

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/07/2019.



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



GABRIELA CAROLINE ALONSO

**AVALIAÇÃO, DESENHO E PADRONIZAÇÃO DE *PRIMERS* PARA GENES DE
VIRULÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* E SUA EXPRESSÃO EM ISOLADOS
CLÍNICOS SUBMETIDOS À TERAPIAS ANTIFÚNGICAS**

Araraquara

2017



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



GABRIELA CAROLINE ALONSO

**AVALIAÇÃO, DESENHO E PADRONIZAÇÃO DE *PRIMERS* PARA GENES DE
VIRULÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* E SUA EXPRESSÃO EM ISOLADOS
CLÍNICOS SUBMETIDOS À TERAPIAS ANTIFÚNGICAS**

**Dissertação apresentada no Programa de Pós
Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese,
da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para obtenção do
título de Mestre em Reabilitação Oral.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marlise Inêz Klein

Araraquara

2017

Alonso, Gabriela Caroline

Avaliação, desenho e padronização de primers para genes de virulência de *Candida albicans* e sua expressão em isolados clínicos submetidos à terapias antifúngicas / Gabriela Caroline Alonso. -- Araraquara: [s.n.], 2017

141 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Co-orientadora: Dra. Marlise Inês Klein

1. *Candida albicans* 2. Biofilmes 3. Fotoquimioterapia
4. Expressão gênica 5. Fatores de virulência I. Título

GABRIELA CAROLINE ALONSO

**AVALIAÇÃO, DESENHO E PADRONIZAÇÃO DE *PRIMERS* PARA GENES DE
VIRULÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* E SUA EXPRESSÃO EM ISOLADOS
CLÍNICOS SUBMETIDOS À TERAPIAS ANTIFÚNGICAS**

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Comissão Julgadora

Presidente e orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Profº Drº Paulo Tambasco de Oliveira

3º Examinador: Profº Drº Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara, 07 de julho de 2017

Dados Curriculares

GABRIELA CAROLINE ALONSO

Nascimento: 09/02/1992 – Franca, São Paulo

Filiação: Fábio José Silva Alonso
Sônia Aparecida Carreira Alonso

- 2010 – 2014:** Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2010 – 2014:** Estágio de Iniciação Científica no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2013 – 2014:** Representante Discente Titular junto ao Conselho do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2013 – 2014:** Intercâmbio realizado na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Portugal, através de Bolsa Mérito Acadêmico pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2014 – 2014:** Aluna Monitora no departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2015 – 2016:** Estágio de Docência nas disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista Júlio Mesquita Filho.
- 2015 – 2017:** Curso de Mestrado em Reabilitação Oral com ênfase em Prótese pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Agradecimentos

*Agradeço primeiramente a **Deus** pela oportunidade e bênçãos para que esse trabalho fosse realizado e por ter colocado pessoas maravilhosas confortando minha caminhada.*

*Aos meus pais **Fábio e Sônia**, meu eterno agradecimento por dedicarem suas vidas a mim e a meu irmão, pelo amor incondicional, apoio e incentivo, que com certeza foram e são essenciais para essa caminhada. Obrigada por serem meus melhores exemplos. Todas as batalhas vencidas também são méritos de vocês. Amo vocês!*

*Ao meu irmão **Fábio Henrique**, pelo cuidado, amor, carinho e apoio durante toda a minha caminhada. Amo você!*

*Aos meus **Avós, Tios e Primos** minha eterna gratidão pela confiança, apoio e força que me fortaleceram nessa jornada.*

*Agradeço imensamente a minha orientadora, **Profª Drª Ana Cláudia Pavarina** por aceitar me orientar no curso de mestrado nesta instituição de ensino, por todas as oportunidades oferecidas, confiança, orientação, apoio e ensinamentos. Agradeço de coração o cuidado e carinho que teve comigo nesta jornada.*

*Agradeço a **Profª Drª Marlise Inêz Klein** pela paciência e dedicação neste trabalho, os quais foram essenciais para o seu desenvolvimento. Obrigada pelos inúmeros conhecimentos transmitidos e por permitir meu crescimento acadêmico e pessoal estando comigo desde o início desta jornada. Agradeço também todo o carinho e amizade.*

*Aos professores da disciplina de Prótese Parcial Removível, **Profª Drª Janaína Habib Jorge** e **Profº Drº Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, por todo apoio, ensinamentos e valiosa contribuição para minha formação profissional.*

*Agradeço aos demais **professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese** pelos ensinamentos durante o curso, os quais foram essenciais para a minha formação profissional.*

*Agradeço à amiga **Fernanda Alves** por todos os momentos vividos, pelas conversas, pelo apoio e pela disposição em me ensinar desde o início. Obrigada pela convivência e amizade! Sem sua ajuda, calma e ânimo a jornada seria muito mais difícil. Muito obrigada!*

À amiga **Juliana Cabrini**, obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos e contribuições ao longo dessa jornada. Obrigada também pela ajuda com a realização da estatística. Sem sua experiência e calma a jornada teria sido mais árdua. Muito obrigada!

Às amigas **Beatriz Panariello e Lívia Jacovassi**, obrigada pela amizade e apoio tanto dentro quanto fora da faculdade, durante todo o curso de mestrado.

Ao amigo **Elkin**, obrigada pelo companheirismo, amizade e apoio na execução deste trabalho no Laboratório de Biologia Molecular.

Aos amigos companheiros da pós-graduação **Guilherme Rocha, Bruna Pimentel, Kássia Dias, Jefferson Trigo, Vinícius Sakima, Isabel, Midian Castillo, Carmelia Lobo, Jacqueline Zoccolotti, Jéssica Bernegossi, Camila de Foggi, Larissa Miotto e Priscila Scavassin**, obrigada pela amizade e convívio.

Aos amigos **Mariana Amaral, Bruna Moura, Marina Intatilo, Bianca Hitos, Tháila Cruz e Vinícius Krieger** pela força, apoio, companheirismo e amizade que foram essenciais durante este período.

Agradeço também às técnicas dos laboratórios **Geisiane Bueno, Luana Sales e Lígia Sabino** pela ajuda com a execução da metodologia e pela amizade durante esta jornada.

À **Prof.^a Dr.^a Lívia Dovigo**, obrigada pela ajuda na execução da estatística.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP)** por abrir as portas para meu conhecimento, proporcionando ótima estrutura para realização do curso de pós-graduação, bem como para a realização deste trabalho, contribuindo para minha formação profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral**, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr/UNESP, por toda acessibilidade durante este período.

Agradeço aos **funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, pelo convívio, amizade e carinho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de Mestrado concedida no período de março/2015 a setembro/2015 e à **Fundação de**

Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2015/13409-0) pela bolsa de Mestrado concedida no período de outubro/2015 a fevereiro/2017.

Agradeço ao CEPID (Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão) (2013/07276-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (305391/2012-7) pelo auxílio financeiro concedido a este trabalho.

Alonso GC. Avaliação, desenho e padronização de *primers* para genes de virulência de *Candida albicans* e sua expressão em isolados clínicos submetidos à terapias antifúngicas. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

Este estudo avaliou longitudinalmente a expressão de genes de virulência de isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes com candidose oral tratados com Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) ou Nistatina (NIS). Inicialmente, a especificidade de *primers* da literatura e novos *primers* desenhados para os genes de virulência de *C. albicans* ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1, SAP4, SOD1, SOD5 e ACT1 (gene de controle) foi avaliada através de análises *in silico* e *in vitro*. Para a análise *in silico*, foi realizada uma busca no *Pubmed* por artigos com sequências de *primers* que avaliaram a expressão gênica de *C. albicans*. Em seguida, a homologia dos *primers* foi analisada (*BLAST* e *ClustalW2*) assim como a presença de estruturas secundárias (*Mfold*). Novos *primers* foram desenhados (*Beacon Designer™*) a partir de sequências obtidas do "*Candida Genome Database*". Os *primers* foram sintetizados e testados *in vitro* pela técnica de PCR utilizando um painel de DNA genômico de diferentes espécies de *Candida*, com seus produtos visualizados em gel de agarose. Reações de qPCR foram realizadas para determinar a concentração ótima e a eficiência dos *primers*. Para a análise da expressão gênica, os pacientes foram submetidos à aPDT [6 sessões com aplicações do fotossensibilizador *Photoditazine™* (200 mg/mL) no palato e na prótese por 20 minutos com posterior aplicação de luz LED (660 nm – 50 J/cm²)] ou submetidos ao tratamento convencional [bochechos de um minuto com 1 mL da solução de Nistatina (100.000 UI/mL) quatro vezes ao dia durante 15 dias]. Coletas microbiológicas foram realizadas nos tempos Inicial (sem tratamento), Final (pós-tratamento) e 60 dias após o início do tratamento. As amostras foram plaqueadas em meio *CHROMagar* e as colônias (*C. albicans*) foram submetidas à extração e purificação do RNA. O cDNA foi sintetizado e a técnica de RT-qPCR realizada. Os dados da expressão foram analisados por Análise de Variância para Medidas Repetidas Mista ($\alpha = 0,05$). Os *primers* da literatura para os genes SAP1 e HWP1 foram específicos para *C. albicans* enquanto o gene SOD1 reagiu com *C. albicans* e *Candida dubliniensis*. Os *primers* delineados para os genes ACT1, ALS1 e HWP1 foram detectados apenas em *C. albicans*, enquanto os *primers* para os genes CAP1, CAT1, EFG1, LIP3 e PLB1 foram detectados em *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Todos os *primers* apresentaram *Melt Curves* ideais, coeficiente

de correlação $\cong 1$ e eficiência entre 90-110%, com *slope* $\cong -3.3$. Os dados mostraram que a expressão gênica do gene CAT1 foi superior na coleta final em relação à coleta inicial para ambos os grupos ($p = 0,041$). A expressão do gene LIP3 foi reduzida significativamente da coleta inicial para a final, independente do tratamento ($p = 0,039$). O gene SOD1 teve sua expressão diminuída entre as coletas, independente do tratamento ($p = 0,021$). A expressão dos genes PLB1 e ACT1 foi maior no grupo aPDT, independente das coletas ($p < 0,01$ e $p = 0,046$, respectivamente). Para os genes ALS1, CAP1, EFG1, HWP1 e SAP1 não houve diferença estatística entre as coletas independente do tratamento, os quais não influenciaram a expressão de tais genes ($p > 0,05$). Portanto, os dados mostram que os *primers* estão padronizados para análises de expressão gênica a partir de amostras clínicas e não ocorreram diferenças significativas na expressão dos genes de virulência de isolados clínicos de *C. albicans* de pacientes tratados com aPDT quando comparados com os tratados com NIS, exceto para os genes PLB1 e ACT1.

Palavras chave: *Candida albicans*, Biofilmes, Fotoquimioterapia, Expressão gênica; Fatores de virulência.

Alonso GC. Evaluation, design and standardization of primers for *Candida albicans* virulence genes and their expression in clinical isolates submitted to antifungal therapies. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

This study evaluated longitudinally the expression of *Candida albicans* virulence genes on clinical isolates from patients with oral candidiasis treated with Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) or Nystatin (NIS). First, specificity of primers from the literature and newly designed primers for *C. albicans* virulence genes ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1, SAP4, SOD1, SOD5 and ACT1 (control gene) was evaluated through in silico and in vitro analyzes. For in silico analysis, a Pubmed search was performed for studies with primer sequences that evaluated gene expression of *C. albicans*. Then, the homology of these primers was checked (*BLAST* and *ClustalW2*) as well as the presence of secondary structures (*Mfold*). New primers were designed (*Beacon Designer*[™]) from sequences obtained from the "*Candida Genome Database*". The primers were synthesized and tested in vitro by PCR using a panel of genomic DNA from different *Candida* species, with their products visualized on agarose gel. qPCR reactions were performed to determine primers' optimal concentration and efficiency. For gene expression analysis, patients were submitted to aPDT (6 sessions with applications of *Photoditazine*[™] photosensitizer (200 mg/mL) on the palate and dentures for 20 minutes with subsequent application of LED (660 nm - 50 J / cm²)] or conventional treatment [1 minute mouthwash with 1 mL of Nystatin solution (100.000 UI/ mL) four times a day for 15 days]. Microbiological cultures were taken at the initial (before treatment), final (post-treatment) and 60 days after treatment initiation. The samples were plated in *CHROMagar* medium and the colonies (*C. albicans*) were submitted to RNA extraction and purification. The cDNA was synthesized and RT-qPCR technique was performed. Expression data were analyzed by Analysis of Variance for Mixed Repeated Measures ($\alpha = 0.05$). The literature primers for the SAP1 and HWP1 genes were specific for *C. albicans* while the SOD1 gene reacted with *C. albicans* and *Candida dubliniensis*. The designed primers for ACT1, ALS1 and HWP1 genes were detected only in *C. albicans*, while the primers for CAP1, CAT1, EFG1, LIP3 and PLB1 genes were detected in *C. albicans* and *C. dubliniensis*. All primers presented ideal Melt Curves, correlation coefficient of $\cong 1$ and efficiency between 90-110%, with slope $\cong -3.3$. The data showed that the gene expression of CAT1 gene was higher in the final culture compared to the initial culture for both groups ($p = 0,041$).

Expression of the LIP3 gene was significantly reduced from initial to final culture, regardless of treatment ($p = 0,039$). The SOD1 gene had its expression decreased between the cultures, regardless of the treatment ($p = 0,021$). The PLB1 and ACT1 genes expression was higher in the aPDT group, independent of the cultures ($p < 0,01$ and $p = 0,046$, respectively). For the ALS1, CAP1, EFG1, HWP1 and SAP1 genes, there was no statistical difference between the cultures, independent of the treatment, which did not influenced the expression of such genes ($p > 0,05$). Therefore, the data show that the primers are standardized for gene expression analyzes from clinical samples and there are no significant differences on virulence gene expression of clinical isolates of *C. albicans* from patients treated with aPDT when compared to those treated with NIS, except for PLB1 and ACT1 genes.

Keywords: *Candida albicans*, Biofilms, Photochemotherapy, Gene expression, Virulence factors.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Infecções Causadas por Espécies de <i>Candida</i>	18
2.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	24
2.3 Técnica de qPCR e Delineamento de <i>Primers</i>	31
2.4 Expressão Gênica dos Fatores de Virulência de <i>C. albicans</i>	33
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODO	48
4.1 Estudo 1: Análise e Padronização de <i>Primers</i> para Utilização na Técnica de RT - qPCR.....	48
4.1.1 Análise in silico dos <i>primers</i>	48
4.1.2 Extração de DNA para padronização dos <i>primers</i>	52
4.1.3 Padronização dos <i>primers</i>	55
4.2 Estudo 2: Expressão Gênica dos Genes de Virulência em Isolados Clínicos de Pacientes Submetidos à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e Nistatina.....	62
4.2.1 Preparo das amostras.....	62
4.2.2 Análise da expressão gênica.....	66
4.3 Análise Estatística.....	72
5 RESULTADO	73
5.1 Estudo 1: Análise e Padronização de <i>Primers</i> para Utilização na Técnica de RT - qPCR.....	73
5.1.1 Análise in silico – <i>Primers</i> da literatura.....	73
5.1.2 Análise in silico - <i>Primers</i> delineados	82
5.1.3 Justificativa para a escolha dos <i>primers</i>	86
5.1.2 Análise in vitro para padronização dos <i>primers</i> desenhados e da literatura	88

5.2 Estudo 2: Análise da Expressão Gênica em Isolados Clínicos de Pacientes	
Submetidos à aPDT ou NIS.	102
5.2.1 Análise da expressão gênica.....	102
6 DISCUSSÃO	119
7 CONCLUSÃO.....	129
REFERÊNCIAS	130
APÊNDICE.....	136
ANEXO.....	141

1 INTRODUÇÃO

A infecção de tecidos moles da cavidade bucal por *Candida* spp., denominada candidose bucal, é a infecção fúngica mais frequente entre humanos^{1,72}. *Candida albicans* é considerada a espécie mais prevalente e patogênica^{1,43,72}. Alguns fatores predisponentes podem acentuar a susceptibilidade do hospedeiro à infecção, tais como próteses mal ajustadas, uso de antibióticos de amplo espectro e imunossupressores, terapias antineoplásicas e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)^{71,76}.

A capacidade das diferentes espécies de *Candida* em desenvolver infecção nos seres humanos parece ser mediada por diversos fatores de virulência, os quais podem ser entendidos como as características ou produtos microbianos que possibilitam a interação com as células do hospedeiro causando algum tipo de dano^{34,76}. Os principais fatores de virulência identificados nas espécies de *Candida* são: adesão e formação de biofilme em tecidos humanos e superfícies abióticas^{15,69}; e a produção de enzimas hidrolíticas com capacidade de destruição tecidual⁷⁶.

Os biofilmes são comunidades de microrganismos aderidos a uma superfície, organizados em camadas de células e envoltos em uma matriz polimérica extracelular²⁸. A presença dessa matriz e a organização em camadas celulares têm sido sugeridas como fatores contribuintes para a resistência dos biofilmes frente aos antifúngicos, pois limitam a penetração das drogas e protegem as células da resposta imunológica do hospedeiro⁷⁶. Dessa forma, a adesão inicial das células de *Candida* aos tecidos ou outras superfícies abióticas, a posterior divisão e proliferação celular e a subsequente formação de biofilme apresentada pelas espécies de *Candida* estão diretamente relacionadas à virulência destes microrganismos e à sua capacidade de causar infecções²⁷.

A capacidade de adesão das células de *Candida* ao hospedeiro, crucial na etapa de formação do biofilme, parece ser mediada por diversas propriedades da parede celular como: hidrofobicidade da parede celular; composição da mesma e sua carga molecular; e morfologia do fungo²⁷. O gene ALS1 é responsável por codificar a proteína de adesão celular: adesina²⁸. Ainda, este fungo possui a habilidade de adaptação às alterações no pH do ambiente, flexibilidade metabólica e resposta ao estresse oxidativo. A resposta ao estresse oxidativo parece ser vital para a sobrevivência de *C. albicans*, uma vez que esse dano causa a morte celular²¹. Como proteção e em resposta ao estresse oxidativo, este fungo expressa genes antioxidantes, entre eles CAP1, CAT1 e SOD1 que ativam vias que auxiliam na proteção

contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*)^{21,26,40,46,83}.

Além desses fatores, o gene EFG1 regula a transcrição de genes responsáveis pela formação do biofilme³⁵. A formação de hifas, mediada pelo gene HWP1, facilita a adesão e invasão do fungo no tecido do hospedeiro⁷⁷. A habilidade de *C. albicans* em formar hifa auxilia este fungo a invadir o substrato em que está aderido, transformando-o em sua forma mais invasiva. Além disso, a forma alongada da hifa ajuda na translocação direcional de *Candida* no hospedeiro, na consolidação da colônia, na aquisição de nutrientes e na formação de matrizes tri-dimensionais⁷⁹. As lipases são enzimas que degradam lipídeos e são codificadas por vários genes, entre eles os LIP3, que permite o crescimento deste fungo em lipídios, que são importantes fontes de carbono³⁶ o qual auxilia o crescimento do biofilme na mucosa⁶⁰.

Por fim, a secreção de enzimas degradativas como as fosfolipases (por exemplo, PLB1)⁴⁴ e as proteinases (por exemplo, SAP1)⁵⁹ desempenha um papel importante na infecção por *Candida* spp., uma vez que são capazes de hidrolisar importantes constituintes da membrana citoplasmática da célula hospedeira, como por exemplo, fosfolipídios e proteínas. Esse processo resulta na ruptura da membrana celular pelo microrganismo, permitindo a invasão do fungo nos tecidos do hospedeiro⁷⁰ o que causa o aumento da virulência.

Visto os diversos mecanismos que o fungo se dispõe para contornar os tratamentos contra a candidose, pode-se observar que *C. albicans* possui uma ampla gama de ferramentas biológicas que permitem a invasão deste fungo no tecido do hospedeiro, garantindo sua sobrevivência no meio bucal, a formação de biofilme e sua proteção contra a imunidade do hospedeiro e as terapias antifúngicas convencionais.

Os tratamentos direcionados à candidose bucal consistem na utilização de terapia antifúngica tópica⁶ (polienos e os azóis), medicação antifúngica sistêmica⁹ (anfotericina B, itraconazol e equinocandinas) e procedimentos de higienização e desinfecção das próteses⁶. Embora esses medicamentos se mostrem eficazes no alívio dos sinais e sintomas clínicos da infecção associada a *Candida* spp., na maioria das vezes, não eliminam totalmente os microrganismos^{43,64}. Além disso, a saliva e movimentos da musculatura bucal agem como agentes diluentes, os quais podem reduzir a dose do medicamento deixando-os em concentrações subterapêuticas^{5,47}. Deste modo, há uma frequente re-colonização da mucosa bucal pelos microrganismos após o tratamento, o que leva a infecções recorrentes⁴⁹. A terapia antifúngica sistêmica é usualmente prescrita a pacientes com saúde geral comprometida e nos

episódios de infecções recorrentes⁶⁵. No entanto, a utilização destes medicamentos pode promover o desenvolvimento de hepatotoxicidade e resistência antifúngica⁷².

Diante dos problemas associados à capacidade das espécies de *Candida* em desenvolver infecção, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês “*Antimicrobial Photodynamic Therapy*” - aPDT) tem sido sugerida como um método alternativo na inativação de *Candida* spp. e para o tratamento de infecções fúngicas superficiais^{25,31,81}. Com resultados positivos, essa terapia tem sido muito estudada no tratamento das infecções fúngicas bem como no tratamento do câncer⁴. Em linhas gerais, o processo fotodinâmico demanda a utilização de um agente fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e a presença de oxigênio^{22,41}. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz de comprimento de onda adequado com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies ROS capazes de induzir a inativação celular⁸. Tem sido sugerido que esse mecanismo envolve a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, o que leva seus elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o FS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de espécies ROS⁸. Ambos os caminhos podem levar à morte celular.

Diferentes tipos de FSs de primeira geração foram utilizados em estudos anteriores, incluindo as porfirinas^{7,25}. Atualmente, os FSs de segunda geração têm sido avaliados^{17,45,78} e entre esses compostos estão as clorinas, que são FSs que apresentam forte banda de absorção na região vermelha do espectro fotomagnético. O Photodithazine[®] (PDZ), derivado de uma clorina e6, é extraído da cianobactéria *Spirulina platensis* - e apresenta alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete¹⁸. Em estudos preliminares in vivo, Carmello et al.¹² em 2015, demonstraram que a associação do PDZ (100 mg/L) e luz LED (aPDT) foi eficaz na inativação do fungo após uma aplicação da terapia, a qual reduziu 4,36 log₁₀ de *C. albicans* presente em lesões induzidas em língua de camundongo. A aPDT foi caracterizada como eficaz na inativação de *C. albicans* sem causar qualquer efeito nocivo sobre os tecidos do hospedeiro¹². Outro estudo conduzido por Carmello et al.¹¹ (2016) demonstrou a efetividade da aPDT mediada pelo PDZ no tratamento de candidose induzida em língua de camundongo. Neste estudo os autores observaram que aplicações sucessivas da aPDT e NIS promoveu redução de 3 e 3,2 logs₁₀, respectivamente, 24h após o tratamento. Os animais

submetidos a aPDT também apresentaram remissão completa das lesões orais, enquanto que os animais tratados com Nistatina apresentaram remissão parcial de lesões orais em ambos os períodos avaliados. Adicionalmente, a aPDT induziu a expressão de TNF- α quando comparado com o controle (sem FS e sem luz) 24 h e 7 dias após o tratamento¹¹.

Segundo a literatura, alguns estudos indicam que a aPDT pode diminuir a biomassa de biofilmes^{24,32}. Já foi mostrado que, embora biofilmes microbianos não tenham sido completamente inativados pela aPDT, esta ocasionou a remoção das camadas celulares mais externas dos biofilmes⁴⁸. Este mecanismo de ação sugere que sucessivas aplicações de aPDT podem tornar o biofilme mais susceptível às terapias antifúngicas convencionais. Porém, os efeitos que as aplicações de aPDT podem causar aos genes responsáveis pela expressão de fatores de virulência de *C. albicans* ainda não foram avaliados.

Muitas técnicas têm sido utilizadas para caracterizar os principais fatores de virulência responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento da infecção no hospedeiro. Entre elas, está a técnica de qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) que vem sendo promissora para quantificação da expressão de genes envolvidos em determinado processo.

A técnica de PCR foi desenvolvida por Kary Mullis e co-autores na década de 80, descoberta que proporcionou à Kary Mullis o Prêmio Nobel em Química no ano de 1993⁴². RT-PCR é uma técnica de transcrição reversa em que RNA é transformado em cDNA. Esse cDNA pode ser utilizado para quantificação da transcrição de genes de interesse por método de PCR quantitativo (qPCR). Esta técnica tem sido muito utilizada na biologia molecular por sua eficácia, especificidade e fidelidade¹⁴ uma vez que quantifica e não apenas avalia qualitativamente a expressão gênica, o que faz do qPCR o método de escolha em biologia molecular. Entretanto, dentre os critérios que devem ser tomados para que o ensaio de qPCR seja adequadamente realizado, destaca-se a obtenção de um anelamento específico dos *primers*¹⁰. Os *primers* são sequências de ácidos nucléicos que agem como iniciadores da reação, tendo como característica ideal o anelamento em uma região única do DNA molde (do genoma) a ser estudado para que não haja reação cruzada com outras espécies ou outros genes da espécie em estudo.

Para isto, a reação de qPCR requer um par de *primers*, constituído por *Forward* (F) e o *Reverse* (R). Estes são um fator crítico e devem apresentar sequências específicas para que ocorra uma amplificação fidedigna do DNA alvo^{76,84}. A análise da especificidade dos *primers* para os genes a serem estudados é de extrema importância uma vez que sendo específicos, garantem especificidade e fidelidade a técnica. Para isso, *primers* com boas características são

essenciais para resultados confiáveis, fundamentados, e sensíveis à expressão gênica. Essa análise da especificidade dos *primers* muitas vezes é desconhecida, diminuindo assim a sensibilidade e fidelidade dos resultados⁸⁵. Em consequência da negligência dessa análise, os *primers* podem quantificar a expressão de outros genes que não são os do objetivo do estudo, além de outras espécies de microrganismos, alterando assim a viabilidade dos resultados, principalmente quando as amostras provêm de pacientes, nas quais podemos encontrar variações de uma mesma espécie.

Adicionalmente, os parâmetros a serem considerados para o desenho de um *primer* promissor para qPCR são: tamanho do *primer* (entre 18-24bp)^{10,80}; temperatura de anelamento (Tm) que devem estar entre 52-58°C¹⁰; ausência de estruturas secundárias (*hairpin*, *cross dimer*)^{67,80}; e porcentagem de pares de bases G (guanina) e C (citosina) entre 40-60%^{10,67}. Além da padronização dos *primers* para sua utilização em ensaios clínicos, avaliar a expressão fidedigna dos genes de virulência de micro-organismo responsável por infecção em pacientes submetidos a duas terapias distintas, uma convencional (Nistatina) e outra em estudo (aPDT), é de grande importância. A análise da expressão dos genes de virulência pode esclarecer os efeitos da terapia em estudo no tratamento das infecções fúngicas, tais como candidose oral, elucidando seus efeitos nos micro-organismos responsáveis pela infecção, como por exemplo a diminuição da virulência e redução da patogenicidade.

7 CONCLUSÃO

Perante os resultados apresentados podemos concluir que:

- ✓ Os *primers* da literatura para os genes SAP1 e HWP1 foram específicos para *C. albicans* através dos testes de PCR;
- ✓ Os *primers* desenhados (via *Beacon Designer*TM) para os genes ACT1, ALS1 e HWP1 foram detectados apenas em espécies *C. albicans* confirmando sua especificidade;
- ✓ Os *primers* desenhados para os genes CAP1, CAT1, EFG1, LIP3, PLB1 e o *primer* da literatura para o gene SOD1 mostraram detecção em *C. albicans* e *C. dubliniensis*;
- ✓ Adicionalmente, conclui-se que três *primers* da literatura e oito *primers* desenhados estão padronizados e são específicos para *C. albicans/C. dubliniensis*, podendo ser usados com confiança em estudos clínicos para análise da expressão gênica;
- ✓ O gene LIP3 apresentou redução significativa de sua expressão da coleta inicial para a final (após o tratamento) independente do tratamento;
- ✓ O gene SOD1 apresentou diferença estatística entre as coletas independente do tratamento utilizado;
- ✓ A expressão do gene CAT1, foi superior na coleta final (após o tratamento) em relação à coleta inicial tanto no grupo tratado com aPDT quanto NIS;
- ✓ A expressão do gene PLB1 foi estatisticamente maior no grupo aPDT quando comparado com o grupo NIS, independente das coletas;
- ✓ Para os genes ALS1, CAP1, EFG1, HWP1 e SAP1 não houve diferença estatística entre as coletas independente dos tratamentos aPDT e NIS, os quais também não influenciaram a expressão de tais genes.

REFERÊNCIAS*

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78(922): 455-9.
2. Alves CT, Xiao-Qing Wei, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect*. 2014; 69(4): 396-407.
3. Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. *Trends Microbiol*. 2017; 25(1):62-75.
4. Banfi S, Caruso E, Caprioli L, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorine photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12(18): 4853-60.
5. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc*. 1995; 61(3): 199-200.
6. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001; 21(1): 4-8.
7. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(6): 2000–6.
8. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 2001; 57(17): 9513-47.
9. Budtz-Jorgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32(12): 1859-63.
10. Bustin SA, editor. A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line; c2004.
11. Carmello JC, Alves F, Basso FG, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG, et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS ONE*. 2016; 11(6): e0156947.
12. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci*. 2015; 14(7): 1319-28.
13. Carmello JC, Pavarina AC, Oliveira R, Johansson B. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*. 2015; 15(4): fov018.
14. Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl*. 1993; 3(3): S18-29.
15. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001; 183(18): 5385-94.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

16. Chen HF, Lan CY. Role of SFP1 in the Regulation of *Candida albicans* biofilm Formation. PLoS ONE. 2015; 10(6): e0129903.
17. Copley L, Vander Watt P, Wirtz KW, Parker MI, Leaner VD. Photolon, a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis. Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40(2): 227–35.
18. Correa JC. Fotodegradação do Photodithazine® e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser [dissertação de mestrado]. São Carlos: Instituto de Química da USP; 2006.
19. Cury, JA, Seils, J, Koo H. Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms. Braz Oral Res. 2008; 22(3):216-22.
20. Dai B, Wang Y, Zhao L, Li D, Li M, Cao Y, Jiang Y. Cap1p attenuates the apoptosis of *Candida albicans*. FEBS Journal. 2013; 280(11): 2633–43.
21. Dantas AS, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. Biomolecules. 2015; 5(1): 142-65.
22. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res. 2008; 163(1): 1-12.
23. Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. Biofouling. 2013; 29(9): 1057-67.
24. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. Lasers Surg Med. 2011; 43(9): 927-34.
25. Dovigo LN, Pavarina AC, de Oliveira Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Mycoses. 2011; 54(2): 123-130.
26. Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJP, et al. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. Mol Biol Cell. 2006; 17(2): 1018–32.
27. Ferreira C, Silva S, Faria-Oliveira F, Pinho E, Henriques M, Lucas C. *Candida albicans* virulence and drug-resistance requires the O-acyltransferase Gup1p. BMC Microbiol. 2010; 10: 238.
28. Finkel JS; Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(2): 109-18.
29. Freire, F, de Barros PP, da Silva Ávila D, Brito GN, Junqueira JC, Jorge AO. Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. Lasers Med Sci. 2015; 30(5):1511-8.
30. Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NAR. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. Microbiology. 1998; 144(Pt 4): 829–38.
31. Gois MM, Kurachi C, Santana EJ, Mima EG, Spolidório DM, Pelino JE, et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study. Lasers Med Sci. 2010; 25(3): 391-95.

32. Goulart Rde C, Bolean M, Paulino Tde P, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28 Suppl 1:S53-60.
33. Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology.* 2004; 150 (Pt 2): 267–75.
34. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2001; 9(12): 591-6.
35. Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, Schock U, et al. A Histone Deacetylase Adjusts Transcription Kinetics at Coding Sequences during *Candida albicans* Morphogenesis. *PLoS Genet.* 2012; 8(12): e1003118.
36. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schäfer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol.* 2000; 174(5): 362-74.
37. Hwang CS, Rhie G, Kim ST, Kim YR, Huh WK, Baek YU, et al. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim Biophys.* 1999; 1427(2): 245–55.
38. Hwang CS, Rhie G, Oh J, Huh W, Yim H, Kang S. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology.* 2002; 148(Pt 11): 3705–13
39. Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, et al. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res.* 2009; 19(12): 2231–44.
40. Komalapriya C, Kaloriti D, Tillmann AT, Yin Z, Herrero-de-Dios C, Jacobsen MD, et al. Integrative model of oxidative stress adaptation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS ONE.* 2015; 10(9): e0137750.
41. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 694-707.
42. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006; 27(2-3): 95–125.
43. Kulak Y, Arıkan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(3): 283-8.
44. Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 1998; 273(40): 26078–86.
45. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wohrle D, Dimitrov R, Popova E, et al. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochem Photobiol Sci.* 2011; 10(1): 91–102.
46. Martchenko M, Alarco AM, H Marcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(2): 456–67.

47. Martin MV. Antifungal agents. In: Samaranayake LP, Macfarlane TW. Oral candidosis. London: Wright; 1990. p. 238-51.
48. Martins Jda S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 111(1): 71-7.
49. Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. Med Microbiol. 1995; 42(5): 372-9.
50. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013; 4(2): 119–28.
51. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. Int J Oral Maxillofac Surg. 1996; 25(2): 136-44.
52. McManus BA, Coleman DC, Moran G, Pinjon E, Diogo D, Bougnoux M, et al. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2008; 46(2): 652–64.
53. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani C E, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109(3): 392–401.
54. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: in vitro study. Photomed Laser Surg. 2011; 29(12): 827-33.
55. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(10): E380-8.
56. Monroy-Pérez E, Sáinz-Espuñes T, Paniagua-Contreras G, Negrete-Abascal E, Rodríguez-Moctezuma JR, Vaca S. Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. Mycoses. 2012; 55(3): e151-7.
57. Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* more pathogenic?. Int J Microbiol. 2012; 2012:205921.
58. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003; 67(3): 400-28.
59. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. J. Infect Dis. 2003; 188(3): 469-79.
60. Nailis H, Kucharíková S, Řičicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. BMC Microbiology. 2010; 10: 114.

61. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012; 148(1-2): 126–38.
62. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol*. 2008; 18(14): 1017–24.
63. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1(3): 1559–82.
64. Parvinen T, Kokko J, Yli-Urpo A. Miconazole lacquer compared with gel in treatment of denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1994; 102(6): 361-6.
65. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2005; 93(3): 288-93.
66. Prażmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, Mielczarek A. Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. *Adv Clin Exp Med*. 2016; 25(4): 799–807.
67. Premier BioSoft. [homepage na internet]. PCR *Primer* Design Guidelines. [acesso em 10 de agosto de 2016]. Disponível em: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Desgin.html
68. Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(2): 685-94.
69. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005; 4(4): 633-8.
70. Rüchel R. Proteinases of pathogenic fungi. *Mycoses*. 1999; 42 Suppl 1: 48-52.
71. Samaranayake LP. Host factors and oral candidosis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, editors. *Oral candidosis*. London: Butterworth; 1990. p. 66–103.
72. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi A, Fusco-Almeida AM, Mendes Gianini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62(Pt 1): 10-24.
73. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5(2): 125–57.
74. Seleem D, Chen E, Benso B, Pardi V, Murata RM. In vitro evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms. *PeerJ*. 2016; 4:e2148.
75. Shirliff ME, Krom BP, Meijering RA, Peters BM, Zhu J, Scheper MA, et al. Farnesol induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(6): 2392–401.
76. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2): 288–305.
77. Staab JF, Ferrer CA, Sundstrom P. Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1996; 271(11): 6298–305.

78. Strachkovskaya MG, Belenikina NS, Ivanova EV, Chemeris YK, Stranadko EF. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Microbiology*. 2002; 71(3): 345–8.
79. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011; 10(9): 1173-82.
80. Thornton B, Basu C. Real-Time PCR (qPCR) *Primer* design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ*. 2011; 39(2): 145–54.
81. Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *PhotochemPhotobiol Sci*. 2004; 3(5):406-11.
82. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(2): 382-402.
83. Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamon RD. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun*. 1998; 66(5): 1953–61.
84. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. *Primer-BLAST*: A tool to design target specific *primers* for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13:134.
85. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol*. 2001, 79(3): 213-21.
86. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS ONE*. 2011; 6(12): e28830.