de luz visível também possuem atividade antibacteriana e efeitos anti-inflamatórios que produzem uma grande quantidade de enzimas como lipases e fosfolipases gerando respostas inflamatórias ao liberar ácidos graxos livres insaturados dos lipídios sebáceos.[10]

Neste estudo, foi visto que o LED demonstrou um efeito antifúngico contra a levedura *Malassezia*, contudo, ocorreu que a luz LED com 410+-10nm de comprimento de onda

demonstra que o mecanismo de morte não ocorre devido a liberação das ERO, embora existiu alteração do número de colônias com a aplicação do LED.

O estudo de *Wi et al. 2012*, é possível observar que ocorreu a liberação de ERO onde foi aplicado luz LED com 392,5+-1 nm de comprimento de onda induziu o aumento da produção intra e extracelular de ERO além de ser o único comprimento de onda que suprimiu o crescimento das leveduras *Malassezia* junto ao 380 nm+-2 nm, estes resultados sugerem que a produção de ERO pode desempenhar um papel em os efeitos antifúngicos do LED contra a levedura *Malassezia*. A exposição à luz UV desencadeia a apoptose celular por meio de danos no DNA e destruição celular, que incluem danos genotóxicos (a capacidade de realizar alterações no material genético a elas expostos) e o acúmulo de ERO.[6]

A liberação de ERO foi avaliada em outras espécies de fungos após aplicação do LED. Estudo de *Tsutsumi-Arai et al. 2022*, identificou a produção de ERO pelas espécies da *C. albicans* e *S. mutans* após aplicação da luz LED azul de 405 nm por 40 minutos. Demonstrou que tais resultados sugerem que as ERO foram produzidas pela reação de porfirinas com luz LED azul de 405 nm, induzindo a morte celular.[11] Já *Baltazar et al. 2013*, analisou a produção de ERO após a aplicação combinada de LED vermelho (630 nm +-10 nm) e Toluidina Azul (TA). Enquanto a aplicação isolada de cada um não inibiu o crescimento fúngico, a combinação do LED vermelho e TA resultou em uma redução efetiva no número de colônias. Concluiu-se que a morte celular ocorreu devido à irradiação da luz, desencadeando uma reação fotoquímica que resulta na produção de ERO, principalmente oxigênio singlete (O₂). Essas espécies de ERO reagem com vários componentes celulares, causando danos por peroxidação lipídica, ruptura de proteínas estruturais, enzimas e ácidos nucleicos.[12] Referente às limitações do estudo são decorrentes de não possuir os dados da microscopia eletrônica quanto alguma alteração da estrutura celular e não existir informações sobre a causa da morte das células, sendo necessário mais estudos e experimentos na área explorando a causa da morte celular das amostras.

Conclusão

No presente estudo no comprimento de onda de 410 nm +-10nm *in vitro* houve diminuição das colônias, porém não foi possível observar a participação das ERO na diminuição da *Malassezia* devido a não liberação das ERO. Em conclusão, LEDs 410 nm ± 10 nm não induziram liberação de espécies reativas de oxigênio nas leveduras da espécie *M. restricta in vitro*.

Referências

- [1] Park M, Cho Y-J, Lee YW, Jung WH. Genomic Multiplication and Drug Efflux Influence Ketoconazole Resistance in. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:191.
- [2] Leong C, Wang J, Toi MJ, Lam YI, Goh JP, Lee SM, et al. Effect of zinc pyrithione shampoo treatment on skin commensal *Malassezia*. *Med Mycol* 2021;59:210–3.
- [3] Yamauchi PS. *Biologic and Systemic Agents in Dermatology*. Springer; 2018.
- [4] Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:785–98.
- [5] Später S, Hipler U-C, Haustein U-F, Nenoff P. [Generation of reactive oxygen species in vitro by *Malassezia* yeasts]. *Hautarzt* 2009;60:122–7.
- [6] Wi HS, Na EY, Yun SJ, Lee J-B. The antifungal effect of light emitting diode on *Malassezia* yeasts. *J Dermatol Sci* 2012;67:3–8.
- [7] Yang B, Chen Y, Shi J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem Rev* 2019;119:4881–985.
- [8] Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 2008;27:227–38.
- [9] Kurniadi I, Hendra Wijaya W, Timotius KH. *Malassezia* virulence factors and their role in dermatological disorders. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2022;31:65–70.
- [10] Prohic A, Jovovic Sadikovic T, Krupalija-Fazlic M, Kuskunovic-Vlahovljak S. *Malassezia* species in healthy skin and in dermatological conditions. *Int J Dermatol* 2016;55:494–504.
- [11] Tsutsumi-Arai C, Arai Y, Terada-Ito C, Imamura T, Tatehara S, Ide S, et al. Microbicidal effect of 405-nm blue LED light on *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* dual-species biofilms on denture base resin. *Lasers Med Sci* 2022;37:857–66.
- [12] Baltazar L de M, Soares BM, Carneiro HCS, Avila TV, Gouveia LF, Souza DG, et al. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: in vitro activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:354–61.