

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/05/2021.



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



Cláudia Carolina Jordão

Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia fotodinâmica associada ao antifúngico

Araraquara

2019



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



Cláudia Carolina Jordão

Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia fotodinâmica associada ao antifúngico

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral- Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

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

Araraquara

2019

Jordão, Cláudia Carolina

Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia fotodinâmica associada ao antifúngico / Cláudia Carolina Jordão. -- Araraquara: [s.n.], 2019
144 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Co-orientadora: Dra. Marlise Inêz Klein

1. Fotoquimioterapia 2. *Candida albicans* 3. Expressão gênica I. Título

Cláudia Carolina Jordão

Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia fotodinâmica associada ao antifúngico

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Prof. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

3º Examinador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

Araraquara, 22 de maio de 2019

DADOS CURRICULARES

Cláudia Carolina Jordão

Nascimento: 01/06/1994 – Santa Rita do Passa Quatro, São Paulo

Filiação: Claudio Roberto Jordão
Andréia Sirlene Pigato Jordão

2012 – 2016: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2013 – 2014: Bolsa de Extensão no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2014 – 2015: Estágio de Iniciação Científica no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2015 – 2016: Bolsa de Extensão no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, área de Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2017 – 2018: Estágio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”-UNESP.

2017 – 2019: Curso de Mestrado em Reabilitação Oral com ênfase em Prótese pela Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr-Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus** por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Pelas bênçãos concedidas para que esse trabalho fosse realizado e por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.*

*Aos meus pais **Claudio e Andréia**, meu eterno agradecimento por dedicarem suas vidas ao meu bem-estar. Por sempre abdicarem dos seus sonhos a favor dos meus. Pelo apoio, incentivo e compreensão que foram essenciais para essa caminhada. Obrigada por serem meus exemplos. Esse trabalho não seria possível sem o apoio de vocês. Amo vocês!*

*Ao meu irmão **Matheus e minhas tias**, pela ajuda, carinho e apoio durante toda a minha caminhada. Amo vocês!*

*Agradeço ao meu namorado, **Bruno**, com quem eu sei que passarei por muitos momentos de felicidade como este e que é a pessoa que a vida escolheu para ser meu companheiro nas horas boas e ruins. Sendo mais que um namorado, o meu melhor amigo. Que me apoia, me incentiva a continuar e faz os momentos em Araraquara mais leves e felizes. Amo você!*

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

*Agradeço a **Profª Drª Marlise Inêz Klein** pela paciência e dedicação neste trabalho, os quais foram essenciais para o seu desenvolvimento. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos e por permitir meu crescimento acadêmico. Agradeço o carinho ao longo dessa jornada, que me estimulou a continuar.*

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

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

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

As amigas **Juliana Cabrini e Luana Dias**, obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos e contribuições ao longo dessa jornada. Obrigada também pela ajuda com a realização da estatística. Sem a ajuda de vocês essa jornada seria mais árdua. Muito obrigada!

Aos amigos **Jaqueline Zocolotti, Maria Isabel Amaya, Isadora Malavolta, Sabrina Ribeiro e Erick Dante**, obrigada pela amizade e apoio tanto dentro quanto fora da faculdade, durante todo o curso de mestrado.

Aos amigos companheiros da pós-graduação **Laís Medeiros, Camila Jabr, Diego Dantas, Thais Soares, Marcela Dantas, Bruna Valerini, Carlos Moura, Mônica Tinajero, Beatriz Panariello, Fernanda Alves, Gabriela Alonso, Elkin Florez, Guilherme Rocha, Bruna Pimentel, Jefferson Trigo, Midian Castillo e Carmelia Lobo** obrigada pela amizade e convívio.

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

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

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

este período.

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

Aos professores membros da banca, **Profº Drº Ewerton Garcia de Oliveira Mima e Profº Drº Cássio do Nascimento**, pela disponibilidade em estar presente e contribuição com seus ensinamentos. Obrigada!

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq)** pela bolsa de Mestrado concedida no período de maio/2017 a março/2019.

Agradeço ao **CEPID (Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão)** (2013/07276-1).

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*
Madre Teresa de Calcutá

Jordão CC. Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia aotodinâmica antimicrobiana associada ao antifúngico [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

O estudo tem como objetivo avaliar a susceptibilidade ao fluconazol e a expressão de genes de virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de cepa de *Candida albicans* resistente a fluconazol (ATCC 96901) presentes nas línguas de camundongos submetidos à aPDT associada a Nistatina. Para isso, colônias recuperadas de animais submetidos ao tratamento com aPDT e Nistatina (NIS) bem como a associação (NIS+aPDT e aPDT+NIS), foram armazenadas em glicerol 50% e utilizadas para o Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Além disso, as línguas dos animais submetidos aos tratamentos foram armazenadas em *RNAlater* (*RNAlater Tissue Collection: RNA Stabilization Solution Protocol Ambion®*) em freezer -80°C para avaliação da expressão gênica. Para realização do teste CIM, as cepas foram reativadas em placas de Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), cultivadas em estufa 35°C por 48 h e avaliadas seguindo o método de microdiluição em caldo (CLSI) com algumas modificações. Foram realizadas diluições seriadas de fluconazol (variando de 2 a 1024 µg/ml) em meio RPMI 1640 (2 x concentrado), em suspensões (0,5x10³ a 2,5x10³ UFC/mL). As placas foram incubadas a 35°C e observadas quanto à presença ou ausência de crescimento após 24 h, além disso, foi realizado plaqueamento (CFM). Foram consideradas as menores concentrações de fluconazol que resultaram em inibição de pelo menos 50% do crescimento. A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio da técnica quantitativa de Transcrição Reversa da reação em cadeia de polimerase (RT-qPCR) utilizando *primers* específicos para os genes de virulência (ALS1; HWP1; EFG1; CAP1; CAT1; SOD1; SAP1; PLB1 e LIP3) e genes envolvidos na síntese do ergosterol (ERG1; ERG11; ERG3 e ERG25). Novos *primers* para os genes ERGs foram desenhados (*Oligo Software™*) a partir de seqüências obtidas do "Pubmed". Os *primers* foram sintetizados e testados in vitro pela técnica de PCR utilizando um painel de DNA genômico de diferentes espécies de *Candida*, com seus produtos visualizados em gel de agarose. Reações de qPCR foram realizadas para determinar a concentração ótima e a eficiência dos *primers*. Para análise da expressão gênica, as línguas foram submetidas à extração e purificação de RNA. O cDNA foi sintetizado e a técnica de RT-qPCR realizada. Os dados de CFM e expressão foram analisados por Análise de Variância ($\alpha = 0,05$). Os resultados do CFM pós CIM foram avaliados por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Foi verificado que, independente do tratamento aplicado e do momento da coleta (24h ou 7 dias após tratamento), as cepas recuperadas foram semelhantes ao grupo P-L-(animais sem tratamento). Demonstrando que não houve modificação do perfil de resistência da cepa ao fluconazol nas concentrações testadas. Em relação a expressão gênica, os *primers* delineados não foram específicos somente para *C. albicans*. No presente estudo, foi observado que os genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25 apresentaram comportamento semelhante, com redução da expressão gênica nos grupos onde foram realizados os tratamentos em comparação com o grupo controle (P-L-). Os resultados demonstraram que os tratamentos reduziram a expressão dos genes

ALS1, EFG1, CAP1, LIP3, SAP1 e SOD1 em todos os grupos experimentais avaliados em relação ao controle (P-L-). Quando utilizada a terapia combinada (aPDT+NIS, NIS+aPDT), houve redução mais acentuada na expressão dos genes ALS1, LIP3, SAP1 e SOD1. A expressão do gene EFG1, foi estatisticamente semelhante em todos os grupos de tratamento e menor que no grupo controle (P-L-). Para os genes CAT1 e SOD1, não foi observada diferença estatística entre os grupos aPDT e aPDT+NIS. Para os genes CAP1, EFG1, HWP1 e LIP3, os grupos P-L+ e aPDT não apresentaram diferença estatística entre si. Para os genes CAP1, EFG1 e HWP1 não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento NIS e os que foram avaliados a associação das terapias (NIS+aPDT e aPDT+NIS). Não houve expressão detectada para o gene PLB1. A associação de terapias não alterou a susceptibilidade fúngica ao fluconazol e reduziu a expressão dos genes ERG1, ERG3, ERG11, ERG25, ALS1, EFG1, SAP1, LIP3, CAP1 e SOD1.

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. *Candida albicans*. Expressão Gênica.

Jordão CC. Expression of virulence and involved in the synthesis of ergosterol of *Candida albicans* resistant to fluconazole submitted to antimicrobial photodynamic therapy associated with antifungal [dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the susceptibility to fluconazole and the expression of virulence genes and involved in ergosterol synthesis of fluconazole resistant strain of *Candida albicans* (ATCC 96901) present in the mouse's tongue submitted to aPDT associated with Nystatin. For this, colonies recovered from animals submitted to treatment with aPDT and Nystatin (NIS) as well as their association (NIS + aPDT and aPDT + NIS) were stored in 50% glycerol and used for the Minimum Inhibitory Concentration Test (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). In addition, part of the tongue of the treated animals were stored in RNAlater (RNAlater Tissue Collection: RNA Stabilization Solution Protocol Ambion®) in -80 °C freezer for evaluation of gene expression. To accomplish the MIC test, the strains were reactivate in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) plates, grown in a 35 °C oven for 48 h and evaluated using the broth microdilution method (CLSI) with some modifications. Serial dilutions of fluconazole (ranging from 2 to 1024 µg / ml) in RPMI 1640 medium (2x concentrate) were performed in suspensions (0.5×10^3 to 2.5×10^3 CFU / ml). The plates were incubated at 35 °C and observed for presence or absence of growth after 24 h, plating was also performed (CFM). The lowest concentrations of fluconazole that resulted in inhibition of at least 50% growth were consider. The quantification of the gene expression was performed using quantitative Reverse Transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) using specific *primers* for the virulence genes (ALS1; HWP1; EFG1; CAP1; CAT1; SOD1; SAP1; PLB1 and LIP3) and genes involved in the synthesis of ergosterol (ERG1; ERG11; ERG3 and ERG25). New *primers* for the ERG genes were designed (Oligo Software™) from sequences obtained from "Pubmed". The *primers* were design and tested in vitro by the PCR technique using a panel of genomic DNA from different *Candida* species, with their products visualized on agarose gel. Reactions of qPCR were performe to determine the optimum concentration and efficiency of the *primers*. For the analysis of the gene expression, the tongue were submitt to the extraction and purification of RNA. The cDNA was synthesized and the RT-qPCR technique was performed. The CFM and expression data were analyzed by Analysis of Variance ($\alpha = 0.05$). The results of the CFM before MIC were evaluated by ANOVA followed by the Tukey post-test ($\alpha = 0.05$). Regardless of the treatment applied and the time of collection (24h or 7 days after treatment), the recovered strains showed a similar behavior to the P-L- group. Demonstrating that there was no change in the resistance profile of the strain to fluconazole at the concentrations tested. Regarding the q-PCR data, the designed *primers* were not specific only for *C. albicans*. All *primers* presented ideal Melt Curves, correlation coefficient $\cong 1$ and efficiency between 90-110%, with slope $\cong -3.3$. In the present study, the expression of ERG1, ERG3, ERG11 and ERG25 genes presented similar behavior, with reduction expression in the groups that the treatments were performe in comparison with the control group (P-L-). The results showed that the treatments reduced the expression of ALS1, EFG1, CAP1, LIP3, SAP1 and SOD1 genes in all the experimental groups evaluated in relation to the control (P-L-). When combined therapy (aPDT + NIS, NIS + aPDT) was use, there was pronounce reduction in the

expression of ALS1, LIP3, SAP1 and SOD1 genes. EFG1 gene expression was statistically similar in all treatment groups and lower than in the control group (P-L-). For the CAT1 and SOD1 genes, no statistical difference was observed between aPDT and aPDT + NIS groups. For the CAP1, EFG1, HWP1 and LIP3 genes, the P-L + and aPDT groups showed no statistical difference between them. For the CAP1, EFG1 and HWP1 genes, there was no statistical difference between the NIS treatment groups and those that evaluated the association of the therapies (NIS + aPDT and aPDT + NIS). There was no expression detected for the PLB1 gene. The association of therapy did not change the fungal susceptibility to fluconazole and reduced expression of genes ERG1, ERG3, ERG11, ERG25, ALS1, EFG1, SAP1, LIP3, CAP1 and SOD1.

Keywords: Photochemotherapy. *Candida albicans*. Gene Expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 PROPOSIÇÃO	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 Infecções Causadas por <i>Candida spp.</i> e Tratamentos	23
3.2 Resistência Antifúngica.....	25
3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	29
3.4 Expressão de Genes de Virulência e Envolvidos na Síntese de Ergosterol	34
4 MATERIAL E MÉTODO	42
4.1 Coleta das Amostras	42
4.2 Avaliação da Susceptibilidade ao Fluconazol (MIC) das Células Recuperadas Após os Tratamentos	44
4.3 Expressão Gênica de <i>C. albicans</i> Presente nas Línguas dos Camundongos	45
4.3.1 Desenho de novos <i>primers</i>	47
4.3.1.1 Obtenção do gene no formato FASTA.....	47
4.3.1.2 Basic Local Alignment Search Tool.....	48
4.3.1.3 Mfold.....	48
4.3.1.4 Oligo Primer Analysis Software™	49
4.3.2 Extração de DNA para padronização do <i>primer</i>	49
4.3.2.1 Extração e isolamento do DNA	49
4.3.2.2 Eletroforese em gel de agarose	51
4.3.3 Padronização dos <i>primers</i>	52
4.3.3.1 <i>Primer: diluição e armazenamento</i>	52
4.3.3.2 <i>Análise in vitro e padronização dos primers</i>	53
4.3.3.2.1 <i>Especificidade dos primers por PCR seguido de eletroforese em gel de agarose</i>	53
4.3.3.2.2 <i>Determinação da concentração ótima de cada primer</i>	54

4.3.3.2.3	<i>Confecção de curvas padrão para análise de expressão gênica</i>	56
4.3.3.2.4	<i>Reação de qPCR para verificar a eficiência de cada Primer</i>	58
4.3.3.2.5	<i>Etapas realizadas para uso dos genes de virulência delineados por outros autores</i>	59
4.3.4	Extração de RNA das línguas dos camundongos	59
4.3.5	Purificação do RNA	61
4.3.5.1	<i>Primeira etapa de purificação</i>	61
4.3.5.2	<i>Segunda etapa de purificação: tratamento com DNase I em solução</i>	63
4.3.5.3	<i>Terceira etapa de purificação</i>	63
4.3.6	Síntese de cDNA	64
4.3.7	Quantificação da expressão gênica utilizando RT-qPCR	65
4.4	Análise Estatística	66
5	RESULTADO	67
5.1	Avaliação da Susceptibilidade ao Fluconazol (CIM) das Células Recuperadas Após os Tratamentos	67
5.2	Padronização dos Primers	69
5.2.1	<i>Extração de DNA de Candida spp.</i>	69
5.2.2	<i>Diluição e preparo dos primers</i>	70
5.2.3	<i>Especificidade dos primers testados</i>	71
5.2.4	<i>Determinação da concentração ótima de cada primer</i>	72
5.2.5	<i>Confecção da curva padrão de cada primer</i>	74
5.2.6	<i>qPCR para análise da curva padrão e eficiência de cada primer</i>	77
5.3	Extração de RNA das Línguas dos Camundongos	81
5.4	Purificação do RNA	82
5.5	Síntese de cDNA	86
5.6	qPCR para Avaliação da Expressão Gênica	86
6	DISCUSSÃO	100

7 CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS	112
APÊNDICE A	120

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* pertencem à microbiota da cavidade oral, trato gastrointestinal e vagina de indivíduos saudáveis. Fatores predisponentes podem fazer com que esses micro-organismos atuem como patógenos oportunistas, sendo responsável pelo desenvolvimento de infecção. *Candida albicans* é considerada a espécie mais prevalente e patogênica¹. Essa espécie tem sido associada a manifestações clínicas de infecção que variam desde lesões mucocutâneas superficiais, tais como Candidose Orofaríngea (OPC) até formas disseminadas da infecção². A OPC tem sido relatada 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) e não fazem uso de anti-retrovirais^{1,2}.

A patogenicidade das diferentes espécies de *Candida* parece ser mediada por diversos fatores de virulência, os quais podem ser entendidos como as características ou produtos microbianos que possibilitam a interação com as células do hospedeiro causando algum tipo de dano^{3,4}. Os principais fatores de virulência identificados nas espécies de *Candida* são: capacidade de contornar as defesas do hospedeiro, adesão e formação de biofilme em tecidos humanos e superfícies abióticas^{5,6} e a produção de enzimas hidrolíticas com capacidade de destruição tecidual⁴. A capacidade de adesão das células de *Candida albicans* ao hospedeiro tem sido relacionada com o gene aglutinina (ALS1), que é responsável por codificar a proteína de adesão celular, a adesina⁷. Ainda, este fungo possui a habilidade de adaptação às alterações no pH do ambiente, flexibilidade metabólica e resposta ao estresse oxidativo. Como proteção e em resposta ao estresse oxidativo, o mesmo expressa genes antioxidantes, entre eles CAP1, CAT1 e SOD1 que ativam vias que auxiliam na proteção contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS)⁸⁻¹². Além desses fatores, o gene EFG1 atua como um fator de transcrição, regulando a transcrição de genes que são responsáveis pela formação do biofilme¹³. A formação de hifas, mediada pelo gene HWP1, facilita a adesão e invasão do fungo no tecido do hospedeiro¹⁴. As lipases são enzimas que degradam lipídeos e são codificadas por vários genes, entre eles o LIP3, que permite o crescimento do biofilme na mucosa¹⁵. Além disso, *C. albicans* também possui a capacidade de invasão tecidual pela ruptura da membrana celular do hospedeiro, por meio da secreção de enzimas degradativas como as fosfolipases (por exemplo, PLB1)¹⁶ e as proteinases (por exemplo, SAP1)¹¹. Além disso, a avaliação da

expressão desses genes após os tratamentos pode ajudar a entender os mecanismos de ação do microrganismo frente aos tratamentos propostos.

Para tratamento da OPC, têm sido utilizados os antifúngicos derivados poliênicos, azólicos e equinocandinas¹⁷. Os agentes poliênicos, particularmente a nistatina, são os medicamentos tópicos mais utilizados e tem se mostrado eficazes no alívio dos sinais e sintomas clínicos da doença, entretanto, muitas vezes não eliminam completamente as espécies de *Candida*^{1,18}. Os efeitos diluentes da saliva e movimentos da musculatura bucal normalmente reduzem a dose desses agentes a concentrações subterapêuticas, o que reduz a eficácia deste medicamento¹. Conseqüentemente, a re-colonização da mucosa bucal pelo microrganismo tem sido frequente após a utilização do antifúngico, o que leva a infecções recorrentes¹⁹. A prescrição de antifúngico sistêmico (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) tem sido instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e em episódios de infecções recorrentes²⁰. Esses agentes vêm sendo amplamente empregados para o tratamento da candidose, especialmente em pacientes imuno-comprometidos, porém tem sido relatado a ocorrência de efeitos hepatotóxicos ou nefrotóxicos com a utilização desses medicamentos¹, além de resistência antifúngica²¹.

A utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC tem resultado no desenvolvimento de resistência em espécies de *Candida*²¹⁻²³. Resistência antifúngica pode ser definida como a persistência ou a progressão de uma infecção após aplicação do tratamento²⁴. Em *C. albicans* essa resistência é principalmente secundária, que é aquela adquirida após longos períodos de exposição ao fármaco²⁴. Além disso, a organização dos microrganismos em biofilmes proporciona proteção adicional, possibilitando a sobrevivência desses patógenos mesmo quando aplicada a terapia antifúngica⁵.

Em *C. albicans*, a resistência ao fluconazol é um processo multifatorial^{21,23} com combinação de diferentes mecanismos moleculares. Um exemplo é a indução da expressão de genes que codificam proteínas de transporte de membrana (bombas de efluxo), as superfamílias ABC (cassete de ligação ao ATP) e MFS (facilitadores) que altera a interação entre agentes antifúngicos azóis, pois a superexpressão dessas proteínas transportadoras de membrana, reduzem o acúmulo do antifúngico no meio intracelular^{21,22,47-50}. Além disso, a resistência pode ser oriunda de fatores ambientais que promovem a colonização fúngica ou a substituição de espécies²¹. Os antifúngicos azóis apresentam ação na síntese de ergosterol, atuando na expressão de genes e

proteínas, alterações nesta via podem induzir resistência. Os genes ERGs regulam a síntese de ergosterol pela modulação da enzima alvo na via de síntese de esteróis, a 14 α -lanosterol-desmetilase. Esta enzima é fundamental para a produção de ergosterol e a inibição em sua atividade resulta em ruptura da membrana celular promovendo a inibição do crescimento do fungo⁴⁷. Assim, o fluconazol, contribui para a regulação positiva dos genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25, que poderia induzir resistência fenotípica⁴⁷. Outro mecanismo de resistência aos azóis, envolve a calcineurina, proteína envolvida na mediação da resposta celular aos antifúngicos e na modulação do estresse oxidativo. Essa proteína é ativada quando se liga à calmodulina na presença de íons Ca⁺² e afeta a expressão gênica via transcrição de reguladores como Crz1p, atua fazendo com que o fungo tolere meios mais salinos e alto pH, além do estresse de membrana⁴⁷. A resposta a esse estresse de membrana envolve Hsp90 (“Heat Shock Proteins”), que é uma chaperona essencial na sinalização celular e dependente da co-chaperona Sgt1. Essa via é capaz de ocasionar a perda da função do gene ERG3 na biossíntese do ergosterol, tendo assim uma redução significativa na concentração de ergosterol na membrana⁵¹.

Considerando o aumento na incidência de patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade dos medicamentos utilizados, estudos têm buscado estratégias para inviabilização de espécies fúngicas resistentes aos tratamentos convencionais. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma modalidade de tratamento que tem sido utilizada no combate ao câncer, e também sugerida para a inativação de microrganismos²⁵⁻²⁷. 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 oxigênio²⁵. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS (fotossensibilização). Em seguida, uma fonte de luz de comprimento de onda adequado deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação celular²⁸. 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 com formação de oxigênio singleto (reação do tipo II), induzindo à produção de espécies reativas^{29,30}. Ambos os caminhos podem levar à morte celular. As espécies reativas

possuem reatividade não específica com moléculas orgânicas e podem causar danos irreversíveis em alvos celulares, tais como a lise da membrana e inativação de proteínas. Dessa forma, qualquer macromolécula celular pode ser considerada como alvo para a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e como o FS é aplicado externamente à célula, a membrana celular é considerado o alvo inicial^{25,29}. Os FSs mais utilizados na aPDT são predominantemente das famílias das porfirinas³¹ e das fenotiazinas³². Alguns estudos in vivo^{33,34} associaram a iluminação a diferentes FSs (Photogen® e azul de metileno) em modelo murino, reduzindo significativamente a viabilidade de *C. albicans*. A utilização da aPDT mediada pelo Photogen® também foi investigada como método para desinfecção clínica de próteses totais³⁵ e para tratamento de estomatite protética³⁶, e os resultados demonstraram uma redução significativa dos microrganismos e da inflamação.

Atualmente, uma nova classe de FS vem sendo empregada em aPDT, os FSs de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região vermelha (625-740 nm) do espectro eletromagnético. O Photodithazine ® (PDZ) é uma clorina e6, solúvel em água³⁷ e tem sido utilizada com sucesso na aPDT contra o câncer, devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singleto³⁸. Esse FS apresenta períodos curtos de sensibilização e alta banda de absorção no espectro eletromagnético (650 a 680 nm), o que o permite atravessar com maior profundidade os tecidos biológicos melhorando a ação da aPDT³⁹, além de produzir níveis mais elevados de oxigênio singleto³⁸. Em estudos preliminares foi observado que a aPDT mediada pelo PDZ associada a luz LED promoveu redução significativa na viabilidade de culturas planctônicas de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, além disso, cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após a aPDT⁴⁰. Já para o biofilme, aPDT promoveu redução na viabilidade celular equivalente a 0,9 log₁₀ (UFC/mL) para *C. albicans* e 1,4 e 1,5 log₁₀ (UFC/mL) para *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, respectivamente⁴⁰. Quando um biofilme misto formado por *C. albicans*, *C. glabrata*, e *Streptococcus mutans* foi submetido à aPDT com o PDZ foi observada uma redução significativa na viabilidade das colônias das três espécies avaliadas e uma redução significativa na atividade metabólica dos biofilmes submetidos à aPDT⁴¹. Em estudo in vivo em modelo murino de candidose a associação de 100 mg/L de PDZ com LED promoveu redução fúngica de 4,36 log₁₀⁴².

Um estudo realizado recentemente modificou o protocolo de indução de

candidose em animais de forma a possibilitar o tratamento da lesão com a aplicação da aPDT⁴³. Neste estudo, os animais foram contaminados com uma cepa padrão de *C. albicans* suscetível ao fluconazol. E os autores observaram que o modelo de indução de candidose mimetiza e mantém a infecção, e que aPDT foi efetiva no tratamento da candidose oral em camundongos contaminados com a cepa suscetível. Em outro estudo⁴⁴, foi avaliado o efeito da aPDT isoladamente em camundongos infectados com CaR, e os resultados demonstraram que aPDT se comportou de forma semelhante a Nistatina. Nesse contexto, visando reduções maiores na contagem de colônias e remissão da infecção, os autores realizaram a combinação de terapêuticas (aPDT+NIS e NIS+aPDT) que promoveu redução de 2,6 log₁₀ e 2,1 log₁₀ para os grupos aPDT+NIS+ e NIS+aPDT, respectivamente, 24 horas após os tratamentos. Além disso, a análise macroscópica revelou remissão das lesões orais, e a análise histológica demonstrou expressiva redução da reação inflamatória tecidual com características histológicas de normalidade⁴⁴. Embora estudos já tenham avaliado o efeito da aPDT em suspensões planctônicas, biofilmes, em animais e humanos, os efeitos que as aplicações sucessivas da aPDT e das terapias combinadas causariam na expressão de genes envolvidos com fatores de virulência de *C. albicans* e síntese de ergosterol ainda não foram avaliados até o presente momento.

Como relatado, o mecanismo de ação da aPDT é baseado na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são as responsáveis por causar o dano celular por meio de stress oxidativo. Essas ROS, tais como o radical superóxido (O²⁻), radical hidroxila (OH⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio singleto, podem acarretar danos a integridade celular⁴⁵. Tem sido sugerido que a presença de íons Fe²⁺, O₂ e H₂O₂ podem levar a reação química de Fenton, culminando na produção de radicais extremamente reativos aos constituintes celulares como DNA, lipídeos, proteínas e outras macromoléculas. Dessa forma, o dano oxidativo causado no DNA pode contribuir para a instabilidade genética e possível mutação nas células⁴⁵. Foi reportado efeito genotóxico da luz LED azul (455 nm) com aplicação de 37,5 J/cm² de dose de luz sobre *C. albicans*⁴⁶. Dessa forma, com base nos estudos acima citados, seria importante avaliar além do efeito antimicrobiano da luz LED, seu possível efeito na expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de espécies de *Candida*.

Na literatura pertinente há poucos estudos que avaliaram a resposta da cepa ATCC 96901 (resistente a fluconazol) quando submetida a diferentes tratamentos in

vitro bem como o comportamento dos genes específicos ou produtos desses genes⁵²⁻⁵⁵. Não há relatos de estudos que investigaram os efeitos da aPDT e sua associação com a Nistatina sobre a expressão gênica. Além disso, com a finalidade de avaliar se a suscetibilidade de *C. albicans* ATCC 96901 ao fluconazol pode ser alterado pelos tratamentos propostos in vivo foi avaliada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) após os tratamentos e a Concentração Fungicida Mínima (CFM).

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados podemos concluir que:

- ✓ A PDT não alterou o perfil a resistência da cepa ao Fluconazol uma vez que todos os grupos avaliados (P+L-, P-L+, PDT, NIS, PDT +NIS, NIS+PDT) apresentaram comportamento semelhante ao grupo P-L- (controle positivo), independente do momento da coleta;
- ✓ Os diferentes tratamentos avaliados promoveram redução na expressão dos genes relacionados com a biossíntese do ergosterol (ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25);
- ✓ Foi observado redução na expressão do gene ALS1 quando realizadas as terapias combinadas (NIS+aPDT e aPDT+NIS), aPDT ou NIS isoladamente;
- ✓ Para o gene EFG1 foi observado redução na expressão em todos os grupos de tratamento avaliados (aPDT, NIS, NIS+aPDT, aPDT+NIS), sugerindo redução na capacidade de dimorfismo e formação de biofilme;
- ✓ Nos grupos de tratamento onde a nistatina estava presente (NIS, NIS+aPDT ou aPDT+NIS) foi observado aumento na expressão do gene HWP1, sugerindo aumento na capacidade de formação de biofilme e o dimorfismo;
- ✓ O gene SAP1 e o LIP3 apresentaram redução na expressão após terapia combinada (NIS+aPDT e aPDT+NIS), aPDT e NIS, sugerindo redução na capacidade de invasão tecidual;
- ✓ No que se refere ao estresse oxidativo, foi observado redução na expressão dos genes CAP1 e SOD1 nos grupos tratados com aPDT, NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS. Por outro lado, os tratamentos que envolveram aPDT provocaram aumento na expressão do gene CAT1;
- ✓ A expressão do gene PLB1 não foi identificada no tipo de amostra avaliada no presente estudo;

REFERÊNCIAS*

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002; 78(922): 455-9.
2. Eggimman P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(11): 685-702.
3. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2001; 9(12): 591-6.
4. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 36(2): 288–305.
5. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183(18): 5385-94.
6. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(4): 633-8.
7. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(2): 109-18.
8. Dantas AS, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules.* 2015; 5(1): 142-65.
9. Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJP, Quinn J. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 2006; 17(2): 1018–32.
10. Martchenko M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(2): 456–67.
11. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis.* 2003; 188(3): 469-79.
12. Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamon RD. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun.* 1998; 66(5): 1953–61.

* 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-atualizado.pdf>

13. Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, et al. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. PLoS Genet. 2012; 8(12): e1003118.
14. Staab JF, Ferrer CA, Sundstrom P. Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. J Biol Chem. 1996; 271(11): 6298–305.
15. Nailis H, Kucharíková S, Řičicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. BMC Microbiol. 2010; 10: 114.
16. Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. J Biol Chem. 1998; 273(40): 26078–86.
17. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol. 2013; 62 (Pt 1): 10-24.
18. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. J Prosthet Dent. 1994; 72(3): 283-8.
19. 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.
20. 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.
21. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. Front Microbiol. 2017; 7: 2173.
22. Asai K, Tsuchimori N, Okonogi K, Perfect JR, Gotoh O, Yoshida Y. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(5): 1163-9.
23. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis. 2002; 2(2): 73-85.
24. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(2): 382-402.
25. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res. 2008; 163(1): 1-12.

26. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86(8): 694-707.
27. Lambrechts SAG, Aalders MCG, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(5): 2026-34.
28. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova*. 2000; 32: 237-43.
29. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 2001; 57(47): 9513-47.
30. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras*. 1996; 42(4): 229-36.
31. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2004; 47(16): 3897–915.
32. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 33: 67-73.
33. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VS. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(3): 392–401.
34. 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.
35. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Mima EG, Machado AL, Bagnato VS, Vergani CE. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. Photodynamic disinfection of complete dentures. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(1): 161-8.
36. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS et al. Comparison of photodynamic therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(10): E380-8.
37. Pires L, Bosco SMG, Baptista MS, Kurachi C. Photodynamic therapy in *Pythiuminsidiosum* - an in vitro study of the correlation of sensitizer localization and cell death. *PLoS One*. 2014; 9(1): E85431.
38. Banfi S, Caruso E, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorine photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Biochemistry (Mosc)* .2004; 69(1):45-9.

39. Engelmann FM, Mayer I, Gabrielli DS, Toma HE, Kowaltowski AJ, Araki K, et al. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr.* 2007; 39(2): 175–85.
40. 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.
41. Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(2): 685-94.
42. 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.
43. Carmello JC, Alves F, G Basso F, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG, et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®- mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS One.* 2016; 11(6):e0156947.
44. Hidalgo KJR. 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; 2017.
45. Henle ES, Luo Y, Gassmann W, Linn S. Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. *J Biol Chem.* 1996; 271(35): 21177-86.
46. Carmello JC, Pavarina AC, Oliveira R, Johansson B. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2015; 15(4): fov018.
47. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 5(7): a019752.
48. De Backer MD, Ilyina T, Ma XJ, Vandoninck S, Luyten WH, Vanden Bossche H. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(6): 1660-70.
49. Liu TT, Lee RE, Barker KS, Lee RE, Wei L, Homayouni R, Rogers PD. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6): 2226-36.
50. Nailis H, Vandenbosch D, Deforce D, Nelis HJ, Coenye T. Transcriptional response to fluconazole and amphotericin B in *Candida albicans* biofilms. *Res Microbiol.* 2010; 161(4): 284-92.
51. Cowen LE, Steinbach WJ. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell.* 2008; 7(5): 747-64.

52. Benhamou RI, Bibi M, Steinbuch KB, Engel H, Levin M,, Roichman Y, et al. Real-Time Imaging of the azole class of antifungal drugs in live *Candida* cells. ACS Chem. Biol. 2017; 12(7): 1769–77.
53. Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(2): 225–9.
54. Pumeesat P, Muangkaew W, Ampawong S, Luplertlop N. *Candida albicans* biofilm development under increased temperature. New Microbiol. 2017; 40(4): 279-83.
55. Seleem D, Chen E, Benso B, Pardi V, Murata RM. In vitro evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms. PeerJ. 2016; 4: e2148.
56. Freire, F, de Barros PP, da Silva Ávila D, Brito GN, Junqueira JC, Jorge AO. Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. Lasers Med Sci. 2015; 30(5): 1511-8.
57. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. J Oral Microbiol. 2018; 10(1): 1476644.
58. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, 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.
59. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(1): 445-51.
60. Romano RA, Pratavieira S, Silva APD, Kurachi C, Guimarães FEG. Light driven photosensitizer uptake increases *Candida albicans* photodynamic inactivation. J Biophotonics. 2017; 10(11): 1538-46.
61. Carvalho ML, Pinto AP, Raniero LJ, Costa MS. Biofilm formation by *Candida albicans* is inhibited by photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), using chlorin e6: increase in both ROS production and membrane permeability. Lasers Med Sci. 2018; 33(3): 647-53.
62. Chien CT, Chen YC, Liu YC, Liang SH, Lin HH, Lin CH. The antimicrobial photodynamic inactivation resistance of *Candida albicans* is modulated by Hog1 pathway and the Cap1 transcription factor. Med Mycol. 2018 Oct 4.[epub ahead of print].
63. Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. PCR Methods Appl. 1993; 3(3): S18-29.
64. Bustin SA, editor. A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line; c2004.

65. Thornton B, Basu C. Real-time PCR (qPCR) *primer* design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ*. 2011; 39(2): 145–54.
66. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol*. 2001; 79(3): 213-21.
67. Hwang CS, Rhie G, Oh J, Huh W, Yim H, Kang S. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology*. 2002; 148(Pt 11): 3705–13.
68. Pasrija R, Krishnamurthy S, Prasad T, Ernst JF, Prasad R. Squalene epoxidase encoded by ERG1 affects morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(6): 905-13.
69. Borecká-Melkusová S, Moran GP, Sullivan DJ, Kucharíková S, Chorvát D Jr, Bujdáková H. The expression of genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms exposed to fluconazole. *Mycoses*. 2009; 52(2): 118-28.
70. Ying S, Chunyang L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. *Mycoses*. 2012; 55(1): 50-5.
71. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012; 148(1-2): 126–38.
72. Monroy-Pérez E, Sáinz-Espuñes T, Paniagua-Contreras G, Negrete-Abascal E, Rodríguez-Moctezuma JR, Vaca S. Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. *Mycoses*. 2012; 55(3): 151-7.
73. Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect*. 2014; 69(4): 396-407.
74. Komalpriya C, Kaloriti D, Tillmann AT, Yin Z, Herrero-de-Dios C, Jacobsen MD, et al. Integrative model of oxidative stress adaptation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0137750.
75. Xu Y, Quan H, Wang Y, Zhong H, Sun J, Xu J, Jia N, Jiang Y. Requirement for Ergosterol in Berberine Tolerance Underlies Synergism of Fluconazole and Berberine against Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Isolates. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 491.
76. Hosseini SS, Ghaemi E, Noroozi A, Niknejad F. Zinc Oxide nanoparticles inhibition of initial adhesion and ALS1 and ALS3 gene expression in *Candida albicans* strains from urinary tract infections. *Mycopathologia*. 2019; 184 (2): 261-71.

77. Alonso GC, Pavarina AC, Sousa TV, Klein MI. A quest to find good *primers* for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. *J Microbiol Methods*. 2018; 147: 1-13.
78. Barbosa AH, Damasceno JL, Casemiro LA, Martins CHG, Pires RH, Candido RC. Susceptibility to oral antiseptics and virulence factors *ex vivo* associated with *Candida spp.* isolated from dental prostheses. *J Prosthodont*. 2019; 28(4): 398-408.
79. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008 (Document M27-S4).
80. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol*. 2008; 18(14): 1017–24.
81. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS One*. 2011; 6 (12): e28830.
82. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1(3): 1559–82.
83. Cury JA, Seils J, Koo H. Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms. *Braz Oral Res*. 2008; 22(3): 216-22.
84. Parks LW, Casey WM. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol*. 1995; 49: 95-116.
85. Wu Y, Wu M1, Wang Y, Chen Y, Gao J, Ying C. ERG11 couples oxidative stress adaptation, hyphal elongation and virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2018 Nov 1 18(7).
86. Silva L, Coutinho A, Fedorov A, Prieto M. Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene antibiotic nystatin. A fluorescence study. *Biophys J*. 2006; 90(10): 3625-31.
87. Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, Tjelle TE, Sandvig K, Moan J, et al. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res*. 1999; 59(6): 1180-3.
88. Roudbarmohammadi S, Roudbary M, Bakhshi B, Katirae F, Mohammadi R, Falahati M. ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. *Adv Biomed Res*. 2016; 5:105.
89. Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet*. 1998; 33: 451-9.

90. Huang MC, Shen M, Huang YJ, Lin HC, Chen CT. Photodynamic inactivation potentiates the susceptibility of antifungal agents against the planktonic and biofilm cells of *Candida albicans*. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(2). pii:E434.
91. Desai JV, Mitchell AP. *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(3).
92. Bahn YS, Sundstrom P. CAP1, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 2001; 183(10): 3211-23
93. Broxton CN, Culotta VC. An adaptation to low copper in *Candida albicans* involving SOD enzymes and the alternative oxidase. *PLoS One*. 2016; 11(12):e0168400.
94. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1995; 63(5): 1993-8.
95. Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology*. 2004; 150(Pt 2): 267-75.
96. Stehr F, Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, Mähns B, Neuber K, et al. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res*. 2004; 4(4-5): 401-8.
97. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*. 2008; 154(Pt 11): 3266-80.