

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 09/04/2022



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



Luana Mendonça Dias Santana

**Potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana no desenvolvimento de
resistência em *Candida albicans***

Araraquara

2020



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



Luana Mendonça Dias Santana

**Potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana no desenvolvimento de
resistência em *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral na área de Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP) para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Coorientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

Araraquara

2020

Santana, Luana Mendonça Dias

Potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana no desenvolvimento de resistência de *Candida albicans* / Luana Mendonça Dias Santana.-- Araraquara: [s.n.], 2020
137 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação oral) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina
Coorientador: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

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

Luana Mendonça Dias Santana

**Potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana no desenvolvimento de
resistência em *Candida albicans***

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

1º Examinador(a): Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa

2º Examinador(a): Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Araraquara, 9 de abril de 2020

DADOS CURRICULARES

Luana Mendonça Dias Santana

Nascimento: 22/06/1995 - Salvador, Bahia

Filiação: Newdith Mendonça Dias
Wellington Santana de Jesus

2012.2 - 2017.2: Graduação em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (BAHIANA)

2014 - 2017: Estágio de iniciação científica apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) no Departamento de Biomateriais da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

2015 – 2016: Curso de Aperfeiçoamento/Atualização Em Prótese Dentária no “Innovare: ppf, pt e ppr”, Núcleo de Educação e Saúde (INNOVARE-BA).

2016 – 2016: PROPEX- Programa Preparatório Para Exames”, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (BAHIANA)

2017 - 2017: Curso de Aperfeiçoamento/Atualização “Cirurgia Oral Menor”, Centro Baiano de estudos odontológicos (CEBEO-BA).

2017 - 2017: Curso de Aperfeiçoamento/Atualização “Odontologia Restauradora e Estética”, Núcleo de Educação e Saúde (INNOVARE-BA).

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

2019 - atual: 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.

2018 – 2020: Curso de Mestrado em Reabilitação Oral com ênfase em Prótese pela Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr-Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu mestre DEUS, por interceder na minha caminhada, me guiando no caminho da luz, da paz, e do amor. Gratidão à Virgem Maria, que intercedeu pela saúde da minha mãe e me cobriu com seu divino manto, acalmando e confortando meu coração.

*Agradeço aos amores da minha vida: minha mãe **Newdith** e meu pai **Wellington**, que dedicaram a vida para minha criação. Nunca pouparam esforços para realizar os meus sonhos. Profissionais exemplares, que me ensinaram a importância da disciplina na caminhada. Com eles aprendi que é necessário dedicação em tudo que se faz! A eles, toda a minha profunda gratidão pelo amor mais puro que pude receber em toda a minha vida.*

*Agradeço a toda minha **família**, que esteve presente durante essa jornada, me aconselhando e incentivando nos momentos que precisei.*

*Ao meu namorado **Gabriel**, que foi muito importante durante esse processo. Sempre presente e prestativo, esteve ao meu lado incentivando e torcendo pelas minhas pequenas e grandes conquistas. Ele me faz sentir a pessoa mais especial do mundo!*

*À minha Orientadora **Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina**, pessoa que tenho grande admiração e respeito. Um grande exemplo de comprometimento e ética na vida acadêmica. Agradeço por todos os ensinamentos, cuidado e carinho que recebi durante esses anos. A ela, eterna gratidão por acreditar em mim e sempre me incentivar a ir além do meu potencial.*

*À minha Coorientadora **Profa. Dra. Marlise Inêz Klein**, pela paciência e dedicação durante esse processo. Um grande exemplo de amor a pesquisa científica, com suas admiráveis condutas humanas e profissionais. Gratidão pelo privilégio de poder aprender com ela.*

*Aos professores da disciplina de Prótese Parcial Removível, **Profa. Dra. Janaína Habib Jorge** e **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, por todos os ensinamentos e contribuições para minha formação acadêmica.*

*A **Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo**, por todos os ensinamentos de bioestatística transmitidos durante esses anos, me estimulando a ir além do “básico”. Sempre muito disponível a elucidar minhas dúvidas e acrescentar no trabalho.*

*A **Bruna Pimentel**, uma grande “irmã” que ganhei em Araraquara. Gratidão por todos os momentos de troca de conhecimento e descontração que a conviência nos proporcionou*

A **Amanda Bellini** e **Karine Araújo**, alunas de IC que desenvolveram etapas desse trabalho comigo, e foram extremamente comprometidas e dedicadas na execução dos experimentos.

A **Cláudia Jordão**, que sempre com muita paciência e dedicação me ensinou etapas biomoleculares fundamentais deste trabalho. Uma pessoa muito especial que se tornou uma grande amiga para mim.

A **Juliana Cabrini**, que auxiliou em várias etapas experimentais deste trabalho. Gratidão pela amizade e companheirismo durante todo esse processo.

Aos amigos de turma, destacando **Rafael** e **Lays**, pela amizade e momentos de descontração que vivemos durante esses anos. A convivência com eles tornou esse processo muito mais leve!

Aos amigos de Laboratório: **Paula, Thaís, Tábata, Amanda, Ana Carol, Elkin, Carmélia, Bárbara, Camila, Sabrina, Jefferson, Yuliana, Vinicius, Letícia, César, Jaqueline** e **Guilherme**, por todos os momentos de troca de experiências e risadas.

Aos meus Professores **Rainer** e **Luana**, que contribuíram diretamente com minha qualidade de vida durante esse processo, como também se tornaram grande amigos para mim.

A **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP)**, que me proporcionou uma ótima estrutura para realização do curso pós- graduação, como também, para a realização deste trabalho, contribuindo assim para a minha formação.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/14874-6) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

“Tudo o que acontece no universo tem uma razão de ser; um objetivo. Nós como seres humanos, temos uma só lição na vida: seguir em frente e ter a certeza de que apesar de as vezes estar no escuro, o sol voltará a brilhar”

Sta. Dulce dos Pobres

Dias LM. Potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana no desenvolvimento de resistência em *Candida albicans*. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

O fungo *Candida albicans*, em situações de desequilíbrio imunológico no hospedeiro, pode se tornar um patógeno oportunista e provocar infecções. Tendo em vista a resistência que os microrganismos desenvolveram a fármacos convencionais, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) vem apresentando resultados promissores como uma terapia alternativa. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial que aPDT possui em desenvolver resistência, tolerância ou susceptibilidade em *C. albicans* em associação com o Photodithazine[©] (PDZ- 25 µg/L; 660 nm; 18 J/cm²) e Curcumina (CUR- 40 µg/L; 455 nm; 18 J/cm²) plaqueados em meio sem e com suplementação de Fluconazol (8 µg/L). *C. albicans* (ATCC 90028) em culturas planctônicas e biofilme foram submetidas à aplicações sucessivas de aPDT (10 aplicações), como também, a ciclos de recuperação e re-cultivo das colônias que sobreviveram ao tratamento até o momento que não houvesse mais células viáveis para a recuperação e continuação das aplicações. O plaqueamento foi realizado em placas de *Ágar Sabourand Dextrose* suplementadas ou não com Fluconazol, e os valores das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foram determinados. O teste de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi realizado nos primeiros e últimos ciclos de aPDT. O perfil biomolecular das células sobreviventes as aplicações 1, 4 e 7 de aPDT mediada por PDZ foi investigado através do teste de RT-qPCR. Foi observado no grupo tratamento de aPDT (P+L+) mediada por PDZ redução de aproximadamente 6,8 log₁₀ em culturas planctônicas e aproximadamente 6,2 log₁₀ em biofilme de *C. albicans*, em ambas metodologias utilizadas. No grupo tratamento de aPDT (C+L+) em associação com a CUR, foi observado um aumento da viabilidade em aproximadamente 1 log₁₀ nos biofilmes de *C. albicans*. No grupo controle do experimento (P-L-), na metodologia de aplicações sucessivas, não foi observado diferença estatística entre as aplicações (p>0,05). Os resultados demonstraram menor viabilidade de culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans* cultivadas em placas com fluconazol, quando comparada as placas sem o antifúngico. As últimas sucessivas aplicações de aPDT mediada por PDZ produziram mais ERO, quando comparadas com a primeira aplicação. A aPDT superexpressou o gene SOD1 e promoveu redução de expressão do gene CAP1 e ERG11. O tipo de cultura influencia na susceptibilidade à aPDT, pois foram necessárias quantidades distintas de aplicações para sua inativação. A aPDT foi potencializada pelo antifúngico fluconazol, independente do modelo e fotossensibilizador testado. *C. albicans* (ATCC 90028) em cultura planctônica e biofilme é susceptível à repetidas aplicações de aPDT mediada por PDZ, no entanto, quando mediada por CUR, os biofilmes apresentaram aumento de viabilidade após os ciclos.

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. Antifúngico. *Candida albicans*.

Dias LM. Potential of a antimicrobial photodynamic therapy in the development of resistance in *Candida albicans*. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

The fungus *Candida albicans*, in situations of immune imbalance in the host, can become an opportunistic pathogen and cause infections. Because of the resistance that microorganisms have developed to conventional drugs, Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) has shown promising results as an alternative therapy. The main goal of this study was to evaluate the potential of aPDT to develop resistance in *C. albicans* in association with Photodithazine (PDZ-25 µg/L; 660 nm; 18 J/cm²) and Curcumin (CUR-40 µg/L; 455 nm; 18 J/cm²) grown with and without Fluconazole (8 µg/L). *C. albicans* (ATCC 90028), in planktonic and biofilm cultures, were submitted to successive applications of aPDT (10 applications), as well as cycles of recovery and re-cultivation of colonies that survived treatment until no longer viable cells were present for application recovery and continuation. Plating was performed on *Sabourand Dextrose Agar* plates supplemented or not with Fluconazole, and values of colony forming units per milliliter (CFU/mL) were determined. The reactive oxygen species (ROS) production test was performed in the first and last cycles of aPDT. The biomolecular profile of surviving cells as applications 1, 4 and 7 of PDZ-mediated aPDT was investigated using the RT-qPCR test. PDZ-mediated treatment of aPDT (P+L+) was observed to reduce approximately 6.8 log₁₀ in planktonic cultures and approximately 6.2 log₁₀ in *C. albicans* biofilm in both methodologies used. In the aPDT (C+L+) treatment group in combination with the CUR, viability was increased by approximately 1 log₁₀ in *C. albicans* biofilms. In the control group of the experiment (P-L-), in the successive applications methodology, no statistical difference was observed between the applications (p > 0.05). The results showed lower viability of *C. albicans* planktonic cultures and biofilms grown on fluconazole plates when compared to plates without antifungal. The latest successive applications of aPDT produced more ROS compared to the first application. aPDT overexpressed the SOD1 gene and reduced expression of the CAP1 and ERG11 gene. The type of culture influences susceptibility to aPDT, since different amounts of applications were necessary for its inactivation. The type of culture influences susceptibility to aPDT, since different amounts of applications were necessary for its inactivation. The aPDT was potentiated by the fluconazole antifungal, independent of the model and photosensitizer tested. *C. albicans* (ATCC 90028) in planktonic culture and biofilm is susceptible to repeated applications of PDZ-mediated aPDT, however, when CUR-mediated, biofilms showed increased viability after cycles.

Keywords: Photochemotherapy. Antifungal agents. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	PROPOSIÇÃO	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	Candida albicans	16
3.2	Biofilme	17
3.3	Resistência Antifúngica	19
3.4	Resistência à Antifúngicos da Classe Azólica.....	20
3.5	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)	21
3.5.1	Photodithazine associado a aPDT	22
3.5.2	Curcumina associada a aPDT	23
3.6	Resistência do Biofilme à aPDT	25
3.7	Efeito de Doses Sub-Letais de aPDT	25
3.8	Estresse Oxidativo	28
3.9	Bombas de e-fluxo	29
4	MATERIAL E MÉTODO	30
4.1	Materiais de Consumo	30
4.1.1	Instrumentais	32
4.1.2	Equipamentos.....	32
4.2	Métodos.....	34
4.2.1	Fotossensibilizador e Fonte de Luz.....	34
4.2.1.1	Photodithazine®	34
4.2.1.2	Curcumina.....	34
4.2.2	Análise da viabilidade de C. albicans entre as aplicações de aPDT ..	35
4.2.2.1	Metodologia baseada na recuperação e re-cultivo das células	35
4.2.2.1.1	Preparo da suspensão	35
4.2.2.1.2	Ensaio com cultura planctônica.....	36
4.2.2.1.3	Formação e processamento do Biofilme	36
4.2.2.1.4	Diluição seriada e plaqueamento de culturas planctônicas e biofilme	37
4.2.2.1.5	Recuperação e re-cultivo das suspensões	38
4.2.2.2	Metodologia baseada em aplicações sucessivas de aPDT	39
4.2.2.2.1	Preparo da suspensão	39
4.2.2.2.2	Ensaio com cultura planctônica.....	39
4.2.2.2.3	Formação e processamento do Biofilme	40
4.2.2.2.4	Diluição seriada e plaqueamento de culturas planctônicas e biofilme	41

4.2.2.2.5	Congelamentos das células sobreviventes à aPDT	41
4.2.3	Quantificação da produção de ERO após aPDT	42
4.2.4	Perfil biomolecular das células de <i>C. albicans</i> aos tratamentos	43
4.2.4.1	qPCR para teste de curva padrão e eficiência de cada primer.....	43
4.2.4.2	Extração de RNA	45
4.2.4.3	Purificação do RNA	47
4.2.4.4	Primeira etapa da purificação.....	47
4.2.4.5	Segunda etapa de purificação.....	48
4.2.4.6	Terceira etapa de purificação	49
4.2.4.7	Síntese de cDNA.....	50
4.2.4.8	Quantificação da expressão gênica utilizando RT-qPCR	50
4.3	Análise Estatística.....	52
4.3.1	Análise da viabilidade das células de <i>C. albicans</i>	52
4.3.1.1	Metodologia baseada na recuperação e re-cultivo.....	52
4.3.1.2	Metodologia baseada nas aplicações sucessivas de aPDT	53
4.3.2	Análise da quantificação da produção de ERO após aplicações sucessivas de aPDT	53
4.3.3	Análise da expressão gênica após aplicações sucessivas de aPDT (Apl 1, Apl 4 e Apl 7).....	54
5	RESULTADOS.....	55
5.1	Análise da viabilidade de células de <i>C. albicans</i>	55
5.1.1	Metodologia baseada na recuperação e re-cultivo.....	55
5.1.2	Metodologia baseada nas aplicações sucessivas de aPDT	58
5.1.2.1	aPDT mediada por Photodithazine associada a luz LED	58
5.1.2.1.1	Culturas planctônicas plaqueadas em ausência de fluconazol	58
5.1.2.1.2	Culturas planctônicas plaqueadas em presença de fluconazol.....	62
5.1.2.1.3	Biofilme plaqueado em ausência de fluconazol	66
5.1.2.1.4	Biofilme plaqueado em presença de fluconazol.....	70
5.1.2.2	aPDT mediada por Curcumina associada a luz LED	74
5.1.2.2.1	Culturas planctônicas plaqueadas em ausência de fluconazol	74
5.1.2.2.2	Culturas planctônicas plaqueadas em presença de Fluconazol.....	78
5.1.2.2.3	Biofilme plaqueado em ausência de fluconazol	82
5.1.2.2.4	Biofilme plaqueado em presença de Fluconazol.....	86
5.1.3	aPDT mediada por PDZ.....	90
5.1.3.1	Culturas planctônicas plaqueadas em ausência de fluconazol	90
5.1.3.2	Biofilme plaqueado em ausência de fluconazol	91
5.1.4	aPDT mediada por Curcumina	92
5.1.4.1	Culturas Planctônicas plaqueadas em ausência de fluconazol	92

5.1.4.2	Biofilme plaqueado em ausência de fluconazol	93
5.2	Expressão gênica de <i>C. albicans</i> após aPDT mediada pelo PDZ associada a luz LED (Apl 1; Apl 4; Apl 7)	94
5.2.1	qPCR para teste de cada curva padrão e eficiência de cada primer .	94
5.2.2	Extração de RNA das amostras recuperadas após Apl 1, Apl 4 e Apl 7	97
5.3	Purificação do RNA das amostras	100
5.4	qPCR para a avaliação da expressão gênica	104
6	DISCUSSÃO	112
6.1	Análise da viabilidade de células de <i>C. albicans</i>	112
6.2	aPDT mediada por PDZ e CUR	112
6.3	Quantificação de ERO após aPDT	118
6.3.1	aPDT mediada por PDZ.....	118
6.3.2	aPDT mediada por Curcumina	120
6.4	Expressão gênica após ciclos de aPDT mediada por PDZ (Apl 1; Apl 4; Apl 7)	121
7	CONCLUSÃO	125
	REFERÊNCIAS*	126

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* são consideradas microrganismos comensais, presente na microbiota oral de indivíduos saudáveis, sendo a espécie *Candida albicans* a mais prevalente e patogênica^{1,2}. Em situações de desequilíbrio imunológico ou devido a fatores sistêmicos do hospedeiro, esse microrganismo pode se tornar um patógeno oportunista e penetrar nos tecidos orais, desencadeando a candidose orofaríngea². Para o controle dessas infecções, antifúngicos convencionais de diversas classes têm sido usualmente empregados, sendo os azóis os mais utilizados³. Entretanto, as terapias antifúngicas podem ter sua indicação limitada devido a resistência que os microrganismos podem apresentar após exposição à droga por longos períodos⁴. O crescimento dos microrganismos em biofilme também contribui para a resistência, refletindo em um grande desafio para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e profiláticas⁵. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) é considerada um tratamento alternativo que vem sendo empregado para inativar *C. albicans* e no tratamento de infecções⁶⁻¹¹.

A aPDT requer a aplicação de um agente fotossensibilizador (FS), de uma fonte de luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e da presença do oxigênio¹²⁻¹⁴. A interação da luz com o FS na presença de oxigênio, promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), e podem induzir a morte celular¹⁵. O fotossensibilizador sintético Photodithazine[®] (PDZ), uma Clorina e6 obtida a partir da cianobactéria *Spirulina platensis*, vem sendo utilizado em combinação com a luz LED para inativação de espécies de *Candida* e no tratamento de candidose^{6,8}. A Curcumina (CUR), composto natural extraído da *Cúrcuma Longa L*, possui efeito antioxidante e fungicida já conhecido na literatura¹⁶. Sua potencialização associada a uma Luz LED já promoveu bons resultados no controle antimicrobiano¹⁷, como também no controle antifúngico em espécies de *Candida*¹⁸.

A produção de íons Fe_{2+} , O_2 e H_2O_2 , como resultado da inativação fotodinâmica, auxiliam na produção de radicais (ERO) extremamente reativos aos constituintes celulares¹⁹. O dano oxidativo causado particularmente no DNA, contribui para a instabilidade genética e possível mutação²⁰. Como proteção e em resposta ao estresse oxidativo, *C. albicans* pode expressar genes que ativam vias de proteção contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO)²¹.

Diversos estudos demonstraram a susceptibilidade de suspensões de *Candida*

spp. a aPDT^{7,10,22} entretanto a completa inativação das células fúngicas quando organizadas em biofilme ainda não foi observada. Após aplicação de aPDT em biofilme ainda é possível detectar a presença de células sobreviventes, devido a fatores auxiliares que contribuem para a persistência deste microrganismo^{23,24}. Entretanto, ainda não foi investigado se aplicações sucessivas de aPDT mediada por PDZ e CUR podem, ou não, contribuir para indução de resistência de *C. albicans*. O método mais utilizado para avaliar se um microrganismo, que sobreviveu a uma terapia, pode se tornar resistente, tolerante ou susceptível, é expor o mesmo a repetidos tratamentos deste agente²⁴⁻²⁶.

A aPDT vem sendo associada com antifúngicos convencionais da classe azólica, na tentativa de potencializar a terapia e reduzir o tempo e dose de aplicação²⁷. No entanto, ainda não há evidências na literatura a respeito do efeito da terapia em *C. albicans* em meio suplementado com fluconazol.

Na literatura pertinente, até o momento, não há relatos de estudos que avaliem a possível capacidade de *C. albicans* em desenvolver resistência, susceptibilidade ou tolerância à aPDT mediada por PDZ e CUR após sucessivas aplicações. Dessa forma, o presente estudo testou tal hipótese, tanto em culturas planctônicas, quanto em modelo de biofilme *in vitro*.

7 CONCLUSÃO

- Culturas planctônicas e biofilme de *C. albicans* são susceptíveis à repetidas aplicações de aPDT medida por PDZ, em ambas metodologias testadas;
- O biofilme de *C. albicans* é mais tolerante à aPDT mediada por PDZ, quando comparado a culturas planctônicas;
- A aPDT mediada por PDZ e CUR foi potencializada pelo antifúngico fluconazol;
- Sucessivas aplicações de aPDT medida por CUR aumenta a viabilidade de biofilme de *C. albicans*;
- A produção de ERO em biofilmes de *C. albicans* após aplicações de aPDT é maior que em culturas planctônicas, independentemente do FS utilizado;
- A produção de ERO resultante da última aplicação de aPDT mediada por PDZ em biofilmes de *C. albicans* foi superior a primeira;
- A produção de ERO resultante da última aplicação de aPDT mediada por CUR em biofilmes de *C. albicans* foi inferior a primeira;
- Os biofilmes submetidos à aPDT e plaqueados na ausência do fluconazol apresentaram aumento de expressão do gene SOD1 e redução do CAP1 e ERG11.
- Os biofilmes submetidos à aPDT e plaqueados na presença do fluconazol apresentaram aumento de expressão do gene SOD1, redução do CAP1 e ausência de expressão do ERG11.

REFERÊNCIAS*

1. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(3):283-8.
2. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res.* 1995; 74(5):1152-61.
3. Samaranayake LP. Host factors and oral candidosis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, editors. *Oral candidosis.* London: Butterworth; 1990. p. 66–103.
4. 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.
5. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans Candida spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002; 50(4):243-6.
6. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of candida albicans to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(3):392–401.
7. 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.
8. 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.
9. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of Candida to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(9):927-34.
10. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, Bagnato VS, Kurachi C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against Candida albicans. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(4):895-903.
11. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, Pavarina AC. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of Candida albicans in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013; 51(3):243-51.
12. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras.* 1996; 42(3):229-36

* 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-normalizacaoatualizado.pdf>

13. Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3:406-11.
14. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(5):468-81.
15. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova.* 2000; 32:237-43.
16. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 2005; 41:1955–68.
17. Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci.* 2005; 4:523-30.
18. Andrade MC, Ribeiro APD, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2013; 58:200–10.
19. Franz R, Ruhnke M, Morschhäuser J. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses.* 1999; 42(7-8):453.
20. Boiteux S, Guillet M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst).* 2004; 3(1):1-12.
21. Dantas Ada S, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules.* 2015; 5(1):142-65.
22. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, Diekema DJ. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:318-90.
23. Ribeiro AP, Andrade MC, de Fátima da Silva J, Jorge JH, Primo FL, Tedesco AC, et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. *Photochem Photobiol.* 2013; 89(1):111-9.
24. Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn (II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Anti agen and chem.* 2010; 54(2):637-42.

25. McMahon MA, Tunney MM, Moore JE, Blair IS, Gilpin DF, McDowell DA. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Lett Appl Microbiol*. 2008; 47(4):263-8.
26. Hassan HM, Moody CS. Regulation of manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Anaerobic induction by nitrate. *J Biol Chem*. 1987 15;262(35):17173-7.
27. Snell SB, Foster TH, Haidaris CG. Miconazole induces fungistasis and increases killing of *Candida albicans* subjected to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2012; 88(3):596-603.
28. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5(2):125-57.
29. Matsubara VH, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2016;62(9):1143-53.
30. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo, et al. *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2):288–305.
31. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011; 10(9):1173-82.
32. Ruchel R. Proteinases of pathogenic fungi. *Mycoses* 1999; 42:48–52.
33. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schäfer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol*. 2000; 174(5):362-74.
34. Dantas Ada S, 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.
35. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11:382-402.
36. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*. 2010; 89(3):205-18.
37. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal super glue: The biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathog*. 2016; 12(9):1.
38. Jackson KD, Starkey M, Kremer S, Parsek MR, Wozniak DJ. Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J Bacteriol*. 2004; 186:4466–75.

39. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009; 73(2):310-47.
40. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; 11(1):30-6.
41. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(2):109-18.
42. Guo D, Yue H, Wei Y, Huang G. Genetic regulatory mechanisms of *Candida albicans* biofilm formation. *Sheng Wu Gong Chen Xue Bao.* 2017; 25;33(9):1567-81.
43. Kucharíková S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdáková H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol.* 2016; 60(9):1261-9.
44. Nobile CJ, HA Schneider, JE Nett, DC Sheppard, SG Filler, DR Andes, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol.* 2008; 18:1017–24.
45. Li F, Palecek SP. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions. *Microbiol.* 2008; 154:193–203.
46. Uppuluri P, Pierce CG, Thomas DP, Bubeck SS, Saviile SP, Lopez-Ribot JL. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Euk Cell.* 2010; 9(10):1531-7.
47. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7):2982-92.
48. Oh KB, Miyazawa H, Naito T, Matsuoka H. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 10(98):4664-8.
49. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(2):668-79.
50. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol.* 2018; 45:70-6.
51. Tsai HF, Sammons LR, Zhang X, Suffis SD, Su Q, Myers TG, et al. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:3308-17.

52. Arévalo MP, Arias A, Andreu A, Rodríguez C, Sierra A. Fluconazole, itraconazole and ketoconazole in vitro activity against *Candida* spp. *J Chemother.* 1994; 6(4):226-9.
53. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(5):558-64.
54. Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(9):3135-9.
55. Kashef N, Karami S, Djavid GE. Phototoxic effect of hypericin alone and in combination with acetylcysteine on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Photodiagn. Photodyn.* 2015; 12(2):186–92.
56. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012; 19; 4(165):165rv13.
57. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol.* 2013; 11(10):e1001692.
58. Robbins N, Caplan T, Cowen LE. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu Rev Microbiol.* 2017; 71:753-75.
59. Cowen LE, Lindquist S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science.* 2005; 309(5744):2185-9.
60. LaFayette SL, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Betancourt-Quiroz M, Gunatilaka AA, et al. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8):e1001069:
61. Chen Y, Mallick J, Maqnas A, Sun Y, Choudhury BI, Côte P, et al. Chemogenomic Profiling of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(2):1334-9.
62. Lee KT, So YS, Yang DH, Jung KW, Choi J, Lee DG, et al. Systematic functional analysis of kinases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Nat Commun.* 2016; 7:12766.
63. Wiederhold NP. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 51(3):333-9.

64. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2(2):73-85.
65. Hampe IAI, Friedman J, Edgerton M, Morschhäuser J. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. *PLoS Pathog*. 2017; 13(9):e1006655.
66. Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A, et al. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*. 2006; 172(4):2139-56.
67. Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, BlaB-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2007; 3(11):e164.
68. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(6):2329-35.
69. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008; 163:19-2.
70. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 2001; 57:9513-47.
71. Ferreira J, Menezes PFC, Kurachi C, Sibata C, Allison RR, Bagnato VS. Photostability of different chlorine photosensitizers. *Laser Phys Lett*. 2008; 5:156-61.
72. De Simone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Phys Ther*. 1999; 79:839-46.
73. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P et al. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin (e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1402-10.
74. 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.
75. Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci*. 2014; 116(1):1-7.

76. Martins CV, da Silva DL, Neres AT, Magalhães TF, Watanabe GA, Modolo LV, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(2):337-9.
77. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; 14(8):1518-26.
78. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(5):320-30.
79. Tavares A, Carvalho C, Faustino MA, Neves MG, Tomé JP. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar. Drugs.* 2010; 8(1):91-105.
80. Cassidy CM, Donnelly RF, Tunney MM. Effect of sub-lethal challenge with Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) on the antibiotic susceptibility. *J. Photochem. Photobiol.* 2010; 99(1):62-6.
81. Pourhajibagher M, Boluki E, Chiniforush N, Pourakbari B, Farshadzadeh Z, Ghorbanzadeh R, Aziemzadeh M, Bahador A. Modulation of virulence in *Acinetobacter baumannii* cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016; 15:202-12.
82. Pourhajibagher M, Chiniforush N, Shahabi S, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Sub-lethal doses of photodynamic therapy affect biofilm formation ability and metabolic activity of *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016; 15:159-66.
83. Anbar AD. *Oceans. Eleme and ev.* 2008; 88(1):1481–3.
84. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 2008; 77(7):755-6.
85. Sies H, Menck FM. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mut Res.* 1992; (1):367-75.
86. Sabbahi S, Alouini Z, Jemli M, Boudabbous A. The role of reactive oxygen species in *Staphylococcus aureus* photoinactivation by methylene blue. *Water Sci Technol.* 2008; 58(5):1047-54.
87. Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med.* 2012; 44(6):490-9.

88. Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plésiat P, Pechère JC, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(5):1055-65.
89. Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photochem Photobiol.* 2010; 86(6):1343-9.
90. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontol.* 2010; 98(1):15-25.
91. 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.
92. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2):167-93.
93. Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, Stavnsberg C, Jensen PØ, Tolker-Nielsen T, et al. The Inoculation Method Could Impact the Outcome of Microbiological Experiments. *Appl Environ Microbiol.* 2018; 14:85-95.
94. 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.
95. 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.
96. 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.
97. 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: 3705–13.
98. 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; 1-18(7).

99. 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)1-13.
100. Jordão CC, Klein MI, Carmello JC, Dias LM, Pavarina AC. Gene expression of fluconazole-resistant *Candida albicans* submitted to in vivo treatments with photodynamic therapy and nystatin. *Front*. 2020 (accepted for publication).
101. 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.
102. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28830
103. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1(3): 1559–82.
104. Ebden P, Neill P, Farrow PR. Sputum levels of fluconazole in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33(6):963-4.
105. Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, et al. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(12):2708-17.
106. Ellepola AN, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *Candida albicans*. *J Oral Pathol Med*. 1998; 27(5):213-9.
107. Katragkou A, Alexander EL, Eoh H, Raheem SK, Roilides E, Walsh TJ. Effects of fluconazole on the metabolomic profile of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71(3):635-40.
108. Davies A, Gebremedhin S, Yee M, Padilla RJ, Duzgunes N, Konopka K, et al. Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole. *J Physiol Pharmacol*. 2016; 67(5):777-83.
109. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis: clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol*. 2011; 37(4):328-36.
110. Balzer M, Witt N, Flemming HC, Wingender J. Faecal indicator bacteria in river biofilms. *Water Sci Technol*. 2010; 61(5):1105-11.
111. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol*. 2018; 45:70-76.

112. Quishida CC, Mima EG, Dovigo LN, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine(®) and LED light after one and three successive applications. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(9):2303-12.
113. Amin R, M Bhayana, B Hamblin, Dai T. Antimicrobial blue light inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* by photo-excitation of endogenous porphyrins: In vitro and in vivo studies. *Lasers in Surg Med.* 2016; 48(5):562-8.
114. Zhang Y, Zhu Y, Gupta A, Huang Y, Murray CK, Vrahas MS, et al. Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a mouse burn model: implications for prophylaxis and treatment of combat-related wound infections. *J Infect Dis.* 2014; 209(12):1963-71.
115. Taylor R, Fletcher RL. Cryopreservation of eukaryotic algae—a review of methodologies. *Jour of Ap Phy.* 1998; 10(5): 481-501.
116. Savitskaya MA, Onishchenko GE. Apoptosis in Cryopreserved Eukaryotic Cells. *Biochemistry (Mosc).* 2016; 81(5):445-52.
117. Lyon JP, Moreira LM, Moraes PCG. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses.* 2011; 54:265–71.
118. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med.* 2012; 1:52(1):1-6.
119. Maclean M, Macgregor SJ, Anderson JG, Woolsey GA. The role of oxygen in the visible-light inactivation of *Staphylococcus aureus*. *J Photochem Photobiol B.* 2008; 18:92(3):180-4.
120. Farrell H, Hayes J, Laffey J, Rowan N. Studies on the relationship between pulsed UV light irradiation and the simultaneous occurrence of molecular and cellular damage in clinically-relevant *Candida albicans*. *J Microbiol Methods.* 2011;84(2):317-26.
121. Diffey B, Kochevar I. Basic principles of photobiology. In: Lim H, Honigsmann H, Hawk JL; *Photodermatology.* 2007;15–27.
122. Kashiwabuchi RT, Khan Y, Carvalho FR, Hirai F, Campos MS, McDonnell PJ. Antimicrobial susceptibility of photodynamic therapy (UVA/riboflavin) against *Staphylococcus aureus*. *Arq Bras Oftalmol.* 2012;75(6): 423-6.
123. Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 1996; 19:651–8.

124. Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG. Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem.* 2004;279(40):41975-84.
125. Gourlay CW, Ayscough KR. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(7):583-9.
126. Hu X, Huang YY, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Front Microbiol.* 2018; 27:9:1299.
127. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram- positive pathogenic bacteria. *Antimicrob. Agent Chemother.* 2004; 48: 2173–78.
128. Daia T, Gupta A, Murray CK. Blue light for infectious diseases: Propionibacterium acnes, Helicobacter pylori, and beyond? *Drug Resist Update.* 2012; 15:223–36.
129. Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl.* 1993; 3(3):18-29.
130. Bustin SA, editor. *A-Z of Quantitative PCR.* La Jolla, CA: International University Line; 2004.
131. Martchenko M; Alarco AM; Marcus D; Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal- induced SOD5 gene. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15: 456–67.
132. Hwang CS, Rhie G, Kim ST, Kim YR, Huh WK, Baek YU, et al. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys.* 1999; 1427: 245–55.
133. Jordão CC, Carmello JC, Sousa TV, Klein MI, Dias LM, Pavarina AC. Antimicrobial Photodynamic Therapy reduces gene expression of *Candida albicans* in biofilm. *Photodiag an Photod The.* 2020. (accepted for publication).
134. Chien CT, Chen YC, Liu YC, Liang SH, Lin HH, Lin CH. The antimicrobial photodynamic inactivation resistance of *Candida albicans* is modulated by the Hog1 pathway and the Cap1 transcription factor. *Med Mycol.* 2018 doi: 10.1093/mmy/myy079.
135. Wu Y, Wu M, Wang Y, Chen Y, Gao J, Ying C. ERG11 couples oxidative stress adaptation, hyphal elongation and virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2018; 18(7):123-6
136. Parks LW, Casey WM. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 95-116.

137. 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.
138. 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.
139. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Front Microbiol*. 2017; 7: 2173.
140. Silver PM, Oliver BG, White TC. Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Euk Cell*. 2004; 3(6):1391-7.