

RESSALVA

Atendendo solicitação do autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 15/03/2026.



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



Cláudia Carolina Jordão

**Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a DNase
no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida*
*albicans***

Araraquara

2024



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



Cláudia Carolina Jordão

**Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a DNase
no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida
albicans***

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Araraquara

2024

J82a

Jordão, Cláudia Carolina

Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a DNase no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* / Cláudia Carolina Jordão. -- Araraquara, 2024

105 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Ana Cláudia Pavarina

1. Fotoquimioterapia. 2. Desoxirribonucleases. 3. *Candida albicans*. 4. Resistência a medicamentos. 5. Expressão gênica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Cláudia Carolina Jordão

**Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a DNase
no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida
albicans***

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e orientador Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

3º Examinador Prof^a. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek

4º Examinador Prof^a. Dr^a. Natalia Mayumi Inada

Araraquara, 15 de março de 2024.

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.

2019 – 2024: 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.

2019 – 2024: Curso de Doutorado em Odontologia com ênfase em Reabilitação Oral 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. Essa conquista não seria possível sem o apoio de vocês. Amo vocês!

Ao meu irmão **Matheus**, meu sobrinho **Enzo**, minha madrinha **Maria José**, minha avó **Alzira** e toda minha família, pela ajuda, carinho e apoio durante toda a minha caminhada. Amo vocês!

Agradeço ao meu noivo, **Bruno**, que esteve presente em todos os momentos desde o Mestrado, sendo mais que um namorado, sendo meu melhor amigo. É ele quem me apoia, me incentiva a continuar e faz os momentos diários mais leves e felizes. Obrigada por cada momento, por todo apoio incondicional e por entender as ausências. 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 de muito aprendizado. Muito obrigada! Foi um prazer estar com a senhora ao longo desses oito anos!

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!

Agradeço a **Profª Drª Marlise Inêz Klein** pela paciência e dedicação nos ensinamentos, os quais foram essenciais para o meu crescimento acadêmico.

Agradeço o carinho ao longo dessa jornada, que me estimulou a chegar até aqui.

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

Quero expressar minha gratidão aos meus amigos **Sarah Annunzio, Analú de Oliveira e Túlio Ferrisse**, que sempre me encorajaram a perseguir meus objetivos e me ajudaram a manter a motivação em momentos difíceis. Suas palavras de ânimo e incentivo foram fundamentais para a realização deste trabalho.

As amigas e colegas de trabalho **Tábata Viana, Luana Dias e Juliana Cerrini**, obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos e contribuições ao longo dessa jornada. Sem a ajuda de vocês essa jornada seria mais árdua. Muito obrigada!

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 a **Drª Paula Aboud Barbugli** pela paciência e ajuda nas metodologias, as quais foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço o carinho ao longo dessa jornada, que me estimulou a chegar até aqui.

Aos amigos **César Abreu, Ana Luiza Gorayb, Vinícius, Amanda Ferro, Beatriz Ribas, Jhonatan Oliveira** e todos que fizeram parte dessa jornada. Obrigada a todos!

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 Odontologia** e ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr/UNESP**, por toda acessibilidade durante esse período.

Agradeço aos funcionários do **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, pelo convívio, amizade e carinho. **Marta, Miriam, Érica e Carla** obrigada pelo carinho!

Aos professores membros da banca, **Profº Drº Carlos Eduardo Vergani, Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek e Profa. Dra. Natalia Mayumi Inada**, pela disponibilidade em estar presente e por toda contribuição nesse trabalho. Muito obrigada!

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 FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/27634-6) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

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

Jordão CC. Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a DNase no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) associada a enzima DNase I no tratamento de candidose oral induzida em camundongos infectados com cepas de *Candida albicans* susceptível (CaS-ATCC 90028) e resistente ao fluconazol (CaR-ATCC 96901). Camundongos fêmeas (Swiss) com aproximadamente 5 semanas de vida foram imunossuprimidos e inoculados com CaS ou CaR (10^7 UFC/mL). Após o estabelecimento da infecção, os animais foram submetidos aos tratamentos durante 5 dias consecutivos. Os animais pertencentes ao grupo aPDT (P+L+) foram tratados utilizando Photodithazine (PDZ) 200 mg/L associado à luz LED (50 J/cm^2); no grupo P+L- foi utilizado apenas o PDZ; no grupo P-L+ os animais foram tratados apenas com LED. Nos animais do grupo DNase a enzima foi aplicada por 5 minutos. Também foi avaliada a combinação das terapias (DNase+P+L+). Um grupo foi apenas inoculado com *C. albicans* (grupo P-L-) e outro foi constituído de animais saudáveis, imunossuprimidos ou não (grupo CNI+/CNI-). Imediatamente e 7 dias após o término dos tratamentos, foram realizadas as recuperações de *C. albicans* por meio da fricção de swabs estéreis. Então, diluições seriadas foram realizadas e plaqueadas em placas de Petri com Ágar Sabouraud Dextrose (SDA). Após 48 horas de incubação a 37°C , as colônias foram quantificadas e o número de CFU/mL foi determinado. Além disso, as colônias foram armazenadas para avaliação da expressão gênica (*EFG1*, *HWP1*, *BGL2*, *PHR1* e *SOD1*). Também foram realizadas análises macroscópicas das lesões durante os tratamentos. Os camundongos foram eutanasiados 24 horas e 7 dias após os tratamentos. As línguas removidas foram utilizadas para análise histológica das lesões, marcações da estrutura 3D do tecido da língua e da matriz extracelular (MEC) de *C. albicans* e para avaliação das citocinas inflamatórias por meio de citometria de fluxo (IL-6, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , proteína IL-12p-70 e IL-10). Os resultados demonstraram que a associação da DNase com a aPDT resultou em uma redução de 4,96 (imediatamente) e 1,87 $\log_{10}$ (7 dias) para os animais inoculados com CaS e de 2,89 (imediatamente) e 1,97 $\log_{10}$ (7 dias), para os animais inoculados com CaR. A análise macroscópica revelou redução das lesões orais do grupo DNase+P+L+, equivalentes a 98,92 e 96,07% para os animais inoculados com CaS e CaR nos grupos coletados 24h após os tratamentos, respectivamente. Após 7 dias do término dos tratamentos, foram observadas reduções de 83,31 e 75,24% nos aspectos das lesões no grupo DNase+P+L+ dos animais inoculados com CaS e CaR, respectivamente. A análise histológica do grupo DNase+P+L+ demonstrou expressiva redução da reação inflamatória no tecido que apresentou características histológicas de normalidade. Microscopia de fluorescência demonstrou que os polissacarídeos produzidos por *C. albicans* e as células fúngicas não foram marcados no grupo de animais tratados com DNase seguida de aPDT 24 horas após o término dos tratamentos, aspecto semelhante ao observado para o grupo de animais saudáveis. Após 7 dias do término dos tratamentos, o grupo de animais tratados com a DNase associada à aPDT manteve uma marcação reduzida quando comparados ao controle (animais infectados e não tratados). Os resultados demonstraram redução na expressão de genes relacionados com adesão ao substrato do hospedeiro (*EFG1* e *HWP1*), matriz

extracelular (*BGL2* e *PHR1*) e estresse oxidativo (*SOD1*) de CaS e CaR após os tratamentos com DNase+P+L+. A resposta imune do hospedeiro demonstrou que os grupos de animais inoculados com CaS ou CaR e tratados com P+L+ e DNase+P+L+ apresentaram produção aumentada de IL-6, MCP-1 e TNF- α . Assim, a DNase associada com a aPDT é uma alternativa promissora de tratamento para inativação de fungos, incluindo microrganismos resistentes, e motiva futuras aplicações clínicas do tratamento nas áreas odontológicas e médicas.

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. Desoxirribonucleases. *Candida albicans*. Resistência a medicamentos. Expressão gênica. Inflamação.

Jordão CC. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy associated with DNase effect of in the treatment of oral candidiasis in mice infected with *Candida albicans* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

The aim was to evaluate the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) associated with the DNase I enzyme in the treatment of oral candidosis induced in mice infected with susceptible (CaS-ATCC 90028) and fluconazole-resistant (CaR-ATCC 96901) *Candida albicans* strains. Female mice (Swiss) approximately 5 weeks old were immunosuppressed and inoculated with CaS or CaR (10^7 CFU/mL). After the infection was established, the animals were subjected to treatments for 5 consecutive days. Animals belonging to the aPDT group (P+L+) were treated using Photodithazine (PDZ) 200 mg/L associated with LED light at 50 J/cm^2 ; in the P+L- group only PDZ was used, in the P-L+ group the animals were treated only with LED. In the DNase group, the enzyme was applied for 5 minutes. The combination of therapies (DNase/P+L+) was also evaluated. One group was only inoculated with *C. albicans* (group P-L-) and the other was made up of healthy animals, immunosuppressed or not (group CNI+/CNI). Immediately and 7 days after the end of the treatments, *C. albicans* was recovered by rubbing sterile swabs. Then, serial dilutions were performed and plated in Petri dishes with Dextrose Agar Sabouraud (DAS). After 48 hours of incubation at 37°C , colonies were quantified and the number of UFC/mL was determined. Furthermore, colonies were stored to evaluate gene expression (*EFG1*, *HWP1*, *BGL2*, *PHR1* and *SOD1*). Macroscopic analysis of the lesion was also carried out during treatments. Mice were euthanized 24 hours and 7 days after treatments. The removed tongue was used for histological analysis of the lesions and for evaluation of inflammatory cytokines using flow cytometry (IL-6, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-12p-70 protein and IL-10). Fluorescence Microscopy techniques were used to label the 3D structure of the recovered tongue tissue and the extracellular matrix (ECM) of *C. albicans*. The results demonstrated that the association of DNase with aPDT resulted in a reduction of 4.96 (immediately) and $1.87 \log_{10}$ (7 days) for animals inoculated with CaS and 2.89 (immediately) and $1.97 \log_{10}$ (7 days), for animals inoculated with CaR. Macroscopic analysis revealed a reduction in oral lesions in the DNase+P+L+ group, equivalent to 98.92 and 96.07% for animals inoculated with CaS and CaR in the groups collected 24h after treatments, respectively. Seven days after the end of treatments, a reduction of 83.31 and 75.24% in the appearance of lesions was observed in the DNase+P+L+ group inoculated with CaS and CaR, respectively. Histological analysis of the DNase+P+L+ group demonstrated a significant reduction in the inflammatory reaction in the tissue that presented normal histological characteristics. In the fluorescence microscopy, neither the polysaccharides produced by *C. albicans* nor fungal cells were not labeled in animals treated with DNase followed by aPDT, similar to the healthy animals. After 7 days of the treatment, DNase associated with aPDT maintained a lower count, but not as pronounced as immediately after the intervention. The results demonstrated a reduction in the expression of genes related to adhesion to the host substrate (*EFG1* and *HWP1*), extracellular matrix (*BGL2* and *PHR1*) and oxidative stress (*SOD1*) of CaS and CaR after treatment with DNase+P+L+. The host immune response demonstrated that groups of animals inoculated with CaS or CaR and treated with P+L+ and DNase+P+L+ showed increased production of IL-6, MCP-1 and TNF- α . Thus, DNase associated with aPDT is a promising alternative treatment

for inactivating fungi, including resistant microorganisms, and motivates future clinical applications of the treatment in the dental and medical areas.

Keywords: Photochemotherapy. Deoxyribonucleases. *Candida albicans*. Drug resistance. Gene expression. Inflammation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 Proposições específicas	20
3 PUBLICAÇÕES.....	21
3.1 Publicação 1.....	21
3.2 Publicação 2.....	49
4 DISCUSSÃO	73
5 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE A.....	89
ANEXO A	105

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* pertencem à microbiota da cavidade oral, trato gastrointestinal e reprodutivo de indivíduos saudáveis. Fatores predisponentes podem fazer com que esses microrganismos atuem como patógenos oportunistas, sendo responsável pelo desenvolvimento de infecções¹. A candidose orofaríngea (COF) é uma das infecções mais prevalentes causada por *Candida albicans*; contudo espécies não-albicans também podem estar associadas à COF². A patogenicidade de *C. albicans* é mediada por fatores de virulência que permitem ao fungo interagir com as células do hospedeiro e causar algum tipo de dano³. Dentre os fatores de virulência podemos citar a capacidade de resistir a resposta imune do hospedeiro, adesão e formação de biofilme e produção de enzimas hidrolíticas⁴⁻⁶. Nesse contexto de virulência tem sido relatado que o gene *HWP1* (Hyphal wall protein 1) facilita a adesão e invasão do fungo no tecido hospedeiro⁷. Além disso, o gene *EFG1* (Enhanced filamentous growth protein 1) regula a transcrição de genes responsáveis pela formação de biofilme⁸.

As infecções causadas por *Candida* spp. estão associadas à formação de biofilme, o qual é caracterizado como uma microestrutura complexa de células aderidas à uma superfície e incorporadas dentro de uma matriz extracelular (MEC). Essa por sua vez, é composta de substâncias derivadas da lise celular ou produzidas e secretadas pelas células⁹. A MEC contribui para a preservação de biofilmes e manutenção das interações estáveis entre células e destas com uma determinada superfície e ambiente¹⁰. Além disso, a MEC reduz a susceptibilidade dos microrganismos contra as terapias classicamente utilizadas^{11,12}. Análises bioquímicas revelam que a produção de polissacarídeos (β -1-3-glucano, β -1-6-glucano e β -1-6-manana, por exemplo), ácidos nucleicos (eDNA), lipídeos e carboidratos (celulose e quitina) contribuem na proteção da MEC de biofilmes e para manutenção das interações estáveis entre seus componentes^{10,13}. A resistência antifúngica dos biofilmes de *Candida* é multifatorial e tem sido associada a estimulação de bombas de efluxo de fármacos, o estado fisiológico das células e a proteção exercida pela MEC por meio de β -glucanos que se ligam ao fluconazol e à anfotericina B^{11,12}. O polissacarídeo β -1,3 glucano tem sido fortemente associado a esse mecanismo^{14,15}. Al-Fattani e Douglas¹⁶ verificaram que a MEC de *C. albicans* GDH 2346 (NCYC 1467) contém carboidratos, proteínas, hexosamina, fósforo e ácido urônico. No entanto, o

principal constituinte da MEC de *C. albicans* é a glicose (32%). Além do β -glucano, foi relatado que o eDNA também é um constituinte importante da MEC e que promove a integridade estrutural dos biofilmes¹⁶. Além disso, a presença de polissacarídeos ou eDNA foi relatada por alguns autores como um mecanismo de proteção do biofilme bacteriano contra a difusão de antibióticos^{17,18}. A expressão gênica da glucano transferase *BGL2* (síntese de β -glucanos)¹⁹ e da glicosidase *PHR1* (importante na estrutura da parede celular e virulência das infecções)¹⁵ juntamente com a marcação em estrutura 3D de componentes da MEC pode revelar o efeito de diferentes terapias sobre a formação da matriz extracelular por *C. albicans*¹⁹.

Devido ao fato da MEC estar relacionada a proteção do biofilme⁹, o uso de enzimas capazes de hidrolisar polissacarídeos e ácidos nucleicos vem sendo alvo de investigações, pois configura-se como uma maneira alternativa de tornar o biofilme mais suscetível a ação de fármacos antifúngicos. Panariello et al.²⁰ realizaram um estudo *in vitro* em que biofilmes (crescidos por 48 horas) de cepas susceptíveis e resistentes ao fluconazol foram incubados por 5 minutos com diferentes enzimas hidrolíticas (β -glucanase e DNase em combinação ou isoladamente). Após os tratamentos, os biofilmes foram avaliados quanto a viabilidade celular, biomassa e componentes da matriz extracelular do biofilme. Os resultados indicaram que a enzima DNase apresentou o melhor resultado, reduzindo significativamente o eDNA e proteínas solúveis da matriz de ambas as cepas, bem como polissacarídeos solúveis em água (WSP) da matriz da cepa resistente ao fluconazol. Segundo os autores²⁰, a redução da proteína solúvel e do teor de WSP pela DNase indica que esses componentes da matriz podem estar entrelaçados com o eDNA. Esta enzima atua externamente à célula, reduzindo a estabilidade do biofilme²⁰⁻²³. Tetz e Tetz²² avaliaram *in vitro* o efeito da aplicação da Dnase I em biofilmes bacterianos e observaram que em presença da enzima o biofilme é mais susceptível aos antibióticos, apresentando redução na biomassa bacteriana total. Em outro estudo, foi avaliado o efeito da DNase isoladamente ou em associação com antifúngicos sobre biofilmes (crescidos por 24 horas), e os autores observaram que o tratamento prévio com a enzima, promoveu aumento da susceptibilidade das células de *C. albicans* ao antifúngico anfotericina B²³.

Para tratamento da COF, têm sido empregados antifúngicos derivados poliênicos, azólicos e equinocandinas²⁴. 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 o uso tópico deste tipo de medicamento não elimina completamente as espécies de *Candida*^{1,25}, uma vez que os efeitos diluentes da saliva e movimentos da musculatura bucal podem reduzir a dose desses agentes a concentrações subterapêuticas, o que limita a eficácia da terapia¹. Consequentemente, a re-colonização da mucosa bucal por microrganismos tem sido frequente relatada após a utilização deste tipo de antifúngico, o que resulta em infecções recorrentes²⁶. A prescrição de antifúngico sistêmico (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) tem sido instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e em episódios de infecções recorrentes²⁷. 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 do desenvolvimento de resistência antifúngica²⁸. A resistência pode ser desenvolvida por microrganismos expostos por longos períodos a fármacos antifúngicos; portanto, é um tipo de resistência adquirida chamada secundária²⁹. Por outro lado, a resistência intrínseca ou primária ocorre quando microrganismos apresentam baixa susceptibilidade a uma determinada medicação, previamente a sua exposição ao agente²⁹. Algumas espécies de *Candida* possuem resistência intrínseca aos medicamentos antifúngicos, especialmente ao fluconazol³⁰.

Considerando o aumento de microrganismos resistentes, os efeitos colaterais dos antifúngicos, a re-colonização e a organização em biofilmes, estudos têm buscado estratégias alternativas para inviabilização de espécies fúngicas. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma modalidade de tratamento que tem sido sugerida para a inativação de microrganismos e tratamento da candidose³¹⁻³³. 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 oxigênio³¹. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o fotossensibilizador (FS), seguida da aplicação de uma fonte de luz com comprimento de onda adequado para a iluminação do alvo a ser sensibilizado. A interação da luz com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação celular³⁴. 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^{35,36}. 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), induzindo a produção de espécies reativas, tal como o oxigênio singleto^{35,36}. 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 aPDT e, como o FS é aplicado externamente à célula, a membrana celular é considerada o alvo inicial^{31,35}. Tem sido sugerido que a presença de Fe^{2+} , O_2 e H_2O_2 pode levar a reação química de Fenton, culminando na produção de radicais extremamente reativos aos constituintes celulares como DNA, lipídeos, proteínas e outras macromoléculas. Como proteção e em resposta ao estresse oxidativo, *C. albicans* pode expressar genes antioxidantes, entre eles *CAP1* (AP-1 bZIP fator de transcrição), *CAT1* (catalase) e *SOD1* (enzima superóxido dismutase dependente de cobre ou zinco), que ativam vias que auxiliam na proteção contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS)³⁸⁻⁴¹. A expressão de genes relacionados com o estresse oxidativo ajuda na compreensão do mecanismo pelo qual a aPDT atua nas células fúngicas, e se a aplicação de enzima (DNase) associada a esse tratamento promove alterações na expressão gênica.

Os FSs mais utilizados na aPDT são predominantemente das famílias das porfirinas⁴² e fenotiazinas⁴³. Atualmente, FSs de segunda geração têm sido utilizados, dentre eles as clorinas, que são porfirinas hidrofílicas reduzidas, apresentando forte banda de absorção na região vermelha (625-740 nm) do espectro fotomagnético. O Photodithazine® (PDZ) é uma clorina e6, solúvel em água, e tem sido utilizada com sucesso na aPDT contra o câncer, devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singleto⁴⁴. Em estudos preliminares foi avaliado a eficácia da PDZ na fotoinativação de cepas (isolados clínicos) de *C. albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* provenientes de pacientes com estomatite protética⁴⁵. Os resultados demonstraram que a aPDT promoveu redução significativa na viabilidade de culturas planctônicas de *C. tropicalis* e *C. glabrata* enquanto cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas pelo tratamento. Quando foi avaliada a eficácia da aPDT em biofilme, foi observado que esse tratamento promoveu redução na viabilidade celular equivalente a 0,9 log₁₀ para *C. albicans* e 1,4 e 1,5 log₁₀ para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente⁴⁵. A maior resistência observada no modelo de biofilme pode ser atribuída ao efeito protetor da MEC que reduz a susceptibilidade

dos microrganismos as terapias convencionais e essa menor susceptibilidade também foi observada com a aplicação da aPDT.

Em um estudo *in vivo* foi avaliada a aPDT mediada pelo PDZ associada ao LED na fotoinativação de *C. albicans* em modelo murino de candidose oral⁴⁶. Os animais foram tratados com PDZ (nas concentrações de 75, 100, 125 e 150 mg/L) durante 20 minutos e iluminados durante 14 min (LED 660 nm - 37,5 J/cm²), foi realizada uma única aplicação. Após o tratamento, as células de *C. albicans* foram recuperadas do dorso da língua e plaqueadas em placas de Petri com Ágar Sabouraud Dextrose (SDA). 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 log₁₀⁴⁶. Em outro estudo Alves et al.⁴⁷ avaliaram a eficácia da aPDT (1 aplicação), mediada pelo PDZ associado ao LED, na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol (isolado clínico e ATCC 96901) em um modelo de candidose oral induzida. A aPDT promoveu redução significativa de *C. albicans* resistente a fluconazol (~1,96 log₁₀). Os resultados destes dois estudos demonstraram que a cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol também é menos susceptível a aPDT. Além disso, nestes dois estudos^{46,47} somente uma aplicação de aPDT foi realizada e, esse protocolo não possibilitou o acompanhamento da evolução macroscópica da lesão.

Carmello et al.⁴⁸ desenvolveram um protocolo de indução de candidose que possibilita a permanência da infecção nos animais por um período de até 16 dias (a infecção esteve presente do dia 5 ao 16). Esse protocolo possibilita o tratamento e o acompanhamento da evolução da lesão após a aplicação dos mesmos. Utilizando esse protocolo, os animais foram contaminados com uma cepa padrão de *C. albicans* suscetível ao fluconazol (ATCC 90028) e, após o estabelecimento da infecção, os animais foram tratados durante 5 dias consecutivos com aPDT (100 mg/L de PDZ associado LED) ou com antifúngico tópico nistatina. Os resultados demonstraram que a aPDT foi tão efetiva quanto a nistatina na inativação de *C. albicans*, reduzindo 3 e 3,2 logs₁₀, respectivamente, 24 horas após o término de 5 dias de tratamento. Além disso, foi observado que os animais tratados com aPDT apresentaram remissão completa das lesões orais, enquanto os animais tratados com nistatina apresentaram remissão parcial das lesões em ambos os períodos de avaliação (24 hs e 7 dias)⁴⁸. Hidalgo et al.⁴⁹ utilizando o mesmo modelo murino descrito acima, infectaram os camundongos com uma cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 96901)

e, após o estabelecimento da infecção, tratou os animais com aPDT, nistatina (NIS) ou com a combinação das terapias (NIS+aPDT e aPDT+NIS). Neste estudo, foi demonstrado que os grupos de animais tratados com aPDT ou NIS isoladamente apresentaram resultados estatisticamente semelhantes com redução de 1,3 e 1,1 $\log_{10}$, respectivamente⁴⁹. Entretanto, os animais tratados com ambas as terapias não apresentaram melhora no aspecto macroscópico da lesão presente na mucosa lingual, apresentando semelhança aos animais que não receberam tratamento. Quando as terapias foram associadas, a redução no número de colônias foi mais acentuada, equivalente a 2,6 e 2,1 $\log_{10}$ para os grupos NIS+aPDT e aPDT+NIS, respectivamente. Nestes animais foi observada remissão da lesão em aproximadamente 90%, 24 horas após o tratamento (em comparação aos animais que não receberam tratamento). Os resultados obtidos neste estudo⁴⁹ confirmaram que a cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol é menos susceptível a aPDT e sinalizam que a associação de tratamentos deve ser empregada para o tratamento de candidose induzida utilizando cepas resistentes ao fluconazol. Em outro estudo, foi observada redução na expressão dos genes *EFG1* e *SOD1* de *C. albicans* resistente ao fluconazol após cinco dias de tratamentos consecutivos com a combinação das terapias (NIS+aPDT e aPDT+NIS)⁵⁰. Neste contexto, afim de otimizar os resultados mesmo em infecções com *C. albicans* resistente ao fluconazol, o uso de uma terapia que promova a desestruturação da MEC do biofilme configura-se uma alternativa promissora, fazendo com que o fotossensibilizador atinja camadas mais profundas, e os microrganismos se tornem alvo da aPDT.

Em um estudo *in vitro*, Panariello et al.²⁰ formaram biofilmes com cepa de *C. albicans* susceptível ao fluconazol (ATCC 90028), os quais foram tratados com DNase por 5 min, e, em seguida, foi realizada a aplicação da aPDT mediada pelo PDZ e LED (incubação com 200 mg/L PDZ por 20 min e exposição ao LED - 50 J/cm²) sobre os biofilmes. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com DNase permitiu a penetração do PDZ em camadas mais profundas do biofilme. Através desse protocolo, os autores demonstraram que o efeito da aPDT pode ser potencializado pelo uso da DNase, visto que essa associação terapêutica reduziu significativamente a viabilidade celular e a quantidade de eDNA da matriz do biofilme. Os autores concluíram que a DNase afetou a composição da matriz melhorando a penetração do fotossensibilizador, e, conseqüentemente aumentou a eficácia da aPDT²⁰.

Durante o processo inflamatório agudo ocorre a liberação de componentes moleculares denominados de anafilotoxinas (ativadas pelo fator de complemento), os quais estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-6 (IL-6), proteína quimioaderente de monócitos-1 (MCP-1), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α)⁵¹⁻⁵³. TNF- α e IL-6 são duas citocinas pró-inflamatórias que fazem parte de uma complexa rede de defesa que auxilia na proteção do hospedeiro contra agentes inflamatórios, invasão microbiana e na cicatrização de lesões⁵¹. Além disso, a aPDT pode ter efeitos anti-inflamatórios, atuando modulando a liberação de mediadores que auxiliam no alívio da inflamação local e no processo de cicatrização⁵⁴⁻⁵⁶. Após o tratamento com aPDT, alguns autores relatam um aumento local e sistêmico de IL6 e TNF- α após tratamento com aPDT^{55,57,58}. O aumento na expressão dessas citocinas podem indicar um efeito benéfico, pois pode ter ocorrido devido à morte celular, remoção das células fúngicas ou pelo processo de cicatrização desencadeado pela resposta inflamatória do hospedeiro⁵⁴⁻⁵⁷.

Assim, explorar a expressão de citocinas inflamatórias em camundongos com candidose oral induzida e submetidos ao tratamento pode produzir conhecimentos científicos valiosos para a compreensão de como as terapias modulam a resposta imune, uma vez que a PDT apresenta propriedades anti-inflamatórias. Em estudo prévio, animais inoculados com *C. albicans* susceptível ao fluconazol e tratados com a aPDT mediada pelo PDZ por cinco dias consecutivos apresentaram presença de infiltrado inflamatório leve nos tecidos recuperados. Além disso, os autores observaram que a aPDT induziu uma expressão aumentada de TNF- α ⁴⁸. Quando animais foram inoculados com *C. albicans* resistente ao fluconazol e tratados com aPDT mediada por PDZ isoladamente ou em combinação com o antifúngico tópico nistatina, a análise histológica demonstrou redução expressiva da reação inflamatória tecidual⁴⁹.

Com base nos achados acima, o presente estudo avaliou se a aplicação da enzima DNase I potencializa a ação da aPDT melhorando a eficácia do tratamento da candidose *in vivo*. Além disso, com objetivo de aumentar a relevância do estudo e a abrangência dos resultados, duas cepas diferentes, uma susceptível (CaS) e outra resistente ao fluconazol (CaR) foram utilizadas. Além da análise microbiológica, foi avaliada a marcação de componentes da MEC do biofilme formado sobre o dorso da língua dos animais, expressão gênica de *C. albicans* e a produção de citocinas inflamatórias após o tratamento com a DNase I associada com a aPDT. Esses dados

podem fornecer informações sobre a resposta terapêutica e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

5 CONCLUSÃO

Estudo I: Os resultados demonstraram que a DNase quando aplicada previamente a aPDT promoveu resultados significativos para o tratamento de candidose oral em camundongos.

Estudo II: O tratamento realizado promoveu redução de genes relacionados com adesão ao substrato do hospedeiro, produção de matriz extracelular e estresse oxidativo.

Estudo III: O tratamento apresentou efeito imunomodulador, aumentando a produção de citocinas essenciais para o processo de cicatrização das lesões.

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. 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.
8. Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, Schöck U et al. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS Genet*. 2012; 8(12): e1003118.
9. 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.
10. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the house of biofilm cells. *J Bacteriol*. 2007; 189(22): 7945–7.
11. Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(9): 3259-66.
12. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia*. 2010; 169(5): 323–31.

* 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. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. *PLoS Pathog.* 2016; 12(9): e1005828.
14. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(2): 510-20.
15. VEDIYAPPAN G, ROSSIGNOL T, d'ENFERT C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(5): 2096-111.
16. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 8): 999-1008.
17. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322(2): 85-105.
18. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *PLoS Pathog.* 2008; 4(11): e1000213.
19. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT et al. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog.* 2012; 8(8): e1002848.
20. Panariello BHD, Klein MI, Alves F, Pavarina AC. DNase increases the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 27:124-31.
21. Liao TH. Bovine pancreatic deoxyribonuclease D. *J Biol Chem.* 1974; 249(8): 2354-6.
22. Tetz V, Tetz G. Effect of deoxyribonuclease I treatment for dementia in end-stage Alzheimer's disease: a case report. *J Med Case Rep.* 2016; 10(1): 131.
23. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses.* 2012; 55(1): 80-5.
24. 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(Pt 1): 10-24.
25. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(3): 283-8.

26. 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.
27. 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.
28. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida species*. *Front Microbiol.* 2017; 7: 2173
29. 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.
30. Tsai HF, Sammons LR, Zhang X. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3308–17.
31. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163(1): 1-12.
32. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 694-707.
33. 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.
34. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova.* 2000; 32: 237-43.
35. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 2001; 57(47): 9513-47.
36. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras.* 1996; 42(4): 229-36.
37. 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.
38. 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.
39. Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJP et al. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 2006; 17(2): 1018–32.

40. 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.
41. 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.
42. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2004; 47(16): 3897–915.
43. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 33: 67-73.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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; 57(5):609-17.
48. Carmello JC, Alves F, Basso FG, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®- mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS One*. 2016; 11(6): e0156947.
49. Hidalgo KJR, Carmello JC, Jordão CC, Barbugli PA, Costa CAS, Mima EGO et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy in Combination with Nystatin in the Treatment of Experimental Oral Candidiasis Induced by *Candida albicans* Resistant to Fluconazole. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019; 12(3): pii: E140.
50. Jordão CC, Klein MI, Carmello JC, Dias LM, Pavarina AC. Consecutive treatments with photodynamic therapy and nystatin altered the expression of virulence and ergosterol biosynthesis genes of a fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021; 33: 102155.
51. Camargo MR, Venturini J, Vilani-Moreno FR, Arruda MS. Modulation of macrophage cytokine profiles during solid tumor progression: susceptibility to *Candida albicans* infection. *BMC Infect Dis*. 2009; 9:98.
52. Kabbur MB, Jain NC, Farver TB. Modulation of phagocytic and oxidative burst activities of bovine neutrophils by human recombinant TNF- α , IL-1- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF. *Comp Haematol Int*. 1995; 5: 47–55.

53. Parka H, Solisb NV, Louiec JS, Spellberg B, Rodriguez N, Filler SG. Different tumor necrosis factor α antagonists have different effects on host susceptibility to disseminated and oropharyngeal candidiasis in mice. *Virulence*. 2014; 5: 625–29.
54. Gollnick SO, Evans SE, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer*. 2003; 88: 1772-79.
55. Gollnick SO, Liu X, Owczarczak B, Musser DA, Henderson BW. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res*. 1997; 57: 3904–09.
56. Firczuk M, Nowisaand D, Goła J. APDT-induced inflammatory and host responses. *Photochem Photobiol Sci*. 2011; 10 (5): 653–63.
57. Evans S, Matthews W, Perry R, Fraker D, Norton J, Pass HI. Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82(1): 34-9.
58. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(7): 535-45.
59. Abreu-Pereira CA, Klein MI, Lobo CIV, Gorayb Pereira AL, Jordão CC, Pavarina AC. DNase enhances photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* biofilms. *Oral Dis*. 2022; 29(4): 1855-67.
60. Torabi I, Sharififar F, Izadi A, Ayatollahi Mousavi SA. Inhibitory effects of different fractions separated from standardized extract of *Myrtus communis* L. against nystatin-susceptible and nystatin-resistant *Candida albicans* isolated from HIV positive patients. *Heliyon*. 2022; 8(3): e09073.
61. Sandai D, Tabana YM, Ouweini AE, Ayodeji IO. Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System. *Jundishapur J Microbiol*. 2016; 9(11): e37385.
62. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1): 133-63.
63. Rajendran R, Sherry L, Lappin DF, Nile CJ, Smith K, Williams C, et al. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2014; 14:303.
64. da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J*. 2008; 19(4): 364-9.
65. Jordão CC, Viana de Sousa T, Inêz Klein M, Mendonça Dias L, Pavarina AC, Carmello JC. Antimicrobial photodynamic therapy reduces gene expression of *Candida albicans* in biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 31:101825.

66. Freire F, de Barros PP, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AOC. Photodynamic inactivation in the expression of the *Candida albicans* genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1, and EFG1 in biofilms. *Lasers Med Sci*. 2018; 33(7): 1447-54.
67. 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.
68. Silva S, Rodrigues CF, Araújo D, Rodrigues ME, Henriques M. *Candida* species biofilms' antifungal resistance. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3(1): 8.
69. Fonzi WA. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol*. 1999; 181(22): 7070–9.
70. Hwang CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO. 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 (Reading)*. 2002; 148(Pt 11): 3705-13.
71. Saxena P, Selvaraj K, Khare SK, Chaudhary N. Superoxide dismutase as multipotent therapeutic antioxidant enzyme: Role in human diseases. *Biotechnol Lett*. 2022; 44(1): 1-22.
72. Eichler M, Lavi R, Shainberg A, Lubart R. Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells. *Lasers Surg Med*. 2005; 37(4): 314-9.
73. Carmello JC, Jordão CC, Dias LM, de Sousa TV, Oliveira R, Pavarina AC. Light-induced effects against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Research Soc Develop*. 2022; 11(10): e23111032600.
74. Kick G, Messer G, Goetz A, Plewig G, Kind P. Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF-kappa B DNA binding. *Cancer Res*. 1995; 55(11): 2373-9.
75. Li XY, Zhang YQ, Xu G, Li SH, Li H. miR-124/MCP-1 signaling pathway modulates the protective effect of itraconazole on acute kidney injury in a mouse model of disseminated candidiasis. *Int J Mol Med*. 2018; 41(6): 3468-76.
76. She H, Nakazawa T, Matsubara A, Connolly E, Hisatomi T, Noda K et al. Photoreceptor protection after photodynamic therapy using dexamethasone in a rat model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(11): 5008-14.
77. Yang T, Tan Y, Zhang W, Yang W, Luo J, Chen L et al. Effects of ALA-PDT on the healing of mouse skin wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa* and its related mechanisms. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 585132.

78. Lee JK, Park S, Kim YM, Guk T, Choi JK, Kim JY et al. Antifungal and anti-inflammatory activities of PS1-2 peptide against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Antibiotics (Basel)*. 2022; 11(12): 1779.
79. Lionakis MS, Netea MG. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS Pathog*. 2013; 9(1): e1003079.