

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/06/2023.



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



César Augusto Abreu Pereira

**Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes
de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol**

Araraquara

2021



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



César Augusto Abreu Pereira

Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), para o exame de defesa visando a obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Claudia Pavarina
Coorientadora: Prof. Dra. Marlise Klein Furlan

Araraquara

2021

P436a

Pereira, César Augusto Abreu

Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol / César Augusto Abreu Pereira. -- Araraquara, 2021
105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Ana Claudia Pavarina

Coorientadora: Marlise Inez Klein Furlan

1. Fotoquimioterapia. 2. *Candida albicans*. 3. Resistência antifúngica a fármacos. I. Título.

César Augusto Abreu Pereira

Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol

Comissão Avaliadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Profa Dra Ana Claudia Pavarina

2º Examinador Profa Dra Fernanda Lourenção Brighenti

3º Examinador Profa Dra Natalia Mayumi Inada

Araraquara, 30 de junho de 2021.

DADOS CURRICULARES

César Augusto Abreu Pereira

Nascimento: 16/09/1994 – São Luís – Maranhão.

FILIAÇÃO: Elismar Abreu Pereira
Vicente Muniz Pereira Filho.

2013 - 2018 – Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

2014-2016 – Bolsista no projeto de extensão “Promoção de Saúde Bucal às Gestantes da Maternidade”.

2015 – Bolsista PIBIC-V no projeto “Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de óleo essencial extraído da *Citrus bergamia* risso em modelo animal de osteoartrite”.

2016 – Bolsista PIBIC-V no projeto “Avaliação de um método de estimativa de idade pela mineralização dentária dos terceiros molares”.

2016-2018 – Iniciação Científica na disciplina de Periodontia.

2019 – Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II.

2019-2021 – Pós- graduação em Reabilitação Oral em andamento, nível mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, a Ele toda honra e toda glória! Essa jornada só foi possível graças aos seus planos e a sua infinita bondade. **“O que é nascido de Deus vence o mundo; e esta é a vitória que vence o mundo: a nossa fé”** (1 João 5:4).

Aos meus amados pais, **Vicente e Elismar**, por todos os ensinamentos, incentivo aos estudos, apoio nos meus mais altos voos e por todo amor que foi incutido em mim durante toda a vida. Sem vocês essa conquista não teria o mesmo sabor e importância, pois é para vocês que dedico esse título.

Agradeço também à minha irmã **Tanuza Abreu** e ao meu querido e amado sobrinho **Pedro Ryan** por acreditarem no meu sucesso profissional, por todo amor distribuído durante esses 2 anos em que estive distante geograficamente. Vocês me deram forças para continuar minha jornada!

A minha tia **Maria da Conceição** e a minha prima querida **Thaynan Abreu** por todo apoio e suporte. Obrigado por acreditar e torcer junto comigo nas minhas conquistas.

Agradeço também a todos os membros das famílias **Rêgo Abreu e Borges Pereira** por serem tão queridos e por sempre torcerem por cada vitória minha.

Agradeço especialmente a minha orientadora **Prof Ana Claudia Pavarina** por acreditar em mim e na seriedade do meu trabalho. Poder trabalhar com uma profissional tão admirável me enche de orgulho e satisfação. Obrigado por todo carinho, profissionalismo, atenção e ensinamentos repassados, sem a sua orientação este trabalho não teria a mesma qualidade e importância. Serei eternamente grato por ter tido a oportunidade de realizar o mestrado com a presença de uma orientadora extremamente compreensível e amorosa. **“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”** (Isaac Newton).

Agradeço imensamente a minha coorientadora **Prof Marlize Inês Klein Furlan** por todo suporte e paciência em ensinar algo que, até então, era novo para mim. Aprender sobre biofilmes e metodologias de avaliação me tornaram um pesquisador mais consistente. Obrigado de todo coração por todo ensinamento transmitido. Este trabalho também é reflexo da sua dedicação pela ciência.

À minha querida aluna de Iniciação Científica, companheira de pesquisa e grande amiga **Ana Luiza Gorayb Pereira** por estar sempre ao meu lado, por dividir o cansaço, a ansiedade, as alegrias e as conquistas ao longo destes 2 anos. Gratidão por ter alguém tão especial ao meu lado nesta jornada. Poder contar com uma amiga tão querida foi muito importante para que esse trabalho fosse realizado com leveza e de forma prazerosa. Este trabalho é só o primeiro de muitos outros que ainda virão! **“Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolvermos em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos”** (Sócrates).

À queridíssima **Claudia Carolina Jordão** por todo companheirismo, ensinamentos, auxílios e conselhos. Uma grata surpresa que a FOAr me presenteou. Obrigado pelos risos e por todo carinho que você distribui por onde passa. Sou seu admirador tanto pelo perfil profissional quanto pela postura pessoal, tão condizente com tudo aquilo que acredito. Desejo muito sucesso e voos cada vez mais altos, pois você faz por merecer cada conquista realizada.

À querida **Prof Juliana Álvares Duarte Bonini Campos** por me mostrar a maravilha que é o mundo da estatística. Agradeço por toda atenção, carinho e zelo. A sua postura enquanto professora,

mulher e ser humano é admirável e me sinto muito grato por ter tido a oportunidade de conhecê-la e aprender, acima de tudo, sobre a vida. Estou certo de que aprendi e ainda aprenderei valiosas lições que levarei por toda a vida. **“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”** (Cora Coralina).

À Professora e amiga **Rosana Costa Casanovas** por incentivar meu crescimento acadêmico, por continuar sempre presente, apesar da distância física, em todos os momentos dessa caminhada. Agradeço imensamente por todas as oportunidades confiadas a mim, por todos os projetos e artigos que desenvolvemos juntos nestes últimos dois anos. Sua contribuição para minha formação profissional e pessoal é imensurável, visto a grandeza de dimensão que ela possui. A base de toda conquista é o professor! **“Ouça conselhos e aceite instruções, e acabará sendo sábio”** (Provérbios 19:20).

À **Lucas Arrais de Campos** por toda paciência, atenção e colaboração no desenvolvimento da análise estatística deste trabalho. Obrigado por tanto!

À **Prof Livia Nordi Dovigo** por todas as considerações para este trabalho nas etapas de pré-qualificação e qualificação. Agradeço ainda pelos ensinamentos estatísticos repassados durante a disciplina prática. Obrigado também por estar sempre disponível em elucidar minhas dúvidas deste universo tão rico que é o estatístico.

Aos professores do **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese** por todo ensinamento transmitido e que contribuíram de forma substancial para a minha formação profissional.

Agradeço também aos membros da banca avaliadora, **Prof Fernanda Lourenção Brighenti** e **Prof Natalia Mayumi Inada**, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho. Muito obrigado!

Agradeço a **Camyla Pereira Jansen** por ser fundamental para que este sonho se realizasse. Obrigado por entender a minha necessidade por mais conhecimento, por acreditar na seriedade e dedicação do meu trabalho, por toda ajuda financeira e por todo carinho e amor que você transmite para mim. Agradeço a Deus todos os dias pela sua vida! **“Rico, de fato, não é aquele que tem, mas aquele que dá”** (João Paulo II).

Aos amigos da minha turma de mestrado, por todo companheirismo e amizade ao longo desta caminhada, especialmente à **Marina Mantovani, Fernanda Kitagawa, Amanda Brandão, Bruno Mascaro, Marlon Eduardo, Amanda Ferro, Thais Santana, Suellen Pedrosa, Maydson Meneses, Igor Paulino, Mariana Baldochi, Isabela Souza e Juliana Padilha**.

Aos amigos de pós-graduação por toda amizade e momentos vividos dentro e fora da faculdade, especialmente à **Jessica Katarine Abreu Silva** por ser tão querida, atenciosa e por sempre ter a palavra certa, ao querido **Lucas Portela Oliveira** por toda ajuda e disponibilidade em transmitir ensinamentos, à **Amanda Bellini** por todo companheirismo e risadas, e à **Carmélia Isabel Lobo, Guilherme Rocha e Elkin Flores** por toda ajuda nos experimentos realizados no **Laboratório de Biologia Molecular – BIOMOL** e no **Laboratório de Microbiologia Aplicada**.

Aos amigos da **Cobertura (CBT)** por me adotarem, por todo carinho e atenção ao longo desse caminho. Vocês foram essenciais para que essa jornada fosse realizada de forma mais divertida e especial.

À **Prefeitura Municipal de Cajari – MA** (gestão 2016-2020) por todo apoio para que eu pudesse concretizar essa etapa de forma digna e confortável.

Aos meus amigos do Maranhão por entenderem a minha ausência e por vibrarem por cada conquista minha, em especial à **Beatriz Nogueira, Celso Afonso Rodrigues, Rodolfo Rêgo, Vinicius Ahid, Giuliana Santos e Isadora, Maurício Viana, Julyana Cunha, Lídia Machado, Glenda Serra, Priscila Santos, Gabriel Magalhães, Deborah Pinheiro e Nicole Veras.**

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP** por promover o conhecimento e abrir as portas para que pesquisas tão necessárias sejam realizadas com condições adequadas para que possamos devolver à comunidade científica resultados confiáveis. Agradeço todos os funcionários que fazem parte dessa grande instituição.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/11602-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

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

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

*Só mesmo o tempo pode revelar
O lado oculto das coisas
O que se foi e o que não passará
Inesquecíveis sensações
Que sempre vão ficar pra nos fazer lembrar
Dos sonhos, tantos momentos bons...*

Pereira CAA. Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) promove a inativação dos microrganismos em cultura planctônica, entretanto, biofilmes são menos sensíveis à essa terapia. A resistência dos biofilmes de *Candida spp.* é multifatorial e está associada ao efeito protetor da matriz extracelular do biofilme (MEC) que impede a penetração do agente fotossensibilizador (FS) e de fármacos. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da enzima DNase I associada à TFD, mediada por Photodithazine® (200 mg/L) e Luz LED (660 nm; 50 J/cm²), sobre biofilmes de isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (CaR). Biofilmes de 48 horas foram formados a partir das cepas de CaR [ATCC 96901; e dois isolados clínicos (R14 e R70)]. A DNase foi utilizada com objetivo de degradar a MEC dos biofilmes e potencializar o efeito da TFD. Os biofilmes foram expostos a pré-incubação com DNase por 5 min, seguida da aplicação do fotossensibilizador (P) e da Luz (L), de forma isolada ou em associação, originando 8 grupos de tratamento (P+L+, P-L+, P+L-, P-L-, P-L-DNase, P+L+DNase, P+L-DNase e P-L+DNase; n=12). A eficácia dos tratamentos foi avaliada através dos seguintes métodos: contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), quantificação de: peso seco total e insolúvel, proteínas solúveis e insolúveis, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e em álcali (ASP), e DNA extracelular (eDNA). Os dados foram submetidos ao teste ANOVA three-way com pós teste de Bonferroni. O tratamento com DNase em associação à TFD (P+L+DNase) apresentou redução de 1.92; 1.65 e 1.29 em log₁₀ da viabilidade celular para as cepas ATCC 96901, R14 e R70, respectivamente. Também foi observado redução dos componentes da MEC dos biofilmes, como WSP e eDNA, bem como sua biomassa insolúvel quando comparados com o grupo controle (P-L-). O peso seco total e a quantificação de proteínas não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Todas as cepas apresentaram o mesmo padrão de comportamento quando tratadas com DNase, e os componentes da MEC foram afetados, potencializando a eficácia da TFD.

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. *Candida albicans*. Resistência antifúngica a fármacos.

Pereira CAA. Evaluation of the effectiveness of Dnase associated with photodynamic therapy in inactivating biofilms from clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy (PDT) promotes microorganisms' inactivation in planktonic cultures; however, the same effect does not occur in biofilms. The resistance of *Candida spp.* biofilms is multifactorial and it has been associated to the protective effect of biofilm's matrix extracellular (MEC) that prevents the penetration of photosensitizing agent (PA) and drugs. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of DNase I enzyme associated with PDT, mediated to Photodithazine® (200 mg/L) and LED light (660 nm; 50 J/cm²), on biofilms of fluconazole-resistant *C. albicans*' clinical isolates (CaR). 48h-old biofilms were formed from the strains of CaR [ATCC96901; and two clinical isolates (R14 and R70)]. DNase was used in the aim of degrading the MEC of the biofilms and potentializing the effect of PDT. Biofilms were exposed to pre-incubation with DNase for 5 minutes, followed by photosensitizer application (P) and the light (L), either in isolated or associated form, giving rise for 8 groups of treatment (P+L+, P-L+, P+L-, P-L-, P-L-DNase, P+L+DNase, P+L-DNase and P-L+DNase; n=12). The effectiveness of treatments was evaluated through the following methods: colony forming unit (CFU) counting, quantification of: total and insoluble dry-weight, soluble and insoluble proteins, water-soluble polysaccharides from (WSP) and alkali-soluble polysaccharides (ASP), and extracellular DNA (eDNA). The data were analyzed by three-way ANOVA test with Bonferroni's post-test. The DNase treatment associated with PDT (P+L+DNase) showed a reduction of 1.92; 1.65 e 1.29 in log₁₀ of cell viability to ATCC 96901, R14 and R70 strains, respectively. It was also noticed a reduction of biofilms MEC's components, like WSP and eDNA, as well as its insoluble biomass when it's been compared with control group (P-L-). The total dry-weight and the proteins quantification showed no statistical difference between treatments. All of the strains showed the same standard behavior when treating with DNase, and MEC's components were affected, improving PDT's effectiveness.

Keywords: Photochemotherapy. *Candida albicans*. Antifungal drug resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO.....	16
2.1 Proposição Geral.....	16
2.2 Proposições Específicas.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Biofilmes de <i>C. albicans</i>.....	17
3.2 Resistência Antifúngica.....	23
3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	30
3.4 Utilização de Enzimas para Degradar a Matriz do Biofilme.....	45
4 MATERIAL E MÉTODO	50
4.1 Material.....	50
4.1.1 Materiais de consumo.....	50
4.1.2 Instrumentais.....	51
4.1.3 Equipamentos.....	51
4.2 Método.....	52
4.2.1 Determinação da curva de crescimento dos microrganismos.....	52
4.2.2 Análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados clínicos.....	53
4.2.3 Formação dos biofilmes de <i>C. albicans</i> resistentes ao fluconazol (ATCC e isolados clínicos)	54
4.2.4 Realização dos tratamentos.....	55
4.2.4.1 Preparo da enzima DNase.....	55
4.2.4.2 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	55
4.2.4.3 Realização dos tratamentos.....	56
4.2.5 Avaliação da eficácia dos tratamentos.....	57
4.2.5.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	57
4.2.5.2 Análise do peso seco.....	58
4.2.5.2.1 Peso seco total	58
4.2.5.3 Quantificação de proteínas.....	58
4.2.5.3.1 Solúveis.....	58
4.2.5.3.2 Insolúveis.....	59
4.2.5.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	59
4.2.5.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP).....	60

4.2.5.5.1 Peso seco insolúvel	60
4.2.5.6 Análise de eDNA.....	62
4.2.6 Análise estatística.....	63
4.2.6.1 Variáveis de estudo.....	63
4.2.6.2 Tabulação e organização dos dados.....	63
4.2.6.3 Testes estatísticos.....	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Cepa ATCC 96901.....	66
5.1.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	66
5.1.2 Análise do peso	66
5.1.2.1 Peso seco total.....	66
5.1.2.2 Peso seco insolúvel.....	67
5.1.3 Análise de proteínas.....	67
5.1.3.1 Proteínas totais.....	67
5.1.3.2 Proteínas insolúveis	67
5.1.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	67
5.1.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP).....	68
5.1.6 Análise de eDNA.....	68
5.2 Isolado Clínico R14.....	70
5.2.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	70
5.2.2 Análise do peso	70
5.2.2.1 Peso seco total.....	70
5.2.2.2 Peso seco insolúvel.....	70
5.2.3 Análise de proteínas.....	71
5.2.3.1 Proteínas totais.....	71
5.2.3.2 Proteínas insolúveis	71
5.2.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	71
5.2.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP).....	71
5.2.6 Análise de eDNA.....	71
5.3 Isolado Clínico R70.....	73
5.3.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	73
5.3.2 Análise do peso	73
5.3.2.1 Peso seco total.....	73
5.3.2.2 Peso seco insolúvel.....	73

5.3.3 Análise de proteínas.....	74
5.3.3.1 Proteínas totais.....	74
5.3.3.2 Proteínas insolúveis	74
5.3.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	74
5.3.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP).....	74
5.3.6 Análise de eDNA.....	74
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE A – TESTES ESTATÍSTICOS.....	94

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é uma das espécies mais prevalentes e patogênicas da cavidade oral humana, ela tem sido associada a manifestações clínicas de infecção que variam desde lesões mucocutâneas superficiais, como Candidose Orofaríngea (OPC), até formas disseminadas da infecção^{1,2}.

As infecções causadas por *Candida spp.* são frequentemente associadas ao biofilme, que é uma microestrutura complexa de células microbianas aderidas a uma superfície e incorporadas dentro de uma matriz extracelular (MEC), composta de substâncias derivadas de lise celular ou produzidas e secretadas pelas células microbianas³. A MEC contribui para a preservação de biofilmes e para manutenção das interações estáveis entre célula-célula, célula-superfície e com o meio ambiente⁴.

Além do efeito protetor da MEC realizado pelas β -glucanas, foi demonstrado que o DNA extracelular (eDNA) é um componente decisivo da MEC do biofilme de *C. albicans*, contribuindo para a integridade estrutural do mesmo⁹. A evidência para o papel do eDNA como um componente estrutural da MEC do biofilme bacteriano surgiu a partir de estudos que mostram que o eDNA é necessário nos estágios iniciais da formação do biofilme^{10,11}. Além disso, estudos independentes que avaliaram o DNA exógeno e o efeito da DNase na susceptibilidade antimicrobiana de biofilmes^{11,12} verificaram uma associação entre eDNA e o aumento da resistência microbiana aos antibióticos⁵⁻⁸.

Para tratamento da OPC são utilizados os antifúngicos poliênicos, azóis e equinocandinas¹³. Dentre os medicamentos tópicos, a Nistatina tem se mostrado eficaz no alívio dos sinais e sintomas clínicos da doença, entretanto, muitas vezes não inativam completamente as espécies de *Candida*, uma vez que os efeitos diluentes da saliva e movimentos da musculatura bucal normalmente reduzem a dose desses agentes a concentrações sub-terapêuticas, reduzindo a eficácia deste medicamento¹. A prescrição de antifúngicos sistêmicos (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) é realizada para indivíduos com saúde geral comprometida e em episódios de infecções recorrentes¹⁴. Porém, é relatada a ocorrência de efeitos hepatotóxicos ou nefrotóxicos com a utilização desses medicamentos¹. Além disso, a utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC pode contribuir no desenvolvimento de resistência em espécies de *Candida*¹⁵.

A resistência antifúngica pode ser definida como a persistência ou a progressão de uma infecção após aplicação do tratamento antimicrobiano¹⁵. Algumas espécies de

Candida possuem resistência intrínseca aos medicamentos antifúngicos, especialmente ao fluconazol¹⁶. Sendo assim, uma das principais preocupações com a formação de biofilmes de *Candida* spp. é o fato de que suas células podem apresentar sensibilidade reduzida contra azóis e poliênicos, devido ao desenvolvimento de resistência¹⁷.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento utilizada no combate ao câncer, e para a inativação de microrganismos¹⁸. 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 oxigênio¹⁹. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz de comprimento de onda adequado deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de provocar a inativação celular¹⁸, ocorrendo a transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), permitindo a produção de espécies reativas de oxigênio¹⁸. Dessa forma, qualquer macromolécula celular pode ser considerada como alvo para a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) e como o FS é aplicado externamente à célula, a membrana celular é considerado o alvo inicial¹⁹.

Os FSs mais utilizados na TFD são predominantemente das famílias das porfirinas²⁰ e das fenotiazinas²¹. Entretanto, uma nova classe de FS vem sendo empregada na TFD, os FSs de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região vermelha (625-740 nm) do espectro fotomagnético. O Photodithazine ® (PDZ) é uma clorina e6 solúvel em água e utilizada com sucesso na TFD contra o câncer, devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete²².

A TFD mediada pelo PDZ promoveu redução significativa na viabilidade de culturas planctônicas de *C. tropicalis* e *C. glabrata* enquanto cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após a TFD. Quando avaliado o biofilme, TFD promoveu redução na viabilidade celular equivalente a 0.9 log₁₀ (UFC/mL) para *C. albicans* e 1.4 e 1.5 log₁₀ (UFC/mL) para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente²⁰. Outro estudo, utilizando modelo murino de candidose, avaliou a eficácia da TFD, mediada pelo PDZ e Luz LED na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol (ATCC e isolados clínicos)²³. Os resultados demonstraram que a TFD promoveu redução na ordem de 1.15 a 1.96 log₁₀, dependendo da cepa avaliada (R15, ATCC 96901,

respectivamente), enquanto em outra cepa (R10) não houve decréscimo na quantidade de UFC, portanto foi menos sensível à TFD.

A resistência dos biofilmes de *Candida spp.* é multifatorial e está associada a fatores como o estado fisiológico das células, a ativação de bombas de efluxo de fármacos²⁴ e o efeito protetor da MEC do biofilme realizado pelas β -glucanas, que se ligam ao fluconazol²⁵ e à anfotericina B, impedindo a penetração de fármacos no biofilme¹⁶. A utilização de enzimas pode degradar a matriz do biofilme de cepas de *Candida* susceptível a fluconazol^{26,27}, uma vez que o tratamento de biofilmes maduros com 50 μ g/mL de DNase resultou numa diminuição de 30% de biomassa de biofilme, de forma semelhante à observada para os tratamentos com proteinase K². A incubação de biofilmes maduros de 48 h de cepas susceptíveis e resistentes ao fluconazol por 5 minutos com diferentes enzimas hidrolíticas (Dextranase, β -glucanase e DNase), sozinhas ou em associação, evidenciou que a enzima DNase apresentou o melhor resultado, reduzindo significativamente o eDNA e proteínas solúveis da matriz de ambas as cepas; e polissacarídeos solúveis em água (WSP) da matriz *C. albicans* resistente (CaR)²⁸. A redução da proteína solúvel e do teor de WSP pela DNase indica que esses componentes da matriz podem estar entrelaçados com o eDNA⁷. Neste mesmo estudo, biofilmes de 48h de cepa susceptível (ATCC 90028) foram incubados com DNase por 5 min, seguido de incubação com PDZ por 20 min e exposição à Luz LED (660 nm, 50 J/cm²). Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com DNase permitiu a penetração do PDZ em camadas mais profundas de biofilme, conseqüentemente, o efeito da TFD foi potencializado, demonstrando uma redução significativa da viabilidade celular e da quantidade de eDNA da matriz do biofilme. Dessa forma, a DNase afetou a composição da matriz melhorando a penetração do fotossensibilizador e a eficácia da TFD.

Com base nos resultados deste estudo, julga-se oportuno avaliar se a aplicação da enzima DNase poderia potencializar a ação da TFD em biofilmes de cepas resistentes, melhorando a eficácia da terapia. Além disso, para aumentar a relevância do estudo e a abrangência dos resultados obtidos, serão avaliadas outras duas cepas que são isolados clínicos também resistentes ao fluconazol.

7 CONCLUSÃO

1. A enzima DNase interferiu nos componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *C. albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 96901 e dos isolados clínicos R14 e R70), potencializando o efeito antimicrobiano da TFD;
2. A viabilidade celular dos biofilmes das cepas avaliadas foi reduzida quando a enzima DNase foi combinada com TFD;
3. A exposição dos biofilmes à enzima DNase seguida de TFD reduziu o eDNA, o WSP e o peso seco insolúvel dos biofilmes das três cepas avaliadas;
4. O peso seco total, as proteínas solúveis e insolúveis e a quantidade de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP) apresentaram valores semelhantes independente do tipo de tratamento realizado.

REFERÊNCIAS*

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002;78(922):455-9.
2. Eggimann 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. 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.
4. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*. 2007;189(22):7945-7.
5. Martins J da S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(1):71-7.
6. 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.
7. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathog*. 2016;12(9): e1005828.
8. 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 (2):303-9.
9. 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(8):999-1008.

* 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>

10. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(2):470-6.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent.* 2005;93(3):288-93.
15. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(2):73-85.
16. Tsai HF, Sammons LR, Zhang X, Suffis SD, Su Q, Myers TG, et al. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(8):3308-17.
17. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ; SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):852-6.
18. Hamblin MR, Abrahamse H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? *Drug Dev Res.* 2019;80(1):48-67.

19. Hamblin MR, Abrahamse H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? *Drug Dev Res.* 2019;80(1):48-67.
20. 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.
21. Junqueira JC, Martins Jda S, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):877-84.
22. Banfi S, Caruso E, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem.* 2004;12(18):4853-60.
23. 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.
24. 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.
25. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):510-20.
26. Farisa Banu S, Thamotharan S, Gowrishankar S, Karutha Pandian S, Nithyanand P. Marine bacterial DNase curtails virulence and disrupts biofilms of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species. *Biofouling.* 2019;35(9):975-85.
27. Ye J, Shao C, Zhang X, Guo X, Gao P, Cen Y, Ma S, et al. Effects of DNase I coating of titanium on bacteria adhesion and biofilm formation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;78(5):738-47.

28. 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(7):124-31.
29. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. Future Microbiol. 2013;8(10):1325-37.
30. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. Int J Med Microbiol. 2014;304(8):1192-8.
31. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. MBio. 2014;5:e01333-14.
32. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(13):4092-7.
33. Panariello BHD, Klein MI, Pavarina AC, Duarte S. Inactivation of genes TEC1 and EFG1 in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. J Oral Microbiol. 2017;9(1):1385372.
34. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, et al. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. J Fungi (Basel). 2017;3(1):14.
35. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. J Appl Microbiol. 2017;122(2):321-30.
36. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. J Oral Microbiol. 2018;10(1):e1476644.

37. da Silveira PV, Panariello BHD, de Araújo Costa CAG, Maule SM, Maule SM, Janal MN, et al. Twice-daily red and blue light treatment for *Candida albicans* biofilm matrix development control. *Lasers Med Sci.* 2019;34(3):441-7.
38. McCall AD, Pathirana RU, Prabhakar A, Cullen PJ, Edgerton M. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2019;5(1):21.
39. Nett JE, Andes DR. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. *J Fungi (Basel).* 2020;6(1):21.
40. Gonçalves B, Fernandes L, Henriques M, Silva S. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling.* 2020;36(5):621-30.
41. Arévalo MP, Arias A, Andreu A, Rodríguez C, Sierra A. Fluconazole, itraconazole and ketoconazole in vitro activity against *Candida* spp. *J Chemother.* 1994; 6(4):226-9.
42. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(5):558-64.
43. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):668-79.
44. Da Silva WJ, Gonçalves LM, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Exopolissacarídeo matriz de biofilmes desenvolvidos de *Candida albicans* após exposição a agentes antifúngicos. *Braz Dent J.* 2012; 23(3):716–22.
45. Sanitá PV, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;116 (2): 562–9.

46. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol.* 2013; 11(10): e1001692.
47. 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;12(7):2173-84.
48. Robbins N, Caplan T, Cowen LE. Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71(4):753-75.
49. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol.* 2018;45(7):70-6.
50. Spettel K, Barousch W, Makristathis A, Zeller I, Nehr M, Selitsch B, et al. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. *PLoS One.* 2019;14(1):e0210397.
51. Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms.* 2020;8(2):154.
52. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2329-35.
53. Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol.* 2010;61(5):411-6.
54. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses.* 2011;54(2):123-30.
55. Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, Duarte S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers Med Sci.* 2015;30(2):885-90.

56. 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.
57. Rossoni RD, Barbosa JO, de Oliveira FE, de Oliveira LD, Jorge AO, Junqueira JC. Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2014;29(5):1679-84.
58. 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.
59. 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. Erratum in: *Photochem Photobiol Sci*. 2017;16(8):1336-7.
60. de Sousa DL, Lima RA, Zanin IC, Klein MI, Janal MN, Duarte S. Effect of twice-daily blue light treatment on matrix-rich biofilm development. *PLoS One*. 2015;10(7): e0131941.
61. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016;33(5):67-73.
62. 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.
63. Carmello JC, Alves F, Mima EGO, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *non-albicans Candida* species using Photodythazine® [corrected]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;17(7):194-99. Erratum in: *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;20(4):288-93.
64. Alves F, de Oliveira Mima EG, Passador RCP, Bagnato VS, Jorge JH, Pavarina AC. Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2017;32(4):815-26.

65. Hidalgo KJ, Carmello JC, Jordão CC, Mima EG, Jorge JH, Pavarina AC. Efeito da aPDT com Nistatina na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol in vivo. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2018, Campinas. Proceedings of the 35th SBPqO Annual Meeting, Braz Oral Res.2018;32:392-9.
66. Hu X, Huang YY, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. Front Microbiol. 2018; 9(1):1299.
67. Ma J, Shi H, Sun H, Li J, Bai Y. Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans* biofilms in vitro. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 27(9):280-7.
68. da Silva FC, Fernandes Rodrigues PL, Santos Dantas Araújo T, Sousa Santos M, de Oliveira JM, Pereira Rosa L, et al. Fluorescence spectroscopy of *Candida albicans* biofilms in bone cavities treated with photodynamic therapy using blue LED (450 nm) and curcumin. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 26(6):366-70.
69. Wiench R, Skaba D, Stefanik N, Kępa M, Gilowski Ł, Cieślar G, et al. Assessment of sensitivity of selected *Candida* strains on antimicrobial photodynamic therapy using diode laser 635 nm and toluidine blue - In vitro research. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 27(1):241-7.
70. Jan A, Liu C, Deng H, Li J, Ma W, Zeng X, Ji Y. In vitro photodynamic inactivation effects of hypocrellin B on azole-sensitive and resistant *Candida albicans*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 27(8):419-27.
71. Garcia BA, Panariello BHD, de Freitas Pontes KM, Duarte S. Regimen and different surfaces interfere with photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. J Microbiol Methods. 2020;17(8):106080.
72. Ma W, Liu C, Li J, Hao M, Ji Y, Zeng X. The effects of aloe emodin-mediated antimicrobial photodynamic therapy on drug-sensitive and resistant *Candida albicans*. Photochem Photobiol Sci. 2020;19(4):485-94.

73. Alves F, Carmello JC, Alonso GC, Mima EGO, Bagnato VS, Pavarina AC. A randomized clinical trial evaluating Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy as a treatment for denture stomatitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;32(6):102041.
74. 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(9):101825.
75. 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;32(10):102018.
76. 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.
77. Gándara L, Mamone L, Bohm GC, Buzzola F, Casas A. Enhancement of photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilms by disruptive strategies. *Lasers Med Sci.* 2017;32(8):1757-67.
78. Chen Z, Wang Z, Ren J, Qu X. Enzyme mimicry for combating bacteria and biofilms. *Account Chem Res.* 2018;51(3):789-99.
79. Karygianni L, Attin T, Thurnheer T. Combined DNase and proteinase treatment interferes with composition and structural integrity of multispecies oral biofilms. *J Clin Med.* 2020;9(4):983.
80. 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. *Mat Sci Eng Mat Biol Appl.* 2020;10(8):110499.
81. Du B, Tung CH. Enzyme-ssisted photodynamic therapy based on nanomaterials. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(5):2506-17.

82. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008 (Document M27-S4).
83. Junqueira JC, Vilela SF, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa AC, Rasteiro VM, et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012;54(1):17-24.
84. Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, Stavnberg C, Jensen PØ, Tolker-Nielsen T, et al. The inoculation method could impact the outcome of microbiological experiments. *Appl Environ Microbiol*. 2018;14(7):85-95.
85. Carmello JC, Pavarina AC, Oliveira R, Johansson B. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2015; 15(4): fov018.
86. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(12):740-55.
87. 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.
88. Paramonova E, Krom BP, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms. *Microbiology (Reading)*. 2009;155(6):1997-2003.
89. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956;28(5):350–6.
90. 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.

91. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. Nat Protoc. 2008;3(12):1909-24.
92. Nunes TSBS, Rosa LM, Vega-Chacón Y, Mima EGO. Fungistatic action of N-acetylcysteine on *Candida albicans* biofilms and its interaction with antifungal Agents. Microorganisms. 2020;8(7):980-93.
93. Garcez AS, Núñez SC, Azambuja N Jr, Fregnani ER, Rodriguez HM, Hamblin MR, et al. Effects of photodynamic therapy on Gram-positive and Gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. Photomed Laser Surg. 2013;31(11):519-25.