



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.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar *in vivo* se a aplicação da enzima DNase I potencializa a ação da aPDT, melhorando a eficácia da terapia. Além disso, para melhorar o entendimento sobre o mecanismo de ação das terapias foi avaliada a marcação de componentes da MEC do biofilme, expressão gênica e produção de citocinas inflamatórias após o tratamento com a terapia combinada.

2.1 Proposições específicas

Estudo I: Avaliar *in vivo* a eficácia da aPDT associada a DNase no tratamento de candidose oral induzida em língua de camundongos infectados com cepas de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol.

Estudo II: Avaliar a expressão de genes de *C. albicans* relacionados com a adesão ao substrato do hospedeiro (*EFG1* e *HWP1*), a matriz extracelular (*BGL2* e *PHR1*) e o estresse oxidativo (*SOD1*).

Estudo III: Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias (IL-6, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-12p-70 e IL-10).

3 PUBLICAÇÕES

Publicações resultantes da tese de Doutorado. A Publicação 1 (item 3.1) foi publicada e a Publicação 2 (item 3.2) está em fase de redação para publicação.

3.1 Publicação 1*

DNase improves the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of candidiasis induced with *Candida albicans*

Cláudia Carolina Jordão¹, Marlise Inêz Klein², Paula Aboud Barbugli¹, Ewerton Garcia de Oliveira Mima¹; Tábata Viana de Sousa¹; Túlio Morandin Ferrisse¹, Ana Claudia Pavarina^{1*}.

¹Laboratory of Applied Microbiology, Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, São Paulo, Brazil.

²Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, State University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, São Paulo, Brazil.

*** Correspondence:**

Ana Claudia Pavarina
ana.pavarina@unesp.br

Keywords: Photochemotherapy, *Candida albicans*, antifungal drug resistance, fungi, enzyme.

Abstract

The study evaluated the association of DNase I enzyme with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of oral candidiasis in mice infected with fluconazole-susceptible (CaS) and -resistant (CaR) *Candida albicans* strains. Mice were inoculated with *C. albicans* and after the infection has been established the tongues were exposed to DNase for 5 min, followed by photosensitizer (Photodithazine) and light (LED), either singly or combined. The treatments were performed for 5 consecutive days. Treatment's efficacy was evaluated by assessing the tongues via fungal viable population, clinical evaluation, histopathological and fluorescence microscopy methods immediately after finishing treatments and seven days of follow-up. The DNase prior aPDT reduced the fungal viability in mice tongues immediately after the treatments by around 4.26 and 2.89 log₁₀ for CaS and CaR, respectively (versus animals only inoculated). In the fluorescence microscopy, neither the polysaccharides produced by *C. albicans* nor fungal cells were not labeled in

* Artigo formatado segundo as normas do periódico *Frontiers in Microbiology* no qual foi publicado:
Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1274201/full>.

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. Mice treated with DNase prior aPDT showed remission of oral lesions and mild inflammatory infiltrate for both strains and periods assessed, while animals treated only with aPDT presented partial remission of oral lesions. DNase I enzyme improved the efficacy of photodynamic treatment.

1. Introduction

Oropharyngeal candidiasis (OPC) is the most prevalent infection caused by *Candida* spp. [1,2]. Infections caused by *Candida* spp. are associated with biofilm formation, a complex microstructure of cells adhered to a surface and enveloped by an extracellular matrix (ECM) [3]. ECM contributes to preserving biofilms and conserving stable interactions between cells, surfaces (substrate), and the environment [3]. In addition, ECM reduces the susceptibility of microorganisms against therapies classically used [3,4]. Biochemical analyzes show that the production of polysaccharides (β -1-3-glucan, β -1-6-glucan and β -1-6-mannan, for example), nucleic acids (extracellular DNA —eDNA), lipids and carbohydrates (cellulose and chitin) protect the biofilm' cells and to keep stable interactions between ECM components [2,5]. The antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms is multifactorial. It has been linked with the stimulation of drug efflux pumps, the physiological state of the cells, and the protection employed by the ECM through β -mannan and β -glucans that bind with fluconazole and amphotericin B [3,4]. In addition to β -mannan and β -glucan, it has been reported that eDNA is also an important constituent of the ECM and that it promotes the structural integrity of biofilms [6]. Furthermore, the presence of polysaccharides or eDNA was reported as a bacterial biofilm mechanism of protection against the diffusion of antibiotics [7,8].

The fact that the ECM has been related to biofilm protection [10], the use of enzymes capable of hydrolyzing polysaccharides and nucleic acids has been the aim of investigations, as it represents an alternative way of increasing the susceptible of the biofilm to antifungal drugs [10]. DNase I enzyme can significantly reduce eDNA, soluble matrix proteins, and water-soluble polysaccharides of a fluconazole-resistant *C. albicans* [11]. This enzyme acts externally to the cell, reducing biofilm stability, and enhancing its susceptible to photodynamic therapy and antifungals [11-14]. The treatment of mature biofilms with DNase I (50 mg/mL) inhibited adhesion, biofilm formation, and reduced the biomass by approximately 30% [15]. Incubation of *in vitro*

48h-old biofilms for 5 min to DNase I reduced eDNA and extracellular polysaccharides from the ECMs of fluconazole-susceptible and -resistant *C. albicans* strains [11].

Due to the increase of resistant microorganisms [16], the side effects of antifungals [17], recolonization, and organization into biofilms [16], studies have evaluated alternative strategies to manage fungal infections. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a modality suggested for inactivating microorganisms and treating oral candidiasis [18-20]. The photodynamic process requires a photosensitizing agent (PS) combined with a light with wavelength corresponding to the PS absorption band [18]. The interaction of light with PS, in the presence of oxygen, produces reactive species capable of inducing cell inactivation [21]. Reactive species have non-specific reactivity with organic molecules and can cause irreversible damage to cellular targets, such as membrane lysis and protein inactivation. Thus, any cellular macromolecule can be considered a target for aPDT [18,22].

aPDT mediated by Photodithazine (PDZ) inactivated *Candida* biofilms and treated oral candidiasis [4,5]. A single application of aPDT mediated by PDZ in a murine model decreased the fluconazole-susceptible *C. albicans* (ATCC 90028) viability by 4.36 log₁₀ [24]. On the other hand, mice infected by a fluconazole-resistant *C. albicans* strain (ATCC 96901) that received a single session of aPDT mediated by PDZ presented reduced fungal cell viability by 1.96 log₁₀ [25]. Five consecutive applications of aPDT mediated by PDZ or antifungal nystatin promoted reductions in the fluconazole-susceptible *C. albicans* (ATCC 90028) by 3 and 3.2 logs₁₀, respectively, and promoted the remission of tongue lesions after 24 h of treatment [26]. In another study, when the animals were inoculated with a fluconazole-resistant strain (ATCC 96901), aPDT mediated by PDZ was as effective as the topical antifungal nystatin in the treatment, reducing viability by around 1.2 log₁₀ [27]; however, the animals showed white or pseudomembranous patches on the dorsum of the tongues. In animals inoculated with fluconazole-resistant *C. albicans*, the associations of treatments [aPDT mediated by PDZ and nystatin] reduced ~2.3 log₁₀ of fluconazole-resistant *C. albicans* [27], and the macroscopic analysis revealed remission of oral lesions ranging ~95 % after 24 hours [27]. In general, previous studies [24-27] have demonstrated the efficacy of aPDT in treating infections caused by fluconazole-susceptible *C. albicans*. However, fluconazole-resistant *C. albicans* have reduced susceptibility to aPDT, and to find similar outcomes in the treatment of infections with these strains, it is necessary to combine treatments.

DNase treatment might be an adjuvant to anti-biofilm therapies since it reduces most ECM components that can hinder antifungal drug penetration into biofilms without interfering with cell viability [11,28]. Fluconazole-susceptible *C. albicans* biofilm incubated with DNase I (5 min) before aPDT [(PDZ combined with light-emitting diode (LED))], reduced the counting of viable colonies (CFU) and the levels of eDNA in the ECM [11]. In the fluconazole-resistant *C. albicans* biofilm, this treatment promoted a decrease by $\sim 1.62 \log_{10}$ in the log value and also reduced water-soluble polysaccharides (36.3%) and eDNA (72.3%) [28]. The effect of photodynamic treatment was potentiated because DNase I disturbed the ECM and allowed the diffusion of PDZ and light through the ECM of fluconazole-susceptible and -resistant *C. albicans* biofilm, increasing treatment efficacy [28]. Thus, the present study evaluated if the application of the DNase enzyme could potentiate the action of aPDT treatment in mice infected with fluconazole-susceptible and -resistant *C. albicans*, focusing on fungal viable population recovery and resolution of candidiasis lesions on the mice's tongues.

2. Materials and Methods

2.1. Photosensitizer, DNase enzyme and LED parameters

Photodithazine® (PDZ) is an e6 chlorin derivative (VETAGRAN, Co, Moscow, Russia), which has an absorption peak of 660 nm. The PDZ was prepared on the day of use from the stock solution (5000 mg/L) at a concentration of 200 mg/L in natrosol gel (Farmácia Santa Paula, Araraquara, SP, Brazil) and was kept protected from light [27]. The bovine pancreas DNase I enzyme stock solution (AMPD1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared on the day of use in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5) at the concentration of 20 units/mL [28].

The red LED light device (LXHLPR09, Luxeon® III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California, USA) was used with an absorption band of 660 nm, and light intensity at the end of the device (5 mm in diameter) was 44.6 mW/cm². Thus, a light dose of 50 J/cm² (19 min) was applied to the tongues of animals infected with *C. albicans*.

2.2. Experimental oral candidiasis and treatments performed

The present study was approved by the Animal Ethics Committee of the School of Dentistry of Araraquara, UNESP (Case number: 09/2020). A total of 180 female

mice of the Swiss strain ($\cong$ five weeks old) were used from the vivarium of the School of Dentistry of Araraquara, UNESP. The animals were allocated in individual cages according to the study groups and kept in a room with a controlled temperature ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) with standard chow and water *ad libitum* [26,27].

Strains of *C. albicans* ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA), susceptible to fluconazole (ATCC 90028; CaS) and resistant to fluconazole (ATCC 96901; CaR) were defrosted, reactivated in Agar Sabureaud Dextrose (SDA) medium (37°C , 48 h). Next, colonies were transferred and cultivated in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C for 16 h. Then, the cells were washed twice with sterile phosphate buffered saline (PBS), resuspended with 3 mL of RPMI 1640, and the cell suspension was standardized spectrophotometrically with an optical density (OD) of 540 nm ($1.0 \text{ nm} \pm 0.08$, corresponding to 10^7 CFU/mL) [26,27].

For the induction of oral candidiasis, the methodology described before [26,29] was used with some modifications. Tetracycline (0.83 mg/mL) was administered in the water available to the animals during the experimental period. The animals were immunosuppressed with subcutaneous injections of prednisolone at a dose of 100 mg/kg of body mass on days 1, 5, 9, and 13. On day 2 of the experiment (Figure 1), inoculation with the strains was performed [26,27,29]. For this procedure, the animals were sedated with 0.1 mL of chlorpromazine hydrochloride (2 mg/mL), and sterile mini-swabs soaked in the CaS or CaR suspension were scrubbed across the dorsum of the animals' tongues for 30 seconds.

On day 7 the presence of white patches or pseudomembranous lesions was verified and the treatments were performed. The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine [100 mg/kg body weight (National Pharmaceutical Chemistry Union S/A, Embu, SP, Brazil)] and xylazine [10 mg/kg body weight (Veterinary JA Ltda., Sponsor Paulista, SP, Brazil)]. Then, the animals were placed in a supine position on the work table, the tongues were gently taken out of the oral cavity, and 50 μL of PDZ diluted in natrosol gel (200 mg/L) was applied with a pipette [26,27]. The mice stayed in the dark for 20 minutes for a pre-incubation time. Then, each dorsum of the tongue was illuminated with LED for 19 minutes (50 J/cm^2) (P+L+ group). The effect of the isolated application of PDZ (P+L-) and the LED (P-L+ group) was also evaluated. For DNase treatment, the tongue of the mice received 50 μL of DNase (20 units/mL) for 5 minutes. One group received the combined treatment with the enzyme and aPDT (DNase+P+L+ group). After the treatments, neither DNase nor PDZ was

removed from the mice' tongue. The untreated control group (P-L- group) received no PDZ, light, or DNase. In addition, two additional negative infection control groups (NIC groups) with healthy animals were evaluated. In one of them, mice were immunosuppressed on days 1, 5, 9, and 13 (NIC+ group); in the other group, animals did not receive immunosuppression (NIC- group). Seven animals were evaluated for each experimental condition, except the group NIC+ (n = 3) and NIC- (n=3). The therapies were performed once a day for five consecutive days (from day seven until day 11).

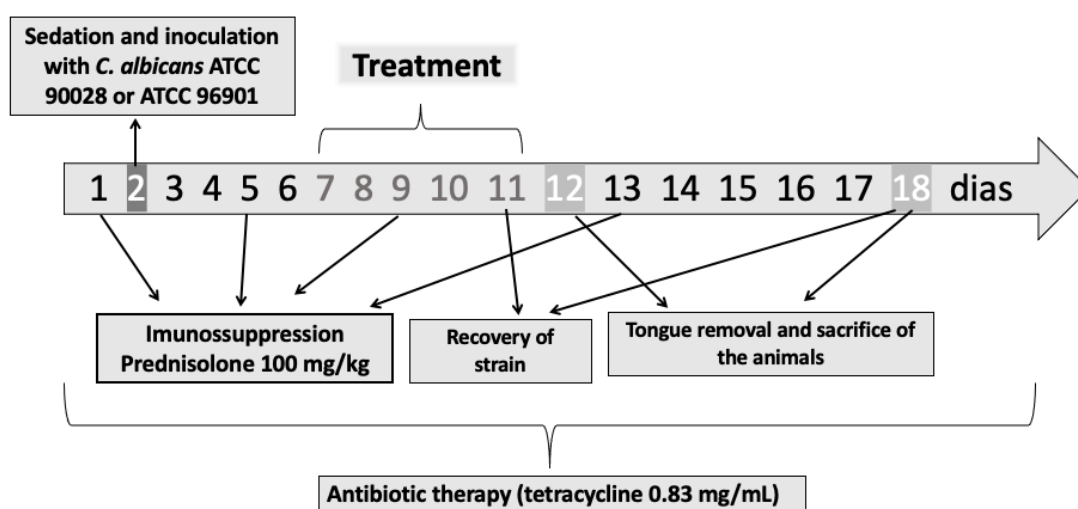


Figure 1. Experimental protocol. On the days 1, 5, 9, 13 the animals were immunosuppressed with subcutaneous injections of prednisolone. On the day 2, the animals were inoculated with CaS or CaR. The treatment was performed 5 days (day 7 to 11). On the days 11 and 18 the fungal was recovery from the mice's tongue. The tongue removal and euthanasia were performed on the days 12 and 18. During all experimental period (18 days), tetracycline hydrochloride was administered in the water system.

2.3. Fungal viable population

After five consecutive days of treatment (day 11) and seven days after the end of the treatment (day 18), *C. albicans* cells were recovered from the tongue of mice. For this procedure, the mini-swabs were swabbed on the dorsum of each tongue for 1 minute. Then, they were transferred to tubes with 1 mL of saline solution and vortexed for 1 minute to detach *C. albicans* cells. Then, serial dilutions were made (10^{-1} a 10^{-3}) and plated in duplicate in SDA culture medium containing 5 µg/mL of chloramphenicol. After 48 hours of incubation at 37 °C, the viable colonies were counted, and the values of CFU/mL were determined.

2.4. Macroscopic analysis of tongue's lesions

The white patches or pseudomembranous lesions in the tongues of mice were photographed before the beginning of the treatments, 24 h (day 12), and seven days (day 18) after the last application. All photographs were standardized and obtained with the same digital camera (Sony Cyber-Shot DSCF717; Sony Corporation, Tokyo, Japan), by the same operator and under the same conditions (place, light, angle, and position of the animals), thus aiming to facilitate the reproducibility. The extension area of the lesion on the tongue in each photograph was evaluated using the Image J.exe program. (free access at <https://imagej.nih.gov/ij/docs/install/windows.html>). The percentage of the extension area of each lesion over the total area of the tongue was calculated using this software [27].

2.5. Histopathological analyses and animal sacrifice

Initially, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine and xylazine. Then, animals' tongues were surgically removed and destined for histopathological and fluorescence microscopic analyses. After the tongue excision, mice were euthanized by intramuscular injection of a lethal dose of ketamine (0.2 mL) and xylazine (0.4 mL) 24 h (day 12) and 7 days (day 18) after the last application of treatment [26,27].

The tongues were placed in plastic cassettes for the histopathological and fluorescence microscopic analyses. These cassettes were immersed in 10% of paraformaldehyde (pH 7.2). Then, the histological fixation process was made, and the blocks were fixed on wooden supports and placed in a rotating microtome. Sixteen serial histological sections of each block were obtained. These cuts were placed on glass slides and stained with hematoxylin-eosin (HE) stain to evaluate the histological events that occurred in each of the groups through light microscopy [Zeiss microscope LSM 700 (Carl Zeiss, Heidelberg, Germany)] at 100 and 200X magnification. Histological analysis was performed by a pathologist, and the following aspects were available: the presence/absence of yeast and inflammatory infiltrate, epithelial tissue integrity and adjacent connective tissue response. The material was classified into scores: 0—the absence of inflammation; 1—the presence of inflammatory infiltrate; 2—moderate inflammation; 3: severe inflammation; 4: abscess formation (ISO 7405:1997). The evaluation was performed by a single examiner blinded to each experimental group at each evaluated time after treatment.

2.6. Microscopy analysis of fluorescence to determine fungal colonization on tongues

Initially, the samples were deparaffinated and hydrated in water. The antigenic retrieval was made by heat. The sections were then immersed in 10 mM buffered sodium citrate, pH 6.0, and placed in the microwave twice for 5 minutes each [30]. Next, the slides were dried, and the sections were circled with a hydrophobic barrier pen (Sigma Advanced PAP Pen-Z377821) and 20 μ L of the primary antibody (1 $\rightarrow$ 4)- β -mannan and galacto-(1 $\rightarrow$ 4)- β -mannan (400-4) (Table 1) diluted in 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X100 (1:20 dilution) was pipetted [31]. The slides were incubated overnight (4°C). After incubation, sections were carefully washed with 0.89% NaCl solution, and blocking solution (3% BSA) was added, followed by incubation for 15 min (room temperature). Then, the sections were washed again with 0.89% NaCl solution, and the secondary antibody (20 μ L) labeled with Alexa Fluor® 594 nm (1:500 dilution in ASB 2 %) was added (Table 1), followed by incubation for 2 hours (4 °C). After the secondary antibody incubation time, the sections were washed with 0.89% NaCl and incubated with 20 μ L of concavalin-A lectin conjugated with Alexa Fluor® 488 nm (200 μ g/mL) (Table 1) and Hoescht (6 μ g/mL) (Table 1) for 30 min. Next, samples were washed with 0.89% NaCl. The mounting media [Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (F4680, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)] was added and the slides were ready for image acquisition. Images were acquired using the Leica DM2500 LED microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Table 1. Probes and stains used in the fluorescence microscopic analysis

Labeling Target	Labeling (stain or probe) (Excitation/emission nm)	Brand	Reference
<i>C. albicans</i>	ConcanavalinA (ConA) lectin conjugated with tetramethylrhodamine (488/520 nm)	Molecular Probes (Cat. No. C860)	[31,32]
Nucleic acids	HOESCHT 33342	ABCAM Staining Staining Dye Solution (Cat. No. ab228551)	[33]
Polysaccharides produced by <i>C. albicans</i>	Primary monoclonal antibody to (1 $\rightarrow$ 4)- β -mannan and galacto-(1 $\rightarrow$ 4)- β -mannan	Biosupplies (Cat. No. 400-4)	[31,34]
Secondary antibody	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (561/620 nm)	Abcam (Cat. No. ab175660)	[31,34]

2.7. Statistical Analysis

Analyses were performed using the IBM SPSS Statistics for Windows Version 27; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Data from each strain was evaluated separately. The normality and homoscedasticity of the data from CFU converted in base-10 logarithms for each strain were assessed using the Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. The data were normal and heteroscedastic, so they were analyzed by a two-way ANOVA test, considering two periods of evaluation of the treatment (immediate and 7 days after). Games-Howell post-hoc analysis was performed for multiple comparisons ($\alpha = 5\%$). The percentage values of tongue's lesions assumed normality and were homoscedastic for the data evaluated in both periods (24 h and 7 days after the treatments) for CaS and CaR. Thus, they were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc ($\alpha = 5\%$). Descriptive analyses were performed for the images obtained for the histopathological and fluorescence microscopy evaluations.

3. Results

3.1. Fungal viable population from mice inoculated with CaS and CaR

The results of viability from CaS, immediately after the treatments demonstrated that the animals treated with aPDT followed DNase (DNase+P+L+ group) showed the highest $\log_{10}$ reduction value (CFU/mL), compared to the negative control group (P-L-) equivalent to 4.26 $\log_{10}$ (Figure 2) and different from the other groups and the control ($p \leq 0.0001$). The P+L+ group showed a reduction of approximately 2.50 $\log_{10}$ compared to the control (P-L- group) (Figure 2). The other groups showed statistically similar values with the control (P-L-) ($p \geq 0.05$) (Figure 2).

The results of CaR showed that DNase+P+L+ group immediately after the treatments was statistically different from the other groups and exhibited the highest $\log_{10}$ reduction value (CFU/mL), compared to the P-L-group ($p \leq 0.0001$), equivalent to 2.89 $\log_{10}$ (Figure 3). The group treated only with aPDT (P+L+ group) showed a reduction of 0.34 $\log_{10}$ compared to the P-L- group. The P+L-, P-L+, P+L+, DNase and P-L-groups presented statistically similar effect (Figure 3).

The results of 7 days after the end of the treatments demonstrated that the DNase+P+L+ group exhibited the greatest reduction in the viable colonies of CaS when compared to the negative control group (P-L-) ($p \leq 0.0001$); this reduction was approximately 1.97 $\log_{10}$ (Figure 2). The P+L+ group was similar to DNase+P+L+

group and showed a statistically different value from the other groups, with a reduction of 1.18 $\log_{10}$ compared to the P-L- group ($p \leq 0.0001$). The other experimental groups (P+L-, P-L+, DNase) showed statistically similar effect among themselves and with the negative control (P-L-) ($p \geq 0.05$) (Figure 3).

For CaR after 7 days of the end of the treatments, the DNase+P+L+ group showed the greatest reduction in viable colonies when compared to the P-L- group ($p \leq 0.0001$), with a reduction of approximately 1.27 $\log_{10}$ (Figure 3). The P+L+ group showed a reduction of 0.22 $\log_{10}$ compared to the P-L- group. The other experimental groups (P+L-, P-L+, P+L+, and DNase) showed statistically similar values among themselves and the P-L- group ($p \geq 0.05$) (Figure 3).

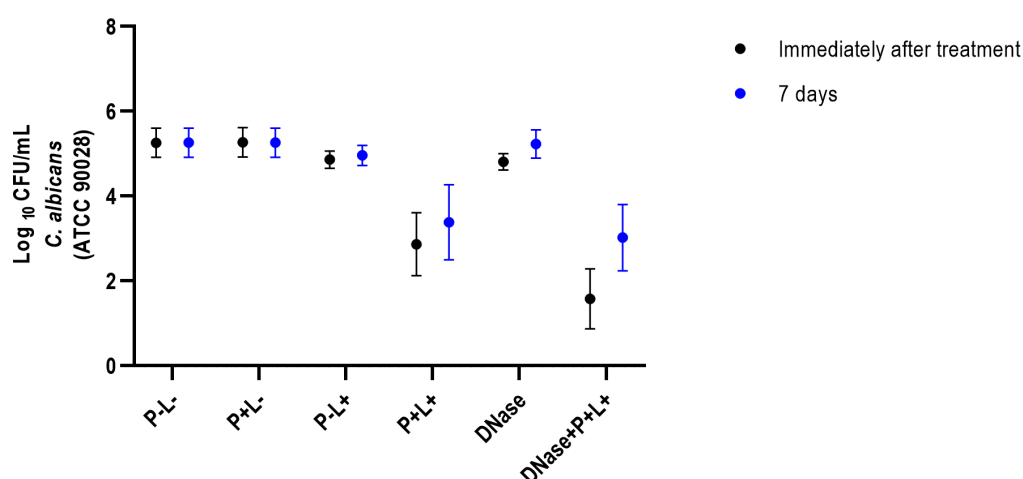


Figure 2. Mean values +/- standard deviation of $\log_{10}(\text{CFU/mL})$ for different experimental groups and periods evaluated (immediately and 7 days after treatments) for animals inoculated with CaS.

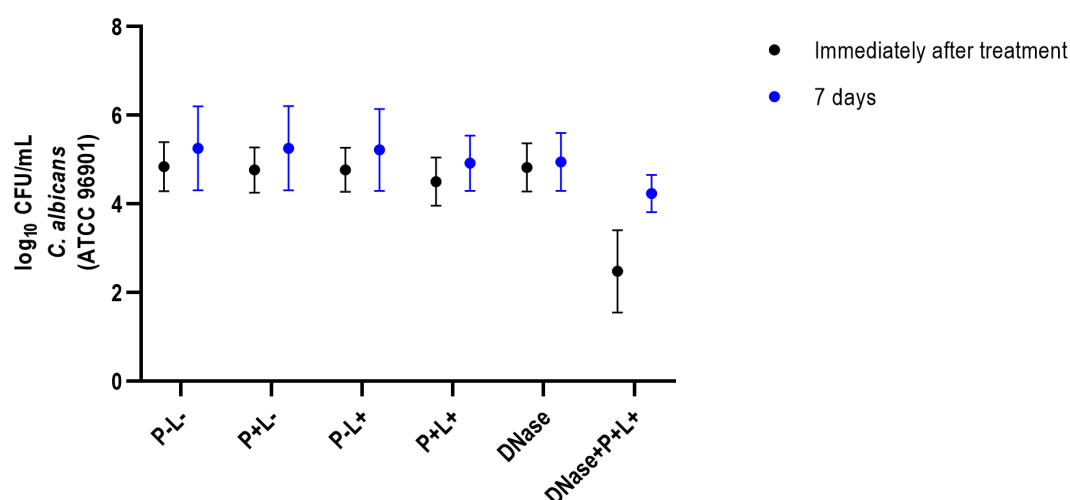


Figure 3. Mean values +/- standard deviation of $\log_{10}(\text{CFU/mL})$ for different experimental groups and periods evaluated (immediately and 7 days after treatments) for animals inoculated with CaR.

3.2. Clinical evaluation from mice inoculated with CaS and CaR

The results after 24 h of treatment (Figure 4) for mice inoculated with the CaS showed that the DNase+P+L+ and P+L+ groups significantly reduced oral lesions by 98.92% and 97.71 %, respectively, when compared to the P-L- group ($p \leq 0.0001$). The results for 7 days after the treatments showed a reduction in oral lesions of 83.31% for DNase+P+L+ group, compared to the P-L- group ($p \leq 0.0001$). The DNase+P+L+ group was statistically different from P+L+ group that reduced the oral lesions by around 63.81% compared to the P-L- group ($p \leq 0.0001$). The other groups evaluated immediately and after 7 days (Figure 4) showed statistically similar effect to the P-L- control ($p \geq 0.05$). The images presented in Figure 5 illustrate the presence of white patches or pseudomembranous plaques on the dorsum of the animals' tongues inoculated with CaS for each group 24 h and 7 days after the treatments.

The results obtained for CaR (Figure 6) demonstrated that the DNase+P+L+ and P+L+ groups immediately after the treatments exhibited reductions of oral lesions by 96.07% and 50.41%, respectively, when compared to the P-L- group ($p \leq 0.0001$). The other groups, immediately after the treatments, showed statistically similar effect to the P-L- group ($p \geq 0.05$). In addition, seven days after the treatments, the DNase+P+L+ group showed a significant reduction in oral lesions by 75.24% when compared to the P-L- group ($p \leq 0.0001$). The other groups showed statistically similar values to the P-L- control ($p \geq 0.05$) (Figure 6).

The images in Figure 7 illustrates the presence of white patches or pseudomembranous plaques on the dorsum of the tongues 24 h and 7 days after the treatments performed on animals inoculated with CaR (Figure 7).

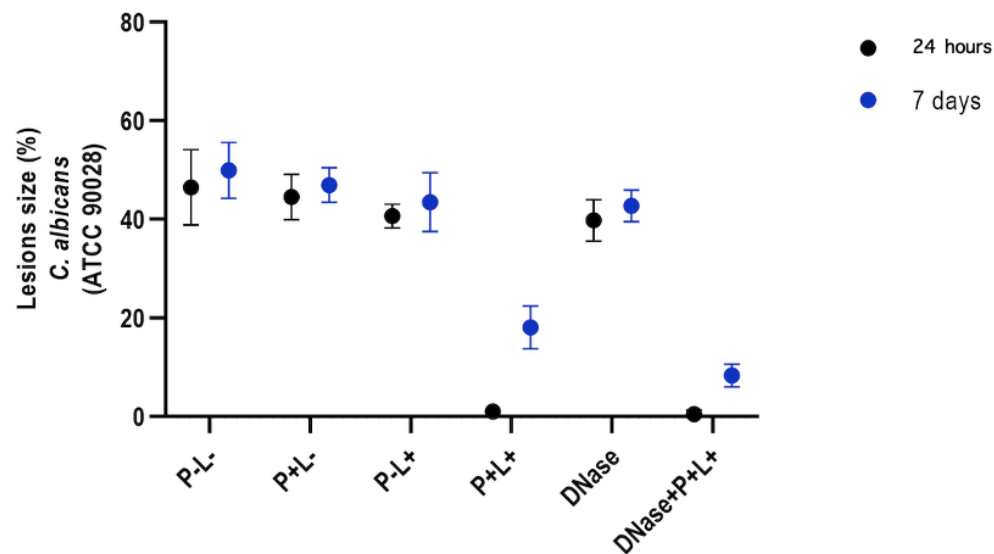


Figure 4. Mean values $\pm$ standard deviation of the lesion size (with the size of the patches) in percentages (%) on the tongue's dorsum of the mice inoculated with CaS evaluated 24 h (black circle) and 7 days (blue circle) after the end of the treatments.

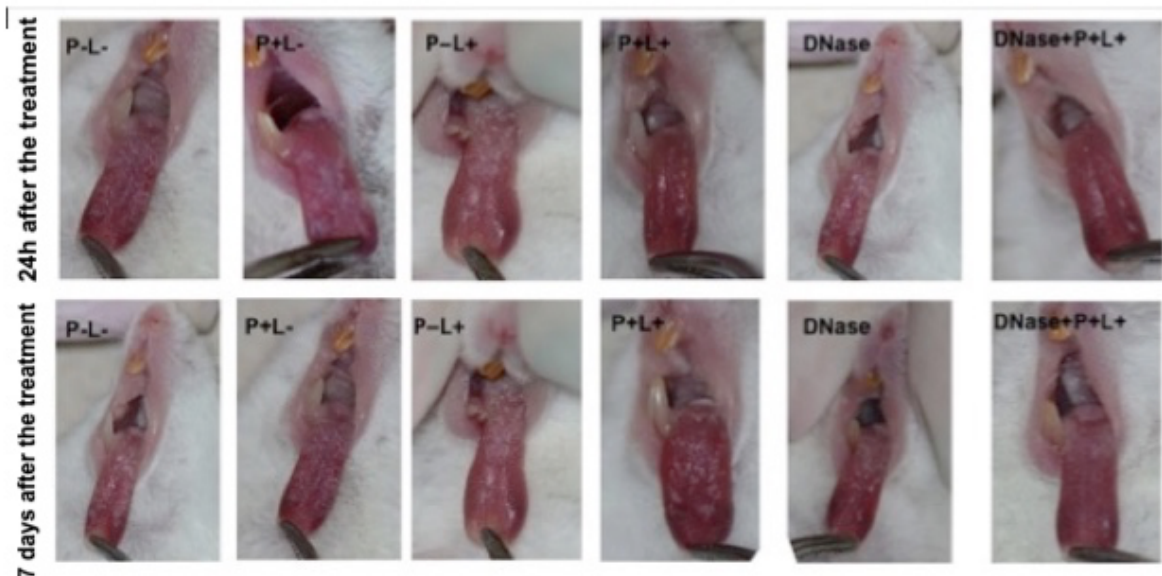


Figure 5. Representative images of the white or pseudomembranous patches of mice' tongues inoculated with CaS for the groups P-L-, P+L-, P-L+ and DNase 24 h and 7 days after the end of treatment. Also, representative images of the remission of tongue lesions were observed in the mice submitted to the P+L+ 24 h and DNase+P+L+ 24 h and 7 days after the treatments.

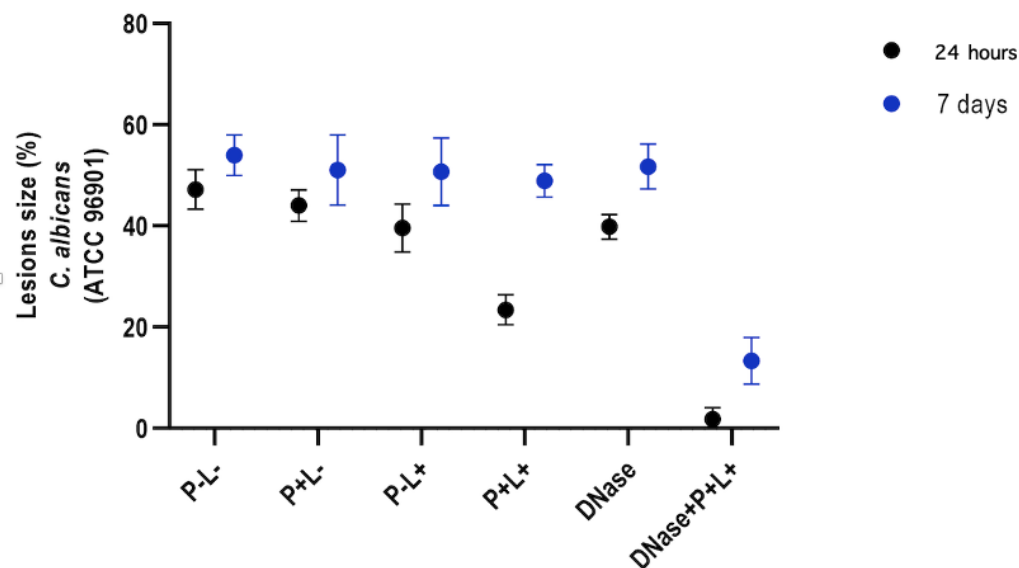


Figure 6. Mean values $\pm$ standard deviation of the lesion size (with the size of the patches) in percentages (%) on the tongue's dorsum of the mice inoculated with CaR evaluated 24 h (black circle) and 7 days (blue circle) after the end of the treatment.

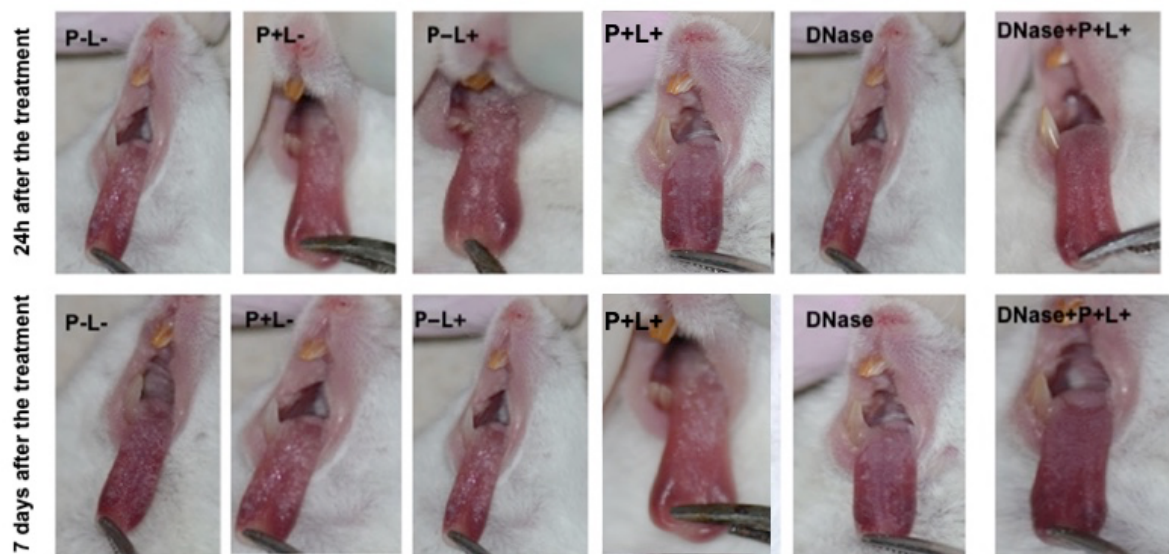


Figure 7. Representative images of the white or pseudomembranous patches of mice' tongues inoculated with CaR for the groups P-L-, P+L-, P-L+, P+L+ and DNase 24 h and 7 days after the end of the treatment. Also, representative images of the remission of tongue lesions in the mice submitted to the DNase+P+L+ treatment are observed 24 h and 7 days after the treatment.

3.3. Histopathological evaluation

The histopathological evaluation demonstrated that the sections from tongues contaminated with CaS exhibited mild inflammatory infiltrates for groups DNase+P+L+ and P+L+ 24 h after the treatment (Figure 8). These groups presented histopathological characteristics similar to those observed in the NIC- and NIC+ groups. The stratified epithelium exhibited normal and healthy features, with lingual

papillae covered by a fine keratin layer. The other groups (P-L-, P-L+, P+L- and DNase) presented similar histopathological characteristics with moderate inflammatory infiltration and the presence of numerous hyphae/pseudohyphae on the keratin layer and some hyphae/pseudohyphae invading the epithelial tissue of the tongues (Figure 8). Regarding the histological sections evaluated 7 days after the treatment for CaS, the morphological characteristics remained relatively unchanged, with the exception of the P-L-, P+L-, P-L+, and DNase groups, which showed moderately degraded muscle tissue (Figure 8).

For the animals inoculated with CaR (Figure 9), the group treated with DNase+P+L+ presented histopathological characteristics similar to those observed in the NIC- and NIC+ groups (Figure 8) after 24 h of the treatments. The stratified epithelium exhibited normal and healthy features, with lingual papillae covered by a fine keratin layer (Figure 9). The group treated with P+L+ showed a greater number of hyphae and pseudohyphae within the keratin epithelial layer. The animals in the P-L-, P+L-, P-L+, and DNase groups presented extensive amounts of *C. albicans* covering the epithelial tissue, and there was loss of the papillae (Figure 9). This epithelium showed intense inflammation with the existence of mononuclear cells inside the dilated blood vessels caused by the inflammation. The underlying connective tissue was formed by muscle fibers with normal characteristics.

The histological findings 7 days after treatments (Figure 9) for the P-L-, P+L-, P-L+ and DNase groups contaminated with CaR were similar to those observed 24 h after treatments associated with damage in the muscular tissue. In the P+L+ and DNase+P+L+ groups, many hyphae and pseudohyphae were observed in the epithelium keratin layer, but the epithelial tissue remained with normal characteristics (Figure 9).

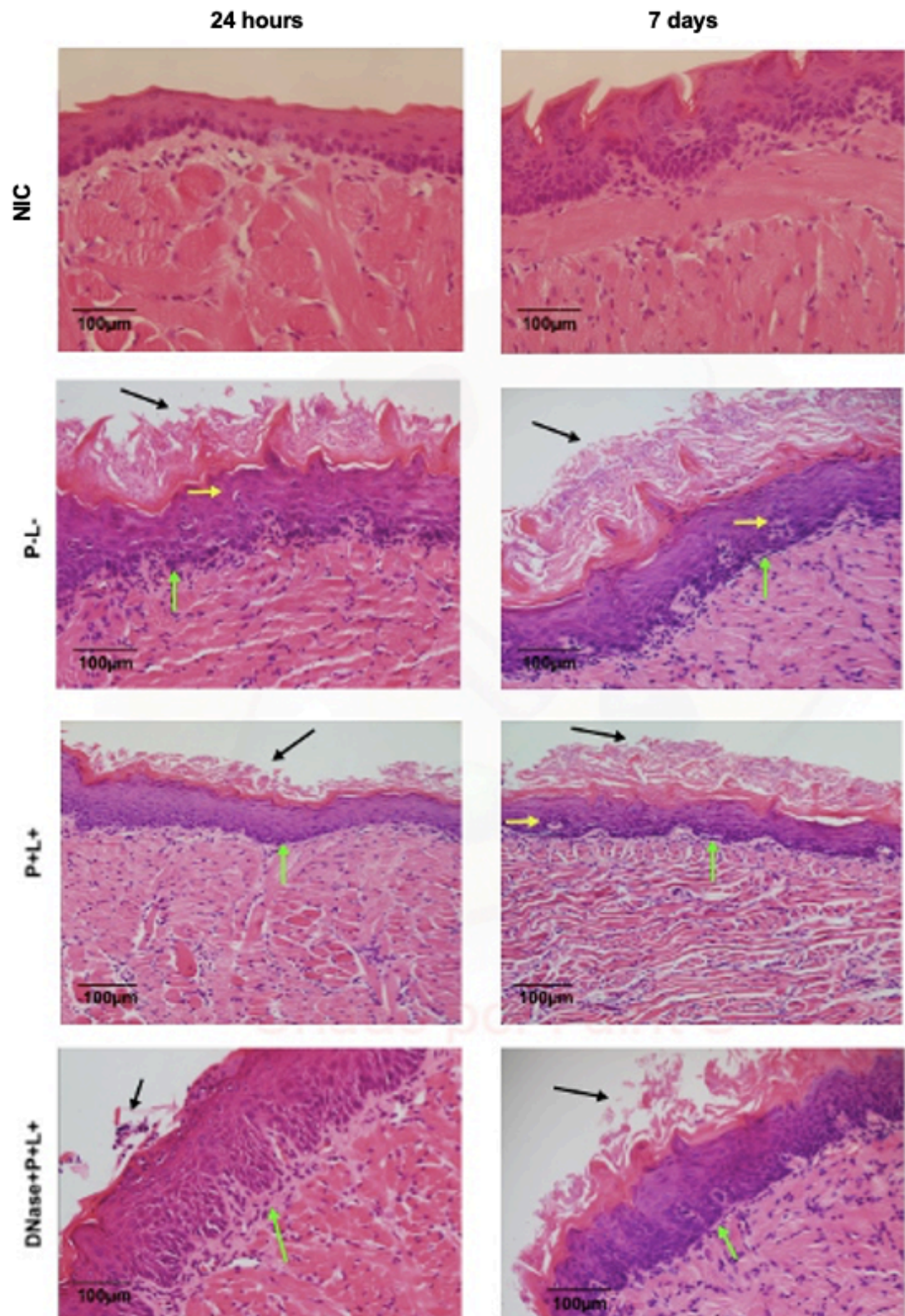


Figure 8. Representative images of the histological sections of tongues from mice inoculated with CaS and recovered 24 h and 7 days after the end of treatments. Muscle tissue was stained with hematoxylin-eosin (HE) (40X). Black arrow - keratin layer contaminated with hyphae and pseudohyphae; green arrow - lamina propria and yellow arrow - dilated blood vessels in response to the local inflammatory reaction.

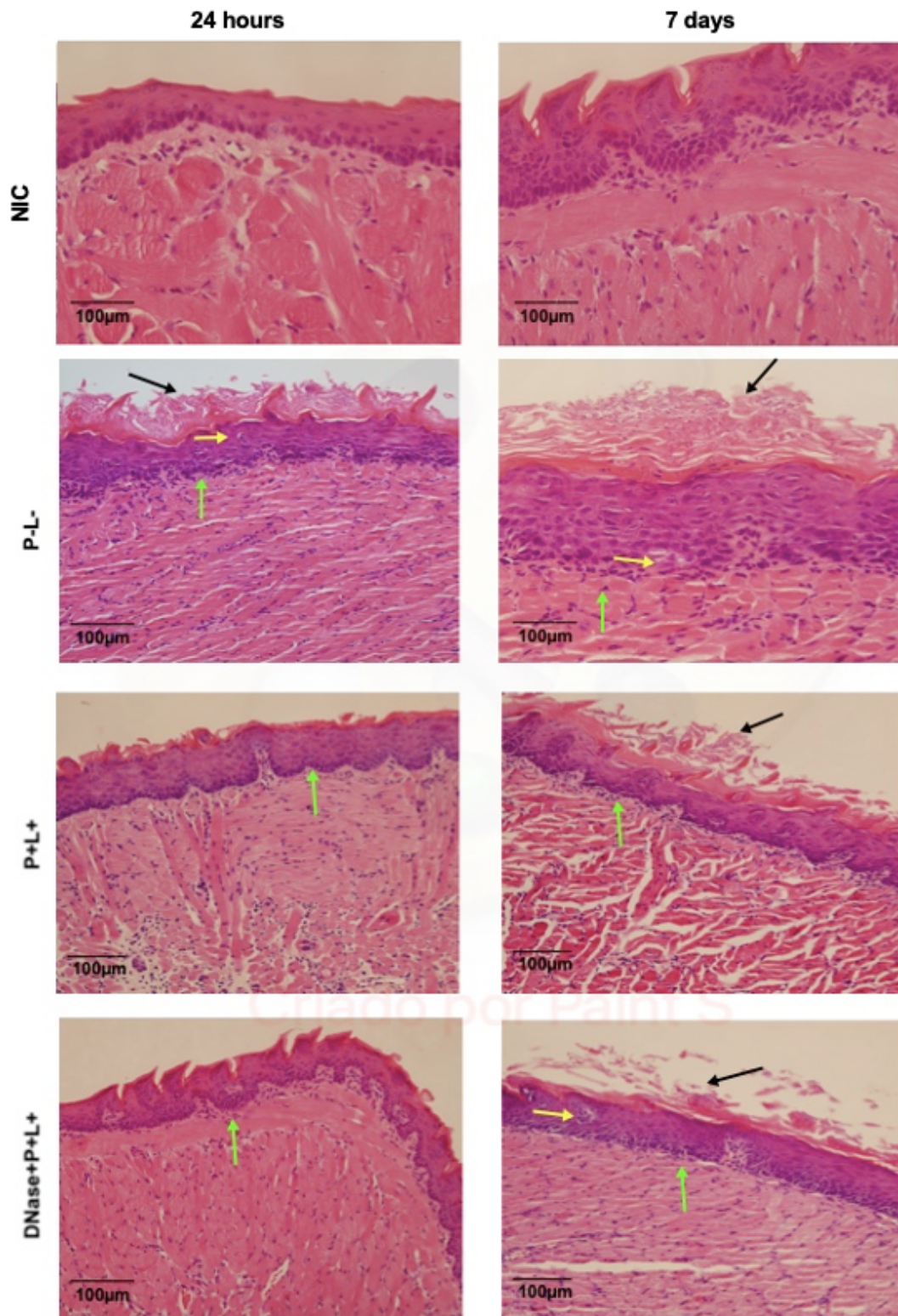


Figure 9. Representative images of the histological sections of tongues from mice inoculated with CaR and recovered 24 h and 7 days after the end of treatments. Muscle tissue was stained with hematoxylin-eosin (HE) (40X). Black arrow - keratin layer contaminated with hyphae and pseudohyphae; green arrow - lamina propria and yellow arrow - dilated blood vessels in response to local inflammatory reaction.

3.4. Microscopy fluorescence evaluation

The representative images from animals for P-L- group inoculated with CaS and CaR 24 h after the treatment (Figure 10 and 12, respectively) showed a thick layer of biofilm (green) surrounded by polysaccharides (1-4 β -mannan and galacto) (red) produced by *C. albicans*. In the DNase+P+L+ groups, neither the polysaccharides produced by *C. albicans* (red) nor fungal cells (green) were detected like in the NIC group. The P+L+ group showed a small amount of biofilm (green) and polysaccharides (red) (Figures 10 and 12).

After 7 days of the treatment for CaS and CaR (Figure 11 and 13), the P-L- group was labeled with polysaccharides produced by *C. albicans* (red), with higher intensity of label in fungal cells (green) (Figures 11 and 13). The group DNase+P+L+ of animals contaminated with CaS presented a small layer of *C. albicans* biofilm without polysaccharides (red color) (Figure 11). The P+L+ group demonstrated a slight presence of fungal biofilm (green) and polysaccharides (red color) (Figure 11). For CaR, it was observed that the group DNase+P+L+ presented less biofilm and polysaccharides than the group treated only with aPDT (P+L+group) once there was a thick layer of CaR biofilm (green) surrounded by polysaccharides (red) (Figure 13).

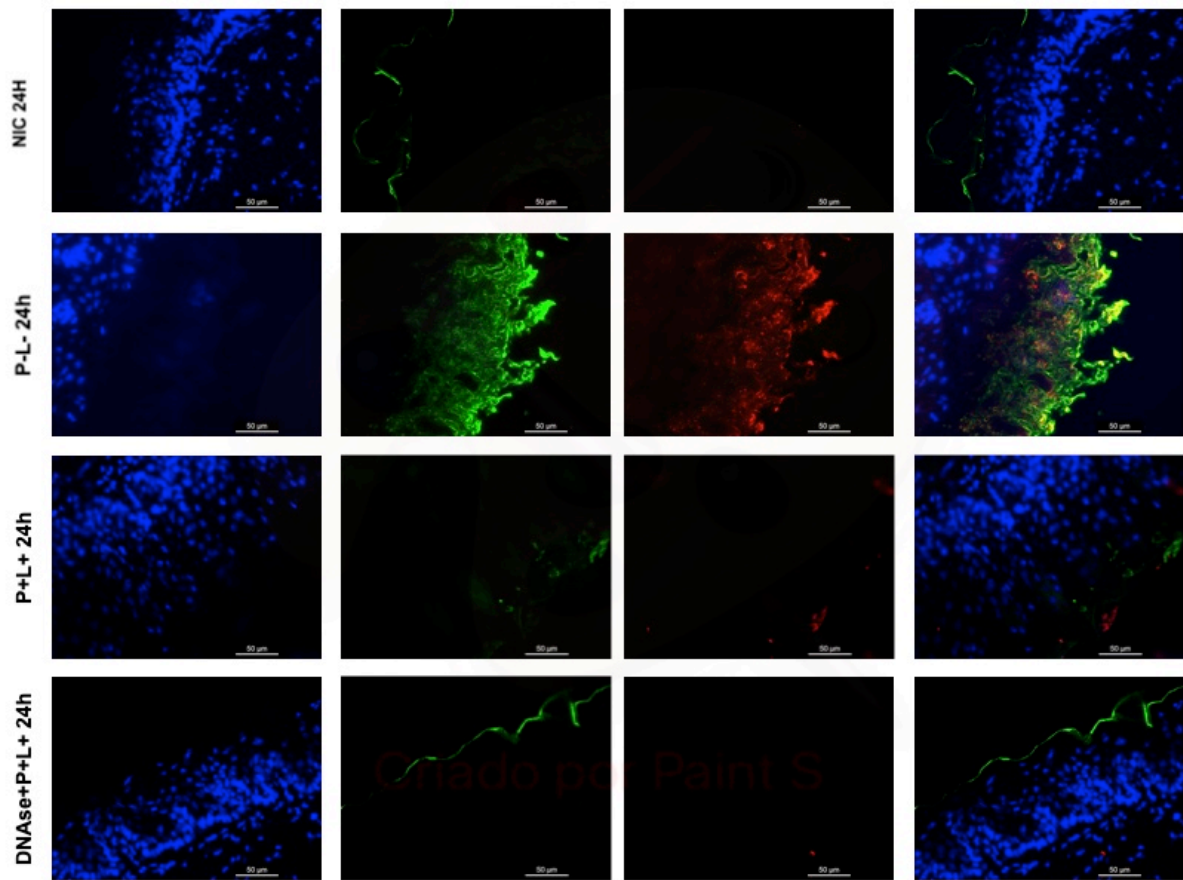


Figure 10. Representative fluorescence microscopy images of histological tongues sections recovery 24 h after treatments from the mice inoculated with CaS, labeled with Hoestch (first left column), concanavalin A conjugated with Alexa 488 nm, (second column), and with primary antibody 1,4 β -mannan and galacto (400-4) paired with secondary antibody conjugated with Alexa Fluoride 594 nm (third column). The tongue tissue cells (cell nucleus) were represented by the color blue. Fungal cells and matrix polysaccharides of *C. albicans* were represented by the colors green, and red, respectively. In the last collum are the merge images.

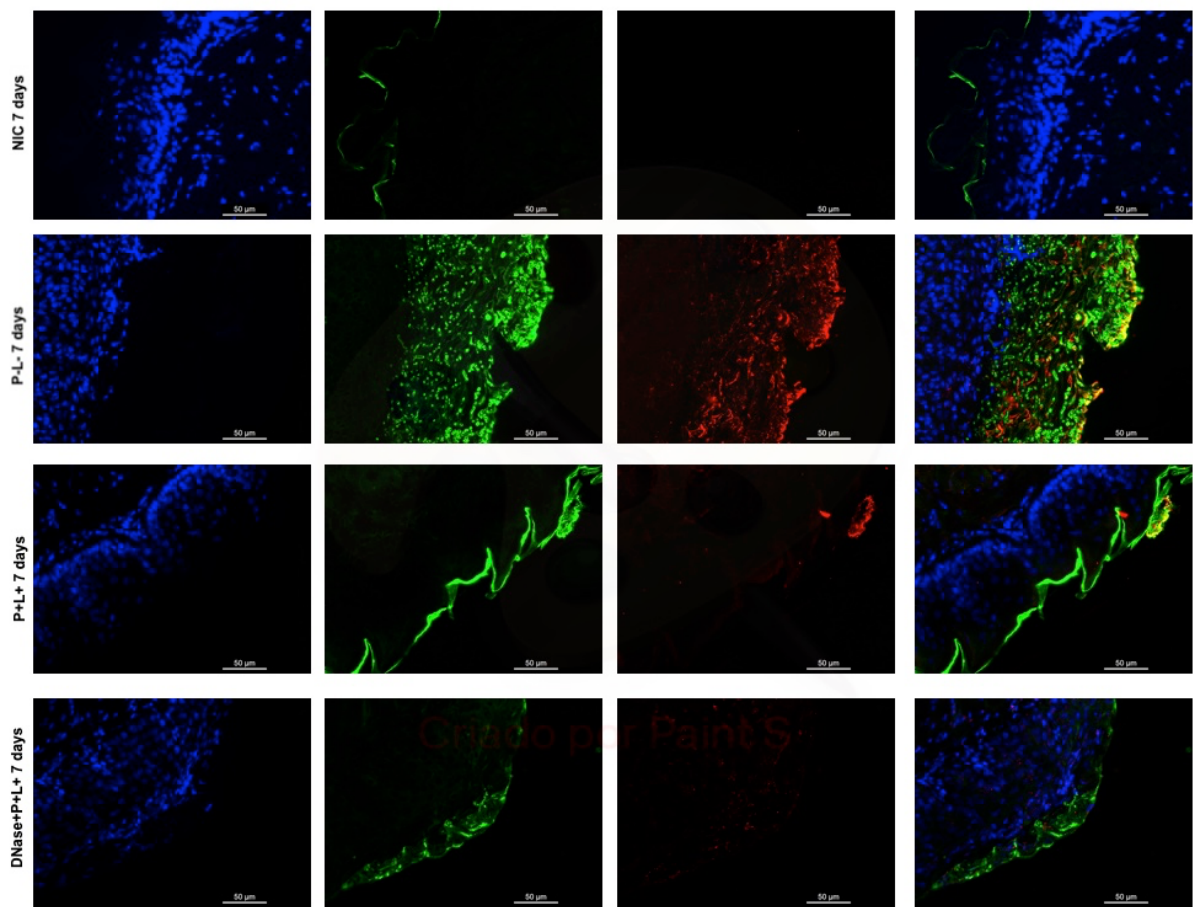


Figure 11. Representative fluorescence microscopy images of histological tongues sections recovery 7 days after the end of treatments from the mice inoculated with CaS, labeled with Hoestch (first left column), concanavalin A conjugated with Alexa 488 nm, (second column), and with primary antibody 1,4 β-mannan and galacto (400-4) paired with secondary antibody conjugated with Alexa Fluoride 594 nm (third column). The tongue tissue cells (cell nucleus) were represented by the color blue. Fungal cells and matrix polysaccharides of *C. albicans* were represented by the colors green, and red, respectively. In the last collum are the merge images.

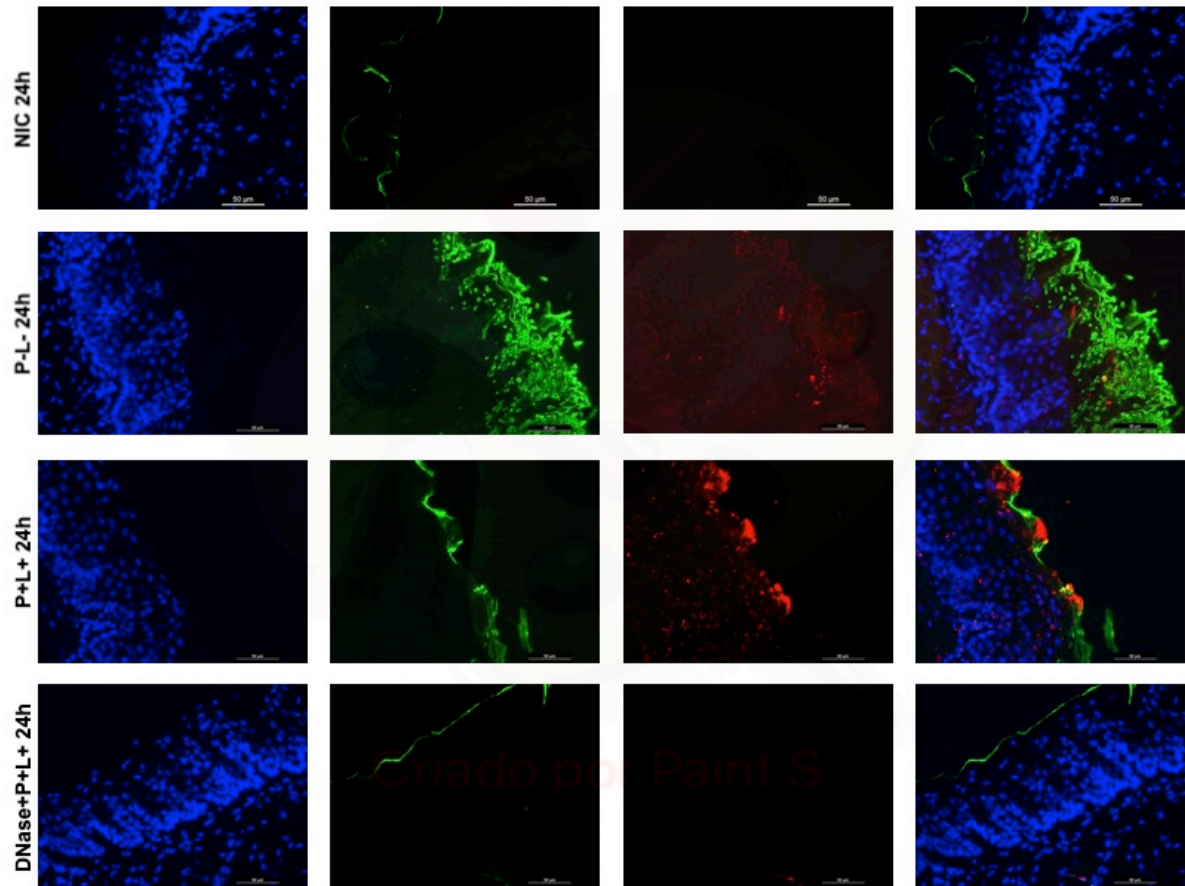


Figure 12. Representative fluorescence microscopy images of histological tongues sections recovery 24 h after the treatments from the mice inoculated with CaR, labeled with Hoestch (first left column), concanavalin A conjugated with Alexa 488 nm, (second column), and with primary antibody 1,4 β -mannan and galacto (400-4) paired with secondary antibody conjugated with Alexa Fluoride 594 nm (third column). The tongue tissue cells (cell nucleus) were represented by the color blue. Fungal cells and matrix polysaccharides of *C. albicans* were represented by the colors green, and red, respectively. In the last collum are the merge images.

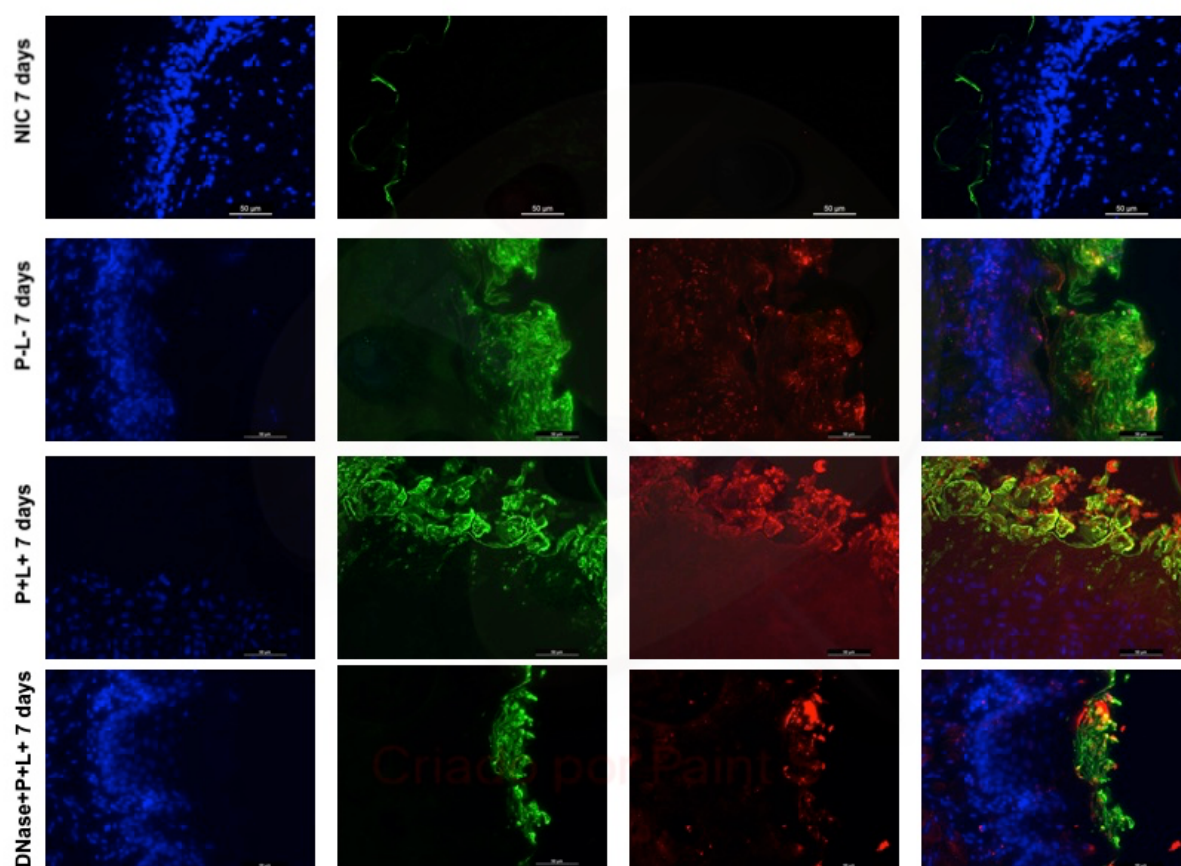


Figure 13. Representative fluorescence microscopy images of histological tongues sections recovery 7 days after the end of treatments from the mice inoculated with CaR, labeled with Hoestch (first left column), concanavalin A conjugated with Alexa 488 nm, (second column), and with primary antibody 1,4 β -mannan and galacto (400-4) paired with secondary antibody conjugated with Alexa Fluoride 594 nm (third column). The tongue tissue cells (cell nucleus) were represented by the color blue. Fungal cells and matrix polysaccharides of *C. albicans* were represented by the colors green, and red, respectively. In the last collum are the merge images.

4. Discussion

In vitro studies report the improved efficacy of aPDT combined with DNase against *C. albicans* biofilms [11,28]. Enzymes decrease the integrity of the ECM by hydrolyzing proteins, polysaccharides, and nucleic acids. DNase I reduces biofilm stability, increasing the susceptible of the biofilm to the action of antifungals and aPDT [11-14, 28]. The current study investigated whether applying DNase I enzyme could potentiate the aPDT outcomes in mice infected by susceptible and fluconazole-resistant *C. albicans*. Here, DNase I (20 units/mL) combined with aPDT was able to promote antifungal effects against CaR in the oral lesions of mice with experimental oral candidiasis, and macroscopic analysis showed that, 24 h after completion of treatment, the animals presented 96.7% remission of lesions. To our knowledge, there

is no previous published study investigating *in vivo* the efficacy of DNase I associated with aPDT in treating induced oral candidiasis in mice.

The results from mice inoculated with CaR showed that DNase I prior aPDT promoted a reduction in viable colony counts by around 2.89 and 1.27 $\log_{10}$, respectively, immediately and 7 days after the treatments. In addition, the macroscopic oral lesions were reduced by around 96.07% and 75.24% 24 h and 7 days after the treatment, respectively. These results observed here corroborate with a previous study [27], that evaluated the combination of PDZ (200 mg/L) mediated aPDT associated with nystatin in the treatment of mice infected with fluconazole-resistant *C. albicans* (ATCC 96901). Using the same methodology for induction of infection in mice, the combination of treatments reduced $\sim 2.60 \log_{10}$ the fungal viability and $\sim 95\%$ the macroscopic oral lesions 24 h after the treatment [27]. The results obtained after 7 days of the end treatment showed that nystatin combined with aPDT promoted a reduction of $\sim 1 \log_{10}$ in fungal viability and macroscopic reduction in oral lesions by around $\sim 50\%$ [27]. Here, DNase promoted an outcome more favorable than nystatin in decreasing fungal viability and reducing the rate of lesion recurrence. Using alternative sources can lead to access the novel therapeutic agents with fewer side effects without the risk of antifungal resistance [35,36]. DNase may be an adjuvant for biofilm treatments since it degrades eDNA in the extracellular matrix of biofilms [37,38]. Therefore, we suggest that DNase enables PDZ diffusion in the extracellular matrix of biofilms, potentiating the effects of aPDT, and promoting the inactivation of biofilms *in vivo*.

The enzyme associated with aPDT reduced the fungal viability of CaS by around 4.26 and 1.97 $\log_{10}$, respectively, immediately and 7 days after the treatments. In addition, there was a remission in the oral lesions, around 98.92% and 83.31%, respectively, after 24 h and 7 days. *In vivo* investigation [24] demonstrated that five applications of aPDT mediated by PDZ or antifungal nystatin promoted reductions in the cell viability of *C. albicans* (ATCC 90028) of 3 and 3.22 $\log_{10}$, respectively 24 h after the treatment [26]. After seven days of treatment, a reduction of $\sim 2 \log_{10}$ for aPDT and nystatin groups was observed [26]. Compared to antifungal, the lack of development of antimicrobial resistance increases further studies using aPDT [39]. Thus, our findings revealed that DNase improves aPDT outcomes, being a promising alternative for fungal inactivation, including resistant microorganisms.

DNase I (5 min) combined with aPDT (mediated by PDZ) decreased the fungal viability in $\sim 2.16 \log_{10}$ and the levels of eDNA in the ECM of biofilms formed by fluconazole-susceptible *C. albicans* (ATCC 90028) [11]. When fluconazole-resistant *C. albicans* biofilms were treated with DNase prior to the aPDT, there was a decrease of $\sim 1.92 \log_{10}$ in the fungal viability, water-soluble polysaccharides (36.3%), and eDNA (72.3%) [28]. Here, the fluorescence microscopy images of histological tongue sections 24 h after treatment demonstrated that DNase I prior to aPDT promoted the absence of fungal polysaccharides, similar to healthy animals (NIC). After 7 days of the treatment, the presence of polysaccharides was observed only in mice infected by fluconazole-resistant *C. albicans*. Still, the fungal viable count was smaller than that in the aPDT group. Thus, DNase treatment reduced the fungal polysaccharides *in vitro* [11,28] and in the animal model here. Among the components present in the ECM, eDNA, associated with β -glucans and β -mannan, contributes to the organizational integrity of biofilms and antifungal tolerance of *C. albicans* [40-42]. Some reports found an association between eDNA levels and an increase in microbial resistance to antibiotics [43,44]. Therefore, disrupting the ECM and reducing eDNA levels of *C. albicans* biofilms are essential to optimize antifungal therapies.

The histological sections of the tongues recovered after the treatment with DNase prior to aPDT for both strains (CaS and CaR) demonstrated histological characteristics similar to those of the NIC group (healthy animals). The tissues presented a reduced amount of hyphae/pseudohyphae/blastopore on the keratin layer, minor inflammation in the subjacent connective tissue, and intact muscle tissue. In a previous study, mice treated with 5 applications of nystatin associated with aPDT mediated by PDZ presented normal histological characteristics, which are outcomes very similar to those observed in the present study [27]. In addition, the inoculation of mice with fluconazole-resistant *C. albicans* promoted an intense inflammatory response in the subjacent connective tissue [25,27] and 5 applications of aPDT mediated by PDZ decreased an inflammatory reaction from intense to mild [27]. Here, the control groups (P-L-, P+L-, P-L+, and DNase) 24 h after the treatment presented a large area of hyphae/pseudohyphae covering the epithelial tissue, which demonstrated acanthosis associated with the papillae destruction. Moreover, there is an intense inflammation of the epithelium with dilated blood vessels. Seven days after the treatments, the muscle fibers were partially degraded in the superficial region of the tissue in the control groups (P-L-, P+L-, and P-L+ groups). In the sections from

animals inoculated with CaR, seven days after the end of treatment, there were hyphae and pseudohyphae on the keratin layer, suggesting recurrence of the oral infection in the DNase+P+L+ group, but its keratin layer was smaller than that observed for P+L+ group. Furthermore, in the aPDT group, there was a return in the oral lesions. Our results demonstrated that DNase prior to aPDT reduces the lesion recurrence rate after 7 days compared to other treatments for fluconazole-resistant *C. albicans*. Therefore, DNase I affected the biofilm composition and hampered the new formation of *C. albicans* biofilm, probably because the complete epithelial restructuring was promoted in the groups treated with DNase+P+L+.

The overall increased occurrences of pathogens resistant to conventional antifungals and the toxicity of drugs have motivated searches for strategies to inactivate fungal species. In addition, the ECM of *C. albicans* biofilms limits the penetration of antimicrobials, antiseptics and photosensitizers, influencing the efficacy of aPDT and other fungal therapies. In summary, DNase before aPDT promoted expressive outcomes by reducing fungal viability and healing the oral lesions in mice. Therefore, this study further demonstrates that DNase is a promising alternative adjuvant for fungal photoinactivation *in vivo* of antifungal-susceptible and -resistant strains.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Author Contributions

C.C.J., M.I.K., and A.C.P. designed research; C.C.J., T.V.S. and P.A.B., performed research; C.C.J., A.C.P. and T.M.F. analyzed data; and C.C.J., M.I.K., A.C.P. and E.G.O.M. wrote the paper.

Funding

This work was based on the PhD dissertation research of the author C.C.J.. This work was supported by the São Paulo Research Foundation [FAPESP #2013/07276-1 (CePID CePOF) and #2020/09332-0] and scholarship (FAPESP #2019/27634-6 to C.C.J.).

Competing Interest Statement

The authors declare no competing interest.

References

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. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *J Bacteriol.* (2007) 189(22):7945–7.
4. 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) 52:3259-66.
5. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* (2010) 169:323–31.
6. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. *PLoS Pathog.* (2016) 12(9): e1005828.
7. 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.
8. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* (2008) 322:85-105.
9. 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.
10. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, Mitchell AP. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr. Biol.* (2008) 18(14), 1017–24.
11. 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.
12. Liao TH. Bovine pancreatic deoxyribonuclease D. *J Biol Chem.* (1974) 249(8):2354-6.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. Kumar S, Kumar A, Roudbary M, Mohammadi R, Černáková L, Rodrigues CF. Overview on the Infections Related to Rare *Candida* Species. *Pathogens*. (2022) 11(9):963.
17. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol*. (2017) 133: 86-96.
18. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. (2008) 163(1): 1-12.
19. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. (2007) 86(8): 694-707.
20. 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.
21. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova*. (2000) 32: 237-43.
22. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* (2001) 57(47): 9513-47.
23. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, Andes D. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. (2007) 51(2):510-20.
24. 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.
25. 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) 18.
26. 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.

27. Hidalgo KJR, Carmello JC, Jordão CC, Barbugli PA, Costa CAS, Mima EGO, Pavarina AC. 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.
28. 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) 10:14149.
29. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol.* (2003) 47(5): 321–6.
30. Ahmed El-Habashi, Bahiga El-Morsi, Scott M. Freeman, Monir El-Didi, Aizen J, Marrogi MD. Tumor Oncogenic Expression in Malignant Effusions as a Possible Method to Enhance Cytologic Diagnostic Sensitivity: An Immunocytochemical Study of 87 Cases, *Ameri Jour of Clin Pathol.* (1995) 103:206–214.
31. Lobo CIV, Rinaldi TB, Christiano CMS, De Sales Leite L, Barbugli PA, Klein MI. Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. *J Oral Microbiol.* (2019) 11(1):1581520.
32. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque bio- films in vivo. *Infect Immun.* (2014) 82(5):1968–81.
33. Chazotte B. Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc.* (2011) 10 (5557).
34. Wartenberg A, Linde J, Martin R, et al. Microevolution of *Candida albicans* in macrophages restores filamentation in a nonfilamentous mutant. *PLoS Genet.* (2014) 10(12): e1004824.
35. 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) 10: e09073.
36. 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.

37. Rajendran R, Sherry L, Lappin DF, Nile CJ, Smith K, Williams C, Munro CA, Ramage G. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. BMC Microbiol. (2014) 14:303.
38. Hamblin MR, Abrahamse H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? Drug Dev Res. (2019) 80(1):48-67.
39. 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.
40. 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.
41. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. PLoS Pathog. (2016) 12(9): e1005828.
42. Rajendran R, Sherry L, Lappin DF, Nile CJ, Smith K, Williams C, Munro CA, Ramage G. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. BMC Microbiol. (2014) 14:303.
43. Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, Bayles KW. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. (2007) 104(19):8113-8.
44. 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.

3.2 Publicação 2*

DNase I associated with antimicrobial photodynamic therapy affects gene expression and promotes immunomodulatory effects in mice with candidiasis

Cláudia Carolina Jordão¹, Marlise Inêz Klein², Paula Aboud Barbugli¹, Túlio Morandin Ferrisse¹, Juliana Cerrini¹, Ana Claudia Pavarina^{1*}.

¹Laboratory of Applied Microbiology, Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, São Paulo, Brazil.

²Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, State University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, São Paulo, Brazil.

* Correspondence:

Ana Claudia Pavarina

ana.pavarina@unesp.br

Abstract

This study evaluated *Candida albicans* gene expression and the local inflammatory response from mice with oral candidiasis induced by fluconazole-susceptible (CaS) and -resistant (CaR) *C. albicans* strains and treated with DNase I enzyme associated with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). DNase I was applied, followed by aPDT mediated by Photodithazine (PDZ) 200 mg/L and LED light 50 J/cm², either singly or combined (P+L+, P-L+, P+L-, DNase, DNase+P+L+) for five consecutive days. The positive control group of infection (P-L-) was only inoculated with CaS or CaR. Immediately and seven days after treatments, *C. albicans* colonies were recovered in agar plates from mice tongues, and gene expression was performed via qPCR. Mice were sacrificed 24 hours and seven days after the treatments and the tongues were removed to evaluate the host's inflammatory cytokines (IL-6, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-12p-70 protein, and IL-10) using Cytometric Bead Array. A significant reduction occurred in the gene expression related to adhesion to the host substrate (*EFG1* and *HWP1*), the biofilm extracellular matrix (*BGL2* and *PHR1*), and oxidative stress (*SOD1*) of CaS and CaR recovered from mice treated with DNase I plus aPDT. A increased production of IL-6, TNF- α , and MCP-1 occurred for mice infected with CaS and but not as much for those infected with CaR in the groups treated with DNase I associated with aPDT and aPDT. Thus, DNase I associated with aPDT decreased the

* Artigo formatado segundo as normas do periódico *Oral Diseases* para o qual será submetido.

expression of the fungal genes evaluated and increased local inflammatory response, which helped to fight the localized infection.

Key words: Antimicrobial photodynamic therapy; *Candida albicans*; gene expression; enzyme; inflammation; cytokines.

Introduction

Candida spp. is part of the normal oral flora in healthy individuals, and an overgrowth of these microorganisms in the oral mucosa can be triggered by various systemic and local factors of the host [1]. *Candida albicans* is the most frequent pathogen associated with oral infections, such as Oral Candidiasis (OC) [2]. The treatment of OC involves various antifungal drugs, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is emerging as a novel approach [3]. In recent years, aPDT has been used to treat various diseases, including OC, acne, peri-implantitis, and infectious diseases (conjunctivitis and herpes) [3-5]. The aPDT treatment requires a photosensitizing agent (PS), light of a particular wavelength, and the presence of oxygen [6] that interact and produce reactive oxygen species, which induce cell inactivation. Additionally, aPDT exhibits a variety of biological activities, including anti-inflammatory properties [7-9]. Some *in vitro* and *in vivo* studies support the efficacy of aPDT in treating OC [10-13]. Specifically, an *in vivo* study demonstrated that aPDT presented comparable outcomes to those achieved with nystatin, a common antifungal medication used to treat oral fungal infections [10]. However, little is known regarding the fungal virulence and inflammatory response when aPDT is applied *in vivo*.

C. albicans biofilms exhibit a complex antifungal resistance associated with the activation of drug efflux pumps, cellular physiological conditions, and the protection related to extracellular matrix (ECM) [14]. Specifically, β -mannan and β -glucans in the ECM bind to fluconazole and amphotericin B, contributing to biofilm resistance [14,15]. Notably, eDNA plays a crucial role in ECM composition, fortifying the structural integrity of biofilms [16]. The ECM's association with biofilm protection has motivated researchers to improve biofilm susceptibility to antifungal drugs [17]. DNase I enzyme reduced eDNA, soluble matrix proteins, and water-soluble polysaccharides in fluconazole-resistant *C. albicans* strains [18]. This enzyme disrupts biofilms operating externally to the fungal cell and allows the action of aPDT and antifungals [18-20].

DNase treatment might be an adjuvant to anti-biofilm therapies since it reduces most ECM components that can hinder antifungal drug penetration into biofilms without interfering with cell viability [18,20]. Treatment with DNase I (50 mg/mL) on mature biofilms inhibits adhesion, formation, and decreases biomass by approximately 30% [21]. Even short incubation periods with DNase I (5 minutes) on 48-hour-old biofilms reduced eDNA and extracellular polysaccharides in ECMs of both fluconazole-susceptible and -resistant *C. albicans* strains [18]. The combination of DNase I with aPDT [mediated by Photodithazine (PDZ)] reduced the fungal viability in mice tongues immediately after the treatments by around 4.26 and 2.89 log₁₀ for fluconazole-susceptible and -resistant *C. albicans*, respectively, compared with mice only inoculated with the fungal. In the fluorescence microscopy, animals treated with the combination of DNase I with aPDT presented similar images to the healthy animals, where the polysaccharides produced by *C. albicans* and fungal cells were less labeled [22].

Microbial virulence factors facilitate interactions with host cells, contribute to pathogenesis, and are essential for biofilm formation [23–25]. *C. albicans* has various genetic mechanisms that enable it to adapt and survive in diverse environments, including the human host [23-26]. Hyphal wall protein 1 (*HWP1* gene) permits the fungal adhesion and invasion of host tissue [27]. Enhanced filamentous growth protein 1 (*EFG1* gene) regulates the transcription of genes responsible for biofilm formation [28]. In addition, the antifungal resistance of *C. albicans* biofilms is associated with the presence of β -1,3 and β -1,6 glucans [29,30]. The glucan 1,3-beta-glucosidase (*BGL2* gene) is associated with the synthesis of β -glucans [30]. In addition, pH-responsive protein 1 (*PHR1* gene) is important in cell wall structure and virulence of infections related to low pH [31], acting in the merger of β -1,3 and β -1,6 glucans [32]. *BGL2* and *PHR1* genes were associated with the synthesis of *C. albicans* extracellular matrix by *C. albicans* [30]. In addition, *C. albicans* copper and zinc cytosolic superoxide dismutase (*SOD1* gene) protects the fungal against oxidative stress [33,34]. Previously, PDZ-mediated aPDT decreased the expression of *HWP1* and *SOD1* genes in the biofilms of *C. albicans* [35]. When mice were infected with a fluconazole-resistant *C. albicans* and treated with aPDT mediated by PDZ alone or in combination with topical antifungal nystatin, the treatments reduced the expression of *ALS1*, *EFG1* and *SOD1* genes [36].

During the acute inflammatory process, anaphylatoxins activated by complement factor are released, triggering the release of pro-inflammatory cytokines like interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) [37,38]. IL-6 and TNF α are two pro-inflammatory cytokines that form part of a complex defense network that protects the host against inflammatory agents, microbial invasion, and injury. The initial stages of *Candida* infection activate local TNF- α production [37,38]. Some studies suggest that cytokine expression indicates a beneficial effect, potentially due to cell death or elimination of fungal cells by the host's inflammatory response [37-39]. Photodynamic therapy has anti-inflammatory effects by modulating the release of pro-inflammatory mediators, alleviating local inflammation, and improving the healing process [40-42]. Increased local and systemic expression of IL6 and TNF- α has been found after the local treatment with aPDT [41,43,44].

Hence, exploring the immune response in infected mice subjected to treatment can yield valuable scientific insights into understanding how therapies modulate the immune response since aPDT exhibits anti-inflammatory properties. In a previous study, when animals were inoculated with fluconazole-resistant *C. albicans* and treated with aPDT mediated by PDZ alone or in combination with topical antifungal nystatin, the histological analysis demonstrated an expressive reduction in the inflammatory tissue reaction [11]. Mice treated with the combination of DNase I with aPDT presented similar characteristics to healthy mice via histopathological evaluation [22]. Consequently, the treatment resulted in a reduction of the inflammatory tissue reaction [22]. Then, understanding the immunomodulatory effect and gene expression of *C. albicans* following treatment with DNase I and aPDT provides valuable insights into the therapeutic response and helps in developing new treatment strategies.

However, until now, there hasn't been any report regarding the effect of treatment with DNase I associated with aPDT in the expression of genes associated with adhesion to the host substrate (*EFG1* and *HWP1*), the extracellular matrix of the biofilm (*BGL2* and *PHR1*) and oxidative stress (*SOD1*) of *C. albicans*. Furthermore, the effect of the treatment on the inflammatory response has to be understood.

Material and Methods

2.1) Sample collection

The samples used in the present study (*C. albicans* colonies and tongue tissue recovered from mice after the treatments) came from the study performed by Jordão et al. [22]. It was approved by the Animal Ethics Committee of the School of Dentistry of Araraquara, UNESP (Case number: 09/2020). In the *in vivo* study [22], 6-week-old female Swiss mice were kept in individual cages in a room with a controlled temperature (23 ± 2 °C) and fed with feed and water *ad libitum*. Mice were infected with fluconazole- susceptible or -resistant *C. albicans* strains [American Type Culture Collection (ATCC) 90028 and 96901, CaS and CaR, respectively] (Rockville, MD, United States). Five days after the inoculation, mice were exposed to the treatments described in Table 1 [22]. The treatments were performed during five consecutive days [22].

Table 1 – Name of experimental groups and description of treatments performed in mice

Groups	Treatments performed
NIC	Mice healthy without candidiasis (negative control of infection)
P-L-	Mice were only infected and did not receive treatment (positive control of infection).
P-L+	Mice infected were only illuminated with LED (red LED light (660 nm) (LXHL-PR09, Luxeon® III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA, United States) ^{ref} (5mm diameter) with an output power of 44.6 mW/cm ² for 19 min (50 J/cm ²) with one application by day for five days.
P+L-	Mice infected were treated only with 50 µL of Photodithazine® (PDZ) (VETAGRAN, Co, Moscow, Russia) diluted in natrosol gel (200 mg/L) incubated for 20 min (pre-irradiation time) with one application by day for five days.
P+L+	Mice infected were treated with the application of PDZ 200 mg/L for 20 min (pre-irradiation time) followed by the LED irradiation (50 J/cm ²) for 19 min with one application by day for five days.
DNase	Mice infected were treated with 50 µL of DNase (20 units/mL) for 5 min with one application by day for five days.
DNaseP+L+	Mice infected were treated with combined treatment with DNase and aPDT mediated by PDZ, one application by day for five days.

After the five consecutive treatments, *C. albicans* recovery was achieved by mini-swabs friction over the animal's tongue dorsum (immediately and seven days after). Then it were moved to plastic tubes with 1 mL saline solution and shaken for 1 min to separate the fungal cells, followed by plating on SDA plaques (Sabourand Dextrose Agar) (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, United States) supplemented with chloramphenicol (50 mg/L) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) [22]. Then, 3 to 5 colonies were collected and stored in 300 µl glycerol (50%) (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brazil) and frozen in -80 °C freezer until the moment of RNA isolation to assess the gene expression of *C. albicans* [36]. Moreover, 24 h and 7 days after the five consecutive treatments, the animals had their tongues removed and frozen in -80 °C freezer until the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) evaluation.

2.2) Gene expression of *C. albicans* recovery from the animal's tongues

The colonies recovered from the animals' tongues (immediately and 7 days after the treatment) were thawed, and the RNA was extracted (four different tubes containing three colonies each). Cell rupture was induced using glass beads, followed by purification through phenol-chloroform and ethanol precipitation [45]. After the extraction, the purification was performed using DNase columns (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Austin, TX, USA) and solution (Turbo DNase; Ambion, Austin, TX, USA). The removal of DNase occurred via the RNeasy MinElute clean-up kit (Qiagen). To determine concentration, RNA was quantified using a nano-spectrophotometer (measuring OD 260 nm and OD 260/280 ratio) (DS-11, DeNovix, Wilmington, DE, United States). The extracted and purified RNA samples were evaluated by agarose electrophoresis (2 % agarose) (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States) with 0.8 µL ethidium bromide (0.3 µg/mL) under UV light, employing a gel-doc system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, United States).

For cDNA synthesis, 1 µg of RNA was used per sample in duplicate, employing the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, United States) following the manufacturer's instructions. Complementary DNA was synthesized in duplicate for +RT and a single sample for -RT (without reverse transcriptase to identify potential DNA contamination). The reactions were incubated using the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, United States), following a cycle of 25°C for 5 minutes, 42°C for 30

minutes, 85°C for 5 minutes, and subsequent cooling at 4°C for an indefinite period (removing after 45 minutes post-cycle completion). The resulting cDNA samples were then stored at -20°C until the quantification of gene expression via qPCR. Specific primers described in the literature were used to investigate the gene expression via qPCR [46-48] (Table 2). The primers, verified for the absence of cross-reaction with other microorganisms, were utilized in quantitative PCR analyses following the MIQE Guidelines [49]. Primer sequences were purchased from ThermoFisher (Life Technologies Brasil Com Ind Prod Bio LTDA, São Paulo, SP, Brazil) and employed in qPCR runs to evaluate gene expression via the CFX96 System Bio-Rad.

The reaction setup comprised a final volume of 25 µL, including 0.5 µL of template (undiluted + RT cDNA; undiluted -RT cDNA; or PCR product for standard curve), 12.5 µL of iQ™ SYBR® Green Supermix #1708882 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, United States), 0.75 µL of 10 µM primer set (adjusted to achieve a 300 nM concentration), and 11.25 µL of molecular-grade water (adjusted based on the optimal primer concentration to complete the 25 µL reaction). All primers and reverse transcripts were tested in duplicate, including the no-template control (NTC). Real-time qPCR runs were performed using the Real-Time CFX96 Touch™ PCR Detection System with the cycle: 10 min at 95 °C; 39 cycles of denaturation during 15 s at 94 °C; annealing at 50 °C or 55 °C or 60 °C for 30 s (depending on the primer, see Table 1); and elongation at 60 °C for 15 s, with melt curve tested with a gradual increase of 0.5 °C from 55 °C to 95 °C. Standard curves [46] facilitated the transformation of Quantification Cycle (Cq) values into relative cDNA molecule numbers.

Table 2. Primers used in the present study

Gene	Primer sequence (F: forward; R: reverse)	T _m (°C)	Product length (bp)	Optimal concentration (nM)	References
EFG1	F- ACGAGTAACAACTACCAT R- TATCTGCTCTTCTGACAA	50	89	350	Alonso GC et al., 2018 [46]
HWP1	F- CTCCAAAATCATCAGCTC R- CACTAGCCAAAACAGAAG	55	114	300	Alonso GC et al., 2018 [46]
BGL2	F- ATGGGTGATTTGGCTTTCAA R- CAGCTGGACCAAGGTTTTGT	62	163	350	Srikantha T et al., 2013 [47]
PHR1	F- GGTTTGGTTCTGGTTGATGG R- AGCAGCAGTTCCTGGACATT	62	156	350	Srikantha T et al., 2013 [47]
SOD1	F- TTGAACAAGAATCCGAATCC R- AGCCAATGACACCACAAGCAG	60	396	400	Zhu J et al., 2011 [48]

2.3) Cytometric Bead Array

Mice tongues removed 24 hours and 7 days after 5 consecutive days of the treatment were defrosted and macerated on ice. In a 96-well plate, aliquots of 5 µL were added to quantify soluble protein by the Bradford method [18, 20], in triplicate, for each point of the curve and for each sample to be analyzed. Afterward, 250 µL of Bradford's reagent was added, and the plate was incubated under orbital Shaker (72 rpm / 20 min/ 37 ° C). Then, the respective absorbance at 595 nm was determined. Protein extraction data obtained from tongue samples were converted into concentrations utilizing the generated line equation (slope ranging from 0.020 to 0.026; R² close to 1). These concentrations were standardized to 1 mg/mL for all samples. Immediately after the standardization, the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (Cat. No. 552364) (BD™ Biosciences, San Jose, CA, United States) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, the lyophilized Mouse Inflammatory Cytokines Standards were reconstituted with 2 mL of Assay diluent, and then a serial dilution was performed from 1:2 until 1:256. The negative control (0 pg/mL) was prepared only with Assay Diluent. Next, a mix of capture beads was prepared, and 50 µL was added to each tube (standard curve and samples). Then, 50 µL of standard cytokines or samples were added to each corresponding tube, and finally, 50 µL of Mouse Inflammatory PE Detection Reagent were added to all tubes. After 3 hours of dark room incubation, 1 mL of Wash Buffer was added to all tubes and

centrifuged at 200 g for 5 minutes. The supernatants were carefully discarded, and the pellets were resuspended in 300 μ L of Wash Buffer. The samples were analyzed using a BD FACS Aria™ Fusion Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, United States), and all data obtained were evaluated with the FCAP Array software v3 (BD Biosciences, San Jose, CA, United States).

2.4) Statistical analysis

qPCR data (n=4 per group) were submitted to Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test (Homocedastic) ($p > 0.05$) for comparison between groups ($\alpha = 0.05$). To assess the distribution and homoscedasticity of the data, the Shapiro-Wilk test and Levene test were applied. Inflammatory cytokines data from CBA were evaluated by Student t-test. All data were evaluated using the GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software, CA, USA), where $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Gene expression of CaR recovery from the animal's tongues

The gene expression of CaR recovery from the animal's tongues infected with CaR (*EFG1*, *HWP1*, *BGL2*, *PHR1*, and *SOD1* genes) is displayed in Figure 1. In both evaluation periods, only the DNase+P+L+ group presented a reduction in *EFG1* and *HWP1* gene expression compared to the control group (P-L-) (Figure 1-A and B, respectively).

Immediately after treatments, the P+L+, DNase, and DNase+P+L+ groups presented a reduction in the *BGL2* and *PHR1* gene expression compared to the control group (P-L-) (Figure 1-C and D, respectively). After 7 days of the treatment, P+L+ and DNase+P+L+ groups exhibited a significant reduction in the expression of *BGL2* gene compared to the control group (P-L-) (Figure 1-C).

The DNase+P+L+, P+L+, and P-L+ groups in both evaluation periods (immediately and 7 days after treatments) presented a significant reduction in *SOD1* gene expression compared to the control group (P-L-). The other experimental groups (P+L- and DNase) showed statistically similar behavior to each other and the control group (P-L-) (Figure 1-E).

Gene expression of CaS recovery from the animal's tongues

The expression of *EFG1*, *HWP1*, *BGL2*, *PHR1* and *SOD1* genes from *C. albicans* colonies recovered from the animal's tongues infected with CaS are depicted in Figure 2. The results showed a significant reduction in the expression of *EFG1*, *HWP1*, *BGL2*, *PHR1*, and *SOD1* genes for the DNase+P+L+ and P+L+ groups compared to the control group (P-L-) (Figure 2-A, B, C, D, and E, respectively).

A reduction in the expression of *EFG1* and *HWP1* genes (Figure 2-A and B, respectively) was observed for the DNase+P+L+ and P+L+ groups immediately and 7 days after treatments compared to the control group (P-L-). *EFG1* gene expression showed statistically similar behavior in the DNase+P+L+ and P+L+ groups 7 days after treatments compared to the P-L-, P-L+, P+L-, and DNase groups immediately after treatments (Figure 2-A).

Additionally, a reduction in *BGL2* gene expression was observed in colonies recovered immediately after treatments in the DNase+P+L+, P+L+ and DNase groups when compared to the control group (P-L-). After 7 days of the treatment, the DNase+P+L+ and P+L+ groups showed a significant reduction in *BGL2* gene expression compared to the control group (P-L-) (Figure 2-C).

The DNase+P+L+, P+L+, and DNase groups immediately and 7 days after treatments exhibited a significant reduction in the *PHR1* gene expression compared to the control group (P-L-). The other groups evaluated (P+L- and P-L+) showed statistically similar behavior to each other and the control group (P-L-) (Figure 2-D).

There was a reduction in *SOD1* gene expression for the DNase+P+L+, P+L+, P-L+ groups immediately and 7 days after treatments compared to the control group (P-L-). The other experimental groups (P+L- and DNase) showed statistically similar behavior to each other and the control group (P-L-) (Figure 2-E).

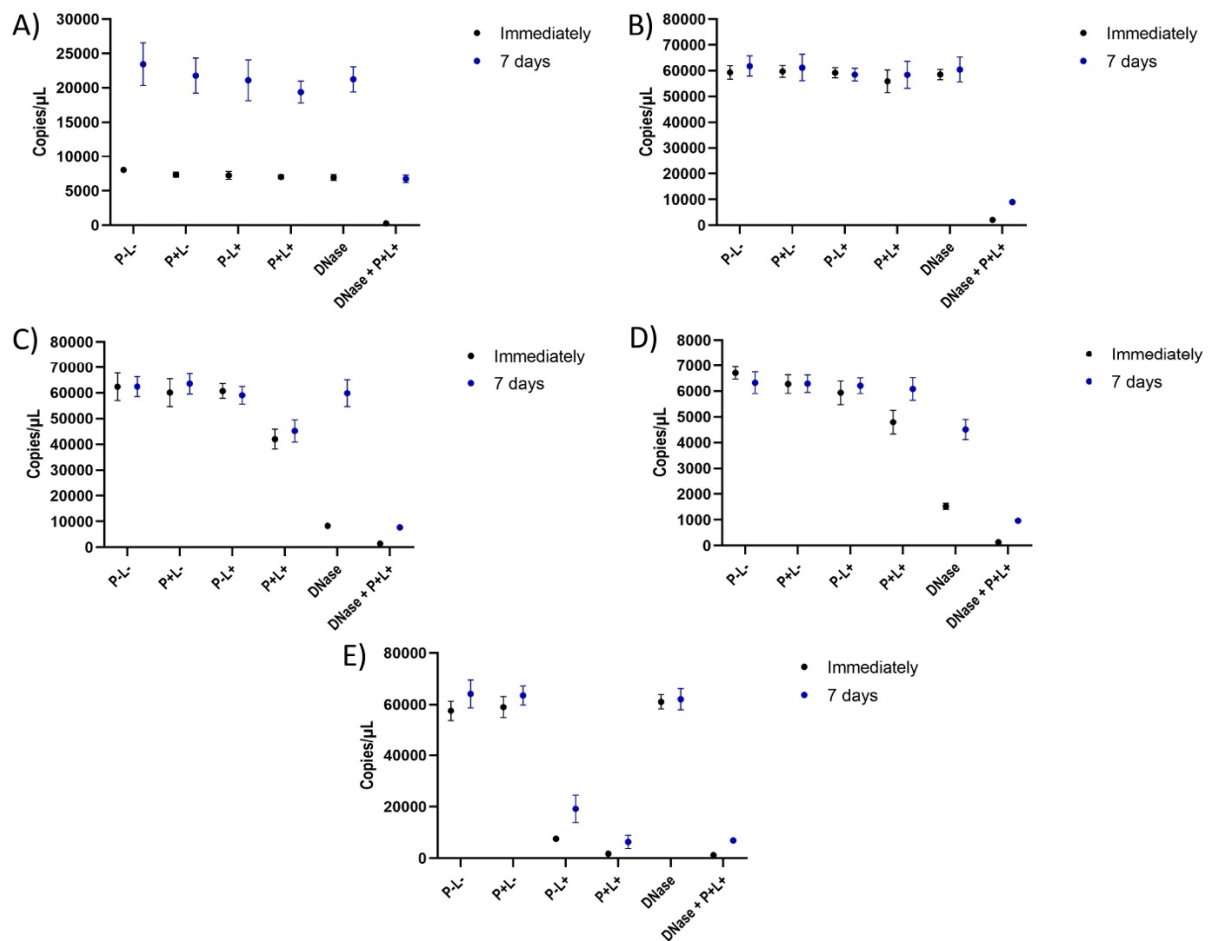


Figure 1- Mean values and standard deviation of fluconazole-resistant *C. albicans* gene expression (copies/ μL) related to adhesion to the host substrate (A: *EFG1* and B: *HWP1*), extracellular matrix of the biofilm (C: *BGL2* and D: *PHR1*), oxidative stress (E: *SOD1*) in each experimental treatment group and periods of recuperation (immediately and 7 days). ($p < 0.05$). It was used $n = 4$ per group.

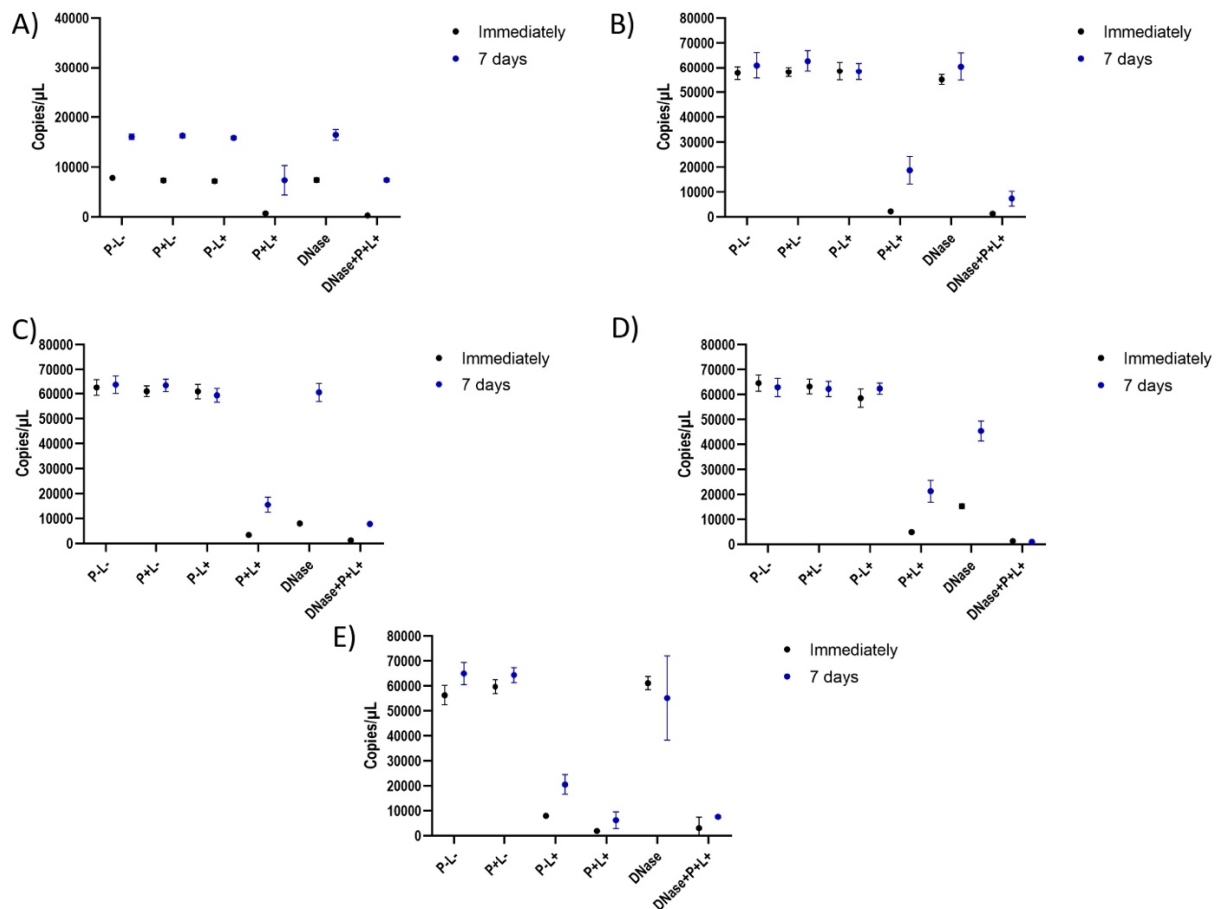


Figure 2- Mean values and standard deviation of fluconazole-susceptible *C. albicans* gene expression (copies/ μL) related to adhesion to the host substrate (A: *EFG1* and B: *HWP1*), extracellular matrix of the biofilm (C: *BGL2* and D: *PHR1*), oxidative stress (E: *SOD1*) of CaS in each experimental treatment group and periods of recuperation (immediately and 7 days). ($p < 0.05$). It was used $n = 4$ per group.

Inflammatory cytokine production

Only the cytokines IL-6, MCP-1 and TNF α were detected. In general, the animals inoculated with CaR and CaS and treated with DNase+P+L+ showed a significant increase in the production of cytokines 24 hours and 7 days after treatments, compared with healthy (NIC) and infected and untreated (P-L-) animals. The group of healthy animals (NIC) and negative control (P-L-) did not present cytokine production. Overall, the results demonstrate higher production of IL-6, TNF- α , and MCP-1 in CaS compared to CaR.

The group of animals inoculated with CaR and CaS and treated with DNase+P+L+ and P+L+ showed a significant increase in the production of interleukin 6 (IL-6) compared to the control group (P-L-) 24 hours after the treatments (Figure 3).

For CaR, 7 days after the end of treatments, only DNase+P+L+ group demonstrated an increase in IL-6 production compared to the control group (P-L-). A significant increase in IL-6 was observed in both evaluation periods in the groups P+L+ and DNase+P+L+ groups for the animals inoculated with CaS.

The production of tumor necrosis factor α (TNF- α) was increased when the animals were inoculated with CaR and CaS and treated with DNase+P+L+ 24 hours and 7 days after treatments (Figures 4). A significant increase in TNF- α was also observed for the animals inoculated with CaS and treated with aPDT (P+L+ group) 7 days after treatments (Figure 4). However, no significant increase in TNF- α was observed for P+L+ group when the animals were inoculated with CaR (Figure 4).

In both periods of evaluation (24 hours and 7 days after treatments), it was observed an increase in MCP-1 production in the group DNase+P+L+ where the animals were inoculated with CaR (Figure 5). For CaS, in both evaluation periods, mice treated with DNase+P+L+ and P+L+ groups demonstrated an increase in MCP-1 production compared to the control group (P-L-). In addition, for CaS, animals treated with light (P-L+) 7 days after the end of treatments demonstrated an increase in MCP-1 production (Figure 5).

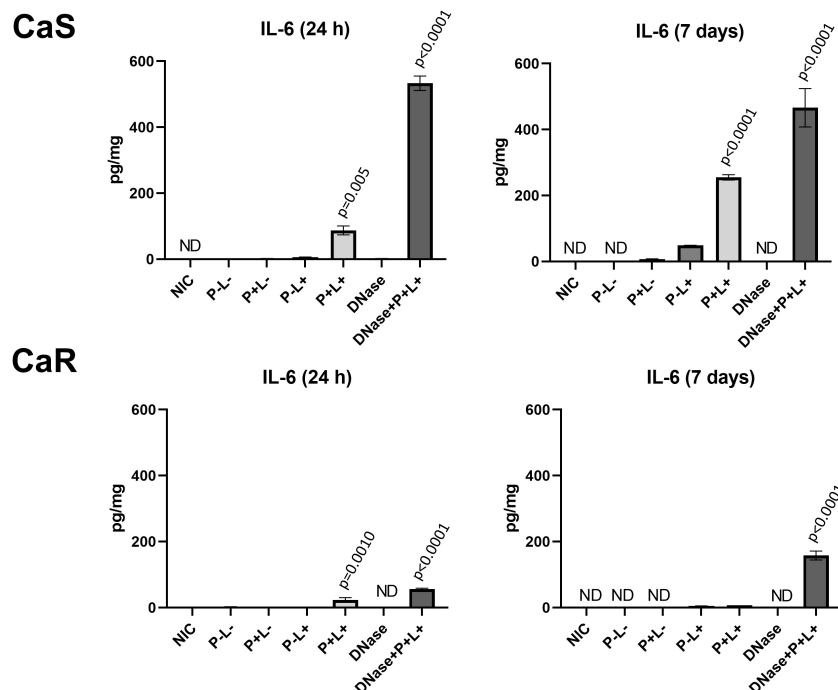


Figure 3- Mean values (pg/mg) of IL-6 produced by mice tissue infected with CaR or CaS recovery 24 hours and 7 days after the end of the treatments. Error bars: standard deviation; NIC: healthy animals; ND: not detected.

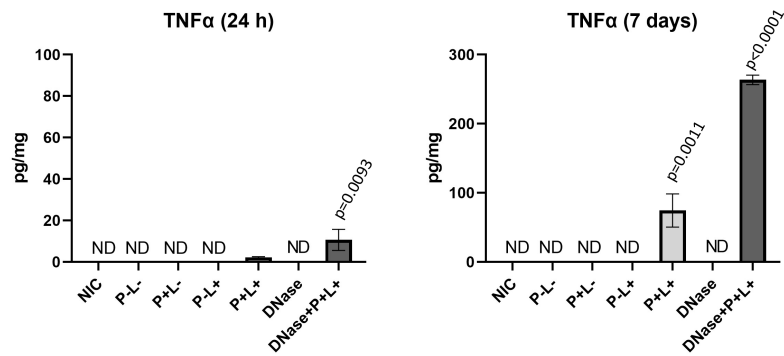
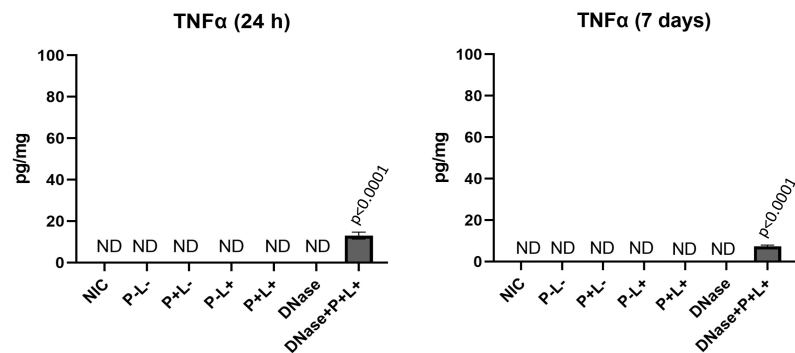
CaS**CaR**

Figure 4- Mean values (pg/mg) of TNF- α produced by mice tissue infected with CaR or CaS recovery 24 hours and 7 days after the end of the treatments. Error bars: standard deviation; NIC: healthy animals; ND: not detected.

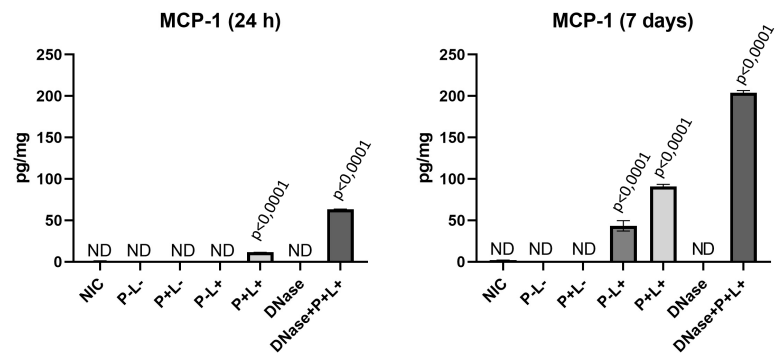
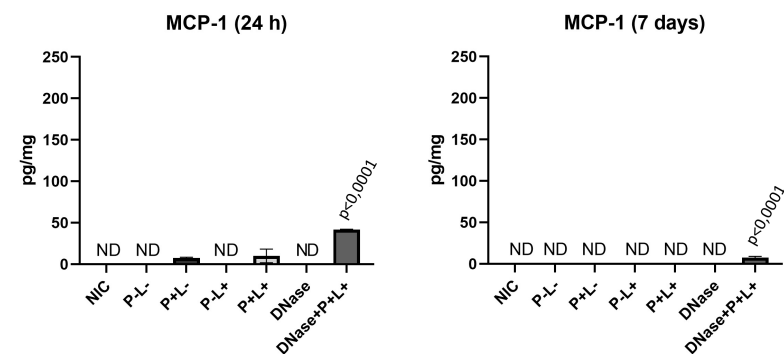
CaS**CaR**

Figure 5- Mean values (pg/mg) of TNF- α produced by mice tissue infected with CaR or CaS recovery 24 hours and 7 days after the end of the treatments. Error bars: standard deviation; NIC: healthy animals; ND: not detected.

Discussion

In a previous study [22], the association of DNase I with aPDT promoted a reduction in fungal viability by around 4.26 and 2.89 $\log_{10}$ for CaS and CaR, respectively, in mice with induced oral candidiasis. In addition, oral lesions and the inflammatory reaction were reduced in infected mice tissue [22]. Then, understanding how the association of DNase I with aPDT in the treatment of candidiasis affects fungal virulence and inflammatory response of the tissue can provide insights into the efficacy of therapies against fungal infections and help develop new treatment strategies. Here, five consecutive topical treatments performed by DNase I associated with aPDT on mice tongues promoted a decrease in the expression of genes related to adhesion to the host substrate (*EFG1* and *HWP1*), the extracellular matrix of the biofilm (*BGL2* and *PHR1*) and oxidative stress (*SOD1*) of CaR and CaS. Also, the association of the enzyme and aPDT treatment modulated immune response in mice by increasing the production of key inflammatory cytokines.

A reduction in the expression of *EFG1* and *HWP1* genes was observed in DNase+P+L+ group for CaR and CaS immediately and 7 days after treatments. In addition, for CaS strains, the P+L+ group also presented a reduction in the expression of *EFG1* and *HWP1* genes. These genes are important for the virulence and adaptation of *C. albicans* to the host environment [27,28]. The results of the present study corroborate with previous in vitro and in vivo studies [35,36]. Reduction in the expression of the *EFG1* and *HWP1* genes was reported in in vitro biofilms after the treatment with aPDT mediated by methylene blue and erythrosine [50]. Furthermore, a reduction in the expression of *HWP1* gene was detected in *C. albicans* biofilms treated with aPDT mediated by PDZ and curcumin in vitro [35]. In an in vivo study, the combination of five applications of nystatin with aPDT (mediated by PDZ) in mice infected with fluconazole-resistant *C. albicans* (ATCC 96901) promoted a reduction in the expression of *EFG1* gene immediately after treatments [36]. aPDT inhibited the transition from yeast to hyphae in fluconazole-susceptible strains in vitro [51]. Furthermore, histopathological evaluation demonstrated that the tongues contaminated with CaS and CaR exhibited a reduction in hyphae/pseudohyphae on the keratin layer for the group treated with DNase I and aPDT 24 hours after treatment in vivo [22]. Then, these previous in vivo findings align with the observed here about the expression of genes related to adhesion and invasion of host tissue. A decrease in

EFG1 and *HWP1* gene expression is significant and can lead to changes in fungal morphogenesis and the transcriptional network responsible for hyphal differentiation in *C. albicans*, thereby reducing its virulence [28].

Here, a reduction in the expression of *BGL2* and *PHR1* genes was observed in the DNase+P+L+ group for CaR and CaS in the two periods evaluated (immediately and 7 days after treatments). Also, for CaS, the P+L+ and DNase groups presented a reduction in *BGL2* and *PHR1* gene expression. These results are supported by fluorescence microscopy images of histological sections presented in the previous study performed and from where the samples used here came [22], where the application of the treatment (DNase+P+L+) promoted a reduction in the extracellular matrix of *Candida* biofilms that were labeled on the dorsum of the mice's tongue [22]. Treatment with DNase I associated with aPDT promoted a reduction in extracellular matrix contents of fluconazole-resistant *C. albicans* (water-soluble polysaccharides, extracellular DNA, and insoluble biomass) [20] and fluconazole-susceptible *C. albicans* (extracellular DNA and soluble proteins) in vitro [18]. Various factors contribute to the development of resistance against antifungal agents in *C. albicans* biofilms [17]. Among them, the protective function of ECM is crucial, with β -mannan and β -glucans playing essential roles [14-17]. The gene expression of the glucan transferase *BGL2* (necessary for the synthesis of β -glucans) [30] and the glycosidase *PHR1* (important in the structure of the cell wall and the virulence of infections related to low pH) [31] are associated with the production of the extracellular matrix by *C. albicans* [30,31]. *PHR1* and *BGL2* genes are required for the adequate production of β -1,3 and β -1,6 glucans [32]. Then, the therapeutic association of DNase I and aPDT evaluated in this study promoted a reduction in the expression of target genes for ECM, suggesting a new promising strategy in the treatment of oral candidiasis.

Besides adhering to the host substrate and forming biofilms, *C. albicans* activates various defense mechanisms, one of which involves the expression of antioxidant genes in response to oxidative stress [33-34] that has been demonstrated to be important for *C. albicans* virulence in mouse models [34]. The expression of *SOD1* antioxidant gene acts in neutralizing the reactive oxygen species and preventing cellular damage [33]. Here, DNase+P+L+, P+L+, and P-L+ groups presented a reduction in expression of *SOD1* gene in both periods of evaluation compared to the control group for CaR and CaS. These data corroborate a previous study where the treatment of fluconazole-susceptible *C. albicans* biofilms with aPDT (mediated by PDZ)

decreased the expression of *SOD1* gene in vitro [35] and in mice infected with fluconazole-resistant *C. albicans* and treated with aPDT (mediated by PDZ) [36]. The *SOD* family of genes plays a crucial role in cellular detoxification in *C. albicans* and acts as a defense mechanism for fungal cells against oxidative stress [52]. Therefore, a decrease in the expression of *SOD1* gene observed in the groups subjected to DNase I associated with aPDT treatment suggests a potential reduction in the *C. albicans*' virulence.

When light was applied alone (P-L+), there was a reduction in the expression of the *SOD1* gene compared to the control in both periods evaluated for CaS and CaR. The application of LED without the photosensitizer reduced the expression of *SOD1* gene in biofilms of *C. albicans* [35] and in *C. albicans* recovery from mice with induced candidosis [36]. It is known that the use of light (wavelengths up to 380 nm) can stimulate endogenous photosensitizing molecules to generate reactive oxygen species [53]. In an in vitro study, the application of red LED (660nm) significantly increased the production of intracellular reactive oxygen species in *C. albicans* [54]. These findings indicate that light applied alone was able to induced reactive oxygen species production and reduced the expression of an important antioxidant gene in *C. albicans* (*SOD1* gene), suggesting a beneficial effect of phototherapy in reducing fungal virulence.

The increase in the expression of inflammatory cytokines indicates a beneficial effect, likely due to cell death or removal of fungal cells by the host's inflammatory response [37-39]. In order to investigate the potential of the treatment in the immunomodulatory process, it was observed that animals inoculated with CaR and CaS and treated with DNase+P+L+ in both periods of evaluation showed a significant increase in the production of IL-6, TNF- α , and MCP-1 compared to the healthy (NIC) and untreated (P-L-) mice. An increase in the local and systemic expression of IL6 and TNF- α after the local treatment with aPDT was reported [43,55]. In a murine model of oral candidiasis induced and treated with aPDT, there was an increase in TNF- α production [10]. MCP-1 plays a role in the excessive inflammatory response produced by disseminated candidiasis in mice [56] and had an increase after aPDT treatment in an in vivo model [57]. Then, we can suggest that the immunomodulatory effect promoted by aPDT treatment presents a beneficial impact by enhancing host defense cell migration and contributing to the therapeutic efficacy of the treatment.

Previously, histopathological sections from tongues recovered from mice infected with CaR and CaS exhibited mild inflammatory infiltrates and similar characteristics to those observed in the healthy animals after the treatment with DNase I associated with aPDT by five consecutive days [22]. Here, the group treated with the combined treatment (DNase I associated with aPDT) presented cytokine production that benefited the tissue recovery observed before. The aPDT employed to treat wounds on the backs of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa* reduced inflammation and cell proliferation in the wounds [58]. Thus, photodynamic therapy may have inflammatory effects by modulating the release of pro-inflammatory mediators, alleviating local inflammation, and improving the healing process [40-43].

Here, mice infected with CaS presented higher cytokine production than those infected with CaR. One of the mechanisms of antifungal resistance involves the enhanced ability of the fungus to evade the host's immune response, thereby hindering the clearance of the infective agent [17,26]. Additionally, some studies demonstrated that resistant *C. albicans* strains may exhibit reduced immunomodulatory effects or altered interactions with immune cells, aiding in the fungal evasion of host defenses [59,60]. *C. albicans* biofilms have been shown to manipulate host cytokine responses to promote immune evasion and facilitate their persistence [60,61]. In the previous study, where the samples came from, mice infected with CaS and treated with DNase I associated with aPDT presented a more significant reduction in the lesion recurrence rate after 7 days compared to CaR [22]. The presence of the inflammatory response in the treatment groups is an essential part of the wound healing and recovery process [42,60]. Therefore, we can speculate that antifungal resistance influences the degree of cytokine production, which may be correlated with the immunomodulatory effect. Therefore, understanding the interplay between antifungal resistance mechanisms and the host immune response is crucial for developing novel treatment approaches and management of fungal infections, particularly in immunosuppressed patients with an elevated risk of emerging antifungal resistance.

Hence, the results of this study demonstrated a reduction in the expression of *EFG1*, *HWP1*, *BGL2*, *PHR1*, and *SOD1* genes in fluconazole-susceptible and -resistant *C. albicans* after five consecutive topical treatments with DNase I associated with aPDT on mice tongues. The therapy promoted an immunomodulatory effect, increasing the production of essential cytokines for the therapeutic effect speeding up wound healing. To our knowledge, this is the first study to evaluate the effect of DNase

I and aPDT on fungal gene expression and host cytokine production. The possible future clinical applications of the treatment in dental and medical fields appear promising and deserve further investigation.

Acknowledgments

This research was supported by the São Paulo Research Foundation [FAPESP #2013/07276-1 (RIDC) and #2020/09332-0] and scholarship (FAPESP #2019/27634-6 to CCJ and #2021/01191-0 to TMF). Additional financial support was provided by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq #304787/2020-5) and scholarship (#PIBIC-9063 to JCGM).

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol.* 2015; 69: 71-92. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002;78(922):455-459. doi:10.1136.
3. Youf R, Müller M, Balasini A, Thétiot F, Müller M, Hascoët A, Jonas U, Schönherr H, Lemercier G, Montier T, Le Gall T. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics.* 2021; 13(12):1995. doi:10.3390/pharmaceutics13121995.
4. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):755-67. doi: 10.1002/lsm.21080.
5. Park D, Kim M, Choi JW, Baek JH, Lee SH, Baek K. Antimicrobial photodynamic therapy efficacy against specific pathogenic periodontitis bacterial species. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 30:101688. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101688.
6. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163:1-12. doi: 10.1016/j.micres.2007.08.001.
7. Tiveron RDR, Costa DA, Leite MDI, Vaz CBS, Sousa M, Carlos SMCF, Oliveira CJF, Machado RR, Paulino TP. Evaluation of cell damage and modulation of cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 in macrophages exposed to PpIX-mediated

- photodynamic therapy. *Braz J Biol.* 2020; 80(3):497-505. doi: 10.1590/1519-6984.193748.
8. 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. doi: 10.1038/sj.bjc.6600864.
 9. Firczuk M, Nowisaand D, Goła J. aPDT-induced inflammatory and host responses. *Photochem Photobiol Sci.* 2011; 10(5): 653-63. doi: 10.1039/c0pp00308e.
 10. Carmello JC, Alves F, G Basso F, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG, Pavarina AC. Treatment of Oral Candidiasis Using Photodithazine®- Mediated Photodynamic Therapy In Vivo. *PLoS One.* 2016; 11(6):e0156947. doi: 10.1371/journal.pone.0156947.
 11. Hidalgo KJR, Carmello JC, Jordão CC, Barbugli PA, Costa CAS, Mima EGO, Pavarina AC. Antimicrobial Photodynamic Therapy in Combination with Nystatin in the Treatment of Experimental Oral Candidiasis Induced by *Candida albicans* Resistant to Fluconazole. *Pharmaceutics (Basel).* 2019;12(3):140. doi: 10.3390/ph12030140.
 12. Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(2):685-94. doi: 10.1007/s10103-013-1397-z.
 13. Dias LM, Klein MI, Jordão CC, Carmello JC, Bellini A, Pavarina AC. Successive applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy effects the susceptibility of *Candida albicans* grown in medium with or without fluconazole. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Dec; 32:102018. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102018.
 14. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol.* 2007; 189(22):7945-7. doi: 10.1128/JB.00858-07.
 15. 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. doi: 10.1128/AAC.00541-08.
 16. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* (2010) 169:323-31. doi: 10.1007/s11046-009-9264-y.
 17. Silva S, Rodrigues CF, Araújo D, Rodrigues ME, Henriques M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *J Fungi (Basel).* 2017; 3(1):8. doi: 10.3390/jof3010008.
 18. Panariello BHD, Klein MI, Alves F, Pavarina AC. DNase increases the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Sep; 27:124-131. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.038.
 19. 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. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x.

20. 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.* 2023; 29(4):1855-67. doi: 10.1111/odi.14149.
21. Tan Y, Ma S, Leonhard M, Moser D, Ludwig R, Schneider-Stickler B. Co-immobilization of cellobiose dehydrogenase and deoxyribonuclease I on chitosan nanoparticles against fungal/bacterial polymicrobial biofilms targeting both biofilm matrix and microorganisms. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020; 108:110499. doi: 10.1016/j.msec.2019.110499.
22. Jordão CC, Klein MI, Barbugli PA, Mima EGO, de Sousa TV, Ferrisse TM, Pavarina AC. DNase improves the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of candidiasis induced with *Candida albicans*. *Front Microbiol.* 2023; 14:1274201. doi: 10.3389/fmicb.2023.1274201.
23. M. Gulati, C.J. Nobile. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms, *Microbes Infect.* 2016; 18(5): 310–21, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>.
24. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(2):109-18. doi: 10.1038/nrmicro2475.
25. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, Škrlec I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J Fungi (Basel).* 2021; 7(2):79. doi: 10.3390/jof7020079.
26. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science.* 2018;360(6390):739-742. doi:10.1126/science.aap7999.
27. 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): 6298–6305, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6298>.
28. Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, Schöck U, Stark A, Kuchler K. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS Genet.* 2012;8(12):e1003118. doi: 10.1371/journal.pgen.1003118.
29. Lal P, Sharma D, Pruthi P, Pruthi V. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. *J Appl Microbiol.* 2010; 109(1):128-36. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04634.x.
30. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, Hamaker J, Mitchell AP, Andes DR. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002848. doi: 10.1371/journal.ppat.1002848.
31. 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. doi: 10.1128/AAC.01638-09.

32. 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. doi: 10.1128/JB.181.22.7070-7079.1999.
33. 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. doi: 10.3390/biom5010142.
34. 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. doi: 10.1099/00221287-148-11-3705.
35. 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. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101825.
36. 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. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102155.
37. 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. doi: 10.1186/1471-2334-9-98.
38. 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. doi: 10.4161/viru.29699.
39. Pathakumari B, Liang G, Liu W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2020; 130:110550. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110550.
40. 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. doi: 10.1038/sj.bjc.6600864.
41. 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.
42. Firczuk M, Nowisaand D, Goła J. APDT-induced inflammatory and host responses. *Photochem Photobiol Sci.* 2011; 10: 653–632011. doi: 10.1039/c0pp00308e.
43. 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. doi: 10.1093/jnci/82.1.34.

44. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(7):535-45. doi: 10.1038/nrc1894.
45. 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) 216–222. doi.org/10.1590/s1806-83242008000300005.
46. Alonso GC, Pavarina AC, Sousa TV, Klein MI. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. *J Microbiol Methods*. 2018; 147:1-13. doi: 10.1016/j.mimet.2018.02.010.
47. Srikantha T, Daniels KJ, Pujol C, Kim E, Soll DR. Identification of genes upregulated by the transcription factor Bcr1 that are involved in impermeability, impenetrability, and drug resistance of *Candida albicans* a/ α biofilms. *Eukaryot Cell*. 2013; 12(6):875-88. doi: 10.1128/EC.00071-13.
48. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS One*. 2011;6(12):e28830. doi: 10.1371/journal.pone.0028830.
49. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1559-82. doi: 10.1038/nprot.2006.236.
50. 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):1447-1454. doi: 10.1007/s10103-018-2487-8.
51. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1):445-51. doi: 10.1128/AAC.01451-12.
52. 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. doi: 10.1007/s10529-021-03200-3.
53. 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. doi: 10.1002/lsm.20239.
54. 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. doi:10.33448/rsd-v11i10.32600.
55. 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.
56. 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):3468-3476. doi: 10.3892/ijmm.2018.3564.

57. She H, Nakazawa T, Matsubara A, Connolly E, Hisatomi T, Noda K, Kim I, Gragoudas ES, Miller JW. Photoreceptor protection after photodynamic therapy using dexamethasone in a rat model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(11):5008-14. doi: 10.1167/iovs.07-1154.
58. Yang T, Tan Y, Zhang W, Yang W, Luo J, Chen L, Liu H, Yang G, Lei X. 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. doi: 10.3389/fcell.2020.585132.
59. Lee JK, Park S, Kim YM, Guk T, Choi JK, Kim JY, Lee MY, Jang MK, Park SC. Antifungal and anti-inflammatory activities of PS1-2 peptide against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Antibiotics* (Basel). 2022; 11(12):1779. doi: 10.3390/antibiotics11121779.
60. Lionakis MS, Netea MG. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS Pathog*. 2013; 9(1): e1003079. doi: 10.1371/journal.ppat.1003079.

4 DISCUSSÃO

A combinação da aPDT com a enzima DNase para o tratamento de biofilmes formados por *C. albicans* tem sido avaliadas^{20,59}. As enzimas atuam diminuindo a integridade da MEC por hidrólise de proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos. Desta forma, a DNase I reduz a estabilidade do biofilme, tornando-o mais suscetível à ação de antifúngicos e tratamento com aPDT^{12,20-22,59}. O presente estudo investigou se a aplicação da enzima DNase I potencializaria os resultados do tratamento com aPDT em camundongos infectados por *C. albicans* suscetível e resistente ao fluconazol. Até o presente momento, esse estudo foi o primeiro a avaliar *in vivo* a eficácia da DNase I associada à aPDT no tratamento da candidíase oral induzida em camundongos.

Para CaR, os resultados demonstraram que a DNase I quando aplicada previamente à aPDT promoveu uma redução na contagem de colônias viáveis em torno de 2,89 e 1,27 log₁₀, respectivamente imediatamente e 7 dias após os tratamentos. O aspecto clínico das lesões orais foi reduzido em torno de 96,07% e 75,24% 24 horas e 7 dias após o tratamento. Esses resultados aqui observados corroboram com um estudo anterior⁴⁹, que avaliou a combinação de aPDT mediada por PDZ (200 mg/L) associada à nistatina no tratamento de camundongos infectados com *C. albicans* resistentes ao fluconazol (ATCC 96901). Utilizando a mesma metodologia para infecção por candidose em camundongos, a combinação de tratamentos reduziu em ~2,60 log₁₀ a viabilidade fúngica e as lesões orais em ~95% após 24h de tratamento⁴⁹. Os resultados obtidos após 7 dias demonstraram que a associação do antifúngico nistatina com a aPDT promoveu uma redução de ~1 log₁₀ na viabilidade fúngica e redução das lesões orais em ~50% após 7 dias do término dos tratamentos⁴⁹. A enzima DNase promoveu resultados mais favoráveis em relação ao antifúngico nistatina em termos de redução de viabilidade fúngica e no percentual de recorrência da infecção oral. O uso de fontes alternativas de tratamento pode levar ao acesso a novos agentes terapêuticos com menos efeitos colaterais sem o risco de resistência antifúngica^{60,61}. A resistência dos biofilmes de *Candida* aos antifúngicos convencionais é considerada multifatorial e está associada ao estado fisiológico das células, ativação das bombas de efluxo de fármacos e ao efeito protetor da MEC^{15,61}. Associado a isso, as células podem ter suscetibilidade reduzida a antifúngicos das classes dos azóis e polienos^{61,62}. Assim, a enzima DNase I pode ser um adjuvante no

tratamento de biofilmes, pois reduz a maioria dos componentes da MEC que podem dificultar a penetração do fotossensibilizador nos biofilmes sem interferir na viabilidade celular.

A enzima associada à aPDT reduziu a viabilidade fúngica de CaS em cerca de 4,26 e 1,97 $\log_{10}$, respectivamente imediatamente e 7 dias após os tratamentos. Além disso, houve remissão nas lesões orais de aproximadamente 98,92% e 83,31%, respectivamente após 24h e 7 dias após o tratamento. Em um estudo *in vivo*⁴⁶ foi demonstrado que uma única aplicação de aPDT mediada por PDZ em um modelo murino promoveu redução na viabilidade de *C. albicans* (ATCC 90028) em 4,36 $\log_{10}$ ⁴⁶. Cinco aplicações de aPDT mediada por PDZ ou antifúngico nistatina promoveram reduções na viabilidade celular de *C. albicans* (ATCC 90028) em aproximadamente 3 e 3,22 $\log_{10}$, respectivamente 24h após o tratamento⁴⁸. Após sete dias do término dos tratamentos, os autores observaram uma redução de $\sim 2 \log_{10}$ para os grupos aPDT e nistatina⁴⁸. Comparado aos antifúngicos, a aPDT apresenta baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência microbiana o que motiva a realização de estudos com objetivo de otimizar a utilização dessa abordagem terapêutica⁶⁰. Assim, nossos achados revelaram que a DNase potencializou os resultados da aPDT, sendo uma alternativa promissora para a inativação fúngica, incluindo microrganismos resistentes.

Alguns estudos *in vitro* demonstraram a eficácia da aPDT associada à DNase na inativação de *C. albicans* suscetível e resistente ao fluconazol^{20,59}. Em um estudo, a aPDT (mediada por PDZ) associada ao tratamento com DNase I (5 min) promoveu uma diminuição de $\sim 2,16 \log_{10}$ em biofilmes formados por *C. albicans* suscetível ao fluconazol (ATCC 90028)²⁰. Além disso, foi exibido níveis significativamente mais baixos de eDNA na MEC²⁰. Quando biofilmes de *C. albicans* resistentes ao fluconazol foram tratados com DNase previamente a aplicação da aPDT, observou-se uma diminuição de $\sim 1,92 \log_{10}$ na viabilidade celular e também redução de polissacarídeos solúveis em água (36,3%) e eDNA (72,3%)⁵⁶. No presente estudo, as imagens de microscopia de fluorescência dos cortes histológicos das línguas 24 horas após os tratamentos demonstraram que a DNase, quando aplicada previamente a aPDT, promoveu a ausência de marcação de polissacarídeos produzidos por *C. albicans*, semelhante ao que foi observado no grupo controle (CNI). Após 7 dias do término do tratamento, observou-se a marcação de polissacarídeos apenas nos camundongos infectados pelo CaR, mas a espessura deste foi menor em comparação ao grupo

aPDT. Assim, com base nestes resultados podemos sugerir que o tratamento com DNase promoveu uma redução nos polissacarídeos produzidos por *C. albicans*. Entre os componentes presentes na MEC, o DNA extracelular (eDNA) associado a β -glucanas e β -mananas, contribui para a integridade organizacional de biofilmes e resistência antifúngica de *C. albicans*^{12,13,63}. Alguns estudos encontraram uma associação entre os níveis de eDNA e um aumento na resistência microbiana aos antifúngicos^{18,64}. Então, utilizar substâncias que sejam capazes de interromper os níveis de MEC e eDNA dos biofilmes de *C. albicans* são métodos eficazes para otimizar as terapias antifúngicas.

Os cortes histológicos das línguas recuperadas após o tratamento com DNase seguida da aPDT para ambas as cepas (CaS e CaR) demonstraram características histológicas semelhantes as observados no grupo CNI (animais saudáveis). Os tecidos apresentavam poucas hifas/pseudohifas/blastóporos na camada de queratina, pequena inflamação no tecido conjuntivo subjacente e tecido muscular intacto. Em estudo anterior, camundongos tratados com 5 aplicações de nistatina associada à aPDT mediada por PDZ apresentaram características histológicas de normalidade, resultados muito semelhantes aos observados no presente estudo após o tratamento com a DNase seguida da aPDT⁴⁹. Aqui, os grupos controle (P-L-, P+L-, P-L+ e DNase) 24 horas após o tratamento apresentaram uma grande área de hifas/pseudohifas cobrindo o tecido epitelial, o que demonstrou acantose associada à destruição das papilas. Além disso, ocorreu uma intensa inflamação do epitélio com a presença de vasos sanguíneos dilatados. Sete dias após os tratamentos, as fibras musculares estavam parcialmente degradadas na região superficial do tecido nos grupos controle (grupos P-L-, P+L- e P-L+). Nos cortes recuperados dos animais inoculados com CaR, sete dias após o término do tratamento, havia hifas e pseudohifas na camada de queratina, sugerindo recorrência da infecção oral no grupo DNase+P+L+, mas a quantidade observada era menor que aquela observada no grupo P+L+. Além disso, no grupo aPDT houve retorno das lesões orais. Nossos resultados demonstraram que a DNase antes da aPDT reduz a taxa de recorrência da lesão após 7 dias em comparação com outros tratamentos para *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Portanto, a DNase I afetou a composição do biofilme e dificultou a nova formação do por *C. albicans*, provavelmente porque a reestruturação epitelial completa foi promovida nos grupos tratados com DNase+P+L+.

Então, entender como a associação da DNase I com aPDT afeta a virulência fúngica e a resposta inflamatória do tecido no tratamento de candidose oral pode fornecer informações importantes sobre a eficácia da terapia em infecções fúngicas e ajudar a desenvolver novas estratégias de tratamento. Com base nos resultados, foi observado, de maneira geral que cinco aplicações tópicas consecutivas de DNase I associada com a aPDT em línguas de camundongos promoveram uma diminuição na expressão de genes relacionados à adesão ao substrato hospedeiro (*EFG1* e *HWP1*), matriz extracelular do biofilme (*BGL2* e *PHR1*) e estresse oxidativo (*SOD1*) de CaR e CaS. Além disso, a associação da enzima com a aPDT promoveu efeito imunomodulador na resposta imune dos camundongos, aumentando a produção de citocinas inflamatórias.

Uma redução na expressão dos genes *EFG1* e *HWP1* no grupo DNase+P+L+ para CaR e CaS imediatamente e 7 dias após os tratamentos foi observada. Além disso, para as cepas CaS, o grupo P+L+ também apresentou redução na expressão dos genes *EFG1* e *HWP1*. Esses genes são importantes para a virulência e adaptação de *C. albicans* ao ambiente hospedeiro^{7,8}. Os resultados do presente estudo corroboram com estudos anteriores *in vitro* e *in vivo*^{50,65}. O tratamento com aPDT mediada por azul de metileno e eritrosina promoveu redução na expressão dos genes *EFG1* e *HWP1* em biofilmes *in vitro*⁶⁶. Além disso, foi relatada redução na expressão do gene *HWP1* em biofilmes de *C. albicans* tratados com aPDT mediada por PDZ e curcumina *in vitro*⁶⁵. Em um estudo *in vivo*, a combinação de cinco aplicações de nistatina com aPDT (mediada por PDZ) em camundongos infectados com *C. albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 96901) promoveu redução na expressão do gene *EFG1* imediatamente após os tratamentos⁵⁰. aPDT inibiu a transição de levedura para hifas em cepas suscetíveis ao fluconazol *in vitro*⁶⁷. Além disso, os resultados de expressão de genes relacionados com a adesão ao substrato do hospedeiro corroboram com a avaliação histopatológica que demonstrou que as línguas contaminadas com CaS e CaR apresentaram redução de hifas/pseudohifas na camada de queratina para o grupo tratado com DNase I e aPDT 24 horas após o tratamento. Então, uma diminuição na expressão dos genes *EFG1* e *HWP1* é significativa e pode levar a alterações na morfogênese fúngica e na rede transcricional responsável pela diferenciação de hifas em *C. albicans*, reduzindo assim sua virulência^{7,8}.

Nos dois períodos avaliados (imediatamente e 7 dias após os tratamentos), foi observada redução na expressão dos genes *BGL2* e *PHR1* no grupo DNase+P+L+ em CaR e CaS. Além disso, para CaS, os grupos P+L+ e DNase apresentaram redução na expressão dos genes *BGL2* e *PHR1*. Esses resultados corroboram com os encontrados nas imagens de microscopia de fluorescência dos cortes histológicos, onde a aplicação do tratamento (DNase+P+L+) promoveu redução na marcação da matriz extracelular presente no dorso da língua dos camundongos. O tratamento com DNase I associado à aPDT promoveu redução no conteúdo da matriz extracelular de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (polissacarídeos solúveis em água, DNA extracelular e biomassa insolúvel)⁵⁹ e de *C. albicans* suscetível ao fluconazol (DNA extracelular e proteínas solúveis)²⁰ *in vitro*. Vários fatores contribuem para o desenvolvimento de resistência em biofilmes de *C. albicans* contra agentes antifúngicos⁶⁸. Entre eles, a função protetora da MEC é crucial, com β -manano e β -glucanos desempenhando papéis essenciais^{10-13,68}. A expressão gênica da glucana transferase *BGL2* (essencial para a síntese de β -glucanos)¹⁹ e da glicosidase *PHR1* (importante na estrutura da parede celular e na virulência de infecções relacionadas ao baixo pH)¹⁵ estão associadas com a produção da matriz extracelular em *C. albicans*^{15,19}. Ambos os genes *PHR1* e *BGL2* são necessários para a produção adequada de β -1,3 e β -1,6 glucanos⁶⁹. Então, a associação da DNase I com a aPDT promoveu redução na expressão de genes envolvidos na síntese de componentes essenciais para a MEC, sugerindo uma nova estratégia promissora para tratamento da candidose oral.

Além de aderir ao substrato hospedeiro e formar biofilmes, *C. albicans* ativa diversos mecanismos de defesa, um deles envolve a expressão de genes antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo³⁸⁻⁴² que demonstrou ser importante para a virulência de *C. albicans* em modelo murino⁷⁰. A expressão do gene antioxidante *SOD1* atua neutralizando as espécies reativas de oxigênio (ROS) e prevenindo danos celulares³⁸. Nossos resultados demonstraram que os grupos DNase+P+L+, P+L+ e P-L+ apresentaram redução na expressão do gene *SOD1* em ambos os períodos de avaliação em comparação ao grupo controle para CaR e CaS. Esses dados corroboram com estudo anterior onde o tratamento de biofilmes de *C. albicans* suscetíveis ao fluconazol com aPDT (mediado por PDZ) diminuiu a expressão do gene *SOD1* *in vitro*⁶⁵ e em camundongos infectados com *C. albicans* resistente ao fluconazol e tratados com aPDT (mediado por PDZ)⁵⁰. A família de genes

SOD desempenha um papel crucial na desintoxicação celular em *C. albicans* e atua como um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo em células fúngicas⁷¹. Portanto, a diminuição na expressão do gene *SOD1* observada nos grupos de tratamento com a DNase I associada com aPDT sugere redução na virulência de *C. albicans*.

A aplicação da luz isolada (P-L+) promoveu redução na expressão do gene *SOD1* em relação ao controle em ambos os períodos avaliados para CaS e CaR. Foi relatado que a aplicação do LED sem o fotossensibilizador reduziu a expressão do gene *SOD1* em biofilmes de *C. albicans*⁶⁵ e na recuperação de *C. albicans* de camundongos com candidose induzida⁵⁰. Sabe-se que o uso de luz (comprimentos de onda acima de 380 nm) pode estimular moléculas fotossensibilizantes endógenas a gerar espécies reativas de oxigênio⁷². Em um estudo *in vitro*, a aplicação de LED vermelho (660nm) aumentou significativamente a produção de ROS no interior das células de *C. albicans*⁷³. Esses achados indicam que a luz aplicada isoladamente foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e reduzir a expressão de um importante gene antioxidante em *C. albicans* (gene *SOD1*), sugerindo um efeito benéfico da fototerapia na redução da virulência fúngica.

O aumento na expressão de citocinas inflamatórias indica um efeito benéfico, provavelmente ocorrido devido à morte celular ou remoção de células fúngicas pela resposta inflamatória do hospedeiro⁵¹⁻⁵³. Com o objetivo de investigar o potencial do tratamento fotodinâmico no processo imunomodulador, observou-se que os animais inoculados com CaR e CaS e tratados com DNase+P+L+ ou P+L+ em ambos os períodos de avaliação apresentaram aumento significativo na produção de IL-6, TNF- α e MCP-1 em comparação com camundongos saudáveis (NIC) e não tratados (P-L-). Foi relatado um aumento na expressão local e sistêmica de IL6 e TNF- α após o tratamento local com aPDT^{57,74}. Em um modelo murino de candidose oral induzida, onde os animais foram tratados com aPDT, houve aumento na produção de TNF- α ⁴⁸. A MCP-1 é responsável por realizar o recrutamento de monócitos para o local da infecção, desempenhando um papel importante na resposta inflamatória produzida pela candidíase disseminada em camundongos⁷⁵ e aumenta após o tratamento com aPDT em um modelo *in vivo*⁷⁶. Então, podemos sugerir que o efeito imunomodulador gerado pelo tratamento com aPDT apresenta efeito benéfico ao estimular a migração das células de defesa do hospedeiro e contribuir para a eficácia terapêutica do tratamento.

Os cortes histológicos recuperados das línguas de camundongos infectados com CaR e CaS exibiram infiltrados inflamatórios leves e características semelhantes às observadas em animais saudáveis após o tratamento com DNase I associada a aPDT. Assim, a produção de citocinas pode ter atuado como um efeito benéfico na recuperação tecidual. A aPDT empregada para tratar feridas no dorso de camundongos infectados com *Pseudomonas aeruginosa* promoveu redução da inflamação e da proliferação celular nas feridas⁷⁷. Assim, a terapia fotodinâmica pode ter efeitos inflamatórios que atuam na liberação de mediadores pró-inflamatórios, aliviando a inflamação local e melhorando o processo de cicatrização⁵⁴⁻⁵⁷.

Camundongos infectados com CaS apresentaram maior produção de citocinas em comparação aos camundongos infectados com CaR. Um dos mecanismos de resistência antifúngica envolve o aumento da capacidade do fungo de driblar a resposta imune do hospedeiro, dificultando assim a eliminação da infecção⁶⁸. Além disso, alguns estudos demonstraram que cepas resistentes de *C. albicans* podem apresentar efeito imunomodulador reduzido ou alterando o sítio de interação com as células imunes, auxiliando na evasão fúngica das defesas do hospedeiro^{78,79}. Os camundongos infectados com CaS e tratados com DNase I associada à aPDT apresentaram redução mais significativa na taxa de recorrência da lesão após 7 dias em comparação ao CaR. A presença da resposta inflamatória nos grupos de tratamentos é parte essencial do processo de cicatrização e recuperação das feridas^{56,79}. Portanto, podemos especular que a resistência aos antifúngicos influencia na produção de citocinas, o que pode estar correlacionado com o efeito imunomodulador. Portanto, compreender a interação entre os mecanismos de resistência antifúngica e a resposta imune do hospedeiro é crucial para o desenvolvimento de novas abordagens de tratamento e manejo de infecções fúngicas, particularmente em pacientes imunossuprimidos com risco elevado de resistência antifúngica.

O aumento geral da ocorrência de patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade das drogas têm motivado a busca de estratégias para inativar espécies fúngicas. Além disso, a MEC dos biofilmes de *C. albicans* atua limitando a penetração de antifúngicos, antissépticos e fotossensibilizadores, influenciando na eficiência do tratamento com aPDT.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar o efeito da DNase I e da aPDT *in vivo*. 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 odontológica e médica.

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.

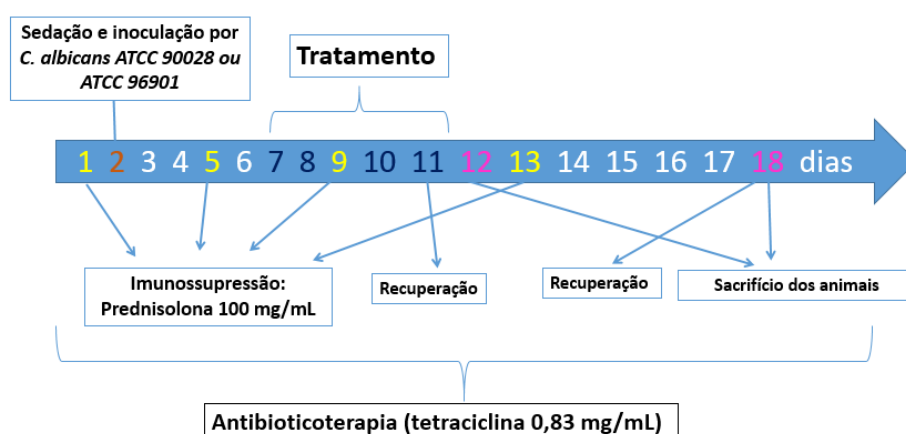
66. Freire F, de Barros PP, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AOC. Photodynamic inactivation in the expression of the *Candida albicans* genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1, and EFG1 in biofilms. *Lasers Med Sci*. 2018; 33(7): 1447-54.
67. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E et 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.

APENDICE A – MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética em Uso Animal, da Faculdade de Odontologia de Araraquara–UNESP (CEUA 09/2020). Foram utilizados 96 camundongos fêmeas da linhagem Swiss com aproximadamente 5 semanas de vida para cada cepa avaliada, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP). As cepas de *C. albicans* susceptível (ATCC 90028; CaS) e *C. albicans* resistente (ATCC 96901; CaR) (Rockville, MD, USA) foram reativadas e utilizadas para a indução da candidose nos animais. Foram obtidas suspensões celulares padronizadas em uma mesma concentração de 10^7 células/mL^{1,2}. A Figura 1 ilustra, resumidamente, as etapas que foram realizadas durante todo protocolo experimental¹⁻³.

Figura 1 - Relação das etapas realizadas para indução e tratamento dos animais



Fonte: Elaboração própria.

Para a realização do protocolo proposto, os tratamentos foram realizados uma vez ao dia (do dia 7 ao dia 11), resultando em 5 aplicações^{1,2}. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com o descrito a seguir (Quadro 1).

- Grupo CNI: constituído de animais saudáveis, os quais não receberam inoculação, nem tratamento e nem imunossupressão.

- Grupo CNI+: constituído de animais imunossuprimidos com prednisolona, os quais não receberam inoculação e nem tratamento.

- Grupo P-L-: os animais deste grupo foram submetidos ao processo de indução de candidose (com CaS ou CaR), porém não receberam nenhum tratamento. Esse grupo foi considerado o controle negativo de trabalho (animais infectados).

•Grupo P+L+ (aPDT): os animais pertencentes a este grupo foram anestesiados intraperitonealmente por meio de injeção de solução anestésica contendo Ketamina (anestésico geral), Xilazina (relaxante muscular) e soro fisiológico. Em seguida, foram colocados em posição supina na mesa de trabalho, cuidadosamente sua língua foi posicionada para fora da cavidade oral, com ajuda de uma pinça clínica. Imediatamente foi aplicado 50µL de PDZ (200 mg/L) com auxílio de uma pipeta sobre o dorso da língua dos camundongos. As línguas desses animais foram posicionadas para dentro da cavidade bucal, e esses animais permaneceram no escuro (para incubação do FS) por um período de 20 minutos (tempo de pré-irradiação). Então, as línguas dos camundongos foram posicionadas delicadamente para fora da cavidade oral para iluminação. Para isso, a extremidade da caneta LED foi colocada por 19 minutos em contato com o dorso lingual, resultando em uma iluminação de 50 J/cm². A fim de manter as línguas hidratadas durante essa iluminação, foram realizadas aplicações de soro fisiológico com auxílio de uma seringa.

•Grupo P+L-: após anestesia, os animais pertencentes a este grupo receberam apenas a aplicação de 50µL de PDZ (200 mg/L) conforme descrito para o grupo aPDT.

•Grupo P-L+: neste grupo experimental, após a anestesia, o dorso lingual foi apenas iluminado por 19 minutos com LED na dose de 50 J/cm², conforme descrito para o grupo aPDT.

•DNase: os animais pertencentes a este grupo foram anestesiados, e em seguida colocados em posição supina na mesa de trabalho, cuidadosamente sua língua foi posicionada para fora da cavidade oral, com ajuda de uma pinça clínica. Imediatamente, foi aplicado com auxílio de uma pipeta 50µL de DNase (20 units/mL) permanecendo incubado por 5 minutos.

•DNaseP+L+: os animais receberam tratamento com 50µL da DNase por 5 minutos seguida da aPDT, conforme descrito previamente para os grupos DNase e P+L+, respectivamente.

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e submetidos aos tratamentos de acordo com o descrito resumidamente no Quadro 1.

Quadro 1- Descrição dos grupos e tratamentos realizados

Grupo	Descrição	24 horas (n)	7 dias (n)	Total (n)
CNI	Controle Negativo da infecção. Animais saudáveis que não foram submetidos a nenhuma intervenção.	3	3	6
CNI +	Controle Negativo da infecção. Animais imunossuprimidos.	3	3	6
P-L-	Animais inoculados e não serão tratados. Controle negativo de trabalho.	7	7	14
P+L+ (aPDT)	Aplicação de 200 mg/L de PDZ por 20 min (pré-incubação), seguida de iluminação com luz LED (50 J/cm ² / 44,6 mW/cm ²).	7	7	14
P+L-	Aplicação de 200 mg/L de PDZ por 20 min (pré-incubação),	7	7	14
P-L+	Iluminação com LED com 50 J/cm ² (19 minutos).	7	7	14
DNase	Aplicação de 20 units/mL de DNase permanecendo incubado por 5 minutos.	7	7	14
DNase+P+L+	Aplicação de 20 units/mL de DNase (5 min) e em seguida aPDT (200 mg/L de PDZ por 20 min (pré-incubação), seguida de iluminação com luz LED (50 J/cm ² / 44,6 mW/cm ²).	7	7	14
Total		48	48	96

Os mesmos grupos e condições experimentais, exceto os grupos CNI e CNI+, foram realizados para CaS e CaR, resultando em 180 animais.

Fonte: Elaboração própria.

Recuperação de *C. albicans* e contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL)

Após o término dos tratamentos, foi realizada a recuperação de CaS e CaR das línguas dos animais. Para a realização da coleta, mini-swabs estéreis foram friccionados sobre os dorsos das língua dos animais durante 1 minuto¹. Esses minis-swabs foram colocados em tubos do tipo eppendorf contendo 900 µL de solução salina tamponada por fosfato (PBS) e foram agitados em vortex durante 1 minuto para o desprendimento do fungo do mini-swab para a solução salina. Na sequência, diluições seriadas foram realizadas na ordem de 10⁻¹ a 10⁻³. Alíquotas de 25 µl de cada diluição foram semeadas em duplicata, em placas Petri contendo meio de cultura SDA. Essas placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Decorrido esse período, a contagem visual de colônias foi realizada e o número de UFC/mL determinado. Além disso, colônias (3 unidades) de CaS e CaR foram armazenadas em glicerol 50% para extração de RNA e análise da expressão gênica.

Análise macroscópica das lesões

As lesões nas línguas dos animais foram fotografadas antes do início dos tratamentos, 24 horas e 7 dias após a finalização dos mesmos. Todas as fotografias foram padronizadas e obtidas com a mesma câmera digital (Sony Cyber-Shot DSCF717; Sony Corporation, Tóquio, Japão), pelo mesmo operador e sob as mesmas condições (lugar, luz, ângulo e posição dos animais), visando assim facilitar a reprodutibilidade. Cada fotografia foi avaliada e analisada no programa ImageJ.exe. (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/install/windows.html>), onde foi calculado a porcentagem das lesões brancas sobre o total da área da língua (%)².

Previamente ao início da análise, foi realizada uma calibração do Software da seguinte forma: Inicialmente foi utilizada uma fotografia dos animais pertencentes ao grupo CNI (animais saudáveis), clicar em “Abrir o programa ImageJ®” e selecionar a imagem da língua do camundongo clicando no menu file e open. A seguir, adicionar a imagem do grupo P-L- (grupo sem tratamento) e, para calibração do software, clicar na ferramenta "medir linha". Nesse momento, o mouse é colocado no início da lesão de mancha branca (no ponto inicial de referência) e arrastado até o fim da lesão de mancha branca (ponto final de referência). Então, foi clicado em “Analyze set scale” e preenchido com as distâncias conhecidas e as de referências (Grupo P-L-) e assim, foi obtida a área da lesão em secção linear. A seguir, afim de obter a área total da lesão, selecionar a ferramenta “free hand selection”, clicar com o botão do mouse esquerdo e manter pressionado até contornar a área da lesão. Então, clicar em “analyse set measurement” e selecione as caixas: “área” e “display label” e em “analyse measure. Salvar a medida da área do grupo P-L-, e, a seguir, importar as demais imagens dos outros grupos experimentais. Então, com base na medida de referência da área total da lesão foram calculadas as áreas das imagens dos diferentes grupos experimentais².

Sacrifício dos animais

Previamente ao sacrifício, os animais foram anestesiados intraperitonealmente e suas línguas foram cirurgicamente removidas e divididas horizontalmente em duas partes com ajuda de uma tesoura clínica e bisturi. Uma das porções foi utilizada para a análise histológica e microscopia de fluorescência. A outra porção foi destinada a análise de citocinas inflamatórias. Os sacrifícios dos camundongos foram realizados

por meio de injeção intramuscular de uma dose letal de ketamina (0,2 mL) e Xilazina (0,4 mL), nos períodos de 24 horas e 7 dias após o término dos tratamentos descritos.

Análise histológica

Com os animais devidamente anestesiados, utilizando uma tesoura clínica, as línguas dos animais foram cirurgicamente removidas e divididas horizontalmente em duas partes. As porções destinadas a análise histológica das línguas foram colocadas em cassetes plásticos. Esses cassetes devidamente identificados ficaram imersos em um recipiente com paraformaldeído 4% (pH 7,2). Imediatamente após a realização dos cortes das línguas e previamente à inclusão das peças em parafina, foi realizado o seguinte processo laboratorial:

1. Fase de desidratação por trocas consecutivas de álcoois em concentrações crescentes;
2. Fase de diafanização;
3. Fase de embebição em parafina histológica a 58°C

Após endurecimento da parafina as formas foram removidas e, com o auxílio de navalhas descartáveis, foram obtidos blocos de parafina com as peças incluídas centralmente. Esses blocos foram fixados em suportes de madeira e posicionados em micrótomo rotatório. Dezesesseis cortes histológicos seriados de cada bloco foram obtidos. Esses cortes foram colocados em lâminas de vidro e corados com reagente ácido periódico de Schiff, Hematoxolina e Eosina para avaliação dos eventos histológicos ocorridos em cada um dos grupos através de microscopia de luz (Zheis). Foram avaliados os seguintes aspectos: presença/ausência de fungo e infiltrado inflamatório, integridade do tecido epitelial e resposta do tecido conjuntivo subjacente. O material foi classificado por um único examinador, e os eventos histopatológicos observados na região da mucosa, para cada grupo experimental, foram descritos nos diferentes períodos de avaliação.

Marcação de estrutura 3D do tecido da língua recuperada e da MEC de *C. albicans*

Inicialmente as lâminas foram submetidas a desparafinização da seguinte forma: Xilol 30 minutos, Xilol 30 minutos, Álcool xilol 15 minutos, Álcool 99% 10 minutos, Álcool 90% 10 minutos, Álcool 70% 10 minutos, seguida de hidratação em água por 10 minutos. Para realização da recuperação antigênica por micro-ondas, as

lâminas foram imersas em tampão citrato (8,2mM, pH=6) e levadas ao micro-ondas intercalando as potências na seguinte sequência: potência 7 por 5 minutos; potência 3 por 1 minuto; potência 2 por 1 minuto; potência 3 por 1 minuto; potência 2 por 1 minuto e potência 3 por 1 minuto. Então, foi realizada a secagem das lâminas e os cortes foram circulados com caneta de barreira hidrofóbica (Sigma Advanced PAP Pen- Z377821). Sobre cada corte na lâmina desparafinizada foram adicionados 20 μ L do anticorpo primário selecionado (400-4) (Quadro 2) diluído em solução de albumina de soro bovino (ASB) a 2% e Tripton X100 a 0,1% (diluição 1:20). As lâminas foram incubadas por 18h (4°C) em ambiente úmido⁴. Após a incubação, os cortes foram lavados cuidadosamente com solução de NaCl 0,89% e foi adicionada solução de bloqueio (3% de ASB) seguida de incubação por 15 min (temperatura ambiente). Então, os cortes foram lavados novamente com solução de NaCl 0,89% e adicionou-se o anticorpo secundário (20 μ L) marcado com fluoróforo Texas Red-X Goat Anti-Mouse IgG H&L (T6390) (diluição 1:500 em ASB 2%) (Quadro 2) seguido de incubação por 2h (4°C). Passado o tempo de incubação do anticorpo secundário, os cortes foram lavados com NaCl 0,89% e incubados com 20 μ L de lectina concavalina-A conjugada com o fluoróforo tetrametilrodamina (200 μ g/mL) (Quadro 2) e HOESCHT (6 μ g/mL) (Quadro 2) durante 30 min⁴. A seguir, foi realizada a lavagem com NaCl 0,89%, fixação com lamínula e aquisição das imagens. As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio de fluorescência Leica DM2500 LED.

Quadro 2- Marcadores utilizados

Alvo de marcação	Nome marcador	Marca comercial
Polissacarídeo β -1-6-mannan	Concanavalina A (ConA) lecitina conjugada com tetrametilrodamina (488/520 nm)	Molecular Probes (Cat. No. C860)
DNA extracelular e núcleo do tecido	HOESCHT 33342	ABCAM Staining Staining Dye Solution (Cat. No. ab228551)
Polissacarídeo β -mannan e galactomanana	Anticorpo monoclonal primário para β -mannan e galactomanana-(1 $\rightarrow$ 4) - β -mannana (1 $\rightarrow$ 4)	Biosupplies, Australia Pty Ltd., Victoria, Australia (Cat. No. 400-4)
Anticorpo secundário contra o anticorpo primário	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (561/620 nm)	Abcam (Cat. No. ab175660)

Fonte: Elaboração própria.

Expressão de genes de *C. albicans* relacionados com a adesão ao substrato do hospedeiro (*EFG1* e *HWP1*), matriz extracelular (*BGL2* e *PHR1*) e estresse oxidativo (*SOD1*):

Extração de RNA das colônias recuperadas

Inicialmente, as colônias armazenadas em glicerol 50% recuperadas após os tratamentos foram submetidas ao método de extração de RNA fenol- clorofórmio.

Para a extração do RNA das colônias recuperadas dos camundongos, os tubos contendo as colônias e glicerol foram descongelados e o protocolo para Extração de RNA “fenol – clorofórmio” descrito por Cury et al.⁵ foi utilizado com algumas modificações conforme descrito a seguir:

a) Centrifugação dos tubos a 10,000 xg por 15 minutos a 4°C para que houvesse a formação do pellet e consequente descarte do sobrenadante para remoção do glicerol;

b) Lavagem do *pellet* com 600 µL de 1x PBS gelado;

c) Este tubo foi novamente lavado com 1 x PBS e centrifugado nas mesmas condições para que fosse realizada a segunda lavagem das células;

d) 750 µL de NAES [833 µL de Acetato de Sódio 3M (SIGMA Life Science) na concentração de 50 mM + 1 mL de 0.5 M EDTA (Ambion®) + 5 mL de Solução SDS (Ambion®) a 10% na concentração final de 1% + 43,167 ml de Água de grau Molecular] à temperatura ambiente foram adicionados à solução e o *pellet* foi ressuspensionado e vortexado por 15 segundos até formar uma suspensão homogênea;

e) Foram adicionados 750 µL de Ácido Fenol (5:1, pH 4,5, Ambion®) em cada tubo e esta solução foi homogeneizada;

f) A mistura foi transferida para um tubo de 2 mL contendo 0,8 g de bolinhas de vidro (Biospec Products) (0,1 mm) e este, depois de misturado, foi colocado no aparelho de ruptura mecânica das células (*BeadBeater*) por 1 minuto;

g) Após esse processo, as amostras foram colocadas em gelo por 1 minuto;

Observação: os passos “f” e “g” foram repetidos mais 5 vezes;

h) Estes tubos foram centrifugados a 10,000 xg por 5 minutos a 4°C e a parte aquosa da solução (onde se encontra o material genético) foi recuperada o máximo possível para um novo microtubo, o restante da reação (solução oleosa correspondente ao fenol e proteínas) foi descartado;

i) Em cada amostra foram adicionados mais 750µL de fenol ácido. O tubo foi invertido gentilmente, e estes foram deixados em temperatura ambiente por 1 minuto

(para que o fenol tivesse maior efetividade) e os tubos foram novamente centrifugados a 12,000 xg por 5 minutos a 4°C;

j) O tratamento com Fenol ácido (passo “i”) foi repetido mais uma vez;

k) A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 750 µL de solução 24:1 de clorofórmio: álcool Isoamílico (CHLO: 48 mL de Clorofórmio (SIGMA) + 2 mL de álcool isoamílico (SIGMA);

l) Este tubo foi invertido gentilmente e novamente centrifugado a 14,000 xg por 5 minutos a 4°C;

m) Após centrifugação a parte aquosa foi novamente removida para um novo tubo e esta já foi caracterizada como o RNA bruto;

n) Foram adicionados 60 µL de acetato de sódio 3M, pH 5, homogeneizados com o RNA bruto e posteriormente adicionados 600 µL de isopropanol gelado;

o) As amostras ficaram incubadas *overnight* em freezer -80°C;

p) Decorrido o tempo de incubação, o pellet do RNA foi recuperado por centrifugação dos tubos a 12,000 xg por 30 minutos a 4°C;

q) O pellet foi lavado 3 vezes com 500 µL de Álcool 75%(SIGMA), com centrifugações de 5 minutos nos intervalos das lavagens, e uma lavagem extra com álcool 99%(SIGMA) foi realizada no final para melhor secagem do *pellet*;

r) O excesso do álcool foi removido e os *pellets* foram deixados em temperatura ambiente sobre lenços de papel para que os *pellets* secassem;

s) Cada *pellet* seco foi então ressuspendido em 100 µL de H₂O de grau molecular e deixados em gelo por 1 hora para hidratação. A concentração do RNA bruto foi quantificada em nanoespectrofotômetro (1,25 µL da amostra) a 260nm.

As amostras de RNA bruto (250 ng do RNA por *slot*) foram analisadas via eletroforese em gel de agarose (2%) para verificar a integridade do RNA antes de passar para a etapa de Purificação do RNA.

Purificação do RNA

Para remoção de qualquer contaminação com DNA, utilizou-se o kit de purificação “*Qiagen Rneasy MinElute Protocol*” (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo metodologia proposta por Cury et al.⁵ e recomendação do fabricante.

Primeira etapa da purificação

Foi preparado uma solução contendo 10 μL de β -mercaptoetanol (SIGMA) para cada 1 mL do Buffer RLT (presente no Kit da *Qjagen RNeasy MinElute*). Assim iniciou-se o protocolo com os seguintes passos:

a) As amostras foram ajustadas para o volume de 100 μL utilizando água de grau molecular;

b) Adicionou-se alíquotas de 350 μL do Buffer RLT contendo o β -mercaptoethanol e as amostras foram vortexadas;

c) Em seguida, foram adicionados 250 μL de álcool 99% e a amostra foi misturada pela técnica de pipetagem (“*up and down*”);

d) 700 μL de cada amostra foram colocados em colunas individuais com membranas de purificação do kit *RNeasy MinElute* instaladas em tubos coletores de 2 mL. Estas foram centrifugadas a 12.000 $\times g$ por 15 segundos e o sobrenadante do tubo coletor foi descartado;

e) Foi preparado um *master mix* com os componentes: 50 μL de H_2O de grau molecular; 175 μL de Buffer RLT contendo β -mercaptoetanol; e 125 μL de álcool 99% para cada amostra. Este *master mix* foi colocado sobre a membrana de purificação e esta foi novamente centrifugada em velocidade máxima por 15 segundos. O volume no tubo coletor foi descartado;

f) Posteriormente, foram adicionados 350 μL de Buffer RW1 (presente no kit da *Qjagen*) à coluna e esta foi novamente centrifugada em máxima velocidade por 15 segundos. O volume no tubo coletor foi descartado e um novo tubo coletor foi colocado sob a coluna de purificação;

g) Uma mistura de 10 μL de DNase I solução estoque com 70 μL de Buffer RDD (presente no kit da *Qjagen*) foi colocada sobre a coluna de purificação (com a amostra) e esta foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente;

h) Decorrido este período, foram adicionados 500 μL de Buffer RPE (presente no kit da *Qjagen*) sobre a coluna de purificação e as amostras foram centrifugadas por 15 segundos em velocidade máxima. O volume no tubo coletor foi descartado;

i) Foram adicionados 500 μL de Álcool 75 % sobre a amostra fixada na membrana da coluna de purificação e esta foi centrifugada por 2 minutos em velocidade máxima para secar a membrana de purificação;

j) O volume no tubo coletor foi descartado e a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos em velocidade máxima para que a membrana de purificação fosse seca;

k) O tubo coletor foi descartado e a coluna de purificação foi transferida para um microtubo novo;

l) Para eluição adiciona-se 20 µL de H₂O de grau molecular sobre o centro da coluna de purificação (atentando-se para que a água recobrisse toda a membrana) e as amostras foram novamente centrifugadas por 60 segundos em velocidade máxima. O eluente foi então armazenado com o RNA resultando da primeira etapa de purificação;

m) A quantidade de RNA e a pureza da amostra foram analisadas por nanoespectrofotômetro (DO 260 nm e Razão DO 260/280) utilizando 1,25 µL da amostra. Leitura foi realizada em duplicata.

Segunda etapa da purificação: tratamento com DNase I em solução

As amostras no volume de 100 µL foram incubadas com a enzima Turbo DNase (Ambion) com o equivalente a 2 µL da enzima para cada 10 µg de RNA. A incubação foi realizada em banho seco na temperatura de 37°C por 30 minutos. Após este tratamento, as amostras foram imediatamente submetidas à terceira etapa da purificação que consiste na remoção dessa enzima através de colunas do kit de purificação *RNeasy MinElute clean-up kit* (Qiagen).

Terceira etapa de purificação

a) À cada amostra, foi adicionado alíquotas de 350 µL do Buffer RLT contendo o β-mercaptoetanol e as amostras foram vortexadas;

b) Em seguida, foram adicionados 250 µL de álcool 99% e a amostra foi misturada pela técnica de pipetagem (*“up and down”*);

c) O volume de 700 µL da amostra foi colocado nas membranas de purificação do kit *RNeasy MinElute* instaladas em tubos coletores de 2 mL. Estas foram centrifugadas em velocidade máxima por 15 segundos e o volume no tubo coletor foi descartado;

d) Foram adicionados 500 µL de Buffer RPE sobre a coluna de purificação e as amostras foram centrifugadas por 15 segundos em velocidade máxima. O volume no tubo coletor foi descartado;

e) Foram adicionados 500 µL de etanol 75% sobre a amostra fixada na membrana da coluna de purificação e esta foi centrifugada por 2 minutos em velocidade máxima para secar a membrana de purificação;

f) O volume no tubo coletor foi descartado e a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos em velocidade máxima para que a membrana de purificação fosse seca;

g) O tubo coletor foi descartado e a coluna de purificação foi transferida para um novo microtubo;

h) Foram adicionados 20 µL de H₂O de grau molecular sobre o centro da coluna de purificação (atentando-se para que a água recobrisse toda a membrana) e as amostras foram novamente centrifugadas por 60 segundos em velocidade máxima. O eluente foi então armazenado com o RNA puro;

i) A quantidade de RNA e a pureza da amostra foram analisadas por nanoespectrofotômetro (DO 260 nm e Razão DO 260/280) utilizando 1,25 µL da amostra. Leitura em duplicata.

j) As amostras foram submetidas a técnica de eletroforese em gel de agarose (2%) para analisar integridade e ausência de DNA. Foi utilizado 0,250 µg do total do RNA para cada canaleta.

Síntese de cDNA

O cDNA será sintetizado a partir do RNA extraído e purificado de cada grupo experimental que tenha apresentado rendimento igual ou superior a 3,5 µg. Será utilizado o kit *Bio-Rad iScript cDNA Synthesis (BIO-RAD)*. Em um tubo estéril, serão pipetados os seguintes componentes:

- Água de grau molecular-volume variado dependendo do volume de RNA;
- 4µL 5 X iScript Rxn mix;
- 1µL Reverse Transcriptase;
- 1µg de RNA.

Esses volumes de reagentes deverão ser suficientes para realização do cDNA em duplicata (2 tubos de RT+). É necessário preparar um controle negativo (RT-), os mesmos componentes acima serão usados, exceto a Transcriptase Reversa, seu volume é substituído por Água de grau molecular. O RT- revela se houve contaminação da amostra com DNA.

O ciclo para conversão de RNA em cDNA foi realizado usando a PCR Machine (CFX96-Bio-Rad), com as seguintes condições:

- 5 min a 25°C;
- 20 min a 46°C;
- 1 min a 95°C;
- ∞ hold a 4°C.

Após o término do ciclo, as amostras serão armazenadas em freezer -20°C até a sua utilização para o teste de qPCR.

Quantificação da expressão gênica utilizando RT-qPCR

O cDNA será amplificado com os *primers* descritos abaixo. Esses *primers* foram previamente padronizados por Alonso et al.⁵³, Lobo et al.⁵⁴ e Zhu et al.⁵⁵.

Para as reações de qPCR, deveremos nos basear na concentração ótima de cada *primer* utilizado, para selecionarmos o volume de cada componente para o *Master Mix*. No Quadro 3 estão descritas as concentrações ótimas dos *primers* a serem utilizados no presente estudo.

Quadro 3- Características dos primers a serem utilizados para análise da expressão gênica

Gene	Primers	T _m (°C) Ciclo qPCR	[] ótima (nM)	Referência
EFG1	F - ACGAGTAACAACCTACCAT	50	350	Alonso et al. ⁵³
	R – TATCTGCTCTTCTGACAA			
HWP1	F – CTCCAAAATCATCAGCTC	55	300	
	R - CACTAGCCAAAACAGAAG			
	R - CCCTGTTCAAAGTATCTAT			
BGL2	F - ATGGGTGATTTGGCTTTCAA	62	350	Lobo et al. ⁵⁴
	R - CAGCTGGACCAAGGTTTTGT			
PHR1	F –GGTTTGTTCTGGTTGATGG	62	350	
	R –AGCAGCAGTTCCTGGACATT			
SOD1	F - TTGAACAAGAATCCGAATCC	60	400	Zhu et al. ⁵⁵
	R – AGCCAATGACACCACAAGCAG			

Temperatura de anelamento (T_m)

Fonte: Elaboração própria.

Exemplo: Volumes de reagentes utilizados para o *primer HWP1* (concentração ótima de 300nM).

- 11,25 µL de Água de grau molecular
- 12,5 µL 2 X SYBR Green Supermix
- 0,750 µL *Primer mix* 10 µM
- 0,5 µL da amostra.

Calcula-se a quantidade necessária de componentes, multiplicando o número de poços utilizados por 1,4, para que se tenha um volume “residual”. Serão aliquotados 61,25 µL desse *master mix* em tubinhos contendo 1,25 µL do *template* [cDNA dos diferentes grupos ou H₂O (NTC – *no template control*)] e esta solução será distribuída em duplicata na placa para qPCR (25µL por poço). O ciclo térmico da máquina de qPCR (CFX 96 (Bio-Rad)) será:

Ciclo 1: 95°C por 10 minutos (ciclo de desnaturação inicial);

Ciclo 2: 94°C por 15 segundos (desnaturação);

Temperatura de anelamento de cada *primer* por 30 segundos;

68°C por 15 segundos (ciclo de polimerização);

Repetir Ciclo 2 por 39 vezes.

Melt Curve: 55°C por 5 segundos;

95°C

O resultado foi analisado no programa *Bio-Rad CFX Manager™ Software* (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA).

Quantificação de proteínas

Previamente ao ensaio de citometria de fluxo, foi realizada a quantificação das proteínas. Para isso, três fragmentos (de cada grupo experimental) das línguas recuperadas foram unidos e lisados com tampão de lise. O sobrenadante foi recuperado em novo tubo. Foram utilizados 5 µL desse sobrenadante para determinar a quantidade de proteínas solúveis usando o método de Bradford⁸. Esse método é baseado na adsorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250. Para isso, foram realizadas diluições seriadas de albumina de soro bovino (BSA) para obtenção de uma curva padrão, conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4 – Valores para a curva padrão do teste de quantificação de proteínas pelo método de Bradford

BSA mg/mL	Volume de BSA a 2 mg/mL	Volume de água
0	0	1mL
0,1	50 µL	950
0,2	100 µL	900 µL
0,4	200 µL	800 µL
0,6	300 µL	700 µL
0,8	400 µL	600 µL
1,0	500 µL	500 µL
1,2	600 µL	400 µL
1,4	700 µL	300 µL

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, em uma placa de 96 poços, foram adicionadas alíquotas de 5 µL, em triplicata, para cada ponto da curva e para cada amostra a ser analisada. Após, foi adicionado 250 µL do reagente de Bradford e a placa foi incubada por 5 minutos sobre a bancada. Em seguida, as respectivas absorbâncias (595 nm) foram determinadas em leitor espectrofotométrico de placas. Os dados das amostras foram convertidos em concentrações de proteínas, usando a equação da reta gerada (inclinação 0.020 -0.026; R^2 próximo de 1). As amostras foram normalizadas a uma concentração de 1 mg/mL de proteína total para serem utilizadas nos ensaios de citometria de fluxo.

Citometria de Fluxo para avaliação de citocinas

Para detecção de citocinas (IL-6, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , proteína IL-12p-70 e IL-10), foi utilizado o ensaio citométrico de esferas com o kit “BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation” seguindo as recomendações do fabricante

(https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/products/global/reagents/immunoassay-reagents/cba/cba-kits/552364_base/pdf/23-12720.pdf). Os padrões de citocinas inflamatórias do camundongo liofilizados foram reconstituídos com 2 ml do diluente (presente no kit). Em seguida, foi realizada a diluição seriada até a concentração de 1:256. O controle negativo foi preparado utilizando apenas o diluente. Em seguida, foi preparada uma mistura com as “Beads” de captura do kit. Na citometria, 50 µl das Beads de captura foram adicionadas aos tubos devidamente identificados com os pontos da curva padrão (de 1:2 até 1:256) e as amostras. Em seguida, 50 µl do reagente de detecção de citocinas inflamatórias do camundongo (presente no kit) foram adicionados a todos os tubos, que foram incubados em temperatura ambiente e protegidos da luz. Após 2 h, 1 ml de tampão de lavagem foi adicionado a cada tubo que foram submetidos a centrifugação (200 xg/ 5 min). O sobrenadante de cada tubo foi descartado e 300 µl do tampão de lavagem foram adicionados aos tubos. As amostras foram processadas no citômetro de fluxo BD FACSAria™. Os dados foram analisados com o software FCAP Array v 3.1.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. 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.
3. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. Microbiol Immunol. 2003; 47(5): 321–6.
4. Lobo CIV, Rinaldi TB, Christiano CMS, De Sales Leite L, Barbugli PA, Klein MI. Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. J Oral Microbiol. 2019; 11(1): 1581520.
5. 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.
6. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. PLoS One. 2011; 6(12): e28830.

7. Alonso GC, Pavarina AC, Sousa TV, Klein MI. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. J Microbiol Methods. 2018; 147: 1-13.
8. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 7(72): 248-54.

ANEXO A – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada *"AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ASSOCIADA A DNASE NO TRATAMENTO DE CANDIDOSE ORAL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CANDIDA ALBICANS"* registrada com o nº **09/2020**, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Ana Claudia Pavarina** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 25/11/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro/2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo - Swiss Mice
Nº de animais	180
Peso/Idade	30 gramas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Araraquara


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

Não autorizo a publicação deste trabalho até 15/03/2026

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 15 de março de 2024.

Cláudia Carolina Jordão