



**UNESP - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Karem Janeth Rimachi Hidalgo**

**Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol**

**Araraquara**

**2018**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Karem Janeth Rimachi Hidalgo**

**Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP) para obtenção do título de mestre em Reabilitação Oral.**

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Pavarina**

**Araraquara  
2018**

Rimachi Hidalgo, Karem

Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol / Karem Rimachi Hidalgo. -- Araraquara: [s.n.], 2018  
100 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia  
Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina

1. Fotoquimioterapia 2. *Candida albicans* 3. Antifúngicos  
I. Título

**Karem Janeth Rimachi Hidalgo**

**Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol**

**COMISSÃO JULGADORA**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral**

**Presidente e Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Pavarina

**2º Examinador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lívia Nordi Dovigo

**3º Examinador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Nara Hellen Campanha Bombarda

**Araraquara, 26 de novembro de 2018.**

## **DADOS CURRICULARES**

**Karem Janeth Rimachi Hidalgo**

<b>NASCIMENTO</b>	<b>24/09/1986 Iquitos - Peru</b>
<b>FILIAÇÃO</b>	<b>Pedro Segundo Rimachi Inga Rosario Hidalgo Gomez</b>
<b>2004-2011</b>	<b>Curso de Graduação na Universidade de la Amazonia Peruana Iquitos-Peru.</b>
<b>2016-2017</b>	<b>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 - UNESP</b>
<b>2016-2018</b>	<b>Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.</b>

Dedico este trabalho a **DEUS**, nosso criador que foi sustento para ter forças, para seguir em frente nesta longa jornada.

Aos meus pais, **PEDRO e ROSARIO**, por todo o amor, carinho, compressão e sacrifício que fizeram e ainda fazem, por mim e meus filhos. **AMO MUITO A VOCÊS**, e sem vocês eu não teria conquistado esta vitória, minha admiração e enorme, serão sempre a minha força e base em tudo.

Aos meus filhos **LUCCAS e BRUNELLA**, por serem meu pilar, alegria e força para sair adiante, amo demais a vocês.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, nosso Pai celestial, que pela sua infinita bondade nos dá saúde e forças para alcançar nossas metas. MUITO OBRIGADA PAI CELESTIAL.

Aos meus pais, **PEDRO E ROSARIO**, pela confiança, amor, compreensão e conselhos, agradeço por estarem sempre a meu lado, fazendo este longo caminho, mais fácil e alegre. Vocês sempre acreditaram em mim.

Agradeço também a meus filhos, **LUCCAS E BRUNELLA**, que com um sorriso, fazem me esquecer as coisas ruins da vida. Vocês são minha força.

Agradeço também a meu irmão, **MARCO, e a EDDY**, pela ajuda.

Agradeço principalmente à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Ana Claudia Pavarina**, pela confiança e oportunidade depositada em mim, para fazer o mestrado nesta universidade de muito prestígio. Sempre estarei eternamente agradecida por sua decisão e amor pelas coisas que faz, é digna de ser admirada. Muito obrigada, Professora.

A **Juliana Cabrini Carmello**, pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade em ajudar-me, você é uma pessoa de caráter e muito trabalhadora. Muito obrigada.

A **Claudia**, por ter sempre a disponibilidade de ajudar-me no bioterio.

A **Valdirene** por seu grande desprendimento em ajudar-me em qualquer momento e amizade sincera.

A todos meus colegas, que eu fiz em Araraquara, obrigada por tudo.

A todos os docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral que, de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e formação.

À **CAPES**: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Estadual Paulista “**Júlio de Mesquita Filho**” – UNESP/Araraquara, e ao Programa de Pós-graduação em **Reabilitação Oral** pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho e que não estão citadas nominalmente, meus sinceros agradecimentos.

Rimachi Hidalgo KJ. Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) associada a Nistatina (NYS) no tratamento de candidose oral induzida em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol. Foram utilizados 174 camundongos Swiss fêmeas com aproximadamente 5 semanas de vida. Os animais foram imunossuprimidos com prednisolona 100 mg/kg no 1º, 5º e 13º dias de experimento. No 2º dia, os animais foram sedados com 0,1 mL de cloridrato de clorpromazina e uma suspensão de *C. albicans* 10<sup>7</sup> UFC/mL foi inoculada na língua dos mesmos. Do dia 7 ao 11 os tratamentos foram realizados. No grupo aPDT foi utilizado 200 mg/L de Photodithazine (PDZ) associado à luz LED de 50 J/cm<sup>2</sup> (grupo P+L+); no grupo (P+L-) foi utilizado apenas com PDZ; o grupo (P-L+) recebeu só luz LED e nos animais do grupo NYS o medicamento foi aplicado uma vez ao dia. Além disso, foi avaliada a combinação de duas terapias: P+L+NYS e NYS+P+L+. Um grupo recebeu apenas inoculação de *C. albicans* (grupo P-L-) e outro grupo de animais saudáveis (grupo CNI). Após os tratamentos, foi realizada a recuperação de *C. albicans* por meio de swabs estéreis. Então diluições seriadas foram realizadas e plaqueadas em placas de Petri com SDA. Após 48 horas de incubação a 37º C as colônias foram quantificadas e o número de UFC/mL foi determinado. Os camundongos foram sacrificados 24 horas e 7 dias após os tratamentos. Os resultados demonstraram que a combinação das terapias promoveu redução de 2,6 log<sub>10</sub> e 2,1 log<sub>10</sub> para os grupos P+L+NYS+ e NYS+P+L+, respectivamente, 24 horas após os tratamentos. A análise macroscópica revelou remissão das lesões orais, e a análise histológica demonstrou expressiva redução da reação inflamatória no tecido que apresentou características histológicas de normalidade. Dessa forma, pode-se concluir que a combinação de terapias é uma alternativa para o tratamento de candidose induzida com cepas de *C. albicans* resistente ao fluconazol.

**Palavras Chaves:** Fotoquimioterapia. *Candida albicans*. Antifúngicos.



Rimachi Hidalgo KJ. Efficacy of nystatin-associated antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of oral candidosis in mice infected with *Candida albicans* resistant to fluconazole [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

## **ABSTRACT**

The aim of the present study was to evaluate of PDZ-mediated aPDT, as well as the association of this approach with antifungal nystatin, would be effective to treat oral candidosis in mice infected with fluconazole resistant *C. albicans*. Were used 174 female Swiss mice of 5 weeks-old-age approximately. The animals were immunosuppressed with prednisolone 100 mg/kg on the 1st, 5th and 13th days of the experiment. On day 2, the animals were sedated with 0.1 mL of chlorpromazine hydrochloride and a suspension of *C. albicans* 107 CFU/mL was inoculated into the tongue. From 7 to 11 the treatments were performed. In the aPDT group, was used 200 mg/L of Photodithazine (PDZ) associated with 50 J /cm<sup>2</sup> LED light (P+L+ group). In the (P+L-) group was used only with PDZ; the group (P-L+) received only LED light and in the animals of the NYS group the drug was applied once a day. In addition, we evaluated the combination of two therapies: P+L+NYS and NYS+P+L+. One group received only inoculation of *C. albicans* (P-L- group) and another group of healthy animals (CNI group). After the treatments, recovery of *C. albicans* was performed by sterile swabs, then serial dilutions were performed and plated on Petri dishes with SDA. After 48 hours incubation at 37 °C the colonies were quantified, and the number of CFU/mL was determined. Mice were sacrificed 24 hours and 7 days after the treatments. The results showed that the combination of the therapies promoted reduction of 2.6 log<sub>10</sub> and 2.1 log<sub>10</sub> for the groups P+L+NYS+ and NYS+P+L+, respectively, 24 hours after the treatments. The macroscopic analysis revealed remission of oral lesions, and the histological analysis demonstrated an expressive reduction of the inflammatory reaction in the tissue that presented histological characteristics of normality. Thus, it can be concluded that the combination of therapies is an alternative for the treatment of candidosis induced with strains of *C. albicans* resistant to fluconazole.

**Keywords:** Photochemotherapy. *Candida albicans*. Antifungals

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVO.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
3.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana In Vitro .....	15
3.2 Modelo Murino de Candidose e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana In Vivo .....	18
3.3 Combinação de Terapias Tópicas.....	26
3.4 Mecanismo de Resistência, Invasão e Resposta ao Estresse Oxidativo de <i>Candida albicans</i> .....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Material .....	41
4.1.1 Material de consumo.....	41
4.1.2 Instrumental.....	42
4.1.3 Equipamento .....	43
4.2 Método .....	44
4.2.1 Reativação da cepa e padronização do inóculo .....	44
4.2.2 Parâmetros de irradiação e preparo do fotossensibilizador..	44
4.2.3 Indução de candidose oral nos animais.....	45
4.2.4 Realização dos tratamentos .....	46
4.2.5 Recuperação de <i>Candida albicans</i> e contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL) .....	49
4.2.6 Análise macroscópica das lesões .....	50
4.2.7 Sacrifício dos animais, análise histológica.....	50
4.3 Análise Estatística.....	52
5 RESULTADOS .....	53
5.1 Análise Microbiológica .....	53
5.2 Análise Macroscópica das Lesões .....	56
5.3 Análise Histológico das Lesões.....	63
6 DISCUSSÃO.....	83
7 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS .....	89
APÊNDICES .....	96
ANEXO A.....	100

## 1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* são consideradas microrganismos comensais, constituintes da microbiota bucal e trato gastrointestinal em indivíduos saudáveis<sup>1</sup>. Sob determinadas circunstâncias, tais como desequilíbrio no pH, mudanças nutricionais, uso de antibióticos ou alterações no sistema imunológico causadas por uma infecção ou terapia imunossupressora<sup>2,3</sup>, esses microrganismos podem atuar como patógenos oportunistas proliferando e sendo responsáveis pelo desenvolvimento de infecções na pele, mucosa e também de infecções sistêmicas<sup>4</sup>. A candidose orofaríngea (OPC) é uma infecção resultante da adesão e penetração das espécies fúngicas nos tecidos orais<sup>5</sup> e apresenta alta incidência em pacientes que utilizam medicamentos imunossupressores após transplante de órgãos, antibióticos de amplo espectro, diabéticos, terapias antineoplásicas e nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)<sup>6,7</sup>.

Para os tratamentos da candidose, têm sido utilizados medicamentos de aplicações tópica e sistêmica, tais como os derivados azóis, poliênos e as equinocandinas. Os azóis inibem a produção de ergosterol que causa instabilidade na membrana, os poliênos se ligam ao ergosterol na membrana celular fúngica, levando à lise celular; e, as equinocandinas inibem a biossíntese da parede celular dos fungos, levando a uma perda de integridade dessa parede celular<sup>8</sup>. Os agentes poliênos, particularmente a Nistatina, é o medicamento mais utilizado para aliviar os sinais e sintomas clínicos da doença, porém muitas vezes não eliminam completamente as espécies de *Candida*<sup>9,10</sup>. Além disso, os efeitos diluentes da saliva e movimentos da musculatura bucal normalmente reduzem a dose desses agentes a concentrações subterapêuticas<sup>11,12,13</sup>. Dessa forma, a recolonização da mucosa bucal pelo microrganismo tem sido frequente após o tratamento, o que ocasiona infecções recorrentes<sup>9,11</sup>. A medicação sistêmica tem sido usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecções recorrentes, utilizando medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B<sup>14</sup>. Esses agentes vêm sendo amplamente empregados para o tratamento da candidose bucal, especialmente em pacientes

imunocomprometidos. Porém a ocorrência de efeitos hepatotóxicos tem sido frequente<sup>14,15</sup>. A utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC tem resultado no desenvolvimento de resistência das espécies de *Candida*<sup>10</sup>. Resistência antifúngica pode ser definida como a persistência ou a progressão de uma infecção após a realização do tratamento antimicrobiano<sup>16</sup>. A resistência intrínseca ou primária ocorre quando um microrganismo apresenta reduzida susceptibilidade a uma determinada medicação, previamente à sua exposição ao agente. Já, a resistência secundária pode ser desenvolvida pelo microorganismo após longos períodos de exposição aos fármacos antifúngicos<sup>17</sup>.

Adicionalmente, a organização dos microrganismos em biofilmes representa um reservatório protetor, possibilitando a sobrevivência desses patógenos mesmo em condições desfavoráveis e proporcionando elevada resistência aos agentes antifúngicos<sup>18</sup>. Considerando o aumento na incidência de patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade dos medicamentos sistêmicos utilizados, alguns estudos têm buscado estratégias para inviabilização de espécies fúngicas resistente a fluconazol.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido avaliada para a inativação de microrganismos<sup>19,20</sup>. O processo fotodinâmico requer 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<sup>21</sup>. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS, 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 reativas capazes de induzir a inativação celular<sup>22</sup>. 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 reativas<sup>21</sup>. Ambos caminhos podem ocasionar morte celular do microrganismo patógeno.

Atualmente vem sendo empregada em aPDT, os FS de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas e porfirinas hidrofílicas que apresentam forte banda de absorção na região vermelha do espectro fotomagnético. O Photodithazine® (PDZ) é uma clorina e<sub>6</sub>, solúvel em água que apresenta um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete<sup>23</sup>. Esse FS apresenta uma alta banda de absorção no espectro eletromagnético (650 a 680 nm), o que o permite atravessar com maior profundidade as membranas biológicas, melhorando a ação da aPDT<sup>24</sup>.

Estudos in vitro tem apontado a aPDT como uma técnica efetiva em promover a inativação de espécies de *Candida*<sup>25,26</sup>. Em um estudo in vivo foi avaliado a associação de Photodithazine® com LED na fotoinativação de *C. albicans* em modelo murino de candidose oral<sup>27</sup>. Os animais foram tratados com concentrações de 75, 100, 125 e 150 mg/L durante 20 min e iluminados durante 14 min (LED 660 nm - 37,5 J/cm<sup>2</sup>). As células de *Candida albicans* (*C. albicans*) foram recuperadas do dorso da língua e a avaliação microbiológica foi realizada. Os animais foram sacrificados após 24 horas e a língua foi processada para análise histológica. Os resultados demonstraram que a aPDT foi eficaz na redução de *C. albicans* (cepa suscetível) quando foram utilizadas as concentrações de PDZ de 100, 125 e 150 mg/L. A associação de 100 mg/L de PDZ com LED promoveu redução de 4,36 log<sub>10</sub>. Em outro estudo Alves et al.<sup>28</sup> avaliaram a eficácia da aPDT (1 aplicação), mediada pelo Photodithazine® (PDZ) e luz LED, na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol (isolado clínico) em um modelo de candidose oral induzida. A aPDT promoveu redução significativa de *C. albicans* resistente a fluconazol (~1,96 log<sub>10</sub>), entretanto, esse protocolo não possibilitava o acompanhamento clínico da evolução da lesão.

Em estudo realizado recentemente Carmello et al.<sup>29</sup> (2016) modificaram o protocolo de indução de candidose em animais para possibilitar o tratamento e o acompanhamento da evolução da lesão após a aplicação da aPDT. O protocolo foi estabelecido com sucesso, uma vez que a lesão permaneceu nos animais por um período de 5 a 16 dias. Então, utilizando este protocolo, foi avaliada a efetividade da aPDT, associando ao PDZ a luz LED, no tratamento da candidose oral induzida em camundongos. Após o estabelecimento da infecção, os animais foram tratados durante 5 dias consecutivos com aPDT ou

com antifúngico tópico Nistatina. A evolução macroscópica e microbiológica da lesão foi acompanhada por um período de até 7 dias após o tratamento. Os resultados demonstraram que a aPDT foi tão efetiva quanto a Nistatina na inativação de *C. albicans*, (cepa suscetível) reduzindo 3 e 3,2  $\log_{10}$ , respectivamente, 24 horas após o término do tratamento. Em resumo, neste estudo, os autores observaram que a modificação do modelo de indução de candidose possibilitou prolongar o período de infecção e que a aPDT foi efetiva no tratamento da candidose oral em camundongos.

Tem sido relatado que combinações de terapias são empregadas com o objetivo de melhorar a eficácia dos tratamentos<sup>30</sup>. Hsieh et al.<sup>31</sup> (2018) avaliaram a combinação da aPDT com o antifúngico fluconazol na inativação de cultura planctônica e biofilme de *C. albicans*. Os autores verificaram que a aPDT, aplicada isoladamente, foi efetiva na erradicação de culturas planctônicas e promoveu redução na viabilidade dos biofilmes. O tratamento isolado com fluconazol promoveu somente redução na viabilidade das culturas planctônicas e no biofilme de *C. albicans*. Ao avaliarem a combinação das terapias (Fluconazol, seguido da aPDT), os autores observaram uma potencialização dos efeitos, sendo a viabilidade das células do biofilme reduzida para 5%. Em outro estudo, Barra et al.<sup>32</sup> (2015) demonstraram que a associação da aPDT (mediada pelo ácido 5-aminolevulínico), seguida da aplicação do antibiótico Gentamicina (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), foi eficaz na redução da atividade metabólica de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus* para 10, 20 e 30%, respectivamente.

Considerando os resultados dos estudos citados nos parágrafos acima, julgamos importante avaliar a eficácia de aplicações sucessivas da aPDT, mediada pelo PDZ e associada a luz LED, como também a combinação das terapias (P+L+NYS e NYS+P+L+) no tratamento de candidose oral induzida em camundongos infectados com cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol.

## **2 OBJETIVO**

### **Geral:**

Avaliar in vivo a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral induzida em língua de camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol.

### **Específicos:**

- Avaliar se a combinação das terapias, independente da ordem de aplicação, é eficaz no tratamento de candidose induzida em língua de camundongos;
- Avaliar macroscopicamente o efeito dos tratamentos sobre as lesões localizadas sobre a língua dos animais,
- Avaliar por meio de análise histológica o efeito dos tratamentos sobre os tecidos da língua dos animais.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana In Vitro

Maisch et al.<sup>33</sup>, em 2005, avaliaram diferentes concentrações (0 a 100 microM) de fotossensibilizadores derivados da porfirina (CTP1, XF70 e XF73) e diferentes tempos de incubação (5min, 1h e 4h) para determinar a fototoxicidade contra duas cepas de *Staphylococcus aureus* susceptível (MSSA) e resistentes à meticilina (MRSA), uma cepa de *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina, uma cepa de *Escherichia coli* e queratinócitos e fibroblastos humanos. As cepas foram iluminadas com uma fluência de 15,2 mW/cm<sup>2</sup>. Os resultados demonstraram que CTP1 na concentração de 1,0 µM exibiu atividade antibacteriana significativa após a iluminação por 5 min (eficácia de morte, 99,93%) e a atividade antibacteriana foi aumentando ainda mais com concentrações crescentes. No entanto, uma concentração de 10 µM causou uma diminuição acentuada nos números de UFC sem iluminação. Em contraste, XF70 ou XF73, em concentrações de apenas 0,005 µM matou 99,9% dos isolados de MSSA quando os compostos foram iluminados. Em resumo, as séries de porfirinas XF representam o primeiro fotossensibilizador com seletividade para bactérias gram-positivas que são ativos in vitro em concentrações nanomolares. Iluminação das duas cepas de MRSA e MRSE na presença de 0,005 µM XF70 ou XF73 resultou em uma diminuição significativa na UFC em todos os casos avaliados. Em resumo, este estudo mostra que a fotossensibilização com três fotossensibilizadores à base de porfirina, a saber: CTP1, XF70 e XF73, foi dependente da concentração após iluminação. Em uma concentração extremamente baixa (0,005µM) XF70 e XF73, foi eficaz para matar duas cepas de MRSA (ATCC BAA-44 e ATCC 43300), uma cepa MRSE (ATCC 700565) e uma Cepa MSSA (ATCC 25923).

Dovigo et al.<sup>34</sup>, em 2011, estudaram o efeito fungicida da terapia fotodinâmica contra *Candida albicans* e *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol. Foram utilizados seis isolados clínicos (*C. albicans*: 10R, 15R, 23R; *C. glabrata*: 50R, 63R, 87R). Além disso, cepas (ATCC; Rockville, MD, EUA) de *C. albicans* (ATCC 90028) e *C. glabrata* (ATCC 2001). Suspensões de cada estirpe de *Candida* foram tratadas com cinco concentrações de Photogem de 2,5, 5, 10, 25 e 50 mg/L<sup>-1</sup> expostas a quatro fluências de luz LED (14, 24, 34 ou



50 min de iluminação). Biofilmes de espécies únicas foram gerados em filtros de membrana de celulose, tratados com 25,0 mg/L, de Photogem e iluminado a 37,5 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que os isolados clínicos de *C. albicans* e *C. glabrata* foram resistentes ao fluconazol, enquanto as cepas de ATCC eram suscetíveis, e as cepas de *C. glabrata* eram menos suscetíveis a aPDT quando comparado com *C. albicans*. Em conclusão, os resultados dessa investigação demonstraram que *C. albicans* e *C. glabrata* podem apresentar sensibilidade reduzida à aPDT. Microrganismos organizados em biofilmes parecem ser menos suscetíveis à fotoinativação quando comparados com células planctônicas.

Dovigo et al.<sup>35</sup>, em 2011, avaliaram a eficácia da aPDT mediada pela curcumina (CUR) contra isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. glabrata*, em culturas planctônicas e biofilme. Foram utilizados 15 isolados clínicos de *Candida* das espécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. A solução de Cur foi avaliada nas concentrações de 5, 10 e 20 mM, o tempo de pré-incubação utilizado foi de 20 minutos e as doses de luz LED avaliadas foram: 5,28; 18; 25,5; e 37,5 J/cm<sup>2</sup> (aPDT grupos). Foi avaliado só o efeito da CUR e da luz LED. O grupo controle consistiu em suspensões de *Candida* não expostas a CUR ou luz LED (PL). Os efeitos antifúngicos contra os biofilmes foram avaliados por um ensaio metabólico baseado na redução de XTT, e a biomassa do biofilme foi avaliada utilizando coloração violeta cristal (CV). Os resultados demonstraram que a concentração de 20 mM CUR associada a luz LED de 5,28 e 18 J/cm<sup>2</sup> permitiram alcançar os mais promissores resultados contra culturas planctônicas. Ao usar 40 mM de CUR, a atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram reduzidos em 85%, 85% e 73%, respectivamente, utilizando 18 J/cm<sup>2</sup>. A aPDT mediada por CUR também reduziu a biomassa do biofilme de todas as espécies avaliadas.

Dovigo et al.<sup>26</sup>, em 2013, estudaram a inativação fotodinâmica (PDI) mediada por Photodithazine® (PDZ) associada à luz LED em 15 isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, em culturas planctônicas e de biofilme. Foi utilizado PDZ nas concentrações de 75, 100 e 125 mg e as doses de luz testadas foram 37,5; 25,5 e 18,0 J/cm<sup>2</sup>. O tempo de

pré-incubação utilizado foi de 20 minutos. As amostras foram tratadas com PDZ, seguida da luz (P+L+). Também foram avaliados grupos que só foram tratados com PDZ (P+L-) ou apenas com Luz LED (P-L+). As amostras do grupo controle não foram tratadas, ou seja, não foram expostas à luz nem PDZ (P-L-). A eficácia do tratamento foi avaliada por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônia. Os resultados demonstraram que a terapia fotodinâmica promoveu uma redução significativa nas suspensões planctônicas de 6,4 log<sub>10</sub> para *C. albicans*, e 5,6 e 4,3 log<sub>10</sub> para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente. Nos biofilmes foram observados 0,9 log<sub>10</sub> para *C. albicans* e 1,4 e 1,5 log<sub>10</sub> para *C. tropicalis* e a *C. glabrata*, respectivamente. Em resumo, a PDI diminuiu a viabilidade celular nos isolados clínicos de *Candida spp.*

Quishida et al.<sup>25</sup>, em 2015, avaliaram a eficácia de sucessivas aplicações de aPDT, mediada por PDZ e luz LED, na inativação de biofilmes multi-espécies formados por *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Staphylococcus mutans* cultivados em resina acrílica. Alíquotas de 500 µL de cada suspensão celular padronizada (*C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*) foram adicionadas a placas de microtitulação de 24 poços, e foram incubadas durante 90 min a 37 °C num agitador orbital em 75 rpm (fase de adesão). Após a formação do biofilme, foram realizadas 3 aplicações de aPDT, pela administração de PDZ (175 e 200 mg) e por 20 min, seguida da iluminação com 37,5 J/cm<sup>2</sup> de luz LED (P+L+). Também foram avaliados grupos que só foram tratados com PDZ (P+L-) ou apenas com Luz LED (P-L+). As amostras do grupo controle não foram tratadas, ou seja, não foram expostas à luz nem PDZ (P-L-). Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram maior redução na viabilidade celular após três aplicações de aPDT.

Carmello et al.<sup>36</sup>, em 2017, avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana, (aPDT) mediada por Photodithazine® (PDZ) associada à luz LED, na inativação de biofilmes mono e duo-espécie de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Foram utilizadas suspensões celulares padronizadas de cada cepa para a formação do biofilme, as quais foram tratadas com 150 e 175 mg/L de PDZ por 20 min (tempo de pré-irradiação) e expostas à luz LED a uma dose de 37,5 J/cm<sup>2</sup> (660 nm) por 9 minutos.

Amostras adicionais foram tratadas com PDZ ou somente com luz, e o controle não recebeu nenhum tratamento. Os autores observaram 1,0 e 1,2 log<sub>10</sub> de redução de *C. albicans* após aPDT mediada por 150 mg/mL e 175 mg/mL de PDZ, respectivamente e, da mesma forma, o aPDT de 150 mg/L de PDZ foi capaz de promover 1,0 e 1,1 log<sub>10</sub> de redução de *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente. Quando foi utilizado 175 mg/L de PDZ, obteve-se 1,6 e 1,0 log<sub>10</sub> de redução, para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos P+L-, P-L + e P-L, mostrando que a aplicação da luz ou PDZ separadamente não foi tóxico para as espécies avaliadas. Os autores concluíram que o uso de 150 mg/L de PDZ associado à luz LED promoveu uma redução significativa na viabilidade dos microrganismos avaliados.

Alves et al.<sup>37</sup>, em 2017, avaliaram os efeitos da terapia antimicrobiana (aPDT) mediada por Photodithazine® (PDZ) e luz LED em cepas de *C. albicans* ATCC 90028 (susceptível ao fluconazol, CaS) e *C. albicans* ATCC 96901 (resistentes ao fluconazol, CaR). Após 48 horas da formação do biofilme, as cepas foram incubadas com PDZ (100 mg/L) e, em seguida, as placas foram deixadas por 20 minutos no escuro (pré-irradiação) e iluminadas com Luz LED por 9 min (660 nm, 37,5 J/cm<sup>2</sup>). Os resultados demonstraram que aPDT reduziu a viabilidade de cepa de *C. albicans*, tanto resistente como suscetível ao fluconazol. Foi observado que a cepa CaR apresentou menor susceptibilidade à aPDT quando comparada com a cepa CaS. Além disso, observou-se que todas as células submetidas aos tratamentos apresentaram capacidade reduzida de adesão de 1,20 log<sub>10</sub> e 1,14 log<sub>10</sub> em comparação com os grupos controles para CaS e CaR, respectivamente.

### **3.2 Modelo Murino de Candidose e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana In Vivo**

Teichert et al.<sup>38</sup>, em 2002, investigaram a efetividade da terapia fotodinâmica no tratamento de candidíase oral em camundongos imunossuprimidos. O fotossensibilizador utilizado foi o azul de metileno. Neste estudo, 65 camundongos foram inoculados com *Candida albicans* 3 vezes por semana, por um período de 4 semanas. Os camundongos infectados com *C. albicans*

receberam uma administração oral de azul de metileno nas seguintes concentrações: 250, 275, 300, 350, 400, 450, ou 500 µg/mL. Após 10 minutos, os camundongos foram submetidos a aPDT com luz laser de diodo a 275J. Após os tratamentos, as línguas dos camundongos foram removidas cirurgicamente para os exames histopatológicos. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que as concentrações de 250 a 400 µg/mL reduziram o crescimento de fungos, mas não eliminaram *C. albicans*, tendo as concentrações de 450 e 500 mg/mL de azul de metileno erradicado totalmente *C. albicans* da cavidade oral, com reduções de 2,54 log<sub>10</sub> e 2,74 logs<sub>10</sub>, respectivamente. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica utilizando azul de metileno pode ser usada para o tratamento de candidíase oral em pacientes imunocomprometidos.

Takakura et al.<sup>39</sup>, em 2003, desenvolveram um novo modelo murino de candidíase oral, com o objetivo de investigar a patogênese da infecção oral por *C. albicans*. Os animais foram imunossuprimidos e infectados oralmente com 10<sup>7</sup> células viáveis de *C. albicans*. A imunossupressão foi realizada com injeção de prednisona a uma dose de 100 mg/kg de peso corporal um dia antes e 3 dias após a inoculação com *C. albicans*. Para inoculação, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular com cloreto de clorpromazina em cada fêmur. Durante todo o período experimental foi administrado cloridrato de tetraciclina na concentração de 0,83 mg/mL na água de beber dos animais. Os pesquisadores observaram que o tratamento com prednisolona produziu 30 vezes mais *C. albicans* viável na cavidade oral dos animais, comparados aos não tratados. Além disso, avaliaram o efeito da clorpromazina para sedação prolongada, mostrando que o grau de gravidade da infecção está correlacionado com o período de sedação após a inoculação, sendo que a sedação por mais de três horas causou lesões graves.

Mima et al.<sup>40</sup>, em 2010, avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em modelo murino de candidíases oral. Foram usados setenta e um camundongos fêmeas de 6 semanas de idade, imunossuprimidos com prednisolona na dose de 100 mg/kg de peso corporal, sendo que cloridrato de tetraciclina foi administrado na água de beber a uma concentração de 0,83

mg/mL a partir dia 0. Para inoculação de *C. albicans* ( $10^7$  UFC/mL), os animais foram sedados com injeção intramuscular com 50  $\mu$ L de clorpromazina a 2 mg/mL. Para a realização dos tratamentos, os camundongos foram anestesiados por meio de injeção intramuscular de ketamina e xilazina. Foi realizada aPDT, mediada por Photogem (concentrações de 400, 500 ou 1000 mg/L) associada à luz LED ( $305 \text{ J/cm}^2$  - 20 minutos). O tempo de pré-irradiação utilizado foi de 30 minutos. Foram avaliadas 3 concentrações do FS (400, 500 ou 1000 mg/L) e 2 comprimentos de onda da luz LED (455 ou 630 nm azul e vermelho). Após os tratamentos, os animais foram sacrificados e as línguas desses animais foram cirurgicamente removidas. Os resultados demonstraram redução significativa de *C. albicans* recuperado da língua quando comparado com o grupo controle positivo. Não houve diferença entre as concentrações de Photogem e nas doses de LED utilizadas. A avaliação histológica demonstrou que o tratamento não promoveu efeito adverso aos tecidos dos camundongos.

Ribeiro et al.<sup>41</sup>, em 2012, avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica (aPDT) para a desinfecção de próteses totais. Foram coletadas amostras de biofilme de próteses de 60 usuários de prótese com idade entre 45 e 85 anos, os quais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais (n=15). Foram utilizadas duas concentrações de Photogem® (50 e 100 mg/L). As próteses foram tratadas com Photogem® suspensão e/ou gel. Em seguida, cada prótese foi colocada individualmente em um plástico transparente e deixado no escuro durante 30 minutos (pré-irradiação), e logo depois as mesmas foram todas colocadas dentro de um dispositivo de diodo emissor de luz, irradiado com luz LED azul de comprimento de onda 440-460 nm, por 26 min. Os resultados demonstraram que aPDT foi eficaz na desinfecção de próteses, inativando mais de 90% dos microrganismos, sendo que a formulação de gel de Photogem® foi mais eficiente por ter a capacidade de permanecer na superfície da dentadura ao longo do período de pré-irradiação e procedimentos de iluminação, quando comparado com forma líquida.

Mima et al.<sup>42</sup>, em 2012, estudaram a eficácia clínica da terapia fotodinâmica (aPDT), comparada com o tratamento tópico antifúngico para o tratamento da estomatite protética (DS). Foram selecionados 40 pacientes

aleatoriamente e distribuídos em dois grupos (n = 20 cada), sendo que no grupo controle (NYT) os pacientes receberam tratamento tópico com Nistatina suspensão oral (100 000 UI) quatro vezes por dia, durante 15 dias. No grupo aPDT, as próteses e o palato dos pacientes foram tratados com 500 mg/L de Photogem (®), e após 30 minutos de incubação, foram iluminados com luz LED 455 nm (37,5 e 122 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente), três vezes por semana durante 15 dias (seis sessões). Culturas micológicas das próteses e do palato foram realizadas no início (dia 0), no final do tratamento (dia 15) e nos intervalos de tempo de acompanhamento (dias 30, 60 e 90). As colônias foram quantificadas (UFC/mL) e identificadas por testes bioquímicos. Os dados demonstraram que os tratamentos reduziram significativamente o número de UFC/mL no final dos tratamentos e no dia 30 do período de acompanhamento (p <0,05). Os grupos NYT e aPDT apresentaram taxas de sucesso clínico de 53% e 45%, respectivamente. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente identificada. Os autores concluíram que a aPDT foi tão eficaz quanto a Nistatina tópica no tratamento da estomatite protética.

Okada et al.<sup>43</sup>, em 2013, estudaram o processo patológico nos tecidos da língua infectados com *C. albicans* no modelo de candidíase oral murino no estágio inicial da infecção. Foram utilizados 115 camundongos, os quais foram imunossuprimidos com prednisolona administrada por via intraperitoneal, 24 horas antes da inoculação. Uma concentração de 10<sup>8</sup> células/mL de *C. albicans* TIMM1768 foi inoculada na língua dos camundongos. Vinte e quatro horas após a inoculação, notou-se a presença de manchas brancas na língua, indicativo da penetração de *C. albicans* no epitélio da mucosa. Foi observado também aglomerações de leucócitos. Quarenta e oito horas após a infecção, muitas manchas brancas foram observadas ocasionando uma extensa colonização que consistia em numerosas hifas no epitélio do dorso lingual. Também foi mostrado uma destruição da estrutura normal das papilas linguais e das camadas epiteliais circundantes. A quantidade de citocinas na língua 24 horas e 48 horas após a infecção foi avaliada. Os resultados demonstraram que, entre os camundongos infectados com *Candida*, os níveis de IL-12p70 e de IFN-g, 48 h após a inoculação foram significativamente maiores do que no grupo com 24 horas de inoculação. Em conclusão, a pior condição no processo

patológico na candidíase oral experimental foi encontrada 48 horas após a inoculação de *C. albicans*, onde foi observado um denso acúmulo de neutrófilos sob as lesões das línguas que continham níveis aumentados de IL-12p70 e IFN-g. Os autores sugeriram que a condição patológica local das línguas infectadas por *Candida* pode ser afetada pelo acúmulo de neutrófilos e aumento dos níveis de algumas citocinas.

Dovigo et al.<sup>44</sup>, em 2013, avaliaram a eficácia da aPDT mediada pela Curcumina (aPDT) em um modelo murino. Um total de 40 camundongos foram imunossuprimidos com prednisolona, um 1 dia antes e 3 dias após a infecção com *Candida*. Em seguida, foram sedados por injeção intramuscular de 50 µl de clorpromazina a 2 mg/ml cloreto em cada fêmur, para realizar a inoculação de *C. albicans* (ATCC 90028). Cinco dias após a inoculação de *Candida* a doença estava presente. Os camundongos foram randomizados em 8 grupos de trabalho. No grupo aPDT (P+L+) os camundongos receberam 70 µl de curcumina (20, 40 e 80 µM) no dorso da língua e foram mantidos no escuro por 20 min (tempo de pré-irradiação). Em seguida, foi colocado um dispositivo de LED no dorso da língua e iluminação foi realizada a 37,5J/cm<sup>2</sup>. O efeito antifúngico do FS foi testado pela aplicação de curcumina nas mesmas concentrações (20, 40 e 80 µM) (grupos P+L-). O grupo que recebeu luz foi exposto ao mesmo LED fluência mencionada acima (P-L+). O grupo de controle positivo não recebeu FS ou luz, sendo tratado apenas com solução salina estéril a 10% (P-L-). Um grupo controle negativo (NCG) de animais saudáveis. Os resultados demonstraram que a aPDT promoveu redução significativa na viabilidade de *C. albicans* após a aPDT, e que o uso de 80 µM de curcumina associada à luz foi capaz de induzir a maior redução log<sub>10</sub> nas contagens de colônias (4 logs). Concluíram que a aPDT, mediada por curcumina, provou ser eficaz na inativação in vivo de *C. albicans* sem prejudicar o tecido do hospedeiro.

Para estudar a fotoinativação de *C. albicans* em um modelo murino, mediada por Photodithazine® (PDZ), Carmello et al.<sup>27</sup>, em 2015, utilizaram camundongos de 6 semanas de vida, os quais foram inoculados com *C. albicans* (ATCC 90028, Rockville, MD). Os animais foram imunossuprimidos e

inoculados, e sendo que, 5 dias, foi realizada a terapia fotodinâmica (aPDT) a qual consistia na aplicação 70 µL de solução de PDZ em concentrações de 75, 100, 125 ou 150 mg/mL. Os camundongos foram mantidos no escuro durante 20 minutos (tempo de pré-irradiação), e em seguida foi aplicado um dispositivo LED emissor de luz vermelha (660nm), com uma dose de 37,5 J/cm<sup>2</sup> por 14 minutos (grupos P+L+). Foi testado também o efeito do PDZ, sem a iluminação LED, e para verificar apenas o efeito da luz, um grupo foi exposto apenas à iluminação LED. O controle positivo não recebeu nenhum PS ou luz (P-L-) e o grupo de controle negativo foi avaliado com simulação de imunossupressão, inoculação e tratamento da mesma maneira que realizado no grupo P+L+. A análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos aPDT de 100, 125 e 150 mg/mL de PDZ. No entanto, o uso de 100 mg/mL registrou redução de 4,36 log<sub>10</sub>. Em conclusão, os resultados obtidos mostraram que aPDT mediada por PDZ promoveu uma redução expressiva nas contagens de *C. albicans*.

Carmello et al.<sup>29</sup>, em 2016, avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento de candidíase oral em um modelo murino, usando Photodithazine® (PDZ). Foi estabelecido um modelo murino de acordo com a metodologia de Takakura et al.<sup>39</sup>, com algumas modificações. Essas modificações foram realizadas para permitir maior período da infecção e o estabelecimento do tratamento dos animais. Os autores utilizaram camundongos fêmeas de seis semanas de idade, os quais foram imunossuprimidos nos dias 1, 5, 9 e 13 com injeções subcutâneas de prednisolona. Todos os animais foram inoculados com *C. albicans* no dia 2. Após a infecção estar instalada na língua dos animais, o tratamento foi realizado por 5 dias consecutivos. Os animais foram divididos em grupos, sendo que para o grupo aPDT foi aplicado o fotossensibilizador Photodithazine® (PDZ) na concentração de 100mg/L (durante 20 minutos) e, em seguida foram iluminados com luz LED vermelha com comprimento de onda de 650-670 nm com dose de 37,5 J/cm<sup>2</sup> (14 min). Outro grupo foi tratado com antifúngico tópico Nistatina (100000 UI) por 5 dias. Também foi avaliado o efeito do PDZ (P+L-) e da luz (P-L+), isoladamente. Os autores observaram que o grupo aPDT foi tão eficaz quanto o grupo Nistatina na inativação de *C.*



*albicans*, reduzindo 3 e 3,2 logs<sub>10</sub> respectivamente. Por outro lado, a análise macroscópica mostrou que 24 horas após o término do tratamento, todos os animais submetidos à aPDT apresentaram remissão total das lesões (escore 0). No grupo tratado com NYS, os animais apresentaram remissão parcial das lesões (escore 1) e os outros grupos apresentaram lesões extensas em todo o dorso da língua (escore 3). Estes resultados foram mantidos até 7 dias após o término dos tratamentos. Em conclusão, a aPDT e Nistatina foram efetivas na inativação de *Candida*.

Alves et al.<sup>45</sup>, em 2017, descreveram 5 casos clínicos de pacientes com estomatite protética (DS) que foram tratados com aPDT mediada pelo fotossensibilizador Photodithazine® (PDZ) associado à luz LED. Para isso, foram selecionados 5 pacientes diagnosticados com DS. As próteses dos pacientes foram incubadas com o gel PDZ (200 mg/L) e mantidas no escuro durante 20 min. Decorrido esse período, a prótese foi colocada no aparelho LED e iluminada durante 17 min (50J/cm<sup>2</sup>). Simultaneamente, o PDZ foi aplicado no palato durante 20 min e, então iluminado durante 4 min (50 J/cm<sup>2</sup>) com LED. O tratamento foi realizado 3 vezes por semana, durante 15 dias (6 sessões). A coleta e a avaliação microbiológica foram realizadas antes do tratamento e no final do mesmo, e nos dias 15, 30 e 45 após o término do tratamento. Os resultados demonstraram que três pacientes apresentaram resolução clínica de DS, após o tratamento com aPDT. Um indivíduo demonstrou redução na inflamação do palato e outro não demonstrou melhora na lesão oral. Assim, chegaram à conclusão de que a aPDT pode ser um tratamento promissor para a DS.

Sakima et al.<sup>46</sup>, em 2018, avaliaram a eficácia da aPDT mediada por nanopartículas poliméricas de curcumina em um modelo murino de candidose oral. Um total de 235 camundongos fêmeas foram imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans* ATCC 90028. A aPDT foi realizada aplicando CUR-NP ou CUR livre (260 µM) e deixado no escuro por 20 min (tempo de pré-irradiação), em seguida, foi iluminada por 7 min a 37,5 J/cm<sup>2</sup> (C+L+, AC+L+ e grupos CC+L+), por cinco dias consecutivos. Para verificar um possível efeito tóxico do FS aplicado, foram tratados apenas com o FS durante a pré-

irradiação e tempo de iluminação (grupos C+L-, AC+L+ e CC+L+). O grupo controle (C-L-) recebeu apenas solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) durante os mesmos tempos de pré-irradiação e iluminação. Um grupo de animais foi tratado com Nistatina uma vez ao dia por cinco. Os resultados demonstraram que a aPDT mediada por CUR livre (grupo C+L+) resultou em significativa ( $p < 0,001$ ) redução de 1,11 log<sub>10</sub> na viabilidade de *C. albicans* recuperada da língua de camundongos comparado com o grupo controle (C-L-). A CUR-NP aniônica, não apresentou efeito. Foi realizado também a avaliação de CK13 e CK14 por imunohistoquímica. Segundo os autores a CUR livre apresentou melhor efeito fotodinâmico do que CUR-NP e nistatina. Além disso, a infecção por *C. albicans* em modelo murino de candidose oral alterou a fisiopatologia do epitélio oral dos animais, caracterizada pelo aumento da expressão de citoqueratina CK13 e CK14.

Alves et al.<sup>28</sup>, em 2018 estudaram a efetividade da terapia fotodinâmica (aPDT), utilizando Photodithazine® (PDZ), diluído em solução salina ou hidrogel, e luz LED (630nm), na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol, também avaliaram a expressão dos fatores de virulência de *C. albicans* resistente a fluconazol antes e após o tratamento com a aPDT. Foram utilizados 45 camundongos com aproximadamente 6 semanas de vida e uma cepa padrão de *C. albicans* resistente a fluconazol (ATCC MYC 575), sendo que a concentração celular foi equivalente a 10<sup>7</sup> células/mL. No dia 2 do experimento os animais foram sedados com 0,1 mL de cloridrato de clorpromazina 2mg/mL, para a inoculação de *C. albicans* resistente a fluconazol. Foram avaliados os seguintes grupos: P-L-, P-L+, P+L-h, P+L-s, P+L+h e P+L+s. Para a realização da aPDT, se aplicou 100 mg/L de PDZ (diluído em salina ou hidrogel) na língua dos camundongos a qual foi iluminada por luz LED 37,5 J/cm<sup>2</sup> durante 14 minutos. A imunossupressão dos animais foi realizada nos dias 1 e 5, com injeções subcutâneas de prednisolona. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após os tratamentos com uma dose letal de ketamina, e a língua dos mesmos foi removida cirurgicamente. Os resultados demonstraram que a aPDT mediada pelo PDZ, em associação com a luz LED, promoveu redução significativa dos valores de UFC/mL de *C. albicans* resistente a fluconazol, resultando em redução equivalente a 1,91 e

1,96 log<sub>10</sub>, para os grupos P+L+h e P+L+s. A aPDT não ocasionou efeitos adversos no tecido lingual dos animais e reduziu apenas a produção de fosfolipase. Em conclusão, a aPDT foi efetiva na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol, sem causar efeitos adversos no tecido lingual.

### 3.3 Combinação de Terapias Tópicas

Snell et al.<sup>47</sup>, em 2012, utilizaram *C. albicans* SC5314 para estudar a capacidade dos antifúngicos derivados do azol em induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *Candida*. A aPDT foi realizada utilizando 10 µg/ml do fotossensibilizador catiônico meso-tetra (N-metil-4-piridil) e porfirina tetra tosilat (TMP-1363). Segundo os resultados, Miconazol aumenta a atividade fungicida da aPDT contra *C. albicans* in vitro. O tratamento combinado com miconazol mais aPDT usando TMP-1363 foi significativamente mais eficaz do que o tratamento isolado. Os autores sugerem que o miconazol pode ser usado para potencializar a eficácia da aPDT.

Davies et al.<sup>48</sup>, em 2016, avaliaram a fotoatividade do fotossensibilizador a base de porfirina, (TMP-1363), em biofilmes de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, e o efeito da combinação do uso de miconazol e aPDT. Discos de acrílico que foram contaminados com suspensões padronizadas de cepas padrão e isolados clínicos de *Candida spp.* e incubados por 48 horas para formar biofilme. Em seguida, foram incubados com miconazol (25 µg/ml; 52,2 µM) durante 2 horas a 37°C. Então foi realizada a aPDT mediada pelo fotossensibilizador TMP-1363 (porfirina). Os resultados demonstraram que *C. glabrata* 7531/06 não foi sensível a TMP-aPDT, enquanto a atividade metabólica das três espécies de isolados clínicos foram reduzidas para 64,2 ± 5,5%, comparado aos controles. O Miconazol (25 µg/ml) reduziu a atividade metabólica de todas as cepas, exceto a cepa *C. albicans* MYA 274. Entretanto, a combinação do antifúngico com aPDT foi eficaz contra essa cepa, sugerindo uma interação sinérgica. Além disso, foi observado que a combinação de TMP-1363 e Miconazol reduziu significativamente (P <0,0005) a atividade metabólica dos biofilmes em aproximadamente 60%, 46% e 58%, para *C. albicans* MYA2732, *C. albicans* MYA-274 e *C. glabrata* MYA-275, respectivamente.

Pourhajibagher et al.<sup>49</sup>, em 2017, avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica em combinação com antibioterapia (colistina) em *Acinetobacter baumannii*. Foi utilizado cepas de *A. baumannii* resistente à colistina. Alíquotas de 100 µL de suspensões bacterianas foram colocadas em uma placa de microtitulação de 96 poços e, em seguida, incubadas com 100 µL de azul de toulina (TBO) a uma concentração final de 0,1 mg/mL e deixadas no escuro por 5 min (período de pré incubação) e, então expostas à luz LED com um comprimento de onda de 635 nm e potência de 220 mW por 3 min. Os resultados obtidos mostraram que a aPDT reduziu a contagem bacteriana em comparação com o grupo controle em 83,7%. A aPDT em combinação com colistina, mostrou alto efeito sinérgico contra *A. baumannii*, apresentando taxa de redução de 100%, o que equivale a redução de 9 log<sub>10</sub>. Segundo os autores, a aPDT, ocasiona um aumento na permeabilidade e ruptura da membrana, potencializando o efeito da colistina.

Hsieh et al.<sup>31</sup>, em 2018, analisaram se a aPDT combinada com agentes antifúngicos tradicionais poderia melhorar o efeito antimicrobiano contra a adesão de *Candida albicans*. Foi utilizada uma suspensão de *C. albicans* (ATCC 90029), e a aPDT foi realizada utilizando como fotossensibilizador a curcumina nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 40 e 80 µM e iluminados por 20 minutos com um aparelho de luz LED azul com um comprimento de onda de 430 nm. Para avaliar a eficácia da combinação do fluconazol como a aPDT, inicialmente o fluconazol na concentração de 208 µM foi adicionada às cepas de *C. albicans* e em seguida foi realizada a aPDT. Segundo os autores, o Fluconazol elimina *C. albicans* na forma de pseudo hifas, mas não os biofilmes, enquanto a aPDT tem o efeito inverso. Os autores concluíram que a combinação da aPDT e fluconazol aumenta a eficácia para o tratamento clínico de *C. albicans*.

Huang et al.<sup>50</sup>, em 2018, avaliaram a eficácia da combinação da aPDT e antifúngico na inativação de isolados clínicos resistentes de *Candida albicans*. Foram utilizadas cepas de *C. albicans*, SC5314 (ATCC MYA-2876D) e um e um isolado clínico resistente ao fluconazol (2008 n°. 22). As cepas foram cultivadas em 10 mL YPD, lavadas e ressuspensas em PBS. A aPDT foi

mediada pelo azul de toluidina (TBO- 0.1 nM) associada a luz LED (50 J/cm<sup>2</sup>). Após o tratamento, culturas planctônicas e biofilmes foram incubados com fluconazol (0.25µg/mL) e posaconazol (0.25µg/mL) por 24 h a 37 °C. A espessura da matriz do biofilme (EPS) foi avaliada em microscópio confocal. Os resultados demonstraram que as culturas planctônicas que sobreviveram à aPDT foram significativamente suscetíveis ao fluconazol nas primeiras duas horas após o tratamento. No biofilme uma redução de 3 log<sub>10</sub> foi encontrada quando utilizada a combinação das terapias. A microscopia confocal análise, demonstrou que a aPDT mediada por TBO poderia remover parcialmente a substância polimérica extracelular (EPS) de biofilme. Os resultados indicaram que a combinação de aPDT e agentes antifúngicos pode ser promissora no tratamento de infecções causadas por *C. albicans*.

### **3.4 Mecanismo de Resistência, Invasão e Resposta ao Estresse Oxidativo de *Candida albicans***

De acordo com Donlan et al.<sup>51</sup>, em 2002, o biofilme pode ser definido como um conjunto de células microbianas alojadas em uma matriz polimérica extracelular (EPS). Os biofilmes podem estar presentes em uma variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos e dispositivos médicos. A adesão de células ao substrato é um processo complexo regulado por diversas características do meio de crescimento, substrato e superfície celular. A estrutura de biofilme estabelecida compreende células microbianas e EPS, tem uma arquitetura definida e fornece um ambiente ideal para a troca de material genético entre as células. As células também podem se comunicar por meio da detecção de quórum sensing, o que, por sua vez, podem afetar os processos metabólicos do biofilme, como o descolamento. Segundo os autores, a composição e estrutura dos polissacáridos determinam a conformação primária da EPS. Foi também relatado que a EPS do biofilme geralmente não é uniforme. O crescimento bacteriano lento melhora a produção de EPS, uma vez que essa estrutura é altamente hidratada, impedindo assim a dessecação do biofilme. O EPS também contribui para a resistência antimicrobiana dos biofilmes uma vez que limita o transporte de antimicrobianos através do biofilme. Provavelmente, a EPS liga-se diretamente a estes agentes. Os biofilmes têm grande importância para a saúde pública devido ao papel que desempenham para o

tratamento e prevenção de certas doenças infecciosas. Dessa forma, maior compreensão dos processos envolvidos poderia dar origem a novas estratégias para o controle dos mesmos e melhorar o manejo de paciente com infecções.

Lushchak et al.<sup>52</sup>, em 2011, realizaram uma revisão de literatura sobre os mecanismos de adaptação dos organismos contra o estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são continuamente produzidas e eliminadas por organismos vivos que normalmente mantêm as ROS em certos níveis estacionários. Em algumas circunstâncias, o equilíbrio entre a geração e a eliminação de ROS é perturbado, ocasionando aumento no nível de ROS chamado “estresse oxidativo”. Dois mecanismos estão envolvidos, a alteração nas propriedades fisiológicas da membrana, e a expressão de certos genes, que são responsáveis pela redução da permeabilidade da membrana. O primeiro pode ajudar a célula a sobreviver a fases oxidativas a curto prazo, enquanto o segundo pode ser útil na exposição contínua a níveis elevados de ROS. A resposta adaptativa dos sistemas antioxidantes bacterianos para o estresse oxidativo é coordenada principalmente por dois sistemas: SoxRS e OxyR. O primeiro responde ao estresse induzido pelo ânion superóxido, enquanto o segundo responde ao induzido por peróxido de hidrogênio.

Martin et al.<sup>1</sup>, em 2011, realizaram uma revisão de literatura, sobre patogêneses associadas à virulência de *C. albicans*. Os autores relataram que a *C. albicans* está presente na cavidade oral juntamente com outras bactérias presentes, sem causar doença. Para mudar do estado de comensal a patógeno, o fungo altera sua morfologia e expressão gênica. No estado de patogênese começa a colonização, de modo que durante este processo as hifas de *C. albicans* penetram no hospedeiro. O reconhecimento de *C. albicans* pelo sistema imunológico inato é crucial para a defesa contra a candidose oral. Além do importante papel das células T e dos fagócitos, a saliva oral contém antimicrobianos pépticos como histatinas,  $\beta$ -defensinas e lactoferrina que trabalham juntos na manutenção do equilíbrio e na prevenção da invasão da mucosa bucal. Durante o início da candidíase oral, quando *C. albicans* invade a mucosa, outros componentes inatos do sistema imunológico provavelmente desempenharam um papel fundamental na luta contra o fungo.

Tobudic et al.<sup>53</sup>, em 2012, realizaram uma revisão de literatura sobre a suscetibilidade antifúngica de *C. albicans* em biofilmes. Os autores explicaram que a resistência antimicrobiana em biofilmes de *C. albicans* é complexa e não pode ser explicada por um único mecanismo. Vários fatores têm sido considerados para o aumento da resistência antifúngica de biofilmes de *C. albicans*, que incluem crescimento alterado, taxa metabólica de células dentro do biofilme, presença de matriz extracelular, expressão de genes de resistência e presença de células persistentes. A matriz extracelular pode atuar como uma barreira física que impede o acesso de agentes antimicrobianos nas comunidades do biofilme, barreira essa que depende da quantidade e natureza da matriz extracelular. A capacidade de formar biofilme está intimamente associada à capacidade de causar infecção. Segundo os autores, na prática clínica, a aplicação simultânea de dois antifúngicos não é recomendada no tratamento de candidose invasiva, exceto pela combinação de anfotericina B com flucitosina em endocardite. O uso de combinação de drogas antifúngicas pode melhorar o manejo de infecções associadas ao biofilme de *Candida spp.*, prevenindo o surgimento de resistência.

Abreu et al.<sup>54</sup>, em 2012, realizaram uma revisão de literatura, destacando as diferenças e semelhanças entre o citoesqueleto e o tecido durante o reparo da ferida. Para uma única célula, um reparo rápido da ferida é absolutamente necessário para a sobrevivência. Se a célula se danifica e a membrana celular não é rapidamente reparada, a célula pode morrer devido à perda do citoplasma e ao influxo de células extracelulares. Para que ocorra o reparo de feridas em tecidos e órgãos, é necessário manter a homeostase, e assim evitar a infecção e manter a função do tecido. A falha em reparar adequadamente as lesões pode resultar na morte de um organismo. Um grande componente de reparação celular e respostas teciduais é o envolvimento do citoesqueleto. A fim de evitar mais danos, prevenir a infecção e restaurar a função normal, as células e os tecidos devem selar e remodelar a área ferida. O citoesqueleto é um importante componente de reparo de ferida. A resposta imediata a uma ferida permite ligar a ruptura da membrana plasmática, evitando assim influxo de moléculas extracelulares e impedindo a

perda de citoplasma. As falhas de membrana são rapidamente reparadas pelo recrutamento e fusão da membrana vesicular interna com a membrana plasmática. Dessa forma, a restauração completa da superfície celular ocorre tipicamente dentro de minutos após sofrer o dano. O estabelecimento de um reparo de membrana no local de uma ferida requer uma resposta altamente dinâmica e exata do citoesqueleto, incluindo a exocitose imediata. No entanto, graças aos avanços na genética, biologia molecular e microscopia, mudaram o foco desses estudos para o papel do citoesqueleto. Uma vez formadas, aderências focais estão intimamente associadas à miosina II e ao Arp2/3 componentes do citoesqueleto responsáveis pela força, geração e nucleação de filamentos de actina. Um componente citoesquelético do reparo da ferida é a actina/aparelho contrátil de miosina II não muscular. Elementos similares do citoesqueleto são utilizados em uma única célula para reparação do tecido adulto, e em processos básicos como a citocinese e morfogênese, refletindo a conservação evolutiva de mecanismos básicos do citoesqueleto e da capacidade da célula e do para adaptar as múltiplas funções biológicas.

Yan et al.<sup>55</sup>, em 2013, *Candida albicans* é um microrganismo comum no intestino. No entanto, a infecção invasiva por *C. albicans* surgiu como uma doença com risco de vida nos últimos anos. A taxa de mortalidade da candidose invasiva é alta hospedeiros criticamente doentes. *C. albicans* pode mudar de levedura para a morfologia das hifas, e aproveitar a barreira da mucosa intestinal prejudicada e imunidade insuficiente do hospedeiro para facilitar sua colonização e penetração. Apesar da disponibilidade de novos antifúngicos potentes nos últimos anos, o tratamento de candidose grave, especialmente candidemia, não foi substancialmente melhorada. Nesta revisão, os fatores de virulência de *C. albicans*, bem como o papel antagônico da barreira da mucosa intestinal são discutidos para esclarecer os mecanismos de infecções enterogênicas por *C. albicans*.

Segundo Taff et al.<sup>56</sup>, em 2014, a produção de uma matriz extracelular é um dos principais mecanismos de resistência de *Candida* que limitam a atividade dos fármacos, como os poliênicos e azóis. Os componentes da matriz,



como a  $\beta$ - glucana e DNA extracelular, são responsáveis pela resistência do biofilme a múltiplos antifúngicos. Os processos que a *Candida spp.* cria para resistir aos antimicrobianos convencionais são múltiplos e variam de acordo com os estágios de formação do biofilme. Durante a fase inicial do desenvolvimento do biofilme, as bombas de efluxo contribuem em parte para a resistência. Este mecanismo de resistência envolve um aumento transitório na atividade de bomba durante os estágios de aderência e formação de biofilme. No entanto, à medida que o biofilme amadurece, o papel das bombas de efluxo é minimizado e mecanismos específicos desempenham um papel muito maior. Uma característica dos biofilmes maduros é a produção de matriz extracelular, um polímero que promove a aderência e protege as células do biofilme. A matriz extracelular de biofilme também pode dificultar a penetração dos antimicrobianos, através do sequestro dos medicamentos. Biofilmes maduros produzem matriz extracelular contendo  $\beta$ -1,3 glucano que participa no sequestro de antifúngicos, incluindo fluconazol, anfotericina B, nistatina e flucitosina, além de conter aproximadamente metade do ergosterol, o qual é um dos conteúdos encontrados na fase inicial de crescimento do microrganismo. Esse achado sugere que os biofilmes maduros dependem menos do ergosterol para manter a fluidez da membrana, limitando potencialmente a eficácia das drogas direcionadas ao ergosterol, como os azóis e poliênicos. O DNA extracelular da matriz também promove resistência à anfotericina B e às equinocandinas.

Brown et al.<sup>3</sup>, em 2014, realizaram uma revisão de literatura sobre o metabolismo de adaptação de *C. albicans* durante o comensalismo. Segundo os autores, *Candida* se adapta facilmente a qualquer nicho do hospedeiro devido à sua capacidade metabólica para assimilar os nutrientes, sendo o carbono a principal fonte para suas patogêneses, além de nitrogênio, oxigênio e fósforo, os quais são essenciais para promover energia para o microrganismo, divisão celular, tolerância às elevadas temperaturas do hospedeiro e a construção de uma parede celular robusta. Quanto à defesa do organismo contra estes microrganismos, as células fagocíticas (principalmente macrófagos e neutrófilos) desempenham um papel fundamental na prevenção da infecção por *C. albicans*. Essas células imunes inatas tentam reconhecer as

células de *albicans* inicialmente através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que detectam moléculas associadas a patógenos específicos padrões (PAMPs) que são padrões de moléculas reconhecidas pelas células do sistema imune inato como sinal de invasão por um grupo de agentes patogênicos. Os autores acima citados relataram também que as células de *C. albicans* que são engolfadas pelos macrófagos são capazes de matar e escapar dos macrófagos.

Maisch et al.<sup>57</sup>, em 2015, realizaram uma revisão de literatura sobre a resistência dos microrganismos às diferentes terapias. Relataram que as bactérias e fungos desenvolvem resistência contra antibióticos em um curto espaço de tempo. Algumas bactérias naturalmente têm um fenótipo de baixa suscetibilidade a antibióticos (resistência intrínseca). Uma nova terapia, chamada terapia fotodinâmica (aPDT), foi sugerida como terapia alternativa contra microrganismos multirresistentes. Para a ação da aPDT necessita de um fotossensibilizador e luz de comprimento de onda adequada e da presença de oxigênio. A reação desses componentes promove a formação de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singleto, peróxido de hidrogênio, ânion radical superóxido e o radical hidroxila, o qual ocasiona dano aos microrganismos. O oxigênio singleto foi identificado como um indutor direto do fator sigma do tipo RpoHII. O fator sigma do tipo RpoHII é necessário para a expressão de vários fatores de defesa dos microrganismos. Ativação do gene RpoHII promove diretamente a expressão de proteínas envolvidas na extinção e desintoxicação de ROS. O peróxido de hidrogênio serve como uma molécula de sensor, ativando o fator de transcrição OxyR que regula a expressão das enzimas catalase e peroxidase que codificam o OxyR. Os microrganismos se adaptam ao estresse oxidativo, produzido pelo ROS. ROS é conhecida por oxidar efetivamente uma grande variedade de biomoléculas e, finalmente, causar danos biológicos substanciais. Portanto, a capacidade de se adaptar ao estresse oxidativo é de fundamental importância para a sobrevivência bacteriana em seu ambiente natural. Em geral, as bactérias desenvolveram vários mecanismos para driblar o estresse oxidativo do ambiente. Este sistema de proteção consiste em uma rede enzimática de proteínas reativas como catalase, peroxidase, desintoxicante reativas. Radicais hidroxila, ânions

superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio singleto são as moléculas mais relevantes que podem induzir estresse oxidativo por aPDT. A geração de oxigênio singleto aumenta a atividade da alternativa do grupo IV  $\sigma$ -factor,  $\sigma^E$  que é responsável pela transcrição e ativação de genes que protegem as células de ROS. A resistência dos microrganismos às diferentes terapias é atribuída aos seguintes fatores: 1- Diversidade genética dentro do biofilme: a diversidade genética pode proteger os microrganismos de condições ambientais instáveis. Isso significa que certas subpopulações bacterianas dentro do biofilme apresentam uma capacidade aumentada de disseminar ou acelerar a formação de biofilme; 2- A expressão gênica; 3- Matriz de biofilme: o EPS (substância extrapolimérica) é uma estrutura 3D que atua como barreira antimicrobiana para proteger o biofilme; 4- Comunicação via quorum sensing: a capacidade das bactérias para se comunicar dentro de um biofilme tem a vantagem de que bactérias podem se adaptar às mudanças ambientais muito velozes. Normalmente, a permeabilidade do EPS diminui fortemente com o aumento do volume de biomassa do biofilme (biofilme maduro vs. biofilme jovem). No entanto, quando a quantidade de ROS gerada é suficientemente alta, os níveis de proteína de defesa basal são insuficientes para eliminar os ROS, de modo que as bactérias não podem sobreviver.

Gulati et al.<sup>2</sup>, em 2016, realizaram uma revisão de literatura acerca do desenvolvimento, regulação e mecanismos moleculares dos biofilmes de *C. albicans*. Segundo os autores, *C. albicans*, que é um microrganismo comensal, que pode se tornar invasivo frente a alterações no hospedeiro, tais como alterações no pH, mudanças nutricionais, uso de antibióticos e alterações no sistema imunológico. A formação dos biofilmes se inicia com a adesão dos microrganismos a uma superfície, seguida da proliferação e filamentação das células aderidas. Na fase seguinte, ocorre a maturação do biofilme e secreção de polissacarídeos extracelulares, resultando em uma rede complexa de células envoltas por uma matriz extracelular. Segundo os autores, as células do sistema imune inato são capazes de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) da forma patogênica de *C. albicans*, o que pode ocasionar destruição das células de *C. albicans*. Este processo inclui células epiteliais, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, sendo que os

neutrófilos circundantes tendem a ser inativos e não conseguem desencadear espécies de oxigênio reativas. A resistência dos biofilmes de *C. albicans* ocasiona a morte de neutrófilos a qual é atribuída à presença de glucanos na matriz extracelular que inibem a ativação de neutrófilos.

Xu et al.<sup>58</sup>, em 2016, utilizando culturas epiteliais orais, tecido reconstituído de mucosa bucal e um modelo murino de infecção oral, demonstraram que *S. oralis* aumentou a capacidade de invasão de *C. albicans* através de junções epiteliais. *C. albicans* e *S. oralis* diminuíram os níveis epiteliais de E-caderina aumentando sinergicamente a calpaína- $\mu$ , uma enzima proteolítica que tem como alvo a E-caderina. No modelo de co-infecção de camundongos, o quadro foi acompanhado pelo aumento da disseminação de fungos nos rins. A co-infecção com a aspartil-protease secretada (*sap*) mutante *sap2456* e *S. oralis* aumentou a  $\mu$ -calpaína e desencadeou a invasão da mucosa e a disseminação sistêmica, sugerindo que a atividade fúngica da protease não é necessária para a invasão durante a co-infecção. Os autores concluíram que *C. albicans* e *S. oralis* atuam sinergicamente para ativar enzimas do hospedeiro que clivam as proteínas da junção epitelial e aumentam a invasão fúngica.

Segundo Gow et al.<sup>59</sup>, em 2017, *Candida albicans* é um fungo comensal inofensivo aos seres humanos, entretanto, pode causar infecções superficiais na mucosa (candidíase oral/vaginal) e infecções da pele ou unhas. Esse fungo também pode se tornar invasivo, causando infecções sistêmicas e sanguíneas que ameaçam a vida em hospedeiros imunocomprometidos, onde a taxa de mortalidade pode alcançar até 50%. *C. albicans* pode inibir a ativação do sistema imunológico do hospedeiro, inativar peptídeos antimicrobianos, enfraquecendo assim as defesas do hospedeiro. Medicamentos antifúngicos que atuam em  $\beta$ -1,3 glucanos da parede celular (equinocandinas) ou na biossíntese do ergosterol (azóis) têm sido utilizados como medicamentos de primeira linha no tratamento de infecções. No entanto, mas tem sido relatado o desenvolvimento de resistência de diferentes cepas de *C. albicans* a esses agentes.

Kashef et al.<sup>60</sup>, em 2017, realizaram uma revisão de literatura sobre a suscetibilidade de bactérias ao estresse oxidativo. Relataram que os microrganismos desenvolveram mecanismos de resistência que lhes permitiram sobreviver, resistência esta que pode ser categorizada em dois mecanismos: 1. Resistência intrínseca ou inata, em que o microrganismo já apresenta resistência inata a determinado medicamento sem exposição prévia ao mesmo. 2. Resistência adquirida em que um microrganismo naturalmente suscetível desenvolve mecanismos de resistência após exposição sucessiva a determinada droga que impedem que ele seja afetado pela mesma. Segundo os autores, os mecanismos de resistência adquiridos podem ocorrer de várias formas: a. presença de uma enzima que inativa o agente antimicrobiano; b. uma mutação no alvo antimicrobiano do agente, o que reduz a ligação do agente antimicrobiano; c. redução da absorção do agente antimicrobiano na célula; e, d. efluxo ativo do agente antimicrobiano fora da célula. Os autores relataram ainda que as ROS geradas pela terapia fotodinâmica provoca a morte microbiana e dano celular através de três mecanismos: a) dano da membrana celular (ou envelope de vírus); b) inativação de enzimas e proteínas essenciais; e / ou c) dano ao DNA. Para a eficiência da aPDT, o fotossensibilizador precisa penetrar a parede celular do microrganismo. No entanto, as barreiras de membrana da célula bacteriana limitam a difusão do fotossensibilizador. As paredes celulares das células fúngicas têm uma estrutura externa a qual é uma camada moderadamente porosa de  $\beta$ -glucana e polissacarídeos de manana. As ROS atuam tanto na base quanto nas moléculas de açúcar, produzindo quebras de cadeias de açúcares, de ligações cruzadas com outras moléculas e lesões de replicação no DNA. Todas estas modificações são prejudiciais à célula e ocasionam perda de função das membranas. Quando os níveis de EROs excedem os limites de segurança, os microrganismos têm a capacidade de organizar uma resposta induzida, resultando no aumento da expressão de enzimas de desintoxicação ROS juntamente com sistemas de proteção adicionais que reparam o dano oxidativo e protegem as enzimas suscetíveis da inativação. OxyR, PerR e OhrR atuam como fatores de defesa ao estresse oxidativo. OxyR e PerR são principalmente sensores de  $H_2O_2$ , enquanto OhrR detecta peróxidos orgânicos (ROOH). Outro sistema regulatório bem caracterizado de estresse oxidativo de defesa é

SoxRS, que regula o superóxido. SoxR (resposta de superóxido regulador) estimula a expressão de SoxS, que subsequentemente induz aos genes de defesa de estresse. Os autores explicaram a resistência do biofilme à aPDT. Segundo os autores, tem sido demonstrado que as bactérias que crescem como biofilmes são menos suscetíveis à aPDT em comparação com suas formas planctônicas equivalentes. De fato, células crescendo em biofilmes diferem de suas contrapartes planctônicas em vários aspectos: como estrutura e composição da parede celular, taxa de crescimento e presença de adesina intercelular polissacarídica (PIA), que pode bloquear tanto a absorção do PS como a penetração da luz, reduzindo assim a eficiência de fotossensibilização.

Segundo Karanja et al.<sup>61</sup>, em 2017, *C. albicans* é o fungo mais prevalente em infecções fúngicas da corrente sanguínea em todo o mundo causando mortalidade de até 50%. Esta alta taxa de mortalidade pode ser atribuída à dificuldade de iniciar uma terapia antifúngica adequada no início da infecção. Segundo os autores o atraso de 12 horas para início da terapêutica antifúngica apropriada resulta em aumento expressivo nas taxas de mortalidade principalmente quando as mesmas são ocasionadas por cepas resistentes. A administração precoce de terapia antifúngica apropriada é prejudicada pela lentidão das técnicas convencionais utilizadas para avaliar a sensibilidade dos microrganismos a drogas. Buscando uma solução para o problema os autores avaliaram por meio de espectroscopia RAMAN (SRS) as diferenças metabólicas entre cepas sensíveis e resistentes ao fluconazol em um nível celular em busca de diferentes características metabólicas uma vez que o metabolismo é essencial para a patogenicidade. Considerando que são necessárias apenas algumas horas para observar um ciclo metabólico completo em *C. albicans*, o perfil metabólico fornece um caminho para o teste rápido de susceptibilidade antimicrobiana. Imagens SRS revelaram diferenças significativas na lipogênese entre os *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol. A exposição ao fluconazol, droga antimicrobiana que atua na biossíntese do ergosterol, afetou apenas a lipogênese da cepa susceptível. Os autores concluíram que a espectroscopia RAMAN (SRS) pode ser usada para a detecção rápida da susceptibilidade antimicrobiana.

Hu et al.<sup>62</sup>, em 2018, realizaram uma revisão de literatura sobre a atuação da aPDT nos biofilmes e em mecanismos mediados por ROS. ROS são produzidas por fotoativação e atacam alvos adjacentes, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos presentes dentro da matriz de biofilme. Os autores descreveram que o biofilme é uma população microbiana envolta por uma matriz extracelular auto secretada, composta por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular, vesículas de membrana, etc. Os componentes do biofilme são: 1. substâncias poliméricas extracelulares (EPS), as quais representam pelo menos 90% em peso do biofilme total, e contribui para a complexidade estrutural e força do biofilme. A matriz representa a primeira linha de defesa contra a difusão de antimicrobianos e também restringe a penetração do fotossensibilizador (PS). A membrana citoplasmática do fungo tem uma bicamada fosfolipídica contendo proteínas e a superfície celular de *C. albicans* possui uma parede celular complexa contendo principalmente quitina, glucana e glicoproteínas. A membrana citoplasmática separa o interior da célula do ambiente externo e é seletivamente permeável aos íons inorgânicos e algumas moléculas orgânicas, controlando a absorção e excreção de substâncias metabólicas. A aPDT emprega luz visível com comprimento de onda específico para excitar ao fotossensibilizador, sendo que após a irradiação, ocorre a formação de espécies reativas ROS. O mecanismo tipo I é um elétron de transferência para formar espécies reativas de oxigênio tóxicas (como superóxido, e radicais hidroxila) e o mecanismo do tipo II produz oxigênio singlete. As duas reações podem ocorrer simultaneamente. A aPDT pode ocasionar degradação enzimática extracelular, sendo que enzimas destruidoras de EPS incluem a dispersina e nucleases que podem degradar o DNA extracelular (também componente importante da matriz do biofilme) e proteases como a proteinase K. As ROS podem enfraquecer e degradar a estrutura da matriz e dos EPS. O processo anti-biofilme da aPDT inclui dois passos: 1) - O fotossensibilizador inicialmente se liga à matriz do biofilme e, em algumas ocasiões, o PS pode ser sequestrado pelo EPS, enquanto em outros casos, o fotossensibilizador (PS) penetra parcialmente no EPS e entra em contato com as células microbianas. Alguns tipos de PS se ligam à célula superfície, enquanto outros tipos de PS passam através do citoplasma da membrana e chegam ao citoplasma celular e até mesmo atingem organelas

celulares e o núcleo das células fúngicas. Assim as ROS geradas podem atuar em uma variedade de moléculas adjacentes, incluindo alvos dentro do biofilme (por exemplo, polissacarídeos), na superfície celular e dentro das células (por exemplo, proteínas e DNA), resultando no colapso da matriz do biofilme e desintegração de células microbianas 2)- De modo geral, as ROS promovem danos oxidativos que ocasionam destruição da matriz do biofilme que é a primeira linha de defesa contra a maior parte do stress ambiental, incluindo aPDT. Os polissacarídeos e outros constituintes do biofilme, como proteínas, lipídios, DNA, são facilmente oxidados por ROS, sendo irreversivelmente danificados. Alguns PS estão fortemente ligados à superfície celular e podem penetrar nas células, ocasionando dano celular, como a clorina (e6). De modo geral, aPDT pode oxidar irreversivelmente os componentes vitais das células promovendo oxidação de lipídeos insaturados, destruindo DNA (particularmente bases de guanina) e inativando proteínas. A principal consequência de danificar a membrana externa é a alteração na permeabilidade da membrana, responsável pela morte das células microbianas, por aPDT.

Segundo Chien et al.<sup>63</sup>, em 2018, as drogas antifúngicas atualmente disponíveis são limitadas e ineficazes contra cepas resistentes. Dessa forma, o desenvolvimento de novos medicamentos ou abordagens terapêuticas alternativas para controlar infecções fúngicas é necessário e a aPDT têm sido promissoras para a erradicação de infecções. Embora as respostas citoprotetoras induzidas pela terapia fotodinâmica têm sido amplamente estudadas em células cancerígenas, os mecanismos pelos quais *C. albicans* responde a aPDT são desconhecidos. Neste estudo, os autores demonstraram que a aPDT induz a ativação de Hog1p de *C. albicans*. A deleção de qualquer um dos genes SSK2, PBS2 e HOG1 diminuiu significativamente a taxa de sobrevivência após reações fotoquímicas, indicando que o Hog1 SAPK é necessário para tolerância a aPDT. Além disso, o fator de transcrição Cap1, que regula vários genes antioxidantes, foi altamente expresso durante a resposta à aPDT e a perda de CAP1 também resultou na diminuição das taxas de sobrevivência de *C. albicans*. Segundo os autores, o estudo demonstrou a importância do Hog1 SAPK e do fator de transcrição Cap1, o qual regulam a



resistência ao estresse oxidativo frente a aPDT em *C. albicans*. A compreensão dos mecanismos pelos quais *C. albicans* responde à aPDT e, conseqüentemente, elimina as ROS será muito útil para o desenvolvimento de terapêuticas para controlar doenças infecciosas fúngicas, particularmente as das infecções da pele e das mucosas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material

Para a realização da fase experimental do presente estudo, foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentais e equipamentos:

#### 4.1.1 Material de consumo

- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 5µg/mL de cloranfenicol (Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, EUA).
- Água destilada.
- Meio de cultura RPMI 1640 (HIMEDIA, Mumbai, Sigma).
- Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm) (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Cloridrato de Xilazina (Produtos Veterinários J. A. Ltda., Patrocínio Paulista, São Paulo, Brasil).
- Ponteira amarela para micropipeta 20-200 µL (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Ponteira azul para micropipeta 100- 10000 µL (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Ponteira para micropipeta 5 mL (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Tubo tipo FALCON cônico (Biogen, São Paulo, São Paulo, Brasil).
- Cloridrato de Ketamina (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil).
- Prednisolona 40 mg - DEPO-MEDROL (Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, São Paulo, Brasil).
- Tetraciclina 1 g (Farmácia Reativa, Araraquara, São Paulo, Brasil)
- Seringa descartê 1 mL com agulha.
- Formaldeído PA (QUEMIS, Joinville, Santa Catarina, Brasil).
- Cloridrato de clorpromazina - medicamento para uso veterinário (Farmácia Reativa, Araraquara, São Paulo, Brasil).
- Cotonetes (Cotonetes Johnson & Johnson. Ind. Com. Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil).
- Nistatina Suspensão Oral 100.000 UI/ mL (Laboratórios Teuto Ltda., Guarulhos, São Paulo, Brasil)

- Gel Natrosol 200 g (Farmácia Reativa, Araraquara, São Paulo, Brasil).
- Potodithazine - Fotoditazin® (Veta-Grand Co., Moscou, Rússia)
- Placas de Petri 90 X 15 mm (Pleion, Barueri, São Paulo, Brasil).
- Água Mili-Q.
- Alça de inoculação 10 µL (Laborplast, Cassinetta di Lugagnano, MI, Itália).
- Tubo tipo eppendorf 1,5 mL (Axygen, Curitiba, Paraná, Brasil).
- Cepa padrão de *C. albicans* resistente a fluconazol, ATCC 96901(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).
- Cloreto de Sódio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).
- Cloreto de Cálcio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).
- Sulfato de Magnésio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).
- Fosfato de Potássio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).
- MOPS Purificado (Quemis, Joinville, Santa Catarina, Brasil).
- Cloreto de Potássio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).
- Parafina histologica (56-58) marca SYNTH.
- Xilol PA 1000mL, marca Synth.
- Laminulas para microscopia, 24X60mm, marca PERFECTA.
- Álcool de 70%
- Álcool de 90 %
- Coloração PAS – Ácido periódico de Shiff (LEICA Biosystems)

#### 4.1.2 Instrumental

- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil).
- Proveta graduada (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil).
- Micropipeta de 0,5-10 µL (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Micropipeta de 20-200 µL (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Micropipeta de 100-1000 µL (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Bico de Bunsen (J.Prolab, São José do Pinhal, Paraná, Brasil).
- Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil).
- Tesoura cirúrgica de ponta fina reta (CBS Médico, São Paulo, São Paulo, Brasil).

- Cabo de bisturi reto (ABC Instrumentos Cirúrgicos, São Paulo, Brasil).
- Pinça clínica (DUFLEX, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil).
- Lâminas para bisturi (Lamedid, Barueri, Brasil).
- Lâminas para microscopia 26 x 76 mm, lapidada (Perfecta, São Paulo, São Paulo, Brasil)
- Lamínulas para microscopia 24 x 60 mm (Perfecta, São Paulo, São Paulo, Brasil)

#### **4.1.3 Equipamento**

- Autoclave vertical Modelo: AV 60. No 6614 (PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil).
- Agitador de tubos Modelo: AP 56. Série: 9803 (PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil).
- Aparelho de luz LED, 660 nm, (LXHL-PR09, Luxeon III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California USA), desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos – USP São Carlos – Brasil.
- Balança de precisão Modelo: BG 400. No 016450. (GEHAKA – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, São Paulo, Brasil). Estufa para secagem e esterilização Modelo: MA 033. Série: 9819 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil).
- Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324. Série – 9819011 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil).
- Espectrofotômetro UV-VIS 200-1000 nm banda: 5nm (Biospectro, Curitiba, Paraná, Brasil).

## 4.2 Método

### 4.2.1 Reativação da cepa e padronização do inóculo

A cepa de *C. albicans* ATCC 96901 (cepa resistente a fluconazol) (Rockville, MD), utilizada para a indução da candidose nos animais, foi descongelada e reativada em meio de cultura Ágar Sabureaud Dextrose com cloranfenicol 5µg/mL (SDA) e incubada a 37°C por 48 horas. A seguir, a cepa foi cultivada em tubo falcon com 10mL de RPMI 1640 e incubada em uma incubadora com agitação orbital a 37°C por 16 horas. Após a incubação, o tubo falcon foi centrifugado a 4000 rpm, durante 10 minutos, sendo que o sobrenadante foi descartado e as células (sedimentado) foram lavadas em 5 mL de água destilada estéril por 3 vezes.

Após o procedimento de lavagem, as células foram ressuspensas em 3mL de meio RPMI, e ajustadas em espectrofotômetro a 540 nm, a uma densidade ótica de 1 de absorbância. Dessa maneira, foram obtidas as suspensões celulares padronizadas do microrganismo avaliado, em uma mesma concentração celular ( $10^7$  células/mL). Baseado em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa.<sup>29,64</sup>

### 4.2.2 Parâmetros de irradiação e preparo do fotossensibilizador

No presente estudo, foi utilizado o aparelho de luz LED vermelha (LXHL-PR09, Luxeon® III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, Califórnia, USA) com banda de absorção de 660 nm, sendo que a potência de saída da luz na extremidade do aparelho (5 mm de diâmetro) foi de 44,6 mW/cm<sup>2</sup>. Foi aplicada dose de luz de 50 J/cm<sup>2</sup> sobre as línguas dos animais (durante 19 min). Essa quantidade de energia é denominada fluência ou dose de luz, e é expressa pela energia por área (J/cm<sup>2</sup>).<sup>45</sup>

Como fotossensibilizador (FS) foi utilizado a Photodithazine® (PDZ), um derivado de clorina e<sub>6</sub>, produzido em Moscou (Rússia - VETAGRAND, Co). O FS foi preparado na concentração de 200 mg/L, o qual foi diluído em 480 µl de gel natrosol e 20 µl de PDZ, misturado com uma ponteira até obter uma solução uniforme. Logo colocado em microtubo do tipo eppendorf e coberto de papel alumínio para evitar o contato com a luz.

### 4.2.3 Indução de candidose oral nos animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Processo 33/2016 ANEXO A). Foram utilizados 174 camundongos fêmeas da linhagem Swiss com aproximadamente 5 semanas de vida, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) foram utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais por grupos de estudo, em uma sala com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e alimentados com ração e água *ad libitum*.

Para indução da candidose oral foi utilizada a metodologia descrita por Takakura et al.<sup>38</sup> (2003) e Carmello et al.<sup>28</sup> (2016) com algumas modificações. Tetraciclina (0,83 mg/mL) foi administrada na água que era disponibilizada para os animais ingerirem durante todo período experimental. Os animais foram imunossuprimidos com injeções subcutâneas de prednisolona na dose de 100 mg/kg de massa corporal, de acordo com o período avaliado para os animais sacrificados 24 horas após os tratamentos, sendo que a imunossupressão foi realizada nos dias 1 e 5; e para os animais sacrificados após 7 dias do tratamento, a imunossupressão foi realizada nos dias 1, 5 e 13.

No dia 2 do experimento foi realizada a inoculação, sendo que para isso, os animais foram sedados com 0,1 mL de cloridrato de clorpromazina 2 mg/mL, e, mini-swabs estéreis embebidos na suspensão de *C. albicans* foram friccionados por todo o dorso da língua dos animais, por 30 segundos, para causar a infecção.

O Quadro 1, a seguir, mostra resumidamente as etapas realizadas durante todo o período experimental.

**Quadro 1-** Etapas realizadas para indução da infecção e tratamento dos animais

<b>DIAS</b>	<b>PROTOCOLO EXPERIMENTAL (PROCEDIMENTOS)</b>
<b>1 a 18</b>	Antibioticoterapia
<b>1 e 5</b>	1, 5: períodos de imunossupressão para animais sacrificados 24 horas após o término do tratamento (dia 12)
<b>1, 5 e 13</b>	1, 5 e 13: períodos de imunossupressão para animais sacrificados 7 dias após o término do tratamento (dia 18)
<b>2</b>	Inoculação por <i>C. albicans</i>
<b>7 a 11</b>	Realização dos tratamentos (aPDT e/ou NYS)
<b>12</b>	Sacrifício dos animais 24 horas após o termino do tratamento
<b>11 e 18</b>	11: Recuperação de <i>C. albicans</i> dos animais de 24 horas, após o termino do tratamento 18: Recuperação de <i>C. albicans</i> e sacrifício dos animais de 7 dias após o termino do tratamento

**Fonte:** Elaboração própria.

#### **4.2.4 Realização dos tratamentos**

Para a realização dos tratamentos, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com o Quadro 2. Os tratamentos foram realizados uma vez ao dia (do dia 7 ao dia 11), durante 5 dias.

**Quadro 2** – Descrição dos grupos de estudo e condições experimentais

GRUPO	DESCRIÇÃO	24 HORAS (n)	7 DIAS (n)	TOTAL (n)
P+L+ (aPDT)	Aplicação de 200 mg/L de PDZ e iluminação com LED 50 J/cm <sup>2</sup> (a PDT)	12	12	24
P+L-	Aplicação de 200 mg/L de PDZ.	12	12	24
P-L+	Iluminação com 50 J/cm <sup>2</sup> (19 minutos) de luz LED.	12	12	24
P-L-	Os animais não foram tratados. Controle negativo de trabalho.	12	12	24
NYS	Os animais foram tratados com Nistatina. Controle positivo de trabalho.	12	12	24
P+L+NYS	Tratados com aPDT, seguido da Nistatina.	12	12	24
NYS+P+L+	Aplicação de Nistatina, seguida da aPDT.	12	12	24
CNI	Controle Negativo da infecção. Animais saudáveis.	3	3	6
<b>TOTAL</b>		<b>87</b>	<b>87</b>	<b>174</b>

Nota:

P+L+ (aPDT)	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
P+L-	Aplicação de só fotossensibilizador
P-L+	Aplicação de só luz LED
P-L-	Controle negativo de trabalho
NYS	Nistatina
P+L+NYS	Terapia fotodinâmica antimicrobiana + Nistatina
NYS+P+L+	Nistatina + Terapia fotodinâmica antimicrobiana
CNI	Controle negativo da infecção

**Fonte:** Elaboração própria.

•Grupo P+L+ (aPDT)

Os animais pertencentes a este grupo, foram anestesiados (30 UI) intraperitonealmente por meio de injeção de solução anestésica contendo Ketamina (anestésico geral), Xilazina (relaxante muscular) e soro fisiológico. Em seguida, eles foram colocados em posição supina na mesa de trabalho, e cuidadosamente a língua foi posicionada para fora da cavidade oral, com ajuda de uma pinça clínica. Imediatamente foi aplicado PDZ (0,1mL) com seringa de insulina descartável de 1mL, sem agulha, sobre o dorso da língua dos camundongos. A língua desses animais era posicionada para dentro da



cavidade bucal, sendo que eles permaneciam no escuro para incubação do FS por um período de 20 minutos (tempo de pré-irradiação).

Transcorrido esse período, a língua dos camundongos foi posicionada delicadamente para fora da cavidade oral para iluminação. Para isso, a extremidade da caneta LED era colocada em contato com o dorso lingual e iluminado  $50 \text{ J/cm}^2$  (19 min). O tratamento foi realizado por 5 dias, sendo uma aplicação por dia.

- Grupo P+L-

Os animais pertencentes a este grupo foram anestesiados intraperitonealmente logo receberam apenas aplicação do FS como descrito para o Grupo P+L+, por 5 dias, sendo uma aplicação por dia. Não foi realizada iluminação, a fim de verificar o efeito do FS aplicado.

- Grupo P-L+

Neste grupo experimental os animais também foram anestesiados, as línguas foram umedecidas com soro fisiológico e iluminadas com  $50 \text{ J/cm}^2$  LED (19min) por 5 dias, conforme descrito para o Grupo P+L+, para verificar o efeito da luz sobre o microrganismo.

- Grupo P-L-

Os animais pertencentes a este grupo foram submetidos ao processo de indução de candidose, não receberam nenhum tratamento e não foram anestesiados. Esse grupo foi considerado o controle negativo de trabalho.

- Grupo NYS

Os animais pertencentes a este grupo também foram anestesiados e receberam tratamento com Nistatina suspensão oral  $100.000 \text{ UI/mL}$ . Foi aplicado  $0,1 \text{ mL}$  do antifúngico sobre as línguas dos animais, o qual permaneceu sobre o tecido durante 39 minutos. Esse tempo foi equivalente ao tratamento com P+L+ (aPDT) (tempo de pré-irradiação + iluminação). O tratamento com NYS também foi realizado durante 5 dias consecutivos, sendo 1 aplicação por dia.

- Grupo CNI

Esse grupo era constituído de animais saudáveis, os quais não receberam inoculação e nem tratamento, nem foram anestesiados.

- Grupo P+L+ NYS

Neste grupo experimental, os animais foram submetidos aos dois tratamentos, para investigar a efetividade das terapias combinadas. Foi realizada a aPDT conforme descrito para o grupo P+L+ (aPDT) e, a seguir, foi aplicado o antifúngico conforme descrito para o grupo de NYS. A combinação de terapias também foi realizada durante 5 dias consecutivos, sendo 1 aplicação por dia. Os animais de este grupo foram anestesiados conforme descrito anteriormente, inicialmente com uma dose de 30 UI, e, a anestesia foi complementada com uma segunda dose (reforço) de 10 UI.

- Grupo NYS + P+L+

Para avaliar se a ordem de aplicação das terapias teria diferença sobre a inativação microbiana, neste grupo os animais foram submetidos à terapia combinada em ordem inversa à descrita anteriormente, sendo a aplicação da Nistatina realizada previamente à aPDT, como descrito previamente para o grupo P+L+NYS.

#### **4.2.5 Recuperação de *Candida albicans* e contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL)**

Após o término dos tratamentos, foi realizada a recuperação de *C. albicans* da língua dos animais. Para a realização da coleta do microrganismo, mini-swabs estéreis foram esfregados sobre o dorso da língua dos animais por 1 minuto.

A coleta foi realizada imediatamente após os tratamentos (dia 11) para os animais a serem sacrificados 24 horas após o término dos tratamentos e no dia 18 para os animais sacrificados 7 dias após o término dos tratamentos.

Tubos de Eppendorf com 900 µL de PBS, contendo no interior mini-swabs, com *C. albicans* recuperadas das línguas dos animais, foram colocados em gelo para seu traslado até o laboratório de microbiologia. Os tubos foram

agitados em vortex durante 1 minuto para o desprendimento do fungo do mini-swab para a solução salina. Na sequência, diluições seriadas foram realizadas na ordem de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ . Alíquotas de 25  $\mu$ l de cada diluição foram semeadas em duplicata, sobre placas petri contendo meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol 5 $\mu$ g/mL (SDA), as quais foram incubadas a 37°C por 48 horas. Decorrido esse período, a contagem de colônias foi realizada e o número de UFC/mL, determinado.

#### **4.2.6 Análise macroscópica das lesões**

As lesões, manchas brancas ou pseudomembrana e inflamação aspecto vermelho no dorso da língua, foram fotografadas antes do início dos tratamentos, e 24 horas e 7 dias após os mesmos. Todas as fotografias foram padronizadas e obtidas com a mesma câmera digital (Sony Cyber-Shot DSC-F717; Sony Corporation, Tóquio, Japão), através do mesmo operador, calibrado e sob as mesmas condições (lugar, luz, ângulo e posição dos animais), visando assim facilitar a reprodutibilidade. Cada fotografia foi avaliada de acordo com o programa ImageJ.exe. (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/install/windows.html>), por um mesmo operador, calibrado. No ImageJ.exe, o cálculo da área (porcentagem das lesões sobre o total da área da língua (%)) é feito pela contagem de pixels da região selecionada (dorso da língua) pelo usuário com as ferramentas do software.

#### **4.2.7 Sacrifício dos animais, análise histológica**

O sacrifício dos camundongos foi realizado por meio da aplicação de uma dose letal de ketamina (0,2 mL) e Xilazina (0,4mL), injetada intramuscularmente na região do fêmur, 24 horas e 7 dias após o término dos tratamentos descritos.

Com ajuda de uma tesoura clínica, as línguas dos animais foram cirurgicamente removidas e divididas transversalmente em três partes. Apenas a porção central do dorso que é a parte, mas adequada para realização dos cortes histológicos por estar revestida por um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, foi utilizada para a análise histológica. Para o processamento histológico, a parte central de cada uma das línguas removidas foi colocada em

cassetes, os quais foram identificados de acordo com o grupo experimental e imersos em um recipiente com formol 10% (pH 7,4). Imediatamente após realização dos cortes das línguas e previamente à inclusão das peças em parafina foi realizado o seguinte processo laboratorial:

1. Fase de desidratação por trocas consecutivas de álcoois em concentrações crescentes:

- álcool 70% por 1 hora;
- álcool 90% por 1 hora;
- álcool absoluto, 6 trocas de 1 em 1 hora.

2. Fase de diafanização:

- álcool xilol por 30 minutos;
- Xilol-puro por 30 minutos;
- Novo xilol piro por mais 30 minutos.

3. Fase de embebição em parafina histológica a 58° C:

- Parafina líquida por 3 horas;
- Nova parafina líquida por mais 3 horas.

As amostras foram incluídas em formas de papel contendo parafina líquida após o processamento laboratorial. Após endurecimento da parafina tais formas foram removidas e, com o auxílio de navalhas descartáveis foram obtidos blocos de parafina que continham as peças incluídas centralmente. Esses blocos foram fixados em suportes de madeira para serem posicionados em microtomo rotatório. Dezesesseis cortes histológicos seriados de cada bloco foram obtidos. Esses cortes apresentavam 6 µm de espessura, os quais foram colocados em lâminas de vidro e corados com reagente ácido periódico de Schiff (PAS), Hematoxolina e Eosina (HE) para posterior avaliação dos eventos histológicos ocorridos em cada um dos grupos através de microscopia de luz, em aumento de 64x 125x e 250x. Foram avaliados os seguintes aspectos: presença/ausência de fungo e infiltrado inflamatório, integridade do tecido epitelial, resposta do tecido conjuntivo subjacente. O material foi classificado em escores (Quadro 3) por um único examinador, experiente e calibrado (Prof. Carlos Alberto de Souza Costa do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP), e os eventos histopatológicos observados na região da mucosa, para cada grupo experimental, foram descritos nos diversos períodos de avaliação.

**Quadro 3** - Classificação dos eventos histopatológicos (ISO 7405:1997)

<b>Escore</b>	<b>Evento histológico</b>
0	Inflamação ausente
1	Inflamação discreta
2	Inflamação moderada
3	Inflamação severa
4	Formação de abscesso

**Fonte:** Elaboração própria.

### 4.3 Análise Estatística

Os dados das contagens de colônias de *C. albicans* foram transformados em logaritmos de base10. Os dados apresentaram distribuição normal (Teste Shapiro - Wilk,  $p = > 0.05$ ) e heterocedasticidade (Teste Levene's  $p = < 0.05$ ). Foi utilizado Anova a dois fatores (tratamento e o tempo) seguida de post- teste de Games Howell ( $\alpha = 5\%$ ).

Os valores percentuais relacionados à área de extensão das lesões da língua referente ao período de 24 horas atendeu aos pressupostos de normalidade (Teste Shapiro - Wilk,  $p = > 0.05$ ) e heterocedasticidade (Teste Levene's  $p = < 0.05$ ), sendo então submetidos a Anova um fator com post-teste de Games Howell ( $\alpha = 5\%$ ). O período de 7 dias atendeu aos pressupostos de normalidade (Teste Shapiro - Wilk,  $p = > 0.05$ ) e homocedasticidade (Teste Levene's  $p = > 0.05$ ), sendo então submetidos a Anova um fator com post-teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Microbiológica

Para avaliar a efetividade da aPDT mediada pelo fotossensibilizador PDZ associada à luz LED, os dados foram submetidos a Análise de Variância a dois fatores (Anova dois fatores), sendo os grupos experimentais e os intervalos de tempo (24 horas e 7 dias após os tratamentos), utilizados como efeitos principais. (Tabela 1).

**Tabela 1** - Sumário da Análise de Variância Anova dois fatores para a contagem de log (UFC/mL) em função dos grupos experimentais realizados em diferentes intervalos de tempo (24 horas e 7 dias)

Origem	Tipo II		Quadrado		Eta		Noncent. Parâmetro	Poder observado <sup>b</sup>
	Soma dos Quadrados	gl	Médio	F	Sig.	parcial quadrado		
Grupos	43,587	6	7,265	22,888	,000	,522	137,330	1,000
Tempo	27,262	1	27,262	85,895	,000	,405	85,895	1,000
Grupos*tempo	9,672	6	1,612	5,079	,000	,195	30,472	1,000
Erro	39,991	126	,317					
Total	2282,296	140						
Total corrigido	120,512	139						

**Fonte:** Elaboração própria

Como pode ser observado, houve interação entre os fatores grupo de tratamento e intervalo de tempo. Além disso, também houve diferença estatística entre os grupos e entre os tempos. Tabela 2 apresenta as medias das comparações entre os grupos experimentais e o tempo avaliado. Dados originais no apêndices. (APÊNDICES).

**Tabela 2** - Valores médios das comparações para a contagem de log (UFC/mL) entre os grupos experimentais e o tempo avaliado (24 horas e 7 dias)

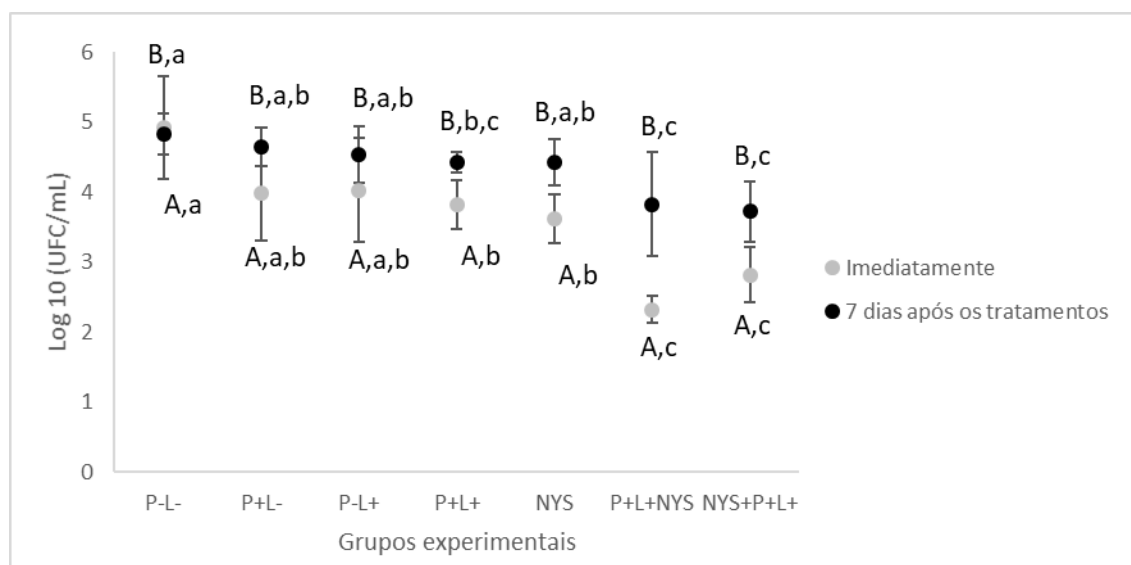
Grupo	Tempo	Media	Erro	Intervalo de confiança 95%	
				Limite Inferior	Limite superior
1	7	4.823	.178	4.470	5.176
	24	4.918	.178	4.566	5.271
2	7	4.635	.178	4.283	4.988
	24	3.978	.178	3.625	4.330
3	7	4.529	.178	4.176	4.881
	24	4.026	.178	3.674	4.379
4	7	4.373	.178	4.021	4.726
	24	3.426	.178	3.073	3.779
5	7	4.418	.178	4.065	4.771
	24	2.954	.178	2.601	3.306
6	7	3.875	.178	3.523	4.228
	24	2.553	.178	2.200	2.905
7	7	3.942	.178	3.590	4.295
	24	2.563	.178	2.211	2.916

**Fonte:** Elaboração própria

De acordo com análise acima, os dados indicam que pelo menos um grupo apresenta média diferente dos demais.

Em razão disso, um teste “post hoc” foi necessário para se determinar quais grupos possuíam médias diferentes entre si. O resultado pode ser visualizado na Figura 1, que apresenta o teste de comparações múltiplas de Games -Howell ( $p < 0.05$ ), para cada grupo em função do tempo.

**Figura 1-** Valores médios e desvio padrão de  $\log_{10}$  (UFC/mL) de todos os grupos avaliados imediatamente e 7 dias após os tratamentos. Letras sobreescritas maiúsculas denotam diferença estatística entre os intervalos de tempo avaliados ( $p < 0.05$ ) e letras minúsculas sobreescritas iguais denotam similaridade estatística entre grupos experimentais ( $p > 0.05$ ).



**Fonte:** Elaboração própria.

Segundo a Figura 1, imediatamente após os tratamentos o grupo P+L+NYS e NYS+P+L apresentam valores de redução estatisticamente significativa da contagem de UFC/mL, comparado ao grupo controle negativo de trabalho (P-L-) ( $p \leq 0.0001$ ), equivalente a 2,6  $\log_{10}$  para o primeiro grupo e 2,1  $\log_{10}$  (UFC/mL) para o segundo grupo. Os grupos P+L+ e NYS foram semelhantes entre si ( $p = 0.912$ ) e estatisticamente diferente do grupo controle P-L- ( $p = 0.004$  e  $p = 0.013$ , respectivamente). NYS foi inferior na capacidade de redução microbiológica quando comparado com as terapias combinadas (P+L+NYS e NYS+P+L+) ( $p \leq 0.0001$ ), mas estas foram semelhantes ao grupo P+L+ ( $p = 0.912$ ). A aplicação isolada de Nistatina (NYS) e aPDT (P+L+), promoveu redução de 1,3 e 1,1 log respectivamente, em relação ao grupo P-L- ( $p \leq 0.0001$ ). Os grupo que avaliaram a aplicação isolada da luz (P-L+) e do FS (P+L-) foram estatisticamente semelhantes entre si, ao grupo P-L- e à aplicação isolada dos tratamentos (NYS e P+L+) ( $p \geq 0.05$ ).

Com relação aos resultados observados 7 dias após os tratamentos, os grupos P+L+NYS e NYS+P+L apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si e diferentes do grupo controle ( $p = 0.024$  e  $p \leq 0.001$ ,



respectivamente) (Figura 1). As terapias combinadas apresentaram redução da viabilidade celular equivalente a 1,0 e 1,1  $\log_{10}$  respectivamente, quando comparado ao grupo P-L-. Os grupos P+L-, P-L+, P+L+ e NYS foram semelhantes entre si e os dois primeiros, foram também semelhantes ao grupo controle negativo de trabalho ( $p>0.05$ ). O grupo P+L+ que avaliou a aplicação isolada da aPDT apresentou valores estatisticamente semelhantes aos grupos P+L+NYS ( $p=1.000$ ) e NYS+P+L+ ( $p.=0.255$ ) e também a todos os outros grupos do estudo exceto ao P-L-.

## 5.2 Análise Macroscópica das Lesões

Para avaliar as lesões macroscópicas presentes na língua dos camundongos, os dados foram submetidos à Análise de Variância a um fator (Anova um fator), sendo os grupos experimentais e o intervalo de tempo (24 horas), utilizados como efeitos principais (Tabela 3). Para o período de 7 dias, foram submetidos à Análise de Variância a um fator (Anova um fator), sendo os grupos experimentais e o intervalo de tempo (7 dias), utilizados como efeitos principais (Tabela 4). Dados originais no apêndice (APÊNDICES).

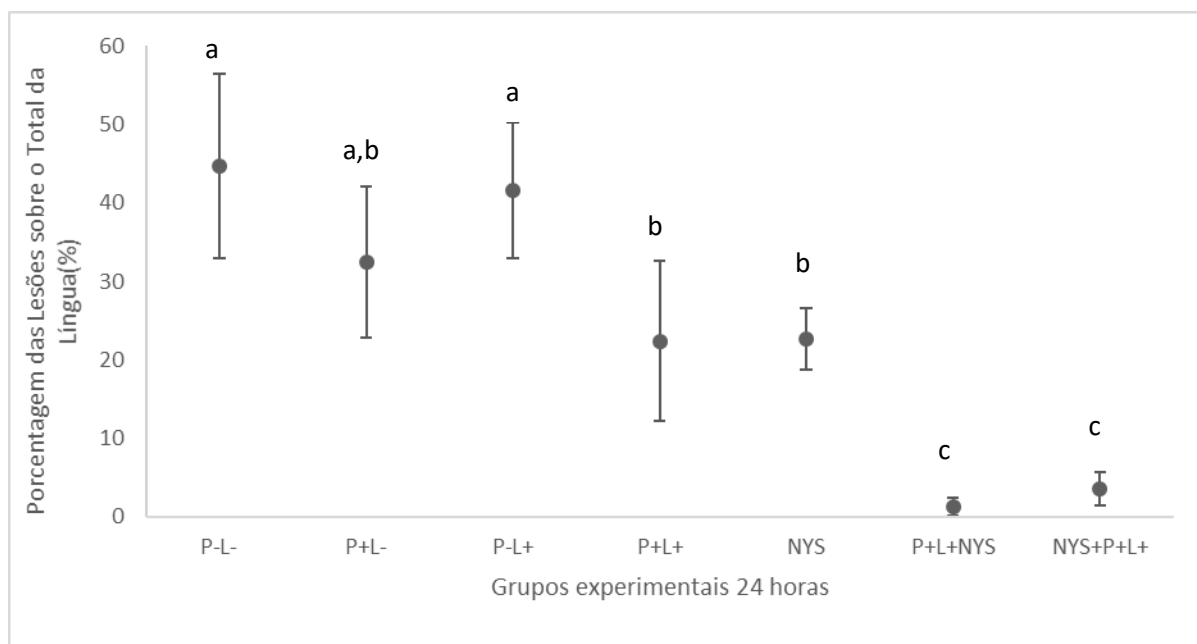
**Tabela 3** - Sumário da Análise de Variância um fator com correção de Welch para a porcentagens das lesões da língua em função dos grupos experimentais realizados 24 horas após a termino do tratamento.

	<b>Estatística</b>	<b>df1</b>	<b>df2</b>	<b>Sig.</b>
<b>Welch</b>	92,730	6	23,148	,000

**Fonte:** Elaboração própria

De acordo com a análise acima, os dados indicam que pelo menos um grupo apresenta média diferente dos demais ( $p\leq 0.0001$ ). Em razão disso, um teste “post hoc” foi necessário para se determinar quais grupos possuíam médias diferentes entre si. O resultado pode ser visualizado na Figura 2, que apresenta o teste de comparações múltiplas de Games -Howell ( $p < 0.05$ ), para cada grupo em função do tempo.

**Figura 2-** Valores médios e desvio padrão das porcentagens das lesões da língua em função dos grupos experimentais realizados 24 horas após a termino do tratamento. Letras sobrescritas diferentes denotam diferença estatística ( $p < 0.05$ )



**Fonte:** Elaboração própria.

Segundo a Figura 2, A terapia combinada promoveu redução significativa na porcentagem da área total das lesões bucais (%), equivalente a 97,34% e 92,23%, para os grupos P+L+NYS e NYS+P+L+, sendo estatisticamente semelhante entre si e diferente do grupo controle negativo de trabalho (P-L-) ( $p \leq 0.0001$ ). Para a aplicação da terapia isoladamente o grupo NYS ( $p=1.000$ ) e P+L+ ( $p=1.000$ ) foram estatisticamente semelhantes entre si e ao grupo P+L- ( $p=0.159$ ) e diferentes dos demais grupos avaliados. O grupo P-L+ ( $p=0.82$ ) e P+L- ( $p=0.382$ ) foram estatisticamente semelhantes e ao grupo P-L- ( $p=0.995$ ) e diferentes da combinação de terapias.

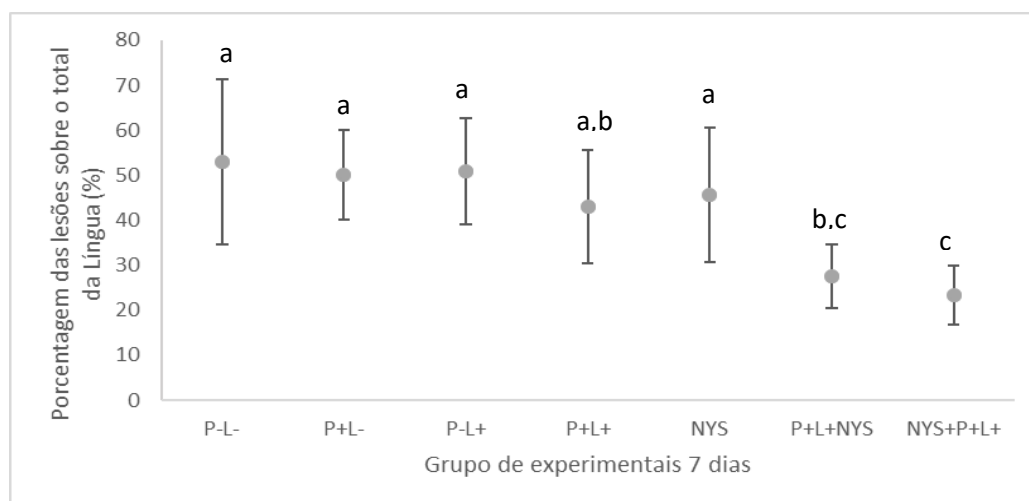
**Tabela 4-** Sumário da Análise de Variância um fator para a porcentagens das lesões da língua em função dos grupos experimentais realizados 24 horas após a termino do tratamento

	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	Sig.
<b>Entre grupos</b>	7521,087	6	1253,515	8,337	,000
<b>Dentro dos grupos</b>	8419,878	56	150,355		
<b>Total</b>	15940,966	62			

**Fonte:** Elaboração própria.

De acordo com a análise acima, os dados indicam que pelo menos um grupo apresenta média diferente dos demais ( $p \leq 0.0001$ ). Em razão disso, um teste “post hoc” foi necessário para se determinar quais grupos possuíam médias diferentes entre si. O resultado pode ser visualizado na Figura 3, que apresenta o teste de comparações múltiplas de Tukey ( $p < 0.05$ ), para cada grupo em função do tempo.

**Figura 3-** Valores médios e desvio padrão das porcentagens das lesões da língua em função dos grupos experimentais realizados 7 dias após a termino do tratamento. Letras sobrescritas diferentes denotam diferença estatística ( $p < 0.05$ )



**Fonte:** Elaboração própria.

Segundo a Figura 3, O grupo P+L+NYS e NYS+P+L+ apresentam valores de redução na porcentagem da área total da lesões (%) , estatisticamente semelhante entre si ( $p=0.152$ ) e diferente do grupo controle negativo de trabalho (P-L-) ( $p\leq 0.0001$ ), equivalente a 47,88 % para P+L+NYS e 55,98% para NYS+P+L+. Para a aplicação da terapia isoladamente o grupo NYS e P+L+ (0.999) foram estatisticamente semelhantes entre si e diferentes do grupo da combinação de terapias. O grupo P-L+ e P+L- ( $p=1.000$ ) foram estatisticamente semelhantes e ao grupo P-L- ( $p=0.999$ ).

A imagem a seguir ilustra a língua de um camundongo saudável (Figura 4). As imagens a seguir (Figuras 5,6,7 e 8) ilustram presença de manchas brancas ou pseudomembrana na língua dos animais nos diferentes grupos avaliados, nos períodos de 24 horas e 7 dias após os tratamentos

**Figura 4-** Imagens representativas da língua de um camundongo saudável. CNI



**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

**Figura 5-** Imagens representativas de manchas brancas ou pseudomembrana no dorso da língua dos animais dos grupos P-L- e P-L+, 24 horas e 7 dias após os tratamentos



P-L+ 24 Horas



P-L+ 7Dias



P-L- 24H

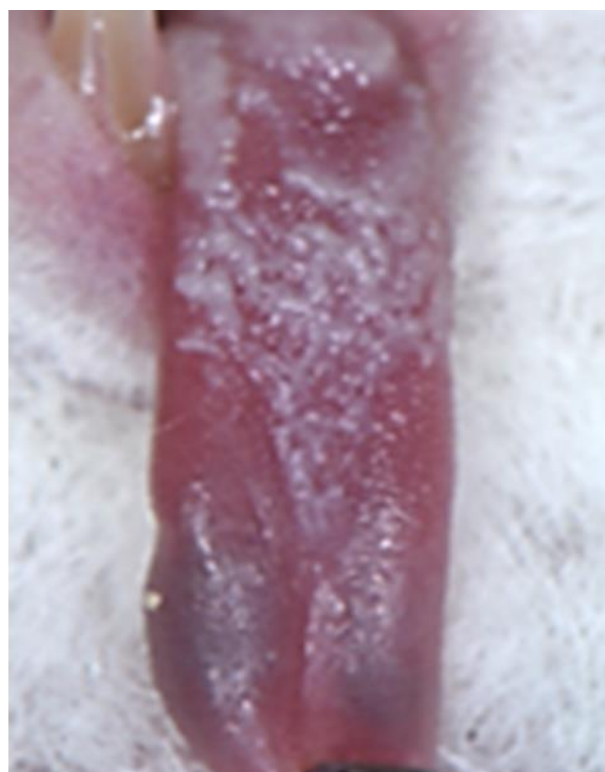


P-L- 7Dias

**Figura 6-** Imagens representativas de manchas brancas ou pseudomembrana no dorso da língua dos animais dos grupos P+L- e NYS 24 horas e 7 dias após os tratamentos



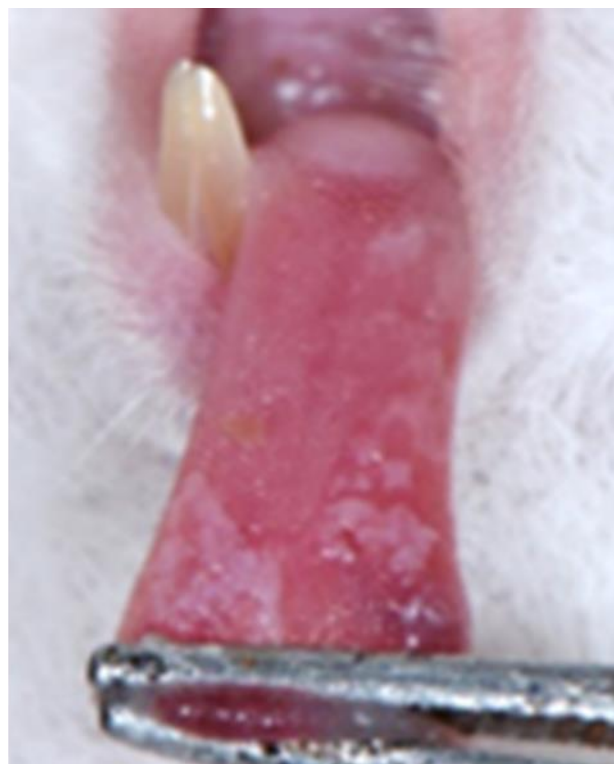
P+L- 24 Horas



P+L- 7 Dias



NYS 24 Horas

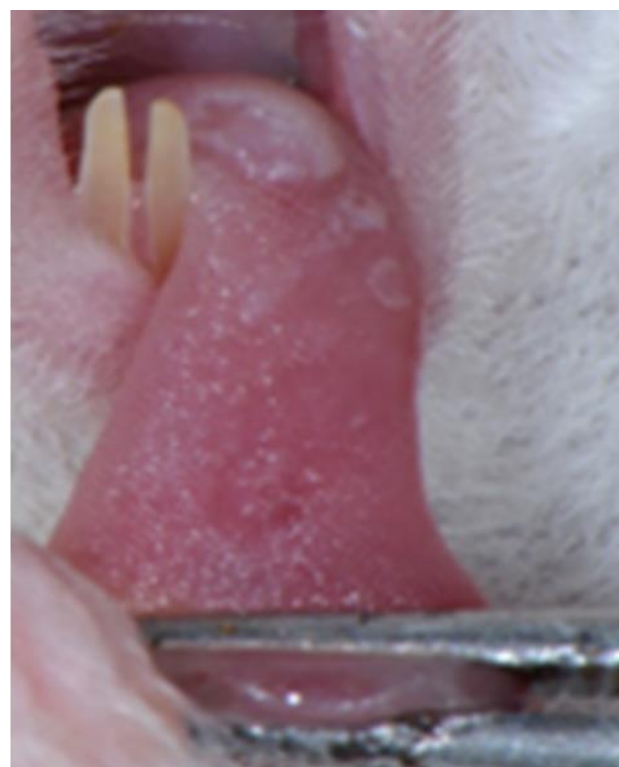


NYS 7 Dias

**Figura 7-** Imagens representativas do dorso da língua dos animais dos grupos P+L+ e NYS+P+L, 24 horas e 7 após os tratamentos. Ausência de manchas brancas no dorso da língua dos animais dos grupos NYS+P+L 24 horas após os tratamentos



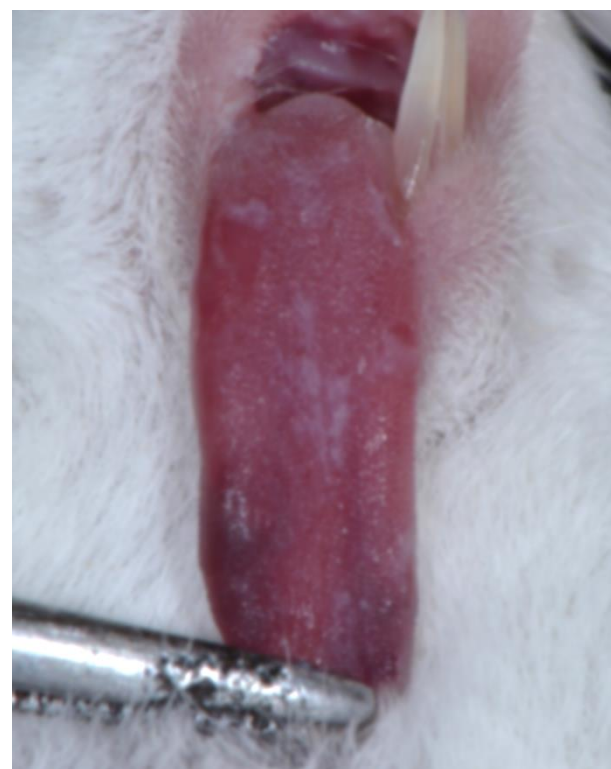
P+L+ 24 HORAS



P+L+ 7 Dias



NYS+P+L+ 24 Horas



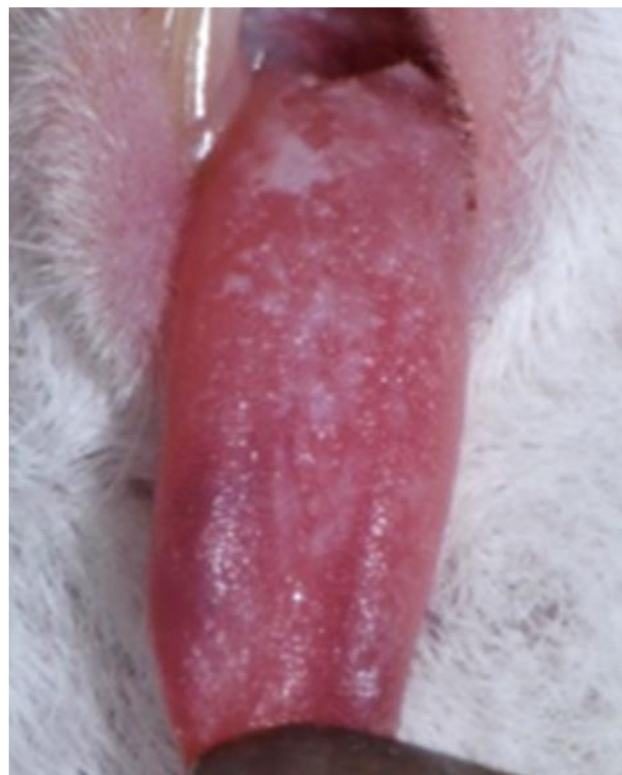
NYS+P+L+ 7 Dias

**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

**Figura 8-** Imagens representativas do dorso da língua dos animais dos grupos P+L+NYS 24 e 7 dias após os tratamentos. Ausência de manchas brancas no dorso da língua 24 horas após os tratamentos.



P+L+NYS 24 Horas



P+ L+NYS 7 Dias

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

### 5.3 Análise Histológica das Lesões

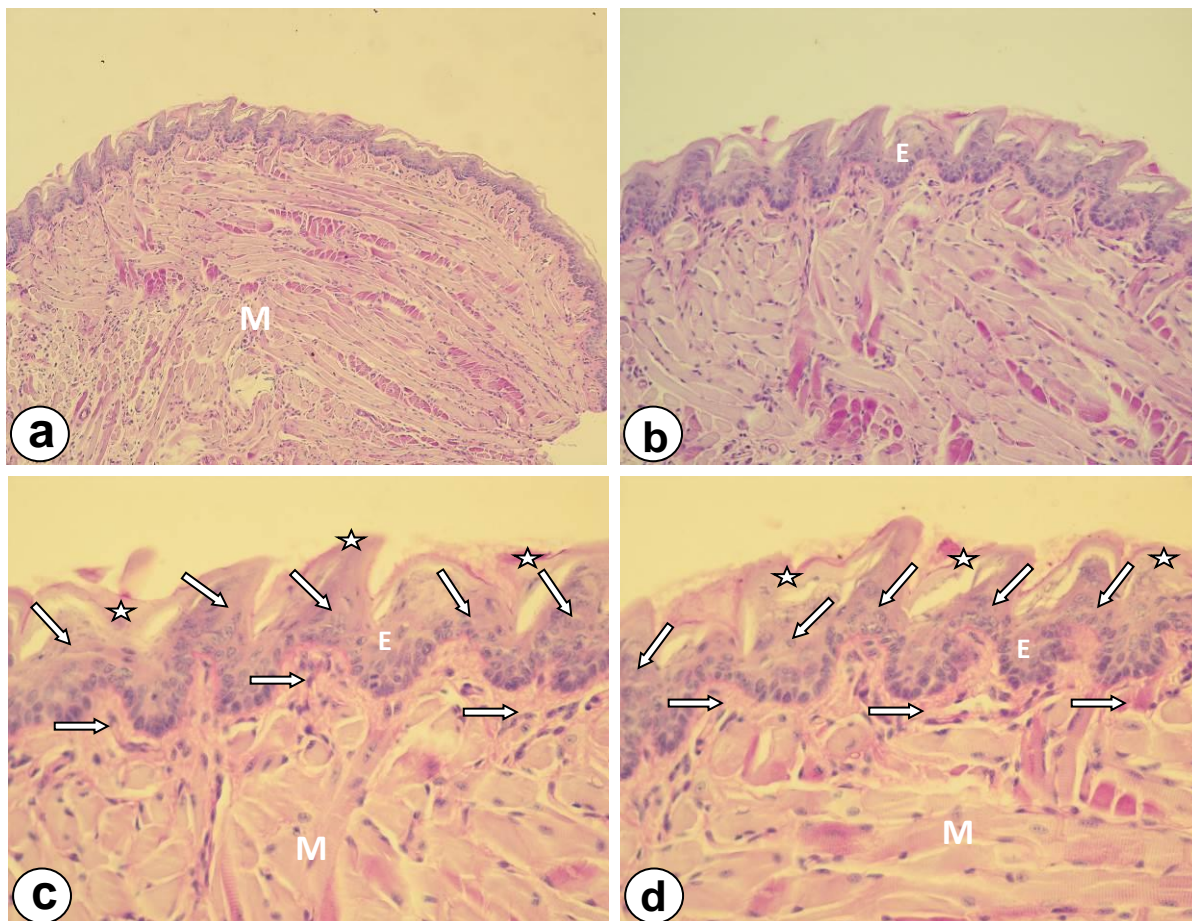
#### A. Período de 24 horas

##### Grupo CNI (controle negativo da infecção, animais saudáveis)

Os cortes histológicos exibem tecido epitelial íntegro, o qual apresenta definidas papilas linguais recobertas por delgada camada de queratina (Figura 9 a, b, c, d). Este epitélio do tipo pavimentoso estratificado apresenta camada basal definida e íntegra, sendo que a lâmina própria subjacente é formada por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo com características histológicas de normalidade. Esta lâmina própria se apresenta aderida a um conjunto de feixes musculares entrelaçados, os quais são envolvidos por tecido conjuntivo.



**Figura 9-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo CNI



a) Visão geral do epitélio pavimentoso estratificado que recobre homogeneamente o ventre da língua. Nota-se o amplo volume de tecido muscular (M), o qual constitui a maior parte do órgão. PAS; 64x. b) Detalhe da Figura 9a, onde é possível observar o epitélio (E) delgado, com inúmeras papilas linguais recobertas por fina camada de queratina. Grande número de fibras musculares estriadas esqueléticas entrelaçadas caracterizam a porção central da língua. PAS, 125x. c/d) Observa-se o epitélio (E) delgado com definidas papilas (setas) linguais recobertas por fina camada de queratina (☆). Não é observado sinais de inflamação, sendo que a delgada lâmina própria (setas horizontais) e feixes musculares (M) exibem características de normalidade. PAS; 250x.

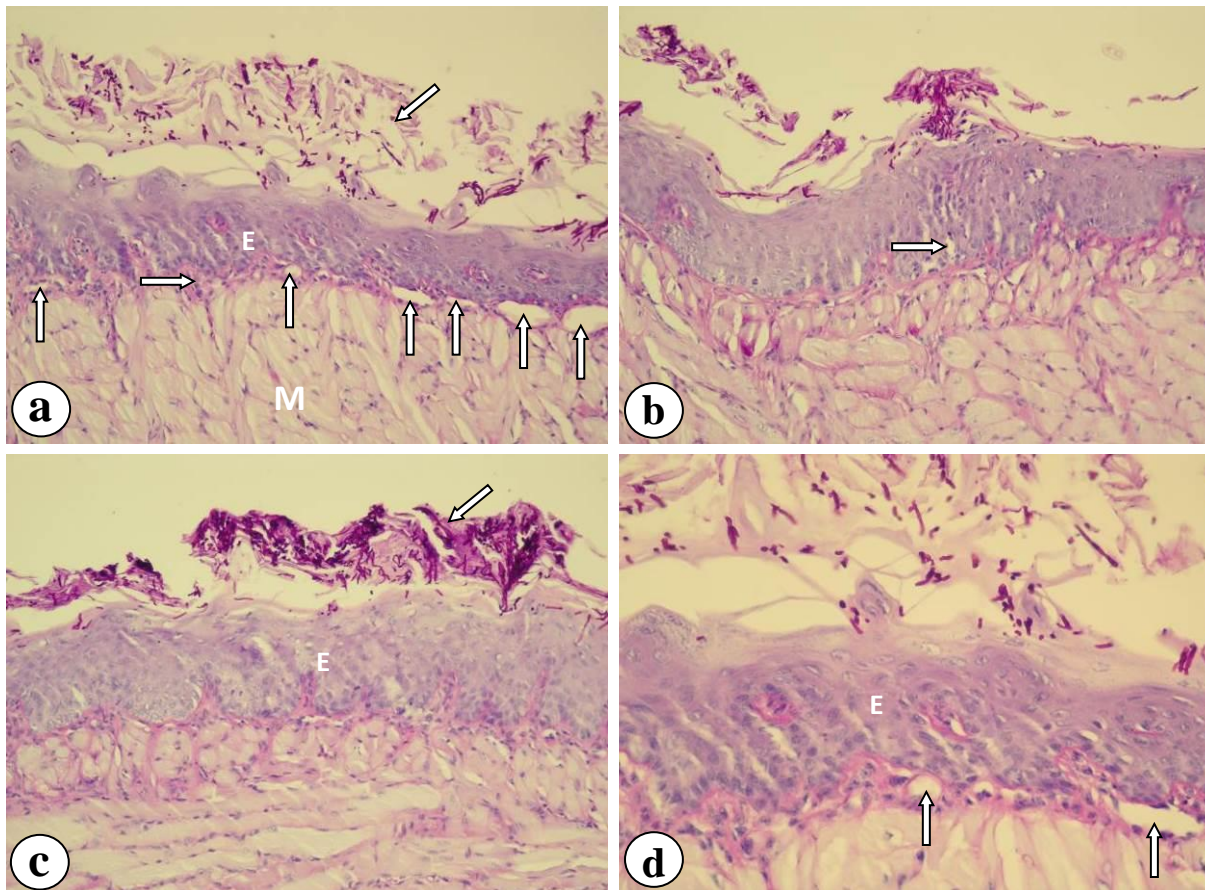
**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

### **Grupo P-L- (controle negativo do trabalho)**

Nos animais pertencentes ao grupo P-L- foi observado espessa camada de queratina com notável presença de hifas e pseudo-hifas, que podem ser observadas recobrindo o tecido epitelial, o qual exibe acantose associada à ampla perda de suas papilas (Figura 10a, b, c, d). Este epitélio apresenta camada basal íntegra, sendo que abaixo é possível observar uma delgada

lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, caracterizada pela presença de células inflamatórias de predomínio mononuclear em meio a vasos sanguíneos dilatados. O tecido subjacente é formado por fibras musculares estriadas esqueléticas, sendo que entre os feixes musculares há delgada camada de tecido conjuntivo frouxo com características de normalidade.

**Figura 10-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P-L-24 horas



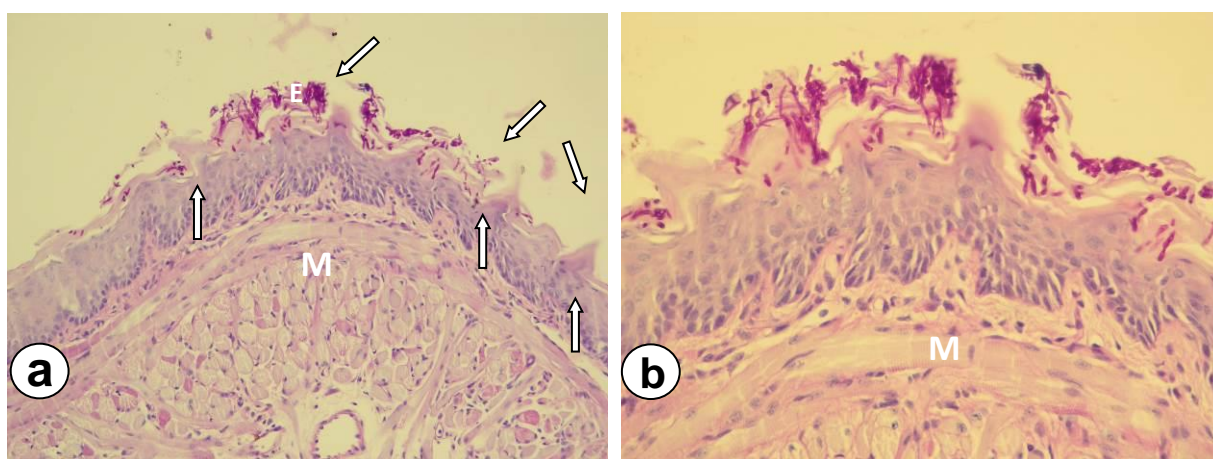
a) Espessa camada de queratina contaminada com hifas e pseudo-hifas (seta oblíqua). Abaixo do epitélio (E), observa-se uma delgada lâmina própria (seta horizontal), onde há reação inflamatória com presença de diversos vasos sanguíneos dilatados (setas verticais). Nota-se o tecido muscular (M) íntegro. PAS; 125x. b) Epitélio acantótico, com células inflamatórias mononucleares invadindo sua camada basal (seta horizontal). PAS, 125x. c) Intensa presença de hifas e pseudo-hifas no interior da espessa camada de queratina (seta oblíqua). PAS; 125x. d) Detalhe da Figura 10a, onde é possível observar hifas, pseudo-hifas e blastoporos ovalados no interior da camada de queratina. O epitélio (E) acantótico exhibe camada basal íntegra, sendo que o tecido conjuntivo subjacente apresenta células inflamatórias mononucleares em meio a vasos sanguíneos dilatados (seta verticais). PAS, 250x.

**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

### Grupo P-L+

Assim como observado para o Grupo P-L-, uma espessa camada de queratina contendo hifas, pseudo-hifas e blastoporos ovalados, recobre o tecido epitelial, o qual exibe camada basal íntegra, porém com perda de grande parte de suas papilas (Figura 11 a,b). A delgada camada de lâmina própria exibe inflamação, sendo que o tecido muscular subjacente apresenta características histológicas de normalidade.

**Figura 11-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P-L+ 24 horas



a) Espessa camada de queratina com presença de fungo em suas variadas formas recobre o epitélio (E) acantótico, o qual exibe camada basal íntegra e algumas papilas linguais evidentes (setas oblíquas). Células inflamatórias de predomínio mononuclear estão presentes em meio a vasos sanguíneos dilatados (setas verticais). PAS; 125x. b) Detalhe da Figura 11a, evidenciando a área de maior contaminação fúngica. Os feixes musculares apresentam características histológicas de normalidade (M). PAS; 250x.

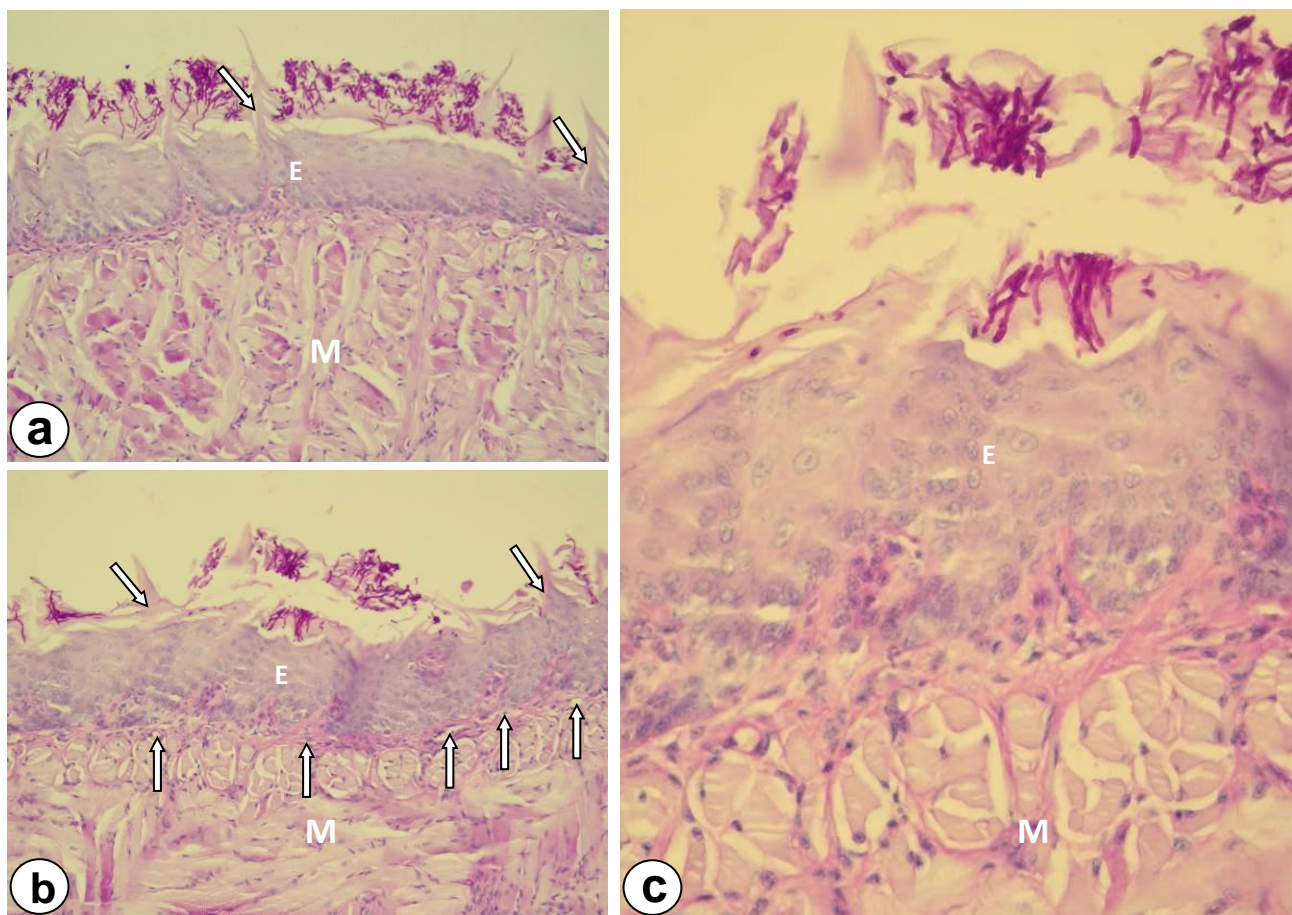
**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

### Grupo P+L-

O mesmo padrão de resposta tecidual anteriormente descrito para os Grupos P-L- e P-L+, também foi observado no presente grupo experimental. Apesar dos cortes histológicos exibirem notável presença de hifas e pseudo-hifas, esta contaminação se manteve limitada à espessa camada de queratina. Assim, o epitélio acantótico, o qual se apresenta com poucas papilas e camada

basal íntegra, reveste um tecido conjuntivo subjacente com inflamação, aderido ao tecido muscular com características histológicas de normalidade (Figura 12 a, b, c).

**Figura 12-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P+L- 24 horas



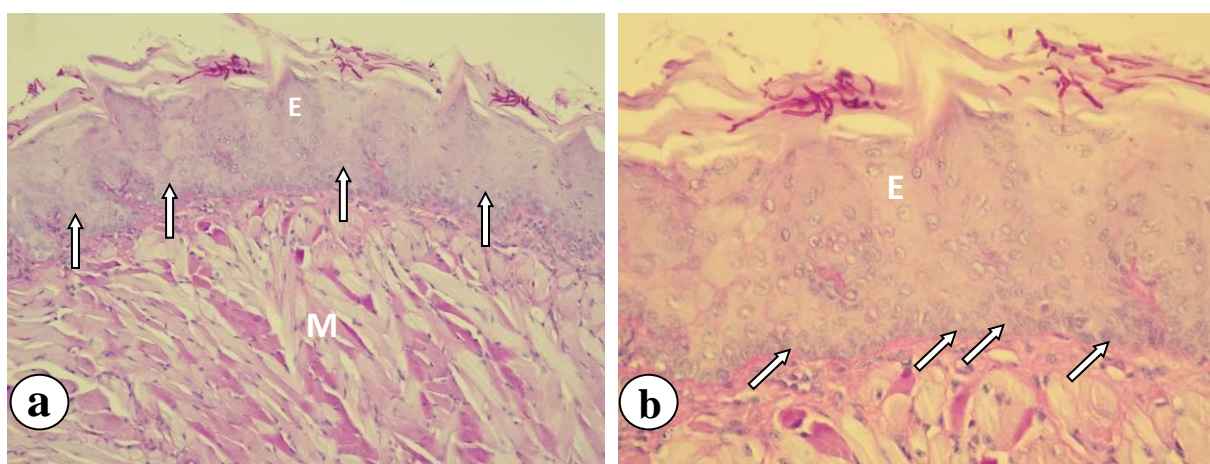
a/b) Nota-se a espessa camada de queratina contaminada com hifas e pseudo-hifas, recobrendo o epitélio acantótico e com poucas papilas linguais evidentes (setas oblíquas). Células inflamatórias de predomínio mononuclear estão presentes em meio a vasos sanguíneos dilatados (setas verticais). PAS; 125x.  
c) Detalhe da Figura 12b, onde é possível observar hifas, pseudo-hifas e blastoporos ovalados em meio à espessa camada de queratina. Feixes de fibras musculares normais com diferentes orientações são evidenciadas. PAS; 250x.

**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

### Grupo NYS

Neste grupo os animais contaminados foram submetidos ao tratamento com Nistatina. Ainda foi possível evidenciar limitada presença de hifas e pseudo-hifas no interior da camada de queratina, a qual se apresenta mais delgada do que aquela observada para os Grupos P-L-, P-L+ e P+L-. Os cortes histológicos exibem tecido epitelial acantótico e com poucas papilas superficiais recobrimdo uma lâmina própria com discreta inflamação, cujo tecido muscular subjacente se apresenta com características histológicas normais (Figura 13 a,b).

**Figura 13-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo NYS 24 horas



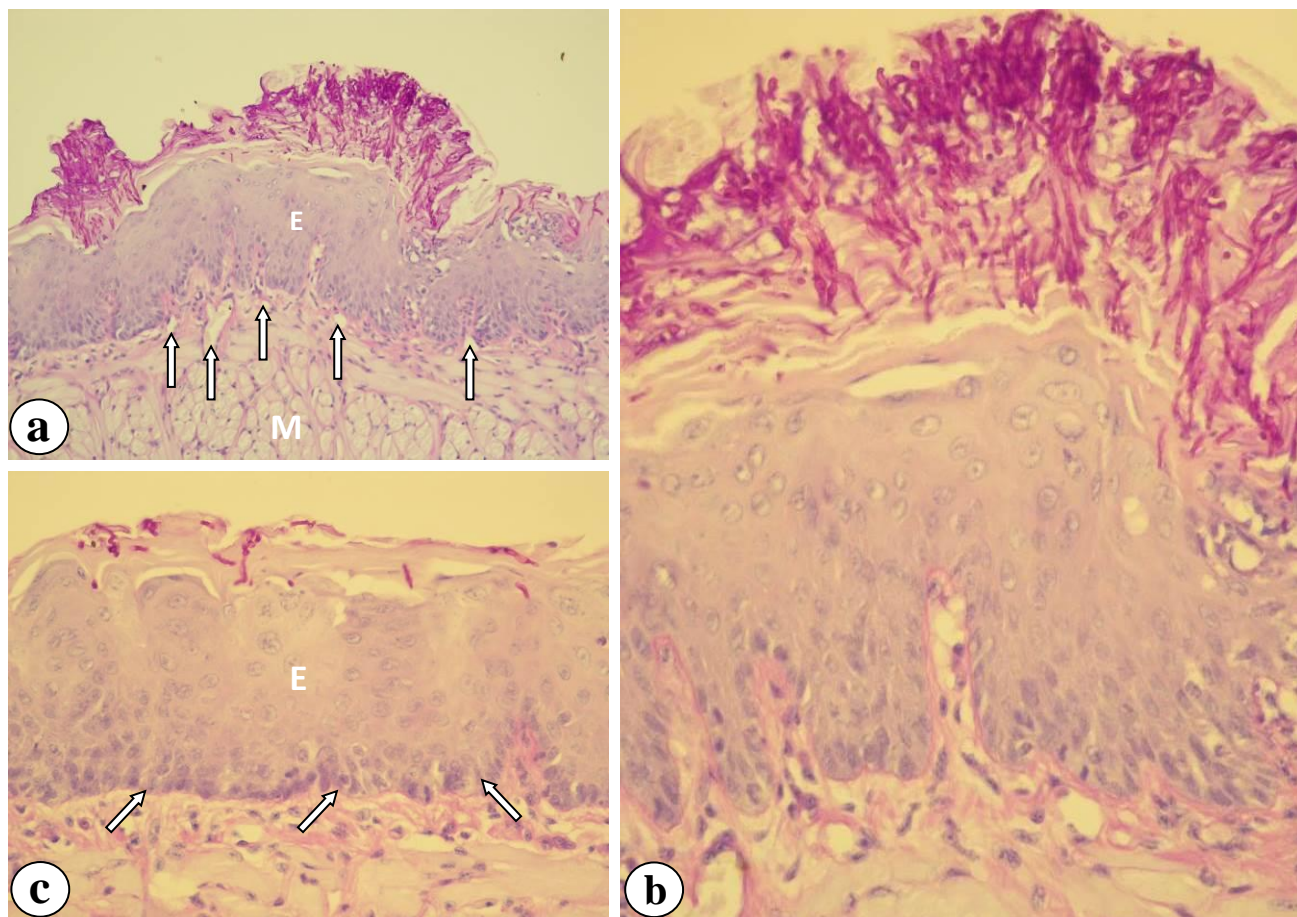
a) Ampla visão do epitélio (E) pavimentoso estratificado acantótico e queratinizado recobrimdo a porção ventral da língua. Observa-se os feixes de tecido muscular entrelaçados (M), sendo que entre estes e o epitélio íntegro, há uma delgada camada de tecido conjuntivo (setas verticais) exibindo discreta reação inflamatória. PAS; 125x. b) Detalhe da Figura 13a, onde é possível observar o epitélio (E) com camada basal íntegra, sendo que vários vasos sanguíneos são identificados (setas oblíquas). PAS; 250x.

**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

**Grupo P+L+ (aPDT)**

Sobre a superfície ventral da língua de 1 animal deste grupo experimental, foi observado intensa contaminação da espessa camada de queratina que recobria o epitélio do tipo pavimentoso estratificado, o qual se apresentava acantótico e praticamente sem papilas superficiais (Figura 14 a,b). Algumas pequenas áreas do epitélio exibiam contaminação. Porém, a lâmina própria apresentava apenas discreta inflamação, sendo que os feixes musculares subjacentes exibiam características histológicas de normalidade (Figura 14 a,b). Para as demais espécies deste grupo, a contaminação e resposta tecidual foram semelhantes àquelas observadas para o grupo com Nistatina. (Figura 14c).

**Figura 14-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P+L+ 24 horas



a) Espessa camada de queratina contaminada com hifas e pseudo-hifas, recobrendo o epitélio pavimentoso estratificado acantótico (E) e praticamente sem papilas linguais definidas. Poucas células inflamatórias de predomínio mononuclear estão presentes em meio a numerosos vasos sanguíneos dilatados (setas verticais). PAS; 125x. b) Detalhe da Figura 14a, onde é possível observar muitas hifas, pseudo-hifas e blastoporos ovalados em meio à espessa camada de queratina. PAS; 250x. c) Apesar da reduzida contaminação observada na delgada camada de queratina, o epitélio (E) subjacente se apresenta com algumas papilas linguais evidentes, porém com definida acantose. Nota-se que a camada basal do epitélio está íntegra (setas oblíquas), sendo que discreta inflamação é observada na lâmina própria. PAS; 250x.

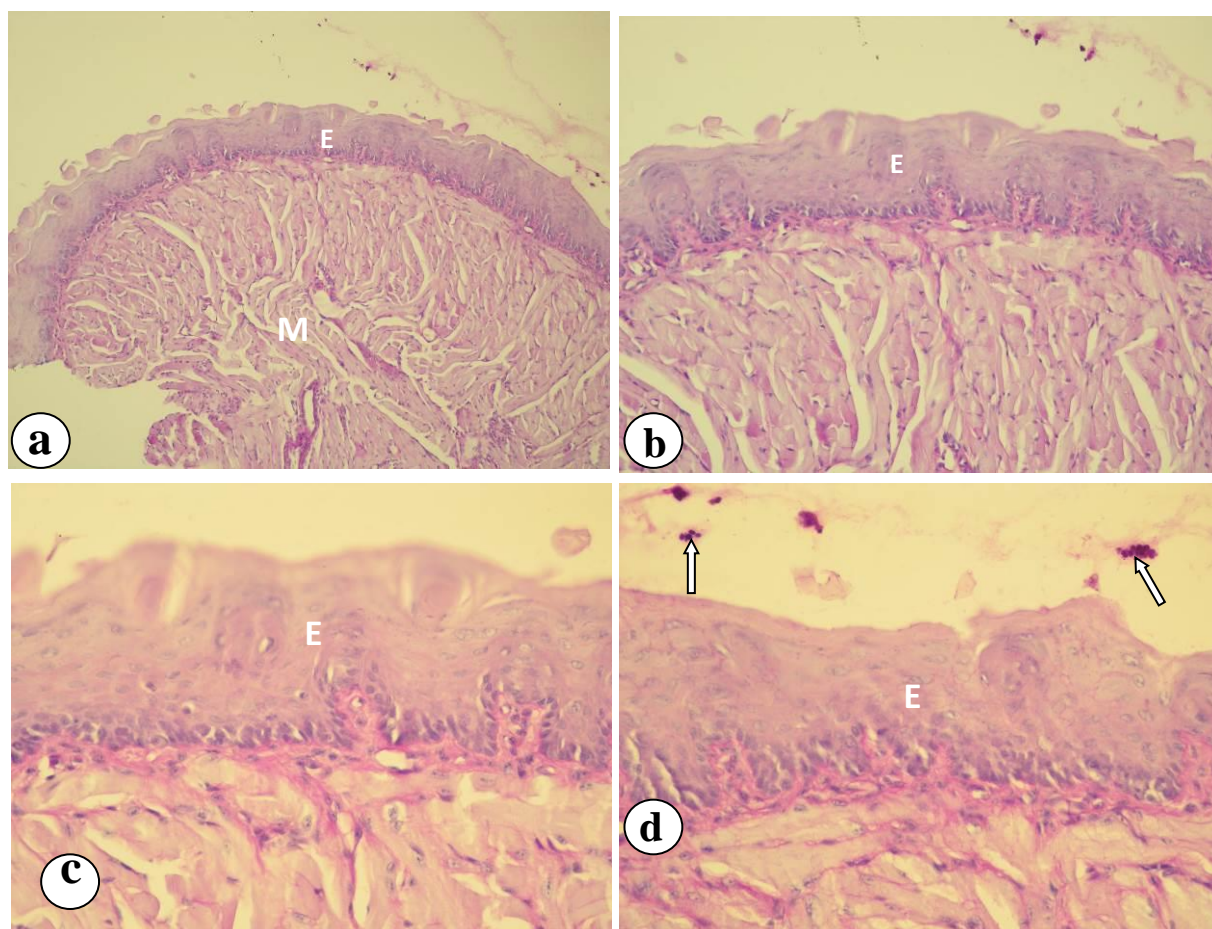
**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

### Grupo P+L+NYS

Os cortes histológicos revelaram, semelhante ao observado para o grupo CNI, os animais não foram contaminados ou receberam qualquer tratamento, são animais saudáveis, a presença de delgada camada de queratina. Porém, uma reduzida quantidade de blastoporos ovalados e pseudo-hifas estava presente em áreas superficiais da queratina, a qual revestia o

tecido epitélio com discreta acantose, algumas papilas evidentes e camada basal íntegra. A lâmina própria subjacente exibia discreta inflamação, caracterizada pela presença de poucas células inflamatórias mononucleares e alguns vasos sanguíneos, sendo que os feixes de fibras musculares estriadas esqueléticas apresentavam características histológicas de normalidade (Figura 15 a,b,c,d).

**Figura 15-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P+L+NYS 24 horas



a) Epitélio (E) pavimentoso estratificado recobrendo todo ventre da língua. Note o amplo volume de tecido muscular (M), o qual apresenta características histológicas de normalidade. PAS; 64x. b) Detalhe da Figura 15a, onde é possível observar epitélio (E) ligeiramente acantótico, e com algumas papilas linguais recobertas por fina camada de queratina. Grande número de fibras musculares estriadas esqueléticas entrelaçadas caracterizam a porção central da língua. PAS, 125x. c/d) Observa-se o epitélio (E) com camada basal íntegra, discreta acantose. Na Figura. 15d é possível detectar uma reduzida quantidade de blastoporos ovalados e pseudo-hifas (setas) em meio a uma delgada camada de queratina em descamação. PAS; 250x.

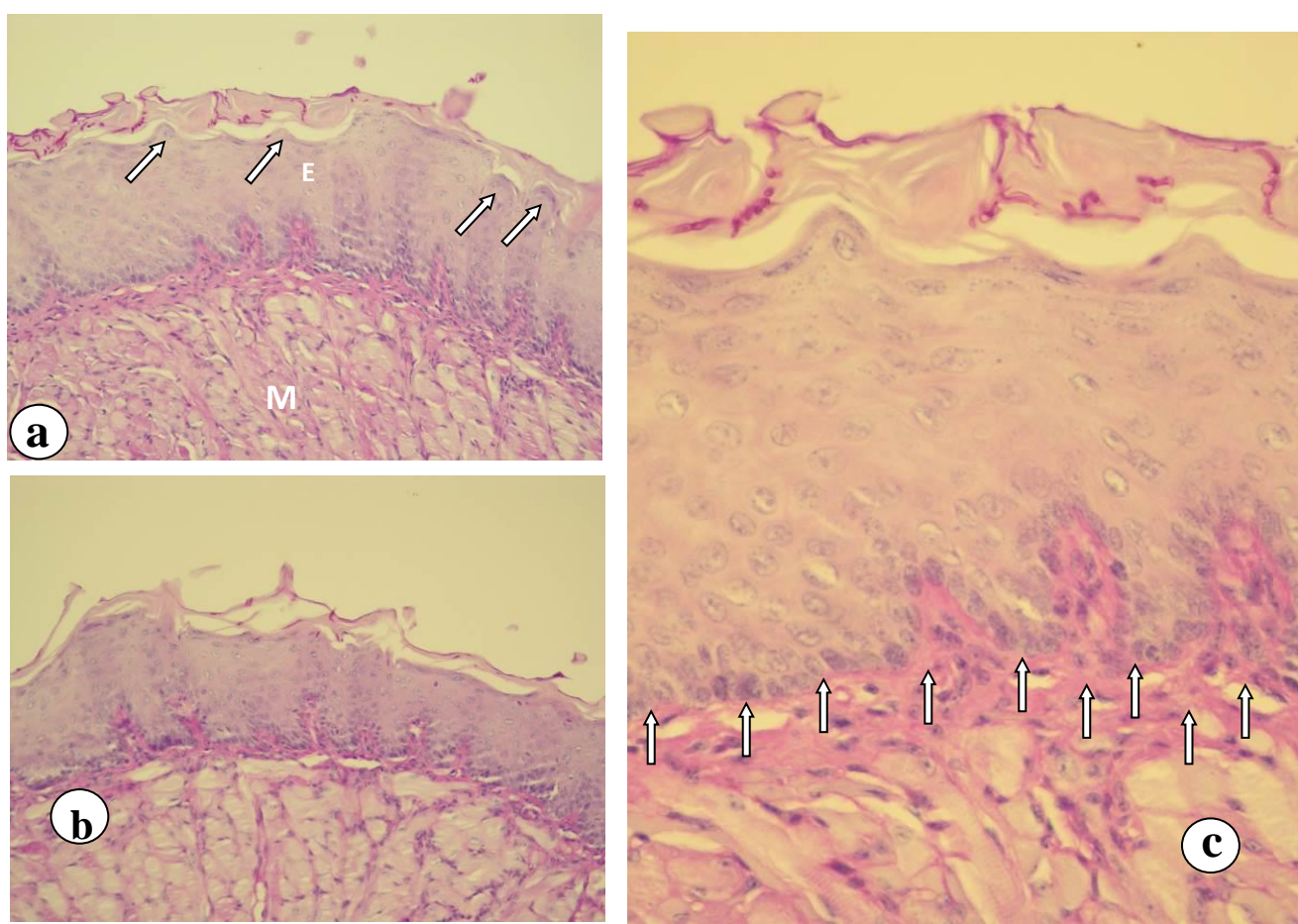
**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.



### Grupo NYS+P+L+

Os cortes histológicos deste grupo experimental revelaram a presença de poucas hifas e pseudo-hifas no interior de uma delgada camada de queratina (Figura 16 a,b,c). O tecido epitelial acantótico exibiu discretas papilas linguais e camada basal íntegra. A fina camada de tecido conjuntivo subjacente apresentava áreas pontuais de discreta inflamação, sendo que o tecido muscular se manteve com características histológicas de normalidade.

**Figura 16-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo NYS+P+L+ 24 horas



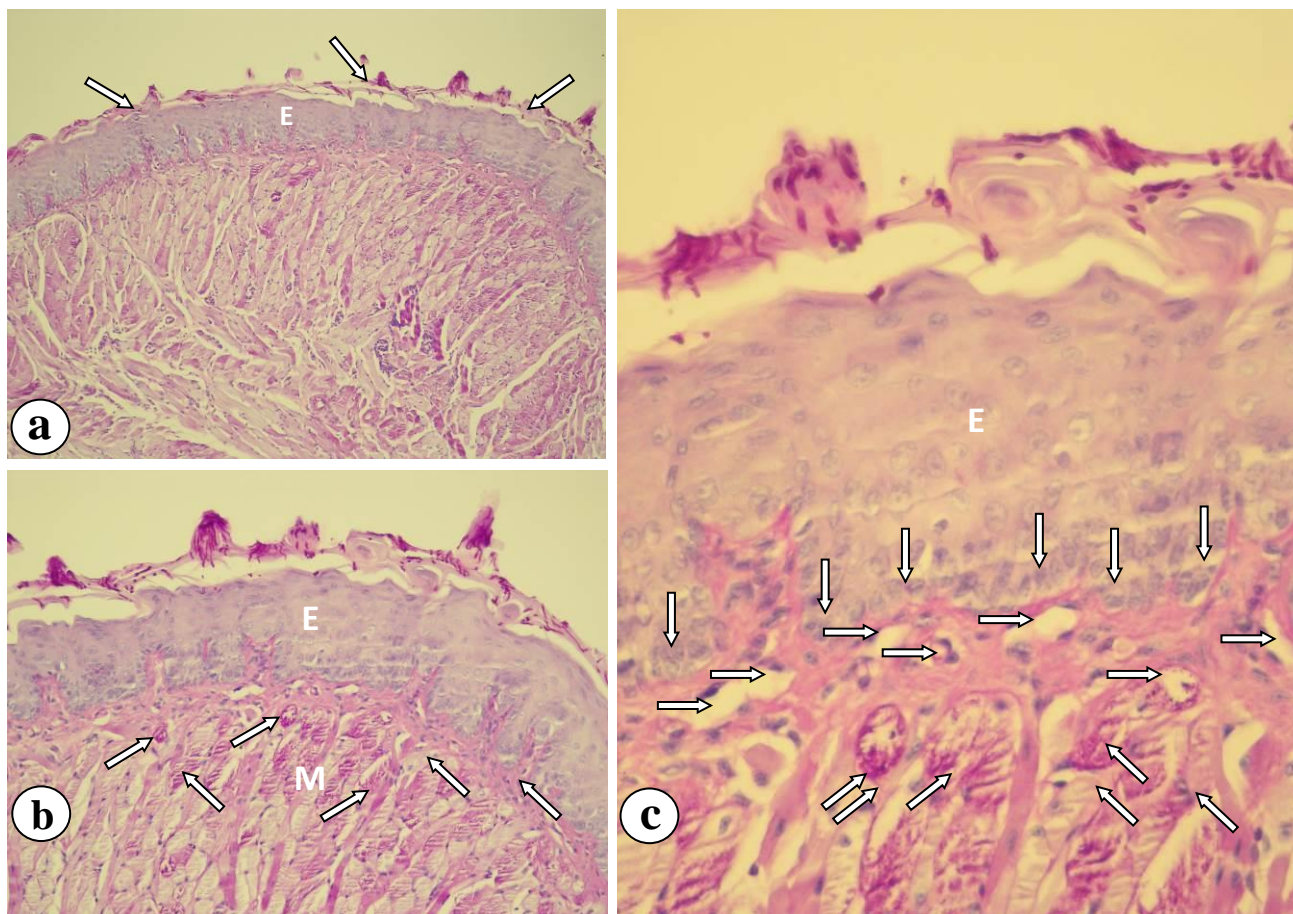
a) Epitélio (E) pavimentoso estratificado acantótico, o qual é recoberto por delgada camada de queratina contaminada. Nota-se a presença de algumas papilas epiteliais (setas oblíquas). Observa-se os feixes de tecido muscular entrelaçados (M), sendo que entre estes e o epitélio íntegro, há uma delgada camada de tecido conjuntivo com discreta inflamação. PAS; 125x. b) Detalhe da Figura 16a, onde é possível observar o epitélio (E) com camada basal íntegra, sendo que vários vasos sanguíneos (setas verticais) são identificados na delgada lâmina própria. PAS; 250x.

**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

**B. Período de 7 dias****Grupo P-L-**

Camada de queratina homogênea e de moderada espessura, a qual se apresenta contaminada com hifas, pseudo-hifas e blastoporos arredondados, recobre o tecido epitelial com acantose associada à ampla perda de suas papilas (Figura 17 a, b,c). Este epitélio apresenta camada basal íntegra, porém as células perderam a afinidade tintorial, sendo que abaixo é possível observar uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, onde há inflamação, caracterizada pela presença de células inflamatórias de predomínio mononuclear em meio a vasos sanguíneos dilatados (Figura 17c). O tecido subjacente é formado por fibras musculares estriadas esqueléticas, as quais se apresentam parcialmente degradadas na região mais superficial (Figura 17 b,c).

**Figura 17-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P-L-7 dias



a) Camada de queratina contaminada (setas oblíquas) aparece recobrendo homogeneamente o epitélio (E) acantótico, o qual exibe algumas papilas linguais não evidentes. PAS, 64x. b/c) Detalhe da Figura 17a, onde pode-se observar perda da afinidade tintorial das células da camada basal do epitélio (setas verticais), sendo que a delgada lâmina própria apresenta inflamação, onde há predomínio de células mononucleares em meio a vasos sanguíneos dilatados (setas horizontais). Nota-se as hifas, pseudo-hifas e blastoporos ovalados em meio à camada de queratina, bem como a degradação dos feixes musculares superficiais (setas oblíquas). b) PAS; 125x e c) PAS; 250x.

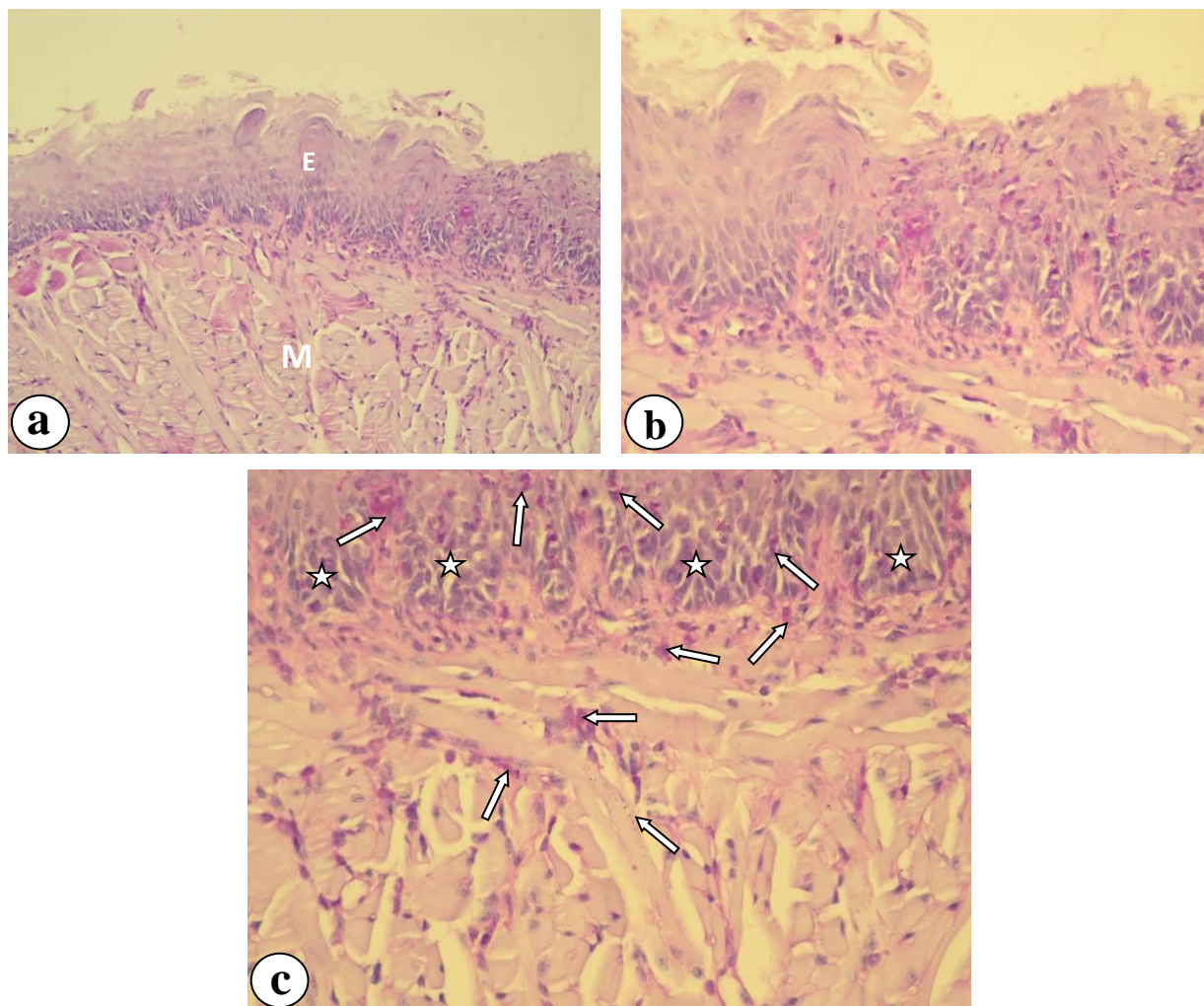
**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

### Grupo P- L+

Neste grupo experimental, foi observada contaminação do epitélio pavimentoso estratificado, o qual se apresenta acantótico e com algumas papilas linguais definidas. Muitas pseudo-hifas e blastoporos arredondados foram evidenciados no interior de todas as camadas do epitélio, assim como no tecido conjuntivo e muscular subjacentes (Figura 18 a,b,c). Intensa mitose das

células da camada basal do epitélio foi observada, sendo que a lâmina própria abaixo exibe reação inflamatória (Figura 18c).

**Figura 18-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P-L+ 7 dias



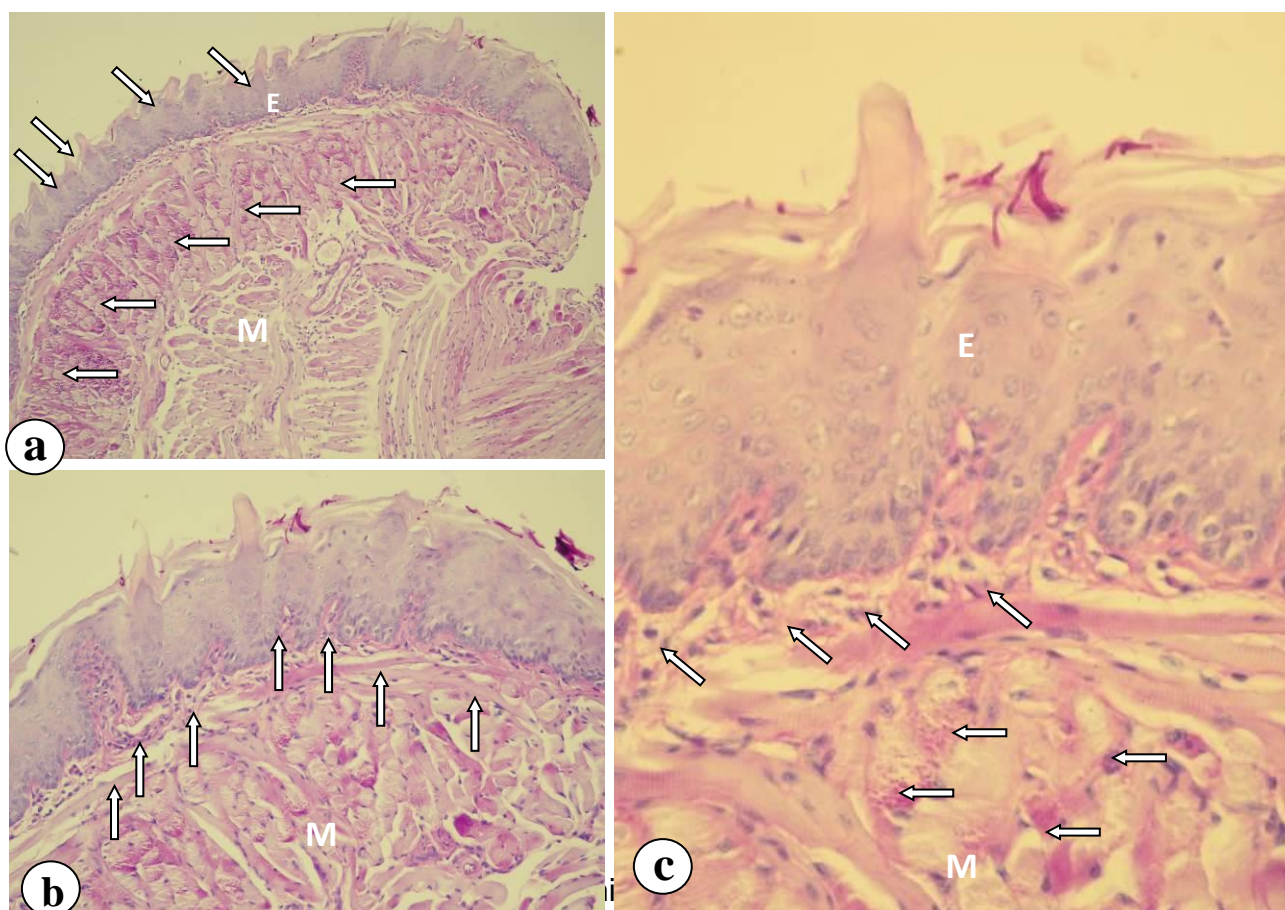
a) Epitélio (E) pavimentoso estratificado acantótico íntegro, o qual é recoberto por delgada camada de queratina. PAS; 125x. b) Detalhe da Figura 18a, onde pode-se observar a camada de queratina sendo descamada e a infecção fúngica atingindo todas as camadas do epitélio (setas). PAS; 250x. c) Muitos blastoporos ovalados e pseudo-hifas estão presentes no interior do tecido epitelial, bem como são detectados na lâmina própria e no tecido muscular subjacente. Note a intensa mitose (☆) das células que compõem a camada basal do epitélio PAS; 250x.

**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

**Grupo P+ L-**

O epitélio pavimentoso estratificado acantótico exhibe algumas papilas filiformes definidas, sendo recoberto por uma delgada camada de queratina homogênea e de moderada espessura, a qual se apresenta contaminada com hifas, pseudo-hifas e blastoporos arredondados (Figura 19 a,b,c). As células que compõem a camada basal do epitélio apresentam baixa afinidade tintorial. Amplas áreas de degradação de tecido muscular podem ser observadas (Figura 19 a,b) nas regiões mais superficiais da língua, sendo que a lâmina própria exhibe pontos de degradação de colágeno e inflamação local (Figura 19c).

**Figura 19-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P-L+ 7 dias



a) Delgada camada de queratina contaminada recobre, homoganeamente, o epitélio (E) acantótico do ventre da língua, o qual exibe diversas papilas (setas oblíquas). Nota-se a ampla área de degradação do tecido muscular (setas horizontais) mais superficial. PAS; 64x. b) Detalhe da Fig. 19a, onde pode-se observar lâmina própria de inflamação, onde células mononucleares são vistas em meio a grande número de vasos sanguíneos (setas verticais). PAS; 125x. c) Apesar de íntegra, a camada basal do epitélio é constituída por células que perderam a afinidade tintorial. Nota-se que a lâmina própria apresenta degradação de colágeno (setas oblíquas), sendo que o mesmo acontece com parte do tecido muscular subjacente (setas horizontais). PAS; 250x.

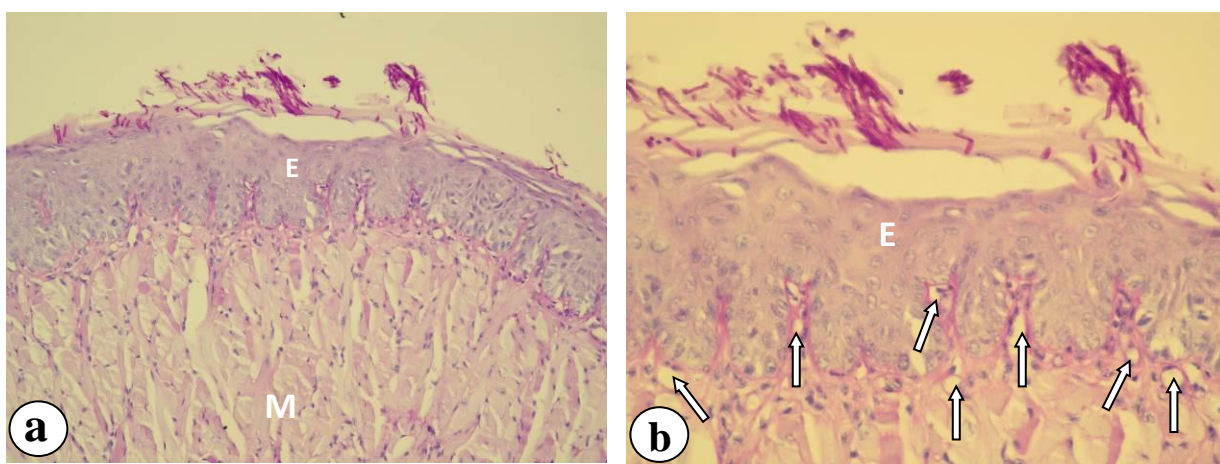
**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

### Grupo NYS

Uma camada ligeiramente espessa de queratina, contendo hifas e pseudo-hifas e blastoporos arredondados, é observada recobrimdo o tecido epitelial, o qual exibe ligeira acantose, sem presença evidente de papilas linguais (Figura 20 a,b). Este epitélio apresenta camada basal íntegra, sendo

que abaixo é possível observar uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, onde há discreta presença de células inflamatórias mononucleares em meio a numerosos vasos sanguíneos. Não há sinais de invasão fúngica no epitélio ou no tecido muscular, sendo que este último apresenta características histológicas de normalidade.

**Figura 20-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo NYS 7 dias



a) Uma camada definida e homogênea de queratina (setas), contendo fungos em suas variadas formas recobre o epitélio (E) acantótico, o qual exibe camada basal íntegra. Nota-se que o tecido muscular (M) que compõe a maior porção do órgão, apresenta características histológicas de normalidade. PAS; 125x. Detalhe da Figura 20a, onde é possível identificar delgada lâmina própria com discreta quantidade de células inflamatórias mononucleares em meio a numerosos vasos sanguíneos (setas). Observa-se que a contaminação é superficial, caracterizada pela presença de hifas, pseudo-hifas e blastoporos arredondados apenas na camada de queratina que reveste o epitélio (E). PAS; 250x.

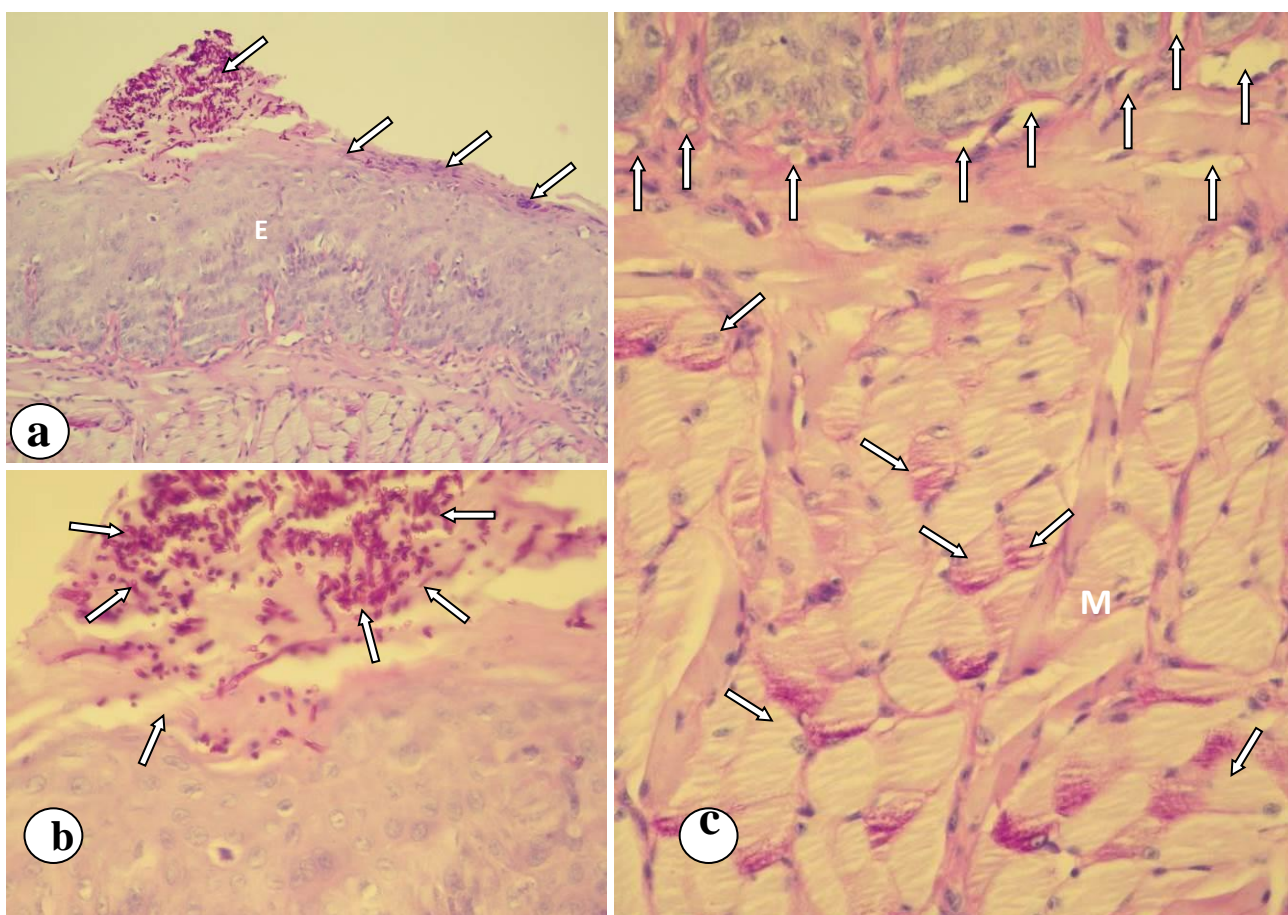
**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

### **Grupo P+ L+ (aPDT)**

Neste grupo experimental, uma camada de queratina contaminada e de variada espessura estava revestindo o epitélio (E) acantótico, o qual exibiu camada basal íntegra composta por células com reduzida afinidade tintorial. Notável quantidade de blastoporos ovalados estava presente na queratina, sendo que um menor número desta forma do fungo foi observado no interior do epitélio pavimentoso estratificado. A lâmina própria, com delgada espessura,

apresentava discreta inflamação, caracterizada pela presença de células mononucleares em meio a vasos sanguíneos (Figura 21 a,b,c). Tal como observado para os Grupos P+L- e P-L+, neste período de 7 dias de avaliação, áreas superficiais de tecido muscular apresentavam degradação de seus feixes (Figura 20c).

**Figura 21-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P+L+ 7 dias



pseudo-hifas e elevado conteúdo de blastoporos (setas), revestindo o tecido epitelial (E), o qual apresenta camada basal íntegra. Este epitélio, com característica de acantose, não exhibe papilas linguais definidas. PAS; 125x. b) Detalhe da Figura 21a, onde pode-se observar contaminação pontual da camada de queratina com predomínio de blastoporos ovalados (setas). PAS; 250x. c) Detalhe do tecido muscular (M) cujos feixes estão em processo de degradação (setas oblíquas). Nota-se a presença de delgada lâmina própria com discreta inflamação (setas horizontais). PAS; 250x.

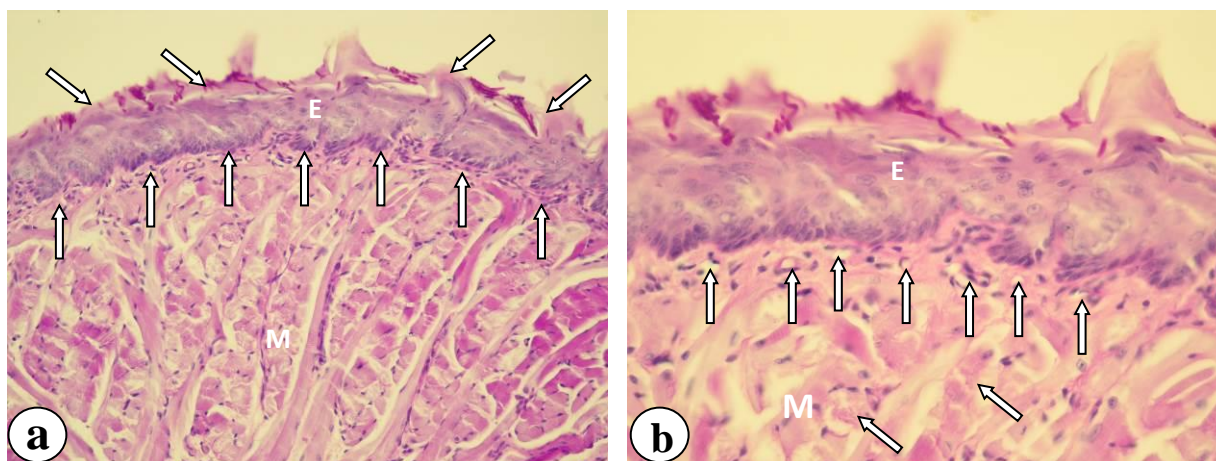
**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.



### Grupo P+L+NYS

Os cortes histológicos dos espécimes pertencentes a este grupo experimental exibem delgada camada de queratina com espessura homogênea, a qual reveste toda porção ventral da língua. Esta camada de queratina, contendo hifas, pseudo-hifas e blastoporos arredondados, recobre um epitélio pavimentoso estratificado, o qual exhibe ligeira acantose e poucas papilas (Figura 22a,b). A camada basal do epitélio está íntegra e é composta por células em paliçadas e de coloração normal. A delgada lâmina própria apresenta discreta reação inflamatória, caracterizada pela presença de células mononucleares em meio a numerosos vasos sanguíneos. Pequenas áreas pontuais do tecido muscular subjacente exibem degradação das fibras musculares estriadas esqueléticas previamente organizadas em feixes (Figura 22b).

**Figura 22-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo P-L+NYS 7 dias



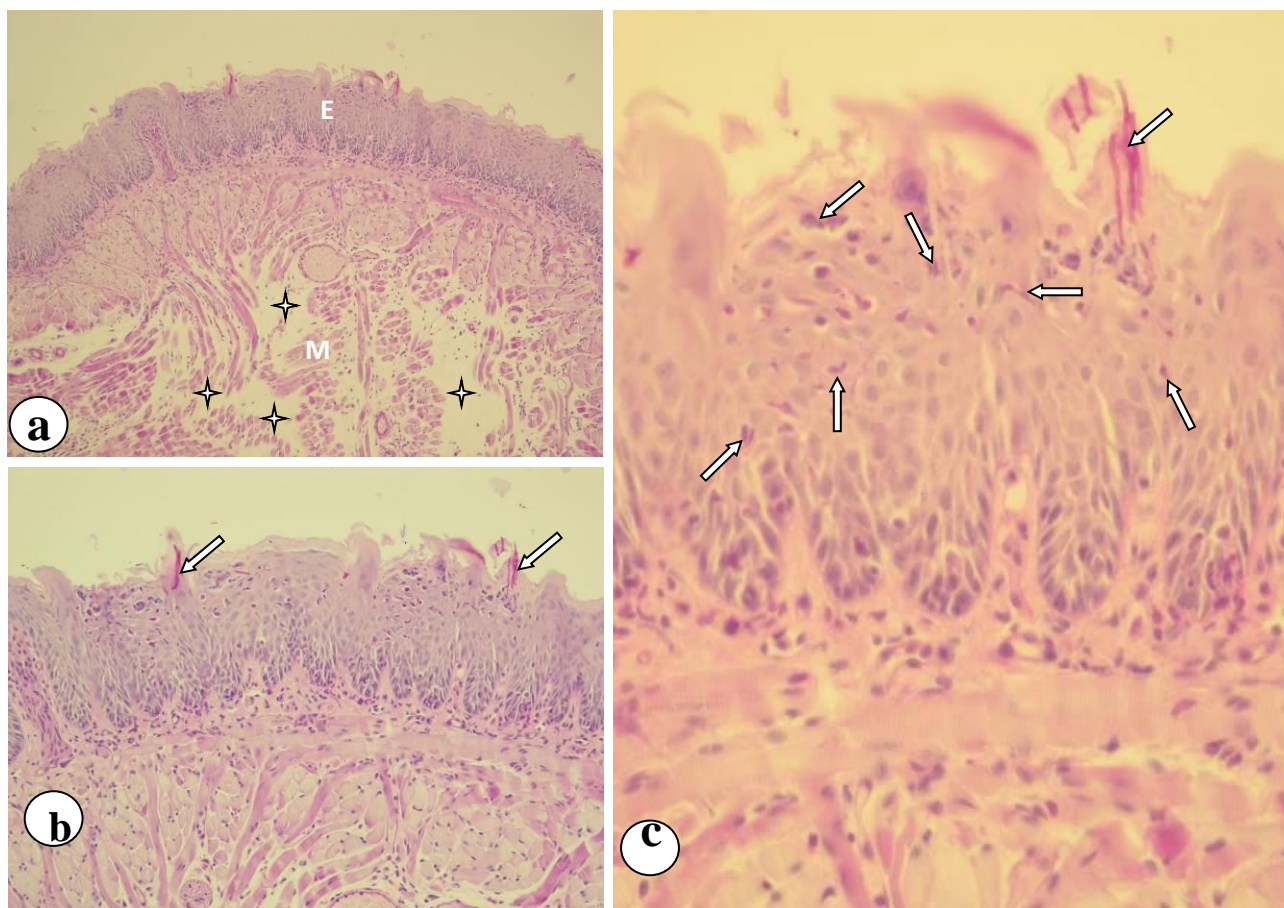
a) Epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, o qual se apresenta ligeiramente acantótico, recobre homoganeamente o ventre da língua. Nota-se as camadas definidas de queratina (setas oblíquas), epitélio (E), tecido conjuntivo (setas verticais) e muscular (M) que caracterizam o órgão. PAS; 125x. b) Detalhe da Figura 22a, onde é possível observar o epitélio (E) com camada basal íntegra, sendo que a lâmina própria exhibe discreta inflamação mediada por numerosos vasos sanguíneos de pequeno calibre (setas verticais). Apenas algumas pequenas áreas de degradação das fibras musculares estriadas esqueléticas são observadas (setas oblíquas). PSA; 250x.

**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

**Grupo NYS+P+L+**

Tal como observado para o Grupo P+L+NYS, os cortes histológicos dos espécimes pertencentes a este grupo experimental apresentaram homogênea camada de queratina contaminada e com delgada espessura, recobrimdo a porção ventral da língua. Esta camada de queratina, a qual parecer conter uma quantidade de hifas, pseudo-hifas e blastoporos arredondados inferior àquela determinada para o Grupo P+L+NYS, reveste um epitélio pavimentoso estratificado acantótico e com poucas papilas linguais (Figura 23 a,b,c). Na maioria dos espécimes notou-se a contaminação fúngica do epitélio (Figura 23c). Imediatamente abaixo da camada basal deste epitélio, a qual se apresenta íntegra, é possível observar uma delgada lâmina própria com discreta inflamação, caracterizada pela presença de células mononucleares em meio a numerosos vasos sanguíneos. Pequenas áreas superficiais do tecido muscular subjacente exibem degradação das fibras musculares estriadas esqueléticas, sendo observado, em dois espécimes deste grupo, a ocorrência de amplo edema na região central da língua (Figura 23a).

**Figura 23-** Imagens representativas de cortes histológicos dos animais do grupo NYS+P-L+ 7 dias



a) Epitélio (E) pavimentoso estratificado acantótico íntegro, o qual é recoberto por delgada camada de queratina contaminada. Nota-se o amplo edema na região central da língua (✦) PAS; 125x. b) Detalhe da Figura 23a, onde pode-se observar hifas em posição perpendicular com relação ao epitélio (setas). PAS; 250x. c) Detalhe da infecção do epitélio por hifas e blastoporos ovalados (setas). PAS; 250x

**Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a efetividade da aPDT combinada ao antifúngico Nistatina no tratamento de candidose oral induzida em camundongos com cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol. Os resultados demonstraram que a combinação das terapias promoveu redução de 2,6 log<sub>10</sub> e 2,1 log<sub>10</sub> para os grupos P+L+NYS+ e NYS+P+L+, respectivamente, imediatamente após os tratamentos. No período de 7 dias após os tratamentos, a redução observada foi de 1,0 log<sub>10</sub> e 1,1 log<sub>10</sub>, respectivamente. A análise macroscópica demonstrou que os animais apresentaram redução significativa de aproximadamente 97,34% e 92,23%, para os grupos P+L+NYS e NYS+P+L+, 24 horas após os tratamentos. No período de 7 dias após os tratamentos, a redução das lesões se manteve em aproximadamente 50% para os animais dos grupos submetidos à terapia combinada. De acordo com o conhecimento dos autores, a presente investigação foi a primeira a avaliar in vivo a eficácia da terapia combinada com diferentes mecanismos de ação no tratamento de candidose induzida em camundongos infectados com *C. albicans* resistente ao fluconazol.

A terapia fotodinâmica associada a antifúngicos tem sido avaliada em estudos in vitro utilizando cepas de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol<sup>46,47,49</sup>. Foi observado que o Miconazol aumentou a susceptibilidade de cultura planctônica de *C. albicans* (SC 5314) à aPDT mediada por fotossensibilizador a base de porfirina (TMP-1363)<sup>47</sup>. Em outro estudo foi observado que tratamento com Miconazol associado à aPDT mediada pelo fotossensibilizador TMP-1363 foi efetivo contra biofilmes de *Candida spp.* formados sobre resina acrílica<sup>48</sup>. Hsieh et al.<sup>31</sup> (2018), avaliaram o efeito da combinação da aPDT mediada pelo fotossensibilizador curcumina (concentrações variando de 1 a 80 µM) com o antifúngico Fluconazol (208 µM durante 24 ou 48 h) na inativação de culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. Foi observado que, a aplicação do fluconazol por 48 horas seguido da aPDT utilizando concentrações a partir de 10 µM de curcumina reduziu o metabolismo do biofilme de 18 hs para 5%. Avaliados em conjunto, os dados dos estudos citados e do presente estudo sugerem que a aplicação tópica da aPDT associada com antifúngicos convencionais é uma alternativa promissora para a inativação fúngica, incluindo os microrganismos resistentes.

Na terapia fotodinâmica um fotossensibilizador que é administrado topicamente, seguido de iluminação por uma fonte de luz com comprimento de onda específico para excitar o fotossensibilizador e, na presença de oxigênio molecular ambiente, ocasiona a produção de espécies reativas citotóxicas (ROS). Essas ROS produzidas durante a reação podem exercer efeitos letais sobre os microorganismos. O estresse oxidativo pode promover a inativação dos micro-organismos por diferentes vias metabólicas, incluindo peroxidação lipídica, inativação de proteínas e enzimas e oxidação de ácidos nucleicos<sup>52</sup>. Além disso, tem sido sugerido que as ROS produzidas podem exercer estresse oxidativo sobre os polissacarídeos da matriz extracelular de biofilmes, promovendo a desestruturação do mesmo<sup>60</sup>. Assim, a alteração na matriz causada pela aPDT possibilitaria a penetração do antifúngico nas camadas mais profundas do biofilme e, conseqüentemente, a ligação entre o antifúngico e o ergosterol presente na membrana fúngica<sup>2</sup>. Essa ligação propiciaria a formação de canais, pelos quais a célula do fungo perde componentes intracelulares, promovendo a inativação do microrganismo.<sup>17</sup>

A presente investigação também avaliou a efetividade da aplicação dos tratamentos isoladamente. A aPDT (P+L+) e NYS promoveram reduções de 1,1 e 1,3  $\log_{10}$  na viabilidade celular, respectivamente, 24 horas após dos tratamentos. Os resultados do presente estudo corroboram com os obtidos em um estudo prévio que avaliou a eficácia da aPDT mediada pelo PDZ na inativação de cepas resistentes ao fluconazol em modelo de candidose induzida. Os autores observaram que apenas uma aplicação de aPDT promoveu redução que variou entre 1,15 a 1,96  $\log_{10}$ , dependendo da cepa avaliada (ATCC ou isolado clínico)<sup>28</sup>. Teichert et al.<sup>38</sup> (2002) obtiveram 2,74  $\log_{10}$  de redução em cepas resistentes a fluconazol utilizando altas concentrações do fotossensibilizador azul de metileno (450 e 500  $\mu\text{g/ml}$ ). Por outro lado, Carmello et al.<sup>29</sup> (2016) observaram que 5 aplicações de aPDT mediada pelo PDZ foi tão eficaz quanto a NYS na inativação de *C. albicans* susceptível ao fluconazol promovendo redução de  $\sim 3 \log_{10}$ . Entretanto, os autores avaliaram cepa sensível ao fluconazol. Teoricamente, 5 aplicações de aPDT teria potencial para gerar maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), portanto maior potencial para promover redução na viabilidade celular quando comparado com uma única aplicação. No entanto, isso não foi

observado no presente estudo. Tem sido relatado que as células fúngicas têm a capacidade de se adaptar, recuperar e se proteger do estresse oxidativo<sup>63</sup> e estariam envolvidos neste processo dois mecanismos que permitem o aumento de tolerância ao estresse oxidativo: a permeabilidade de membrana às espécies reativas e a super-regulação de enzimas anti-oxidantes.<sup>52</sup> Este sistema de proteção consiste em uma rede de enzimas tais como catalase, peroxidase ou superóxido<sup>57</sup>. Essas enzimas antioxidantes atuam quando os níveis de ROS estão elevados e os fungos têm a capacidade de organizar uma resposta rápida, resultando em aumento da expressão das mesmas, juntamente com sistemas de proteção adicionais que reparam o dano oxidativo<sup>52,60</sup>. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que as cepas resistentes aos derivados azóis também apresentam maior resistência à aPDT, quando comparadas às cepas sensíveis<sup>26,34,60</sup>. Dovigo et al.<sup>34</sup> (2011) avaliaram culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* susceptíveis e resistentes à aPDT mediada pelo Photogem e observaram que a eficácia do tratamento foi dependente da espécie avaliada, ademais de que as cepas resistentes ao fluconazol também apresentaram menor susceptibilidade à aPDT. Resultados semelhantes foram observados em um estudo *in vivo* em que cepas resistentes a fluconazol (ATCC e isolado clínico) foram mais resistentes a aPDT mediada pelo PDZ ( $\sim 1,96 \log_{10}$ )<sup>28</sup>, quando comparadas a cepas sensíveis utilizando o mesmo fotossensibilizador ( $\sim 3 \log_{10}$ )<sup>29</sup>. Em outro estudo que avaliou cepas resistentes foi relatado que a aPDT mediada pelo azul de toluidina foi potencializada quando associada a Chitosana<sup>50</sup>. Karanja et al.<sup>61</sup> (2017) verificaram, por meio de Espectroscopia Raman um aumento do acúmulo de lipídeos de membrana em cepas resistentes de *C. albicans* quando comparadas as susceptíveis, sugerindo que esses lipídeos contribuem para resistência antifúngica. Segundo Maish et al.<sup>33</sup> (2005) os lipídeos presentes na membrana celular são considerados alvos primários das ROS geradas no processo fotodinâmico. Dessa forma, podemos sugerir que esse seria um dos aspectos que poderiam estar influenciando na susceptibilidade reduzida à aPDT das cepas resistentes em relação às susceptíveis.

Na análise macroscópica das lesões foi possível verificar que a terapia combinada (independente da sequência do tratamento) promoveu redução de 97,34% e 92,23%, para os grupos P+L+NYS e YYS+P+L+, na extensão das

lesões presentes na língua dos camundongos, 24 horas após os tratamentos. Sete dias após os tratamentos a redução das lesões foi equivalente a 47,88 % para P+L+NYS e 55,98% para YYS+P+L+, sugerindo recidiva da infecção. Por outro lado, as terapias aplicadas isoladamente apresentaram resultados semelhantes aos grupos controles (P-L-, P+L- e P-L+), isto é, presença de manchas brancas ou pseudomembrana na língua dos animais independente do período de avaliação (24 horas e 7 dias após os tratamentos). Em estudo prévio foi observado que a aPDT mediada por PDZ promoveu a remissão da lesão 24 horas após o tratamento<sup>29</sup>. Entretanto, esses autores avaliaram cepas sensíveis ao fluconazol. Dessa forma, a divergência nos resultados obtidos pode ser atribuída ao tipo de cepa avaliada e não ao protocolo de tratamento utilizado.

O presente estudo também avaliou histologicamente a reação dos tecidos da língua aos tratamentos avaliados. Foi observado que os animais submetidos à terapia combinada (P+L+NYS+ e YYS+P+L+) apresentaram características histológicas de normalidade, semelhantes ao CNI. Os tecidos apresentaram reduzida quantidade de hifas/pseudo-hifas/blastoporos sobre a camada de queratina e discreta inflamação no tecido conjuntivo subjacente enquanto que o tecido muscular encontrava-se íntegro. Os animais submetidos as terapias isoladas (P+L+ ou YYS) apresentaram praticamente as mesmas características de normalidade, entretanto, a camada de queratina apresentou-se extensamente contaminada com hifas e pseudo-hifas. Alves et al.<sup>28</sup> (2018) também avaliaram cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol e observaram que a infecção provocada por essa cepa promoveu resposta inflamatória severa no tecido conjuntivo subjacente. Esses autores observaram que, após aPDT mediada pelo PDZ (uma aplicação), a reação inflamatória regrediu de intensa para discreta. Por outro lado, Carmello et al.<sup>29</sup> (2016) ao avaliarem cepas de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol, observaram a presença de infiltrados inflamatórios leves no grupo tratado com aPDT. Esses mesmos resultados foram observados em outros estudos que avaliaram a eficácia da aPDT no tratamento da candidose utilizando diferentes tipos de fotossensibilizadores<sup>26,40</sup>. Nos animais dos grupos controle (P-L-, P+L- e P-L+) foi observado grande quantidade de hifas/pseudo-hifas recobrimo o tecido epitelial, o qual exibiu acantose associada à ampla destruição de suas papilas.

Este epitélio apresentou intensa inflamação, caracterizada pela presença de células mononucleares em meio a vasos sanguíneos dilatados. O tecido subjacente apresentava fibras musculares estriadas esqueléticas, sendo que entre os feixes musculares estava presente uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo com características de normalidade. Esses resultados foram observados nos cortes histológicos realizados 24 horas após os tratamentos e, após 7 dias, também foi observada a presença de feixes musculares parcialmente degradados na região mais superficial. Esses resultados estão de acordo com Alves et al.<sup>28</sup> (2018) que também observaram que as cepas resistentes provocam uma resposta inflamatória severa no tecido conjuntivo subjacente, independentemente do tipo de cepa avaliada (ATCC ou isolado clínico). Foi verificada a presença de numerosas lesões epiteliais, como hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, exocitose, perda de papilas filiformes e hiperparaceratose. Okada et al.<sup>43</sup> (2013) avaliaram as características histológicas da infecção induzida por um isolado clínico e observaram que 48 horas após a inoculação foi observada extensa colonização caracterizada pela presença de numerosas hifas no epitélio do dorso da língua. Além disso, foi observada extensa destruição da estrutura normal das papilas linguais e suas camadas epiteliais circundantes. Dessa forma, podemos sugerir que o infiltrado inflamatório encontrado nos grupos tratados está associado com a infecção causada por *C. albicans* e não aos protocolos de tratamento utilizados.

Em resumo, a combinação das terapias foi mais efetiva no tratamento de candidose oral em camundongos infectados por *C. albicans* resistente a fluconazol em comparação às terapias aplicadas isoladamente.



## 7 CONCLUSÃO

- A combinação das terapias, independente da ordem da aplicação, foi efetiva no tratamento de candidose oral em camundongos infectados por *C. albicans* resistente a fluconazol em comparação às terapias aplicadas isoladamente;
- A análise macroscópica demonstrou que a terapia combinada, promoveu remissão das lesões orais em 97,34% e 92,23%, para os grupos P+L+NYS e NYS+P+L+, respectivamente, no período de 24 horas. Após 7 dias foi verificada discreta recidiva na infecção (lesões abrangeram 47,88 % e 55,98% para P+L+NYS e NYS+P+L+, respectivamente).
- Quando as terapias combinadas foram empregadas a análise histológica demonstrou que os tecidos avaliados apresentaram características histológicas de normalidade quando comparado ao grupo controle negativo de trabalho.

**REFERÊNCIAS\***

1. Martin R, Wächtler B, Schaller M, Wilson D, Hube B. Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301(5): 417–22.
2. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016; 18(5): 310–21.
3. Brown AJP, Brown GD, Netea MG, Gow NAR. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol.* 2014; 22(11): 614–22.
4. Gow NAR, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol.* 2012; 15(4): 406–12.
5. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62(PART1): 10–24.
6. Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res.* 2005 ; 84(11): 966-77.
7. Dongari-Bagtzoglou A, Dwivedi P, Ioannidou E, Shaqman M, Hull D, Burlison J. Oral *Candida* infection and colonization in solid organ transplant recipients. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(3):249-54.
8. Cowen LE, Steinbach WJ. Stress , drugs , and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell.* 2008; 7(5): 747-64.
9. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008; 35(11): 836–46.

---

\* 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-atualizadp.pdf>.

10. Morace G, Perdoni F, Borghi E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *J Glob Antimicrob Resist*. 2014; 2(4): 254–9.
11. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dent*. 2001; 21(1): 4–8.
12. Samaranayake LP, Ferguson MM. Delivery of antifungal agents to the oral cavity. *Adv Drug Delivery Rev*. 1994; 13:161–79.
13. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994; 72(3): 283-8
14. 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.
15. Patton LL, Bonito AJ, Shugars DA. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 92(2): 170–9.
16. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res*. 2009; 9(7): 1029–50.
17. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis*. 2017; 216(3): S445–51.
18. Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2009; 54(11): 1052–60.
19. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry . *J Dent Res*. 2007; 86 (8): 694-707.
20. Lambrechts SAG, Aalders MCG, Van MJ. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(5): 2026–34.

21. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163(1): 1–12.
22. Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry. *Laser Phys.* 2016; 26(12): pii: 123001
23. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* 2001; 57(47): 9513–47.
24. Ferreira J, Menezes PFC, Sibata CH, Allison RR, Zucoloto S, Castro e Silva O, et al. Can efficiency of the photosensitizer be predicted by its photostability in solution? *Laser Phys.* 2009; 19(9): 1932–8.
25. Quishida CCC, Carmello JC, Mima EG de O, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(2): 685–94.
26. 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.
27. 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.
28. Alves F, Carmello JC, Mima EGO, Costa CAS, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Med Mycol.* 2018 Oct 18. [Epub ahead of print].
29. Carmello JC, Alves F, Basso FG, De Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EGDO, et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine-mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS One.* 2016; 11(6): 1–18.
30. Antoniadou A, Kontoyiannis DP. Status of combination therapy for refractory mycoses. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16(6): 539–45.

31. Hsieh Y-H, Zhang J-H, Chuang W-C, Yu K-H, Huang X-B, Lee Y-C, et al. An in vitro study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on *Candida albicans*. *Int J Mol Sci* . 2018; 19(2): 337.
32. Barra F, Roscetto E, Soriano AA, Vollaro A, Postiglione I, Pierantoni MG, et al. Photodynamic and antibiotic therapy in combination to fight biofilms and resistant surface bacterial infections. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(9): 20417–30.
33. Maisch T, Bosl C, Szeimies R, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of Novel XF Porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(4): 1542–52.
34. 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): 123–30.
35. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello AJC, Machado AL. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of Curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9):927-34.
36. Carmello JC, Alves F, Mima EG de O, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species using Photodithazine®. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017; 17: 194–9.
37. Alves F, de Oliveira Mima EG, Passador RCP, Bagnato VS, Jorge JH, Pavarina AC. Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2017; 32(4): 815–26.
38. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(2): 155–60.

39. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol.* 2003; 47(5): 321–6.
40. Mima EG de O, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA de S, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2010; 109(3): 392–401.
41. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, De Oliveira Mima EG, Machado AL, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. a clinical investigation photodynamic disinfection of complete dentures. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1): 161–8.
42. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EMS, 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.
43. Okada M, Hisajima T, Ishibashi H, Miyasaka T, Abe S, Satoh T. Pathological analysis of the *Candida albicans*-infected tongue tissues of a murine oral candidiasis model in the early infection stage. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(4): 444–50.
44. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013; 51(3): 243–51.
45. Alves F, Alonso GC, Carmello JC, Mima EG de O, Bagnato VS, Pavarina AC. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by Photodithazine® in the treatment of denture stomatitis: a case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 21: 168–71.
46. Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by Curcumin-Loaded polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis. *Molecules.* 2018; 23(8): pii E2075.

47. Snell SB, Foster TH, Haidaris CG. Miconazole induces fungistasis and increases killing of *Candida albicans* subjected to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(3): 596–603.
48. Davies A, Gebremedhin S, Yee M, Padilla RJ, Duzgunes N, Konopka K, et al. Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole. *J Physiol Pharmacol.* 2016; 67(5): 777–83.
49. Pourhajibagher M, Kazemian H, Chiniforush N, Bahador A. Evaluation of photodynamic therapy effect along with colistin on pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Laser Ther.* 2017; 26(2): 97–103.
50. Huang M, Shen M, Huang Y, Lin H, Chen C. Photodynamic inactivation potentiates the susceptibility of antifungal agents against the planktonic and biofilm cells of *Candida albicans*. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(434): 1-12.
51. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(9): 881–90.
52. Lushchak VI. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol.* 2011; 153(2): 175–90.
53. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses.* 2012;55(3):199–204.
54. Abreu- Balnco MT, Watts JJ, Verboon JM, Parkhurst SM. Cytoskeleton responses in wound repair. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 2469–83.
55. Yan L, Yang C, Tang J. Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections. *Microbiol Res.* 2013; 168(7): 389–95
56. Taff HT, Mitchell KF, Edward JÁ. Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Futur Microbiol.* 2013, 8(10): 1325-37.
57. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; 14(8): 1518–26.

58. Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Dongari-bagtzoglou A. Streptococcus oralis and Candida albicans synergistically activate  $\mu$ -calpain to degrade E-cadherin from oral epithelial junctions. J Infect Dis. 2016; 214(6): 925–34.
59. Gow NAR, Yadav B. Microbe profile: Candida albicans: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. Microbiol (United Kingdom). 2017; 163(8): 1145–7.
60. Kashef N, Hamblin MR. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? Drug Resist Updat . 2017; 31: 31–42.
61. Karanja CW, Hong W, Younis W, Eldesouky HE, Seleem MN, Cheng JX. Stimulated raman imaging reveals aberrant lipogenesis as a metabolic marker for azole-resistant Candida albicans. Anal Chem. 2017; 1989(18): 9822-29.
62. Hu X, Huang Y-Y, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. Front Microbiol. 2018; 9: 1–24.
63. Chien CT, Chen YC, Liu YC, Liang SH, Lin HH, Lin CH. The antimicrobial photodynamic inactivation resistance of Candida albicans is modulated by the Hog1 pathway and the Cap1 transcription factor. Med Mycol. 2018; Oct 4. [Epub ahead of print].
64. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC, Helena B, Panariello D. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant Candida albicans and Candida glabrata biofilms. J Oral Microbiol. 2018; 10(1).



## APÊNDICES

**TABELA A- Dados Originais da Análise Microbiológica da Contagem de Colônias (LOG)**

Grupos	Períodos Avaliados	
	24 horas (log)	7 dias (log)
P-L	4.30	4.51
	5.89	4.69
	4.90	5.29
	5.85	4.69
	5.58	5.12
	4.70	4.90
	5.38	4.69
	4.69	4.55
	4.09	5.24
	3.81	4.55
P+L-	4.34	4.66
	4.39	5.11
	4.32	4.34
	3.33	4.70
	4.28	4.70
	5.16	4.75
	4.18	4.20
	3.23	4.90
	2.95	4.34
	3.60	4.66
NYS	2.56	4.21
	3.20	3.90
	2.86	4.46
	3.27	4.25
	2.30	4.63
	3.13	4.57
	3.25	4.40
	2.79	4.15
	2.70	4.46
	3.47	5.15
P+L+	1.91	4.03
	2.42	4.63
	3.46	4.44
	3.90	4.58
	2.95	4.63
	3.43	4.36
	4.13	4.07
	3.55	4.30
	4.37	4.38
	4.13	4.30
P+L+NYS	2.15	3.08

	3.41	3.06
	2.48	2.68
	2.58	4.37
	3.13	4.06
	2.08	4.09
	3.41	4.47
	2.42	5.09
	1.79	4.41
	2.46	3.44
P-L+	3.03	4.50
	3.34	5.15
	5.37	4.07
	3.32	4.83
	4.52	4.80
	3.60	4.56
	4.11	4.35
	3.79	3.73
	4.74	4.69
	4.46	4.62
NYS+P+L+	2.30	4.57
	2.78	4.69
	1.61	3.21
	2.60	4.26
	3.62	4.31
	2.42	3.20
	3.30	4.52
	2.60	3.63
	1.79	3.63
	2.60	3.30

**Tabela B –Dados Originais da Análise em porcentagem correspondente a Análise Macroscópica**

Grupos	Períodos Avaliados	
	24 horas (%)	7 dias (%)
P-L	19.913	46.248
	38.405	28.968
	63.621	43.374
	37.717	69.550
	37.728	55.380
	55.856	47.460
	29.757	90.672
	53.834	37.743
	42.806	57.717
	P-L+	34.113
38.634		50.864
46.064		40.074
36.442		64.381
31.359		34.025
33.329		57.473
47.998		42.475
51.388		54.587
55.222		70.085
NYS	16.235	34.025
	23.295	57.473
	20.277	42.475
	26.885	54.587
	26.627	70.085
	25.208	49.750
	17.693	18.202
	21.515	46.091
	26.056	37.929
P+L+	39.412	34.975
	35.685	26.180
	27.309	50.617
	11.139	40.257
	22.762	25.647
	11.705	41.806
	21.730	55.541
	17.924	50.437
	13.754	61.359
P+L+NYS	2.128	29.884
	3.691	16.571
	0.321	28.326
	0.243	25.759
	0.320	34.246
	0.665	28.967
	0.375	16.564

	1.122	37.236
	1.825	31.075
P+L-	24.198	41.901
	37.306	34.090
	33.314	52.932
	25.409	55.087
	28.504	39.596
	41.826	57.509
	19.089	59.959
	31.813	62.606
	50.170	47.208
	NYS+P+L+	2.571
1.131		24.071
5.696		14.603
1.710		23.031
3.519		25.169
6.160		31.034
2.295		10.927
1.493		27.010
6.638		30.051

## ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 33/2016

Araraquara, 23 de fevereiro de 2018.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado **"AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DE CANDIDOSE ORAL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CANDIDA ALBICANS RESISTENTE A FLUCONAZOL"** (Proc. CEUA nº 33/2016), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de alteração na metodologia e no número de animais da pesquisa.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **MAIO/2018**.

Atenciosamente.

**Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE**  
Coordenadora da CEUA

À  
**Profa. Dra. ANA CLÁUDIA PAVARINA**  
DD. Pesquisador Responsável  
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese

**Não autorizo a reprodução deste trabalho antes de 26 de novembro de  
2020**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Karem Janeth Rimachi Hidalgo**

**Araraquara, 26 de novembro de 2018**