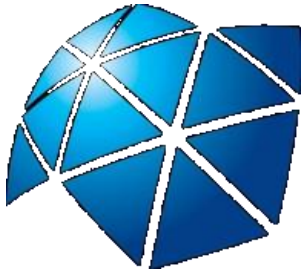


RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/11/2020.



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

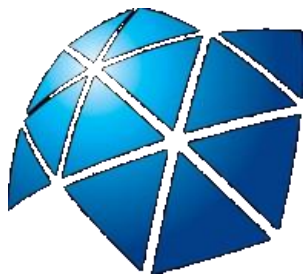


Karem Janeth Rimachi Hidalgo

Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol

Araraquara

2018



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



Karem Janeth Rimachi Hidalgo

Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol

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

Orientador: Prof^a Dr^a Ana Claudia Pavarina

**Araraquara
2018**

Rimachi Hidalgo, Karem

Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol / Karem Rimachi Hidalgo. -- Araraquara: [s.n.], 2018
100 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina

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

Karem Janeth Rimachi Hidalgo

Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol

COMISSÃO JULGADORA

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Prof^a Dr^a. Lívia Nordi Dovigo

3º Examinador: Prof^a Dr^a. Nara Hellen Campanha Bombarda

Araraquara, 26 de novembro de 2018.

DADOS CURRICULARES

Karem Janeth Rimachi Hidalgo

NASCIMENTO	24/09/1986 Iquitos - Peru
FILIAÇÃO	Pedro Segundo Rimachi Inga Rosario Hidalgo Gomez
2004-2011	Curso de Graduação na Universidade de la Amazonia Peruana Iquitos-Peru.
2016-2017	Estágio de docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2016-2018	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

Dedico este trabalho a **DEUS**, nosso criador que foi sustento para ter forças, para seguir em frente nesta longa jornada.

Aos meus pais, **PEDRO e ROSARIO**, por todo o amor, carinho, compressão e sacrifício que fizeram e ainda fazem, por mim e meus filhos. **AMO MUITO A VOCÊS**, e sem vocês eu não teria conquistado esta vitória, minha admiração e enorme, serão sempre a minha força e base em tudo.

Aos meus filhos **LUCCAS e BRUNELLA**, por serem meu pilar, alegria e força para sair adiante, amo demais a vocês.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, nosso Pai celestial, que pela sua infinita bondade nos dá saúde e forças para alcançar nossas metas. MUITO OBRIGADA PAI CELESTIAL.

Aos meus pais, **PEDRO E ROSARIO**, pela confiança, amor, compreensão e conselhos, agradeço por estarem sempre a meu lado, fazendo este longo caminho, mais fácil e alegre. Vocês sempre acreditaram em mim.

Agradeço também a meus filhos, **LUCCAS E BRUNELLA**, que com um sorriso, fazem me esquecer as coisas ruins da vida. Vocês são minha força.

Agradeço também a meu irmão, **MARCO, e a EDDY**, pela ajuda.

Agradeço principalmente à Prof^a Dr^a **Ana Claudia Pavarina**, pela confiança e oportunidade depositada em mim, para fazer o mestrado nesta universidade de muito prestígio. Sempre estarei eternamente agradecida por sua decisão e amor pelas coisas que faz, é digna de ser admirada. Muito obrigada, Professora.

A **Juliana Cabrini Carmello**, pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade em ajudar-me, você é uma pessoa de caráter e muito trabalhadora. Muito obrigada.

A **Claudia**, por ter sempre a disponibilidade de ajudar-me no bioterio.

A **Valdirene** por seu grande desprendimento em ajudar-me em qualquer momento e amizade sincera.

A todos meus colegas, que eu fiz em Araraquara, obrigada por tudo.

A todos os docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral que, de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e formação.

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 Universidade Estadual Paulista “**Júlio de Mesquita Filho**” – UNESP/Araraquara, e ao Programa de Pós-graduação em **Reabilitação Oral** pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho e que não estão citadas nominalmente, meus sinceros agradecimentos.

Rimachi Hidalgo KJ. Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) associada a Nistatina (NYS) no tratamento de candidose oral induzida em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol. Foram utilizados 174 camundongos Swiss fêmeas com aproximadamente 5 semanas de vida. Os animais foram imunossuprimidos com prednisolona 100 mg/kg no 1º, 5º e 13º dias de experimento. No 2º dia, os animais foram sedados com 0,1 mL de cloridrato de clorpromazina e uma suspensão de *C. albicans* 10⁷ UFC/mL foi inoculada na língua dos mesmos. Do dia 7 ao 11 os tratamentos foram realizados. No grupo aPDT foi utilizado 200 mg/L de Photodithazine (PDZ) associado à luz LED de 50 J/cm² (grupo P+L+); no grupo (P+L-) foi utilizado apenas com PDZ; o grupo (P-L+) recebeu só luz LED e nos animais do grupo NYS o medicamento foi aplicado uma vez ao dia. Além disso, foi avaliada a combinação de duas terapias: P+L+NYS e NYS+P+L+. Um grupo recebeu apenas inoculação de *C. albicans* (grupo P-L-) e outro grupo de animais saudáveis (grupo CNI). Após os tratamentos, foi realizada a recuperação de *C. albicans* por meio de swabs estéreis. Então diluições seriadas foram realizadas e plaqueadas em placas de Petri com SDA. Após 48 horas de incubação a 37º C as colônias foram quantificadas e o número de UFC/mL foi determinado. Os camundongos foram sacrificados 24 horas e 7 dias após os tratamentos. Os resultados demonstraram que a combinação das terapias promoveu redução de 2,6 log₁₀ e 2,1 log₁₀ para os grupos P+L+NYS+ e NYS+P+L+, respectivamente, 24 horas após os tratamentos. A análise macroscópica revelou remissão das lesões orais, e a análise histológica demonstrou expressiva redução da reação inflamatória no tecido que apresentou características histológicas de normalidade. Dessa forma, pode-se concluir que a combinação de terapias é uma alternativa para o tratamento de candidose induzida com cepas de *C. albicans* resistente ao fluconazol.

Palavras Chaves: Fotoquimioterapia. *Candida albicans*. Antifúngicos.

Rimachi Hidalgo KJ. Efficacy of nystatin-associated antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of oral candidosis in mice infected with *Candida albicans* resistant to fluconazole [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate of PDZ-mediated aPDT, as well as the association of this approach with antifungal nystatin, would be effective to treat oral candidosis in mice infected with fluconazole resistant *C. albicans*. Were used 174 female Swiss mice of 5 weeks-old-age approximately. The animals were immunosuppressed with prednisolone 100 mg/kg on the 1st, 5th and 13th days of the experiment. On day 2, the animals were sedated with 0.1 mL of chlorpromazine hydrochloride and a suspension of *C. albicans* 107 CFU/mL was inoculated into the tongue. From 7 to 11 the treatments were performed. In the aPDT group, was used 200 mg/L of Photodithazine (PDZ) associated with 50 J /cm² LED light (P+L+ group). In the (P+L-) group was used only with PDZ; the group (P-L+) received only LED light and in the animals of the NYS group the drug was applied once a day. In addition, we evaluated the combination of two therapies: P+L+NYS and NYS+P+L+. One group received only inoculation of *C. albicans* (P-L- group) and another group of healthy animals (CNI group). After the treatments, recovery of *C. albicans* was performed by sterile swabs, then serial dilutions were performed and plated on Petri dishes with SDA. After 48 hours incubation at 37 °C the colonies were quantified, and the number of CFU/mL was determined. Mice were sacrificed 24 hours and 7 days after the treatments. The results showed that the combination of the therapies promoted reduction of 2.6 log₁₀ and 2.1 log₁₀ for the groups P+L+NYS+ and NYS+P+L+, respectively, 24 hours after the treatments. The macroscopic analysis revealed remission of oral lesions, and the histological analysis demonstrated an expressive reduction of the inflammatory reaction in the tissue that presented histological characteristics of normality. Thus, it can be concluded that the combination of therapies is an alternative for the treatment of candidosis induced with strains of *C. albicans* resistant to fluconazole.

Keywords: Photochemotherapy. *Candida albicans*. Antifungals

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVO.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana In Vitro	15
3.2 Modelo Murino de Candidose e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana In Vivo	18
3.3 Combinação de Terapias Tópicas.....	26
3.4 Mecanismo de Resistência, Invasão e Resposta ao Estresse Oxidativo de <i>Candida albicans</i>	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Material	41
4.1.1 Material de consumo.....	41
4.1.2 Instrumental.....	42
4.1.3 Equipamento	43
4.2 Método	44
4.2.1 Reativação da cepa e padronização do inóculo	44
4.2.2 Parâmetros de irradiação e preparo do fotossensibilizador..	44
4.2.3 Indução de candidose oral nos animais.....	45
4.2.4 Realização dos tratamentos	46
4.2.5 Recuperação de <i>Candida albicans</i> e contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL)	49
4.2.6 Análise macroscópica das lesões	50
4.2.7 Sacrifício dos animais, análise histológica.....	50
4.3 Análise Estatística.....	52
5 RESULTADOS	53
5.1 Análise Microbiológica	53
5.2 Análise Macroscópica das Lesões	56
5.3 Análise Histológico das Lesões.....	63
6 DISCUSSÃO.....	83
7 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES	96
ANEXO A.....	100

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* são consideradas microrganismos comensais, constituintes da microbiota bucal e trato gastrointestinal em indivíduos saudáveis¹. Sob determinadas circunstâncias, tais como desequilíbrio no pH, mudanças nutricionais, uso de antibióticos ou alterações no sistema imunológico causadas por uma infecção ou terapia imunossupressora^{2,3}, esses microrganismos podem atuar como patógenos oportunistas proliferando e sendo responsáveis pelo desenvolvimento de infecções na pele, mucosa e também de infecções sistêmicas⁴. A candidose orofaríngea (OPC) é uma infecção resultante da adesão e penetração das espécies fúngicas nos tecidos orais⁵ e apresenta alta incidência em pacientes que utilizam medicamentos imunossupressores após transplante de órgãos, antibióticos de amplo espectro, diabéticos, terapias antineoplásicas e nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)^{6,7}.

Para os tratamentos da candidose, têm sido utilizados medicamentos de aplicações tópica e sistêmica, tais como os derivados azóis, poliênos e as equinocandinas. Os azóis inibem a produção de ergosterol que causa instabilidade na membrana, os poliênos se ligam ao ergosterol na membrana celular fúngica, levando à lise celular; e, as equinocandinas inibem a biossíntese da parede celular dos fungos, levando a uma perda de integridade dessa parede celular⁸. Os agentes poliênos, particularmente a Nistatina, é o medicamento mais utilizado para aliviar os sinais e sintomas clínicos da doença, porém muitas vezes não eliminam completamente as espécies de *Candida*^{9,10}. Além disso, os efeitos diluentes da saliva e movimentos da musculatura bucal normalmente reduzem a dose desses agentes a concentrações subterapêuticas^{11,12,13}. Dessa forma, a recolonização da mucosa bucal pelo microrganismo tem sido frequente após o tratamento, o que ocasiona infecções recorrentes^{9,11}. A medicação sistêmica tem sido usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecções recorrentes, utilizando medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B¹⁴. Esses agentes vêm sendo amplamente empregados para o tratamento da candidose bucal, especialmente em pacientes

imunocomprometidos. Porém a ocorrência de efeitos hepatotóxicos tem sido frequente^{14,15}. A utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC tem resultado no desenvolvimento de resistência das espécies de *Candida*¹⁰. Resistência antifúngica pode ser definida como a persistência ou a progressão de uma infecção após a realização do tratamento antimicrobiano¹⁶. A resistência intrínseca ou primária ocorre quando um microrganismo apresenta reduzida susceptibilidade a uma determinada medicação, previamente à sua exposição ao agente. Já, a resistência secundária pode ser desenvolvida pelo microorganismo após longos períodos de exposição aos fármacos antifúngicos¹⁷.

Adicionalmente, a organização dos microrganismos em biofilmes representa um reservatório protetor, possibilitando a sobrevivência desses patógenos mesmo em condições desfavoráveis e proporcionando elevada resistência aos agentes antifúngicos¹⁸. Considerando o aumento na incidência de patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade dos medicamentos sistêmicos utilizados, alguns estudos têm buscado estratégias para inviabilização de espécies fúngicas resistente a fluconazol.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido avaliada para a inativação de microrganismos^{19,20}. 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 oxigênio²¹. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz de comprimento de onda adequado com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação celular²². Tem sido sugerido que esse mecanismo envolve a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, o que leva seus elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o FS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de espécies reativas²¹. Ambos caminhos podem ocasionar morte celular do microrganismo patógeno.

Atualmente vem sendo empregada em aPDT, os FS de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas e porfirinas hidrofílicas que apresentam forte banda de absorção na região vermelha do espectro fotomagnético. O Photodithazine® (PDZ) é uma clorina e₆, solúvel em água que apresenta um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete²³. Esse FS apresenta uma alta banda de absorção no espectro eletromagnético (650 a 680 nm), o que o permite atravessar com maior profundidade as membranas biológicas, melhorando a ação da aPDT²⁴.

Estudos in vitro tem apontado a aPDT como uma técnica efetiva em promover a inativação de espécies de *Candida*^{25,26}. Em um estudo in vivo foi avaliado a associação de Photodithazine® com LED na fotoinativação de *C. albicans* em modelo murino de candidose oral²⁷. Os animais foram tratados com concentrações de 75, 100, 125 e 150 mg/L durante 20 min e iluminados durante 14 min (LED 660 nm - 37,5 J/cm²). As células de *Candida albicans* (*C. albicans*) foram recuperadas do dorso da língua e a avaliação microbiológica foi realizada. Os animais foram sacrificados após 24 horas e a língua foi processada para análise histológica. 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 log₁₀. Em outro estudo Alves et al.²⁸ avaliaram a eficácia da aPDT (1 aplicação), mediada pelo Photodithazine® (PDZ) e luz LED, na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol (isolado clínico) em um modelo de candidose oral induzida. A aPDT promoveu redução significativa de *C. albicans* resistente a fluconazol (~1,96 log₁₀), entretanto, esse protocolo não possibilitava o acompanhamento clínico da evolução da lesão.

Em estudo realizado recentemente Carmello et al.²⁹ (2016) modificaram o protocolo de indução de candidose em animais para possibilitar o tratamento e o acompanhamento da evolução da lesão após a aplicação da aPDT. O protocolo foi estabelecido com sucesso, uma vez que a lesão permaneceu nos animais por um período de 5 a 16 dias. Então, utilizando este protocolo, foi avaliada a efetividade da aPDT, associando ao PDZ a luz LED, no tratamento da candidose oral induzida em camundongos. Após o estabelecimento da infecção, os animais foram tratados durante 5 dias consecutivos com aPDT ou

com antifúngico tópico Nistatina. A evolução macroscópica e microbiológica da lesão foi acompanhada por um período de até 7 dias após o tratamento. Os resultados demonstraram que a aPDT foi tão efetiva quanto a Nistatina na inativação de *C. albicans*, (cepa suscetível) reduzindo 3 e 3,2 \log_{10} , respectivamente, 24 horas após o término do tratamento. Em resumo, neste estudo, os autores observaram que a modificação do modelo de indução de candidose possibilitou prolongar o período de infecção e que a aPDT foi efetiva no tratamento da candidose oral em camundongos.

Tem sido relatado que combinações de terapias são empregadas com o objetivo de melhorar a eficácia dos tratamentos³⁰. Hsieh et al.³¹ (2018) avaliaram a combinação da aPDT com o antifúngico fluconazol na inativação de cultura planctônica e biofilme de *C. albicans*. Os autores verificaram que a aPDT, aplicada isoladamente, foi efetiva na erradicação de culturas planctônicas e promoveu redução na viabilidade dos biofilmes. O tratamento isolado com fluconazol promoveu somente redução na viabilidade das culturas planctônicas e no biofilme de *C. albicans*. Ao avaliarem a combinação das terapias (Fluconazol, seguido da aPDT), os autores observaram uma potencialização dos efeitos, sendo a viabilidade das células do biofilme reduzida para 5%. Em outro estudo, Barra et al.³² (2015) demonstraram que a associação da aPDT (mediada pelo ácido 5-aminolevulínico), seguida da aplicação do antibiótico Gentamicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foi eficaz na redução da atividade metabólica de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus* para 10, 20 e 30%, respectivamente.

Considerando os resultados dos estudos citados nos parágrafos acima, julgamos importante avaliar a eficácia de aplicações sucessivas da aPDT, mediada pelo PDZ e associada a luz LED, como também a combinação das terapias (P+L+NYS e NYS+P+L+) no tratamento de candidose oral induzida em camundongos infectados com cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol.

7 CONCLUSÃO

- A combinação das terapias, independente da ordem da aplicação, foi efetiva no tratamento de candidose oral em camundongos infectados por *C. albicans* resistente a fluconazol em comparação às terapias aplicadas isoladamente;
- A análise macroscópica demonstrou que a terapia combinada, promoveu remissão das lesões orais em 97,34% e 92,23%, para os grupos P+L+NYS e NYS+P+L+, respectivamente, no período de 24 horas. Após 7 dias foi verificada discreta recidiva na infecção (lesões abrangeram 47,88 % e 55,98% para P+L+NYS e NYS+P+L+, respectivamente).
- Quando as terapias combinadas foram empregadas a análise histológica demonstrou que os tecidos avaliados apresentaram características histológicas de normalidade quando comparado ao grupo controle negativo de trabalho.

REFERÊNCIAS*

1. Martin R, Wächtler B, Schaller M, Wilson D, Hube B. Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol*. 2011; 301(5): 417–22.
2. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016; 18(5): 310–21.
3. Brown AJP, Brown GD, Netea MG, Gow NAR. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol*. 2014; 22(11): 614–22.
4. Gow NAR, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*. 2012; 15(4): 406–12.
5. 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(PART1): 10–24.
6. Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res*. 2005 ; 84(11): 966-77.
7. Dongari-Bagtzoglou A, Dwivedi P, Ioannidou E, Shaqman M, Hull D, Burlison J. Oral *Candida* infection and colonization in solid organ transplant recipients. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(3):249-54.
8. Cowen LE, Steinbach WJ. Stress , drugs , and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell*. 2008; 7(5): 747-64.
9. 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.

* 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-atualizadp.pdf>.

10. Morace G, Perdoni F, Borghi E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *J Glob Antimicrob Resist*. 2014; 2(4): 254–9.
11. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dent*. 2001; 21(1): 4–8.
12. Samaranayake LP, Ferguson MM. Delivery of antifungal agents to the oral cavity. *Adv Drug Delivery Rev*. 1994; 13:161–79.
13. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994; 72(3): 283-8
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. Patton LL, Bonito AJ, Shugars DA. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 92(2): 170–9.
16. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res*. 2009; 9(7): 1029–50.
17. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis*. 2017; 216(3): S445–51.
18. Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2009; 54(11): 1052–60.
19. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry . *J Dent Res*. 2007; 86 (8): 694-707.
20. Lambrechts SAG, Aalders MCG, Van MJ. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(5): 2026–34.

21. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163(1): 1–12.
22. Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry. *Laser Phys.* 2016; 26(12): pii: 123001
23. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* 2001; 57(47): 9513–47.
24. Ferreira J, Menezes PFC, Sibata CH, Allison RR, Zucoloto S, Castro e Silva O, et al. Can efficiency of the photosensitizer be predicted by its photostability in solution? *Laser Phys.* 2009; 19(9): 1932–8.
25. Quishida CCC, Carmello JC, Mima EG de O, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(2): 685–94.
26. 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.
27. 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.
28. 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 Oct 18. [Epub ahead of print].
29. Carmello JC, Alves F, Basso FG, De Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EGDO, et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine-mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS One.* 2016; 11(6): 1–18.
30. Antoniadou A, Kontoyiannis DP. Status of combination therapy for refractory mycoses. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16(6): 539–45.

31. Hsieh Y-H, Zhang J-H, Chuang W-C, Yu K-H, Huang X-B, Lee Y-C, et al. An in vitro study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on *Candida albicans*. *Int J Mol Sci* . 2018; 19(2): 337.
32. Barra F, Roscetto E, Soriano AA, Vollaro A, Postiglione I, Pierantoni MG, et al. Photodynamic and antibiotic therapy in combination to fight biofilms and resistant surface bacterial infections. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(9): 20417–30.
33. Maisch T, Bosl C, Szeimies R, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of Novel XF Porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(4): 1542–52.
34. Dovigo LN, Pavarina AC, De Oliveira Mima EG, 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.
35. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello AJC, Machado AL. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of Curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9):927-34.
36. Carmello JC, Alves F, Mima EG de O, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species using Photodithazine®. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017; 17: 194–9.
37. 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.
38. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(2): 155–60.

39. 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.
40. Mima EG de O, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA de S, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2010; 109(3): 392–401.
41. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, De Oliveira Mima EG, Machado AL, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. a clinical investigation photodynamic disinfection of complete dentures. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1): 161–8.
42. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EMS, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of photodynamic therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(10): E380–8.
43. Okada M, Hisajima T, Ishibashi H, Miyasaka T, Abe S, Satoh T. Pathological analysis of the *Candida albicans*-infected tongue tissues of a murine oral candidiasis model in the early infection stage. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(4): 444–50.
44. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013; 51(3): 243–51.
45. Alves F, Alonso GC, Carmello JC, Mima EG de O, Bagnato VS, Pavarina AC. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by Photodithazine® in the treatment of denture stomatitis: a case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 21: 168–71.
46. Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by Curcumin-Loaded polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis. *Molecules.* 2018; 23(8): pii E2075.

47. Snell SB, Foster TH, Haidaris CG. Miconazole induces fungistasis and increases killing of *Candida albicans* subjected to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(3): 596–603.
48. Davies A, Gebremedhin S, Yee M, Padilla RJ, Duzgunes N, Konopka K, et al. Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole. *J Physiol Pharmacol.* 2016; 67(5): 777–83.
49. Pourhajibagher M, Kazemian H, Chiniforush N, Bahador A. Evaluation of photodynamic therapy effect along with colistin on pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Laser Ther.* 2017; 26(2): 97–103.
50. Huang M, Shen M, Huang Y, Lin H, Chen C. Photodynamic inactivation potentiates the susceptibility of antifungal agents against the planktonic and biofilm cells of *Candida albicans*. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(434): 1-12.
51. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(9): 881–90.
52. Lushchak VI. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol.* 2011; 153(2): 175–90.
53. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses.* 2012;55(3):199–204.
54. Abreu- Balnco MT, Watts JJ, Verboon JM, Parkhurst SM. Cytoskeleton responses in wound repair. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 2469–83.
55. Yan L, Yang C, Tang J. Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections. *Microbiol Res.* 2013; 168(7): 389–95
56. Taff HT, Mitchell KF, Edward JÁ. Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Futur Microbiol.* 2013, 8(10): 1325-37.
57. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; 14(8): 1518–26.

58. Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Dongari-bagtzoglou A. Streptococcus oralis and Candida albicans synergistically activate μ -calpain to degrade E-cadherin from oral epithelial junctions. J Infect Dis. 2016; 214(6): 925–34.
59. Gow NAR, Yadav B. Microbe profile: Candida albicans: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. Microbiol (United Kingdom). 2017; 163(8): 1145–7.
60. Kashef N, Hamblin MR. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? Drug Resist Updat . 2017; 31: 31–42.
61. Karanja CW, Hong W, Younis W, Eldesouky HE, Seleem MN, Cheng JX. Stimulated raman imaging reveals aberrant lipogenesis as a metabolic marker for azole-resistant Candida albicans. Anal Chem. 2017; 1989(18): 9822-29.
62. Hu X, Huang Y-Y, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. Front Microbiol. 2018; 9: 1–24.
63. Chien CT, Chen YC, Liu YC, Liang SH, Lin HH, Lin CH. The antimicrobial photodynamic inactivation resistance of Candida albicans is modulated by the Hog1 pathway and the Cap1 transcription factor. Med Mycol. 2018; Oct 4. [Epub ahead of print].
64. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC, Helena B, Panariello D. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant Candida albicans and Candida glabrata biofilms. J Oral Microbiol. 2018; 10(1).