



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

LÍVIA MARA ALVES FIGUEIREDO

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA CANDIDOSE
EXPERIMENTAL E RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO
MODELO HOSPEDEIRO DE *Galleria mellonella***

2017

LÍVIA MARA ALVES FIGUEIREDO

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA CANDIDOSE
EXPERIMENTAL E RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO MODELO
HOSPEDEIRO DE *Galleria mellonella***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2017]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Figueiredo, Livia Mara Alves

Efeitos da terapia fotodinâmica na candidose experimental e resposta imunológica no modelo hospedeiro de *Galleria mellonella* / Livia Mara Alves Figueiredo. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientador: Juliana Campos Junqueira.

1. *Candida albicans*. 2. Invertebrado. 3. Terapia fotodinâmica. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira (orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Aguinaldo Silva Garcez Segundo

Faculdade São Leopoldo de Mandic

Centro de Pesquisas Odontológicas

Campus de Campinas

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 30 de Maio de 2017.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus amados pais, **Maria Aparecida Alves Figueiredo e Edson Figueiredo**, que sempre me amaram, e se dedicaram para me proporcionar a riqueza dos estudos. Sempre ao meu lado, me dando todo o suporte e carinho necessário para o meu crescimento. Esse trabalho é para vocês com meu imenso **Amor!***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me proporcionar saúde e força necessária para ir atrás de meus objetivos. Cercando-me sempre de boas pessoas com as quais pude aprender ao longo da elaboração desse trabalho.

À Unesp- Universidade Estadual Paulista do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa que proporcionou para realização do mestrado.

A Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira por aceitar me orientar nesse trabalho, por sua disponibilidade, dedicação, paciência. Sempre pronta a me ajudar, tirando minhas dúvidas, indicando os melhores caminhos pelos quais percorrer. Obrigada por tornar esse trabalho possível.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge pela colaboração e sugestões que foram importantes para boa realização desse trabalho.

Aos docentes do Programa de pós-graduação de Biopatologia Bucal, por todo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Garcez Segundo por sua contribuição e orientações, importantes para boa realização desse trabalho.

A Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino por sua colaboração e sugestões que foram importantes para boa realização desse trabalho.

Ao programa de pós-graduação de Biopatologia Bucal, na pessoa da Coordenadora Profa. Dra. Ana Lia Anbinder.

Minha amada mãe, com todo seu carinho, cuidado, sempre zelou pelo meu bem estar, buscando sempre atender a tudo que fosse preciso para me tranquilizar e me oferecer conforto. Sempre à frente abrindo caminho para que tudo chegasse a mim de maneira mais suave.

Meu amado pai, carinhoso, conselheiro, sempre me ouvindo e aconselhando as melhores decisões, me ensinando a ponderar nos momentos de incertezas e dúvidas me auxiliando a enfrentar de frente as dificuldades que se apresentavam.

Meu amor, meu companheiro, meu amado esposo, Julio Cesar Siqueira Souza Godoi, sempre ao meu lado, apoiando, encorajando, dando força e amor para que eu continuasse em frente. Aceitando os horários apertados, os compromissos, ajudando com o que fosse preciso, mudando sua rotina para me proporcionar a oportunidade de realizar os projetos que se apresentavam. A você meu imenso amor e lealdade!

Minha amada vizinha Dica, Maria Aparecida da Conceição Moraes, por sua presença encantadora, seu exemplo de força e determinação. Mesmo estando presente de um jeito diferente, continua a nos tocar com seu carinho, me mostrando que todos os dias nós temos de buscar um novo recomeço. Te amo!

Minha amada irmã Patrícia Helena Figueiredo e Silva, meu amado sobrinho e afilhado Miguel Antonio Figueiredo e Silva e meu cunhado Alex Sander Silva, obrigada por todos os momentos de diversão que pudemos compartilhar me ajudando a repor as energias para o trabalho. Obrigada pela amizade, pelo carinho, por me apoiarem me ajudando sempre com o que fosse possível.

Meus amados sogros, Liliane Siqueira Souza Godoi e Valdir Godoi, por seu carinho, por me acolherem como filha e me auxiliarem sempre.

A meus cunhados, Caio Cesar Siqueira Souza Godoi e Augusto Cesar Siqueira Souza Godoi, obrigada pela amizade, pelos momentos de diversão, e todo o apoio que puderam me dar.

À minha amada família, tios, primos, madrinha, pelo companheirismo e por todo carinho.

A todos meus amigos de Laboratório em especial a Mirian Marcolan de Mello, que desde minha chegada ao Laboratório se dispôs a me ajudar, me ensinar, sempre disposta a colaborar com meu crescimento. Obrigada por sua amizade e carinho.

À Marisol dos Santos Velloso que dividiu sua experiência e conhecimento, sempre ajudando no que fosse possível. Obrigada por sua amizade e todos os momentos de diversão.

As alunas de graduação Raquel Telles Menezes e Jéssica Shiotani Carvalho pela contribuição na elaboração desse trabalho.

À Ana Luiza do Rosário Palma, minha parceira nos trabalhos, dividindo dúvidas, objetivos e realizações. Um sonho dentro de um sonho!

A Elis Lima Andrade pela indicação do curso e companheirismo.

A Karen Cristina Kazue Yui pelo incentivo e indicação para o início do curso.

E a todos os demais amigos da Unes-ICT que cada um a sua maneira contribuíram para a concretização desse trabalho!

Aos técnicos Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, pela colaboração e amizade durante o curso de mestrado.

A pesquisadora Liliana Scorzoni, que esteve disposta a dividir seus conhecimentos e contribuir para a elaboração desse trabalho.

A minha amiga Camila Vitelli Molinari por me inspirar com seu exemplo de pesquisadora, fisioterapeuta e professora as melhores ações.

A minha amiga Francine Ribeiro Hirose por me apoiar nos momentos de incertezas e sempre me estender à mão me apoiando com todo carinho.

A todos que fazem parte da equipe da Biblioteca que contribuíram para elaboração desse trabalho e acesso ao material bibliográfico.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação, Bruno Shiguemitsu M. Tanaka, Ivan Oliveira Damasceno e Sandra Mara Cordeiro, pela disponibilidade, paciência no atendimento. Contribuindo de maneira positiva durante todo o curso de mestrado.

E a todos os amigos que de maneira direta ou indireta puderam contribuir para meu crescimento e elaboração desse trabalho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Cepas de <i>C. albicans</i>	24
3.2 Modelo de <i>G. mellonella</i>.....	25
3.3 Infecção por <i>C. albicans</i> em <i>G. mellonella</i> e análise da curva de sobrevivência.....	28
3.4 Testes para padronização da concentração do fotossensibilizador e da energia laser	29
3.5 Realização da terapia fotodinâmica em <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i>.....	30
3.6 Análise da densidade hemocitária de <i>G. mellonella</i>	32
3.7 Análise estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Análise da curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas por diferentes concentrações de <i>C. albicans</i>	35
4.2 Avaliação dos efeitos do laser e fotossensibilizador em larvas de <i>G. mellonella</i> não infectadas por <i>C. albicans</i>	36
4.3 Análise da terapia laser e da TFD em <i>G. mellonella</i> infectada com <i>C. albicans</i> ATCC 18804.....	41

4.4 Análise dos efeitos da energia laser e da TFD em larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com cepa clínica de <i>C. albicans</i>.....	45
4.5 Análise da densidade hemocitária de <i>G. mellonella</i>	49
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo da interação da luz irradiada com o tecido biológico.....	19
Figura 2 – Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da TFD.....	20
Figura 3 – Placa de ágar Sabouraud contendo colônias de <i>C. albicans</i> isoladas por técnica de esgotamento	25
Figura 4 – Larvas de <i>G. mellonella</i> do Laboratório de invertebrados do ICT....	26
Figura 5 – Seringas Hamilton com capacidade de 10 µL	27
Figura 6 – Inoculação de <i>C. albicans</i> em <i>G. mellonella</i>	27
Figura 7 – <i>G. mellonella</i> mortas, melanizadas.....	29
Figura 8 – Fonte de luz: equipamento laser diodo de baixa intensidade emitido em 660nm.....	31
Figura 9 – Larvas em suporte para realização da TFD	32
Figura 10 – Retirada de hemolinfa das larvas de <i>G. mellonella</i>	33
Figura 11 – Curva de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> com diferentes concentrações inoculadas de <i>C. albicans</i>	36

Figura 12 – Análise das médias de potência laser mensuradas com diferentes concentrações de fotossensibilizador ao longo do tempo	37
Figura 13 – Imagens ilustrando a passagem do laser em <i>G. mellonella</i>	37
Figura 14 – Plotagem correspondente à profundidade de penetração laser na larva de <i>G. mellonella</i>	39
Figura 15 – Plotagem correspondente à distribuição do laser no comprimento do corpo da larva de <i>G. mellonella</i>	40
Figura 16 - Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> ATCC 18804 e tratadas com diferentes energias do laser.....	42
Figura 17 - Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (ATCC 18804) e tratadas com laser 6J.....	42
Figura 18 - Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (ATCC 18804) e tratadas com laser 15 J.....	43
Figura 19 - Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (ATCC 18804) e tratadas com TFD	44
Figura 20 - Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (ATCC 18804), tratadas com TFD 6 J	44
Figura 21 - Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (ATCC 18804), tratadas com TFD 15 J	45

Figura 22 – Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (Cepa clínica 17), tratadas com diferentes energias laser e grupos controle.....	46
Figura 23 – Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (Cepa clínica 17), tratadas com laser 6 J	46
Figura 24 – Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (Cepa clínica 17), tratadas com laser 15 J	47
Figura 25 – Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (Cepa clínica 17), tratadas com TFD.....	48
Figura 26 – Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (Cepa clínica 17), tratadas com TFD 6 J	48
Figura 27 – Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. albicans</i> (Cepa clínica 17), tratadas com TFD 15 J	49
Figura 28 – Análise da densidade hemocitária de <i>G. mellonella</i> infectada com diferentes concentrações de <i>C. albicans</i> ATCC 18804.....	50
Figura 29 – Análise da densidade hemocitária de <i>G. mellonella</i> infectada com <i>C. albicans</i> ATCC 18804 e submetida à terapia laser e TFD	51

Figueiredo LMA. Efeitos da terapia fotodinâmica na candidose experimental e resposta imunológica no modelo hospedeiro de *Galleria mellonella* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) tem demonstrado ação antimicrobiana sobre as leveduras do gênero *Candida*, sendo considerada uma técnica promissora para o tratamento de candidose. Recentemente foi relatado que a aplicação de TFD também pode resultar em ativação do sistema imunológico, contribuindo para a melhora da infecção. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a ação da TFD e da terapia laser sobre a resposta imunológica à candidose experimental utilizando *Galleria mellonella* como modelo hospedeiro de infecção. Larvas de *G. mellonella* foram infectadas com diferentes cepas de *Candida albicans* e, após 30 min, foram tratadas com TFD mediada por azul de metileno e laser diodo emitido em 660 nm. A seguir, as larvas foram incubadas a 37°C por sete dias e analisadas diariamente para determinação da curva de sobrevivência. Para o estudo da resposta imunológica, após os tempos de 3, 6, 18 h da TFD foram realizados testes de determinação da densidade de hemócitos na hemolinfa de *G. mellonella*. Os dados obtidos na curva de sobrevivência foram avaliados pelo teste de *Log-rank (Mantel Cox)* e os resultados da análise imunológica por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, com significância de 5%. Os resultados obtidos demonstraram que tanto para a cepa ATCC 18804 como para a cepa clínica 17 de *C. albicans*, a TFD prolongou a sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por uma dose fúngica letal. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos PDT e controle somente com cepa ATCC ($p=0,0056$). Foi verificado também que a infecção pela cepa ATCC 18804 de *C. albicans* em *G. mellonella* levou a uma redução no número de hemócitos na hemolinfa, e o tratamento com TFD e terapia laser conseguiram aumentar o número de hemócitos, mas sem apresentar diferença estatística significativa. Foi possível concluir com esse estudo que a TFD bem como a terapia laser influenciaram de maneira positiva na melhora da infecção por *C. albicans* no modelo de *G. mellonella*.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Invertebrado. Terapia fotodinâmica.

Figueiredo LMA. *Effects of photodynamic therapy on experimental candidosis and immune response in the Galleria mellonella host model [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.*

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) has demonstrated antimicrobial activity on the yeast of the genus Candida and is considered a promising technique for the treatment of candidiasis. Recently it was reported that the application of PDT may also result in activation of the immune system, contributing to the improvement of the infection. The objective of this study is to evaluate the action of PDT and laser therapy on the immune response to experimental candidiasis using Galleria mellonella as host of the infection. G. mellonella larvae were infected with different Candida albicans strains and, after 30 min were treated with methylene blue-mediated PDT and laser diode emitted at 660 nm. Then, the larvae were incubated at 37° C for seven days and analyzed daily in order to determine the survival curve. For the study of the immunological response, after intervals of 3, 6, 18 h of the PDT, tests were performed to determine the density of hemocytes in the hemolymph of G. mellonella. The data obtained in the survival curve were evaluated by the Log-rank test (Mantel Cox) and the results of the immunological analysis by analysis of variance ANOVA and Tukey test, with significance of 5%. The results demonstrated that for both the ATCC 18804 strain and the C. albicans clinical strain 17, PDT prolonged the survival of the infected G. mellonella larvae by a lethal fungal dose. However, there was a statistically significant difference between the PDT and the control groups only with ATCC strain ($p = 0.0056$). It was also found that infection by the C. albicans ATCC 18804 strain in G. mellonella led to a reduction in the number of hemocytes in the hemolymph, and the treatment with PDT and laser therapy succeeded in increasing the number of hemocytes but without significant statistical difference. It was possible to conclude from this study that PDT as well as laser therapy positively influenced the improvement of C. albicans infection in the G. mellonella model.

Keywords: Candida albicans. Invertebrate. Photodynamic therapy.

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é um fungo patogênico e oportunista, o causador mais comum de doenças fúngicas em seres humanos. Esse fungo está presente naturalmente na maior parte dos indivíduos, encontrado na microbiota normal da pele, membranas mucosas da cavidade oral, do intestino e do trato urogenital de mulheres (Uppuluri et al., 2012; Rodrigues et al., 2013).

C. albicans pode desenvolver candidose em indivíduos previamente saudáveis, porém apresenta maior predisposição de se desenvolver em indivíduos que se encontram imunossuprimidos. Esta espécie de *Candida* é considerada a mais virulenta quando comparada às demais espécies existentes, tais como *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* (Chibebe Jr et al., 2013).

Um importante fator de virulência de *C. albicans* é a sua capacidade de se adaptar a uma variedade de diferentes habitats podendo formar comunidades microbianas aderidas a uma superfície sólida, conhecida como biofilme. O biofilme pode se desenvolver em superfícies de hospedeiros ou em biomateriais usados em dispositivos médicos, odontológicos como a prótese dentária (Junqueira et al., 2011).

C. albicans caracteriza-se como um fungo dimórfico com capacidade de sofrer transições morfológicas dependendo das condições do meio, podendo apresentar-se na forma de leveduras, pseudohifas e hifas. Tais transições colaboram para a patogênese de *C. albicans* em infecções invasivas. As formas de levedura desempenham um papel importante durante a circulação na corrente sanguínea e disseminação para diferentes órgãos, já as formas filamentosas contribuem para a penetração nos tecidos (Uppuluri et al., 2012; Rodrigues et al., 2013).

As infecções geradas podem ser superficiais e localizadas, como na candidose oral, vulvovaginal e urinária, ou infecções mais profundas, disseminadas e sistêmicas (Rodrigues et al., 2013). A crescente taxa de morbidade e mortalidade relacionada às infecções fúngicas associada ao aumento de cepas resistentes aos antifúngicos, tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas sobre novas formas de tratamento a estas infecções (Arvanitis et al., 2013).

Para tais pesquisas se faz necessário o uso de modelos animais. Devido à similaridade de alguns mecanismos do sistema imune de invertebrados com os mamíferos, os animais invertebrados estão sendo cada vez mais utilizados para investigação de patógenos humanos. Além de possuírem baixo custo de manutenção, eles não apresentam restrições éticas e podem ser usados para estudo de larga escala (Arvanitis et al., 2013; Cook, McArthur, 2013).

O início destas pesquisas se deu com *Julies Hoffman* que demonstrou inúmeras possibilidades de estudo de doenças fúngicas em modelos invertebrados (Lionakis, 2011). Posteriormente seguiram-se várias pesquisas e com o tempo observou-se que um dos invertebrados que possui muitas vantagens para estudos de infecções fúngicas é o modelo *Galleria mellonella*.

G. mellonella é a larva da cera da mariposa, que tem como habitat natural a colméia, onde se alimenta de pólen, mel e cera de abelha. Esse inseto pode ser mantido sob uma temperatura de 25 a 37°C. Seu ciclo de vida compreende uma fase larval, seguida de pupas, transformando-se finalmente em mariposas (Fuchs et al., 2010; Trevijano-Contador, Zaragoza, 2014).

Com relação as suas vantagens físicas, o tamanho das larvas de *G. mellonella* permite sua fácil manipulação. Existem três formas de inocular o patógeno: aplicação tópica, ingestão oral e injeção. Porém a quantificação do patógeno é realizada de maneira precisa somente pelo método de injeção (Fuchs et al., 2010; Trevijano-Contador, Zaragoza, 2014). A injeção é feita diretamente

na hemolinfa por meio das *prolegs*. Para isso é utilizada uma seringa apropriada, com a quantidade do micro-organismo pré-determinada. Após uma hora de infecção já é possível notar melanização e a larva passa a apresentar a coloração cinza, com redução de motilidade associada em 24 h. Com o toque, se as larvas não apresentarem nenhum estímulo físico, são caracterizadas como mortas (Fuchs et al., 2010). As formas de alimentação e condições de criação das larvas de *G. mellonella* devem ser criteriosamente padronizadas em cada estudo experimental, pois as condições ambientais podem interferir na resposta imunológica das larvas à infecção experimental (Cook, McArthur, 2013).

Para que se instale uma infecção a primeira barreira a ser rompida nesse invertebrado é a física, como as respostas epiteliais dos mamíferos a fim de impedir a colonização e infecção fúngica. Quando o corpo do inseto é invadido, os micro-organismos se deparam com o sistema imune, formado por resposta celular e humoral como nos seres humanos (Lionakis, 2011; Ligeża-Żuber, 2012). Estudos mostram que os insetos possuem sistema imune adaptativo e não geram anticorpos, mas conseguem promover resposta imune antecipada a uma provável infecção (Junqueira, 2012a).

A resposta imune humoral é composta por alguns processos, incluindo a melanização, a coagulação da hemolinfa e a produção de peptídeos antimicrobianos (AMP). Já a resposta celular possui o encapsulamento, a formação de nódulos, e principalmente a fagocitose (Ligeża-Żuber, 2012; Cook, McArthur, 2013).

Em *G. mellonella* a resposta imune celular se baseia nos hemócitos, que são células encontradas na hemolinfa destes insetos. Parecidos com neutrófilos de mamíferos, utilizam espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas líticas para eliminação de micro-organismos patogênicos. Os hemócitos conseguem distinguir estruturas próprias e não próprias do organismo (Ligeża-Żuber, 2012; Jacobsen, 2014). Neste modelo de invertebrado, os hemócitos estão dispostos

em seis classes: pró-hemócitos, coagulócitos, esferulócitos, enocitóides, plasmócitos e granulócitos. Os plasmócitos foram ainda redivididos de acordo com morfologia e função em outras quatro subclasses (Fuchs et al., 2010; Lionakis, 2011; Ligeza-Žuber, 2012; Arvanitis et al., 2013). A classificação dessas células que compõe a defesa de *G. mellonella* é baseada em características morfológicas e biológicas, porém ainda não é consolidada.

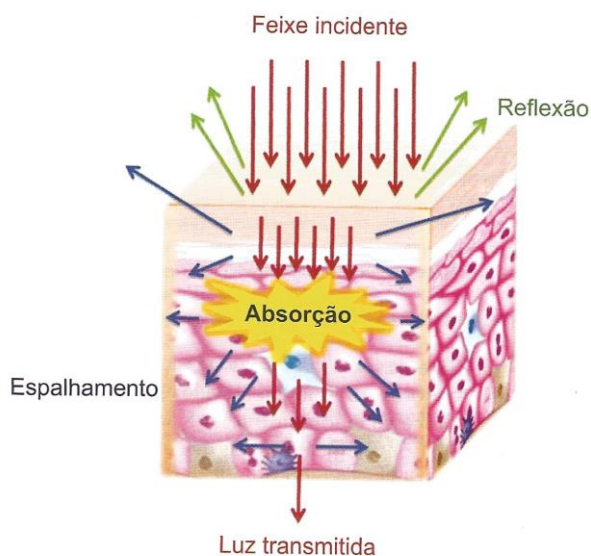
Devido a características do sistema imune de *G. mellonella* citadas anteriormente, esse modelo está se tornando cada vez mais uma referência para o estudo da patogênese microbiana, mecanismos de virulência e eficácia de antimicrobianos (Trevijano-Contador, Zaragoza, 2014).

Com o crescente surgimento de fungos patogênicos resistentes aos antimicrobianos, atualmente os pesquisadores buscam terapias que possam ser associadas aos medicamentos. Uma das terapias que tem se fortalecido nesses estudos é a terapia fotodinâmica (TFD).

A TFD requer a administração de um fotossensibilizador atóxico, de maneira sistêmica ou local, seguida de iluminação por um feixe de luz visível com comprimento de onda adequado e presença de oxigênio (Casas et al., 2011; Gonzáles, Maisch, 2012; Dovigo et al., 2013; François et al., 2013; Sahu et al., 2013).

A luz incidida pode interagir com o tecido alvo de diferentes maneiras. A superfície tecidual pode refletir a luz, quando a luz não é refletida, ela penetra no tecido (Figura 1). Nesse caso, a luz pode ser absorvida pelo tecido, transmitida quando não interage com o tecido ou espalhada quando sua propagação muda de direção. Na TFD a absorção da luz é a interação mais frequente, isso devido ao uso do fotossensibilizador (Sabino, Ribeiro, 2013).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da interação da luz irradiada com o tecido biológico

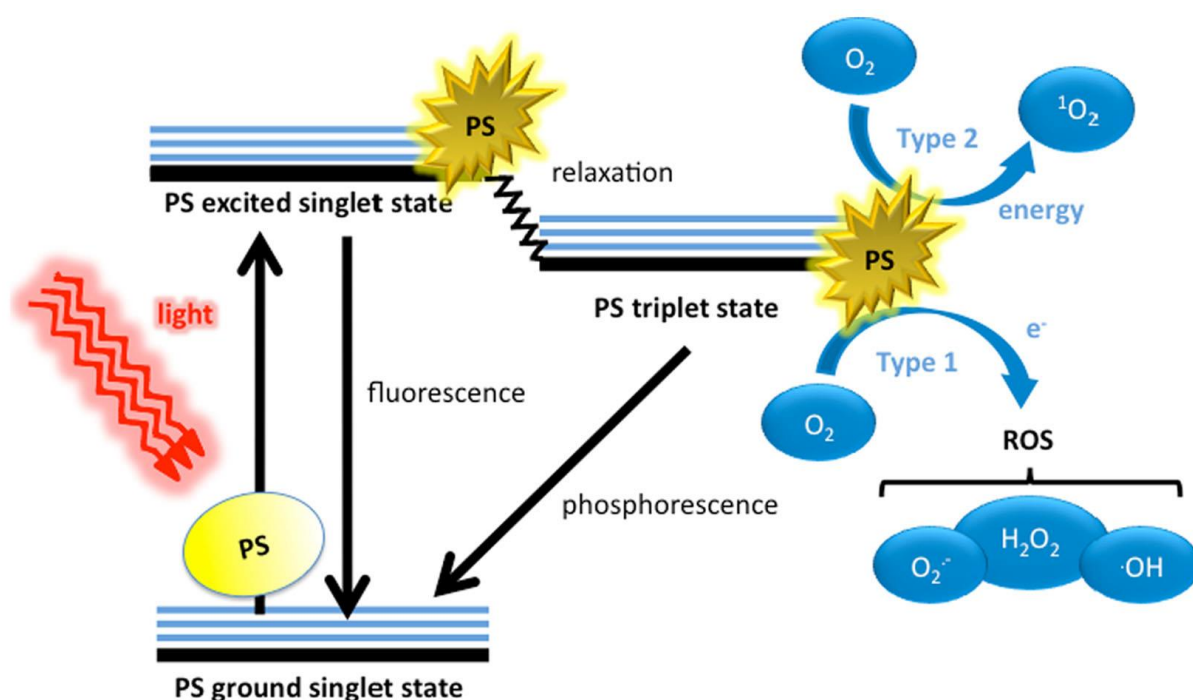


Fonte: Sabino, Ribeiro, 2013.

O fotossensibilizador absorve os fótons de luz, fazendo com que o fotossensibilizador de um estado fundamental passe para um estado *triplete* fotoativo. Neste estado a energia pode ser passada a outras biomoléculas por dois mecanismos de fotossensibilização: Tipo I – com substratos locais que originam radicais livres por transferência de carga; Tipo II – com transferência de energia dos fótons para moléculas de oxigênio, que resulta na produção oxigênio *singleto*, uma ROS. O oxigênio *singleto* é considerado um dos principais responsáveis pela ação fotodinâmica da TFD. Ambos os mecanismos de fotossensibilização originam ROS, que são citotóxicas (Figura 2) (González, Maisch, 2012).

As ROS têm a capacidade de reagir rapidamente com alvos não específicos como membranas celulares e proteínas levando à destruição microbiana, com a morte celular direta (Dovigo et al., 2013).

Figura 2 – Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da TFD



Fonte: Dai et al., 2012.

Entre as vantagens desta terapia estão: seu amplo espectro de ação, alta especificidade alvo, poucos efeitos colaterais, e pouca chance de induzir a resistência de patógenos. Sem evidências de genotoxicidade e mutagenicidade em fungos ou células humanas (González, Maisch, 2012; Dovigo et al., 2013). Algumas espécies de *Candida* usam mecanismos para resistirem à TFD antimicrobiana, como absorção reduzida ou alteração do fotossensibilizador causada por enzimas presentes na célula, bombas de efluxo do fotossensibilizador para fora da célula, enzimas neutralizantes de espécies

oxidativas. Tais mecanismos foram atribuídos à origem celular e ao tipo de fotossensibilizador utilizado (Casas et al., 2011; Calzavara-Pinton et al., 2012).

O uso da TFD no controle de *C. albicans* se mostrou eficiente, tanto aos micro-organismos na forma planctônica, quanto organizados em biofilme (Dovigo et al., 2011). Com o uso de microscopia eletrônica de varredura verificou-se que a TFD além de inativar os micro-organismos no biofilme de *C. albicans*, essa terapia também é capaz de alterar a estrutura do biofilme. Além disso, a TFD não induz resistência, fazendo com que sua aplicação possa ser repetida diversas vezes. Esses fatores sugerem o uso da TFD para o tratamento de infecções por cepas de *C. albicans* resistentes ao tratamento com antifúngicos convencionais (Gonzáles, Maish, 2012).

Recentes estudos têm demonstrado que de alguma forma a aplicação local da TFD ativa as respostas imunológicas, que propiciam benefícios não somente nas áreas tratadas, mas também à distância, de maneira sistêmica. Acredita-se que a aplicação da TFD pode aumentar a ativação de células específicas reforçando a resposta imune (Rogers, 2012).

Uma série de reações pode ser iniciada com a TFD, como as sinalizações celulares e a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, que interagem com o sistema imune inato. Estes sinais são ativados a partir de uma aplicação local, que estimula uma resposta sistêmica, levando ao recrutamento de neutrófilos e demais células inflamatórias (Mroz, Hamblin, 2011; Huang et al., 2012).

Segundo Krupka et al. (2011), muitos estudos já demonstraram a presença de neutrófilos, macrófagos e linfócitos no tecido tratado após TFD, relacionando sua ação com a ativação do sistema imune. A ação destas células inicia logo após a aplicação de TFD e permanece por até 24 h (Huang et al., 2012).

Tanaka et al. (2012) utilizaram a TFD, associada ao azul de metileno, de forma terapêutica e profilática na infecção de artrite em joelhos de modelos de ratos, causada por *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina. Observaram que o uso da TFD terapêutica promoveu migração e acúmulo de neutrófilos no local da infecção e esta foi reduzida. Quando a TFD foi utilizada antes da inoculação bacteriana, houve acúmulo rápido de neutrófilos no local resultando na inibição do crescimento impedindo o estabelecimento da infecção, sugerindo a ativação da resposta imune inata mediada pela ação da TFD.

Em 2013, Vatansever et al. investigaram se o uso da TFD, no tratamento de um tumor primário subcutâneo na coxa de ratos, poderia estimular a resposta imune destes animais a combater metástases cerebrais distantes. Para isso induziram em um grupo de ratos um tumor primário subcutâneo com metástase cerebral por meio da injeção de células tumorais na coxa esquerda e no cérebro respectivamente. Em outro grupo induziram apenas o tumor cerebral. No grupo com metástase o tumor primário era tratado com TFD e o tumor metastático cerebral não recebia tratamento direto, já no grupo onde somente havia o tumor cerebral, este não recebeu tratamento. Quando comparadas às curvas de sobrevivência de ambos os grupos observaram que o grupo com metástases apresentou aumento de sobrevida em relação ao grupo sem tratamento, isso sugere que o uso de TFD mesmo que distante possa ter estimulado o sistema imune do animal e induzido o combate às células tumorais presentes em outra região do corpo dos ratos, contribuindo para a melhora de sua sobrevida.

Assim, é cada vez mais importante o desenvolvimento de estudos para compreender a influência da TFD na resposta imunológica às infecções. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da TFD a de terapia laser na candidose experimental e na resposta imunológica à *C. albicans* utilizando *G. mellonella* como modelo hospedeiro de infecção.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica e da terapia laser na candidose experimental e na resposta imunológica no modelo hospedeiro *G. mellonella*.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a ação da terapia fotodinâmica e da terapia laser na candidose experimental induzida em *G. mellonella* por meio de ensaios de sobrevivência;
- b) analisar os efeitos da terapia fotodinâmica e da terapia laser na resposta imune celular de *G. mellonella* utilizando-se dos ensaios de densidade hemocitária.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de *C. albicans*

Foi utilizada uma cepa clínica de *C. albicans* isolada de candidose orofaríngea de pacientes HIV positivos (cepa 17) (Junqueira et al., 2012b) e uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 18804). Ambas as cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) de São José dos Campos.

As cepas estavam armazenadas em estoques congelados em caldo BHI, contendo 20 % de glicerol a -80°C . A fim de garantir a ausência de contaminação as cepas foram submetidas à semeadura em CHROMagar Candida, as colônias que apresentaram coloração verde indicando pertencer a espécie de *C. albicans* foram utilizadas no estudo. Para ativação do micro-organismo, as cepas de *C. albicans* foram cultivadas em meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) pela técnica de esgotamento e incubadas por 48 h a 37°C em estufa bacteriológica. A seguir, as colônias (Figura 3) posteriormente transferidas para o meio da semeadura em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB, Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) suplementado com glicose na concentração de 100 mM e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h.

Figura 3 – Placa de ágar Sabouraud contendo colônias de *C. albicans* isoladas por técnica de esgotamento



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Modelo de *G. mellonella*

Larvas de *G. mellonella* em seu estágio final da fase larval foram utilizadas como modelo hospedeiro. As larvas foram provenientes do laboratório de invertebrados da disciplina de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia, da Unesp, ICT de São José dos Campos. Para criação de *G. mellonella* no Laboratório de invertebrados, foi necessária a limpeza e a alimentação das larvas três vezes por semana. A alimentação foi baseada em cera, e ração composta de 25% de fubá, 15% de levedura de cerveja, 10% de farinha de soja, 10% de leite desnatado, 20% de mel e 20% de glicerol, preparada na própria Instituição.

Cada grupo experimental foi composto por 15 larvas escolhidas aleatoriamente e com peso corporal entre 250 e 300 mg (Figura 4). Todos os insetos selecionados apresentavam cor clara e estavam livres de manchas e/ou

pigmentos escuros em sua cutícula, que poderiam indicar o comprometimento do animal por algum processo infeccioso, influenciando no resultado do experimento. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Figura 4 – Larvas de *G. mellonella* do Laboratório de invertebrados do ICT



Fonte: Elaborada pela autora.

Para cada ensaio, ao menos dois grupos controles foram sempre incluídos. O primeiro recebeu 20 μL de PBS, o segundo grupo foi composto por larvas que não receberam injeção alguma. Em casos onde ao menos em um dos grupos controle houvesse duas larvas mortas, o ensaio foi desconsiderado e um novo refeito.

Seringas Hamilton com capacidade de 10 μL (Hamilton Inc, EUA) foram utilizadas para as injeções (Figura 5). A cepa de *Candida* foi inoculada na última *proleg* esquerda da larva (Figura 6). A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foi executada a cada cinco injeções e/ou quando do início das injeções de diferentes inóculos. Para tal, a mesma foi lavada sequencialmente em quatro tubos Falcon. Cada tubo continha 15 mL de determinada solução. O primeiro contendo solução de hipoclorito de sódio a 0,25% em água destilada

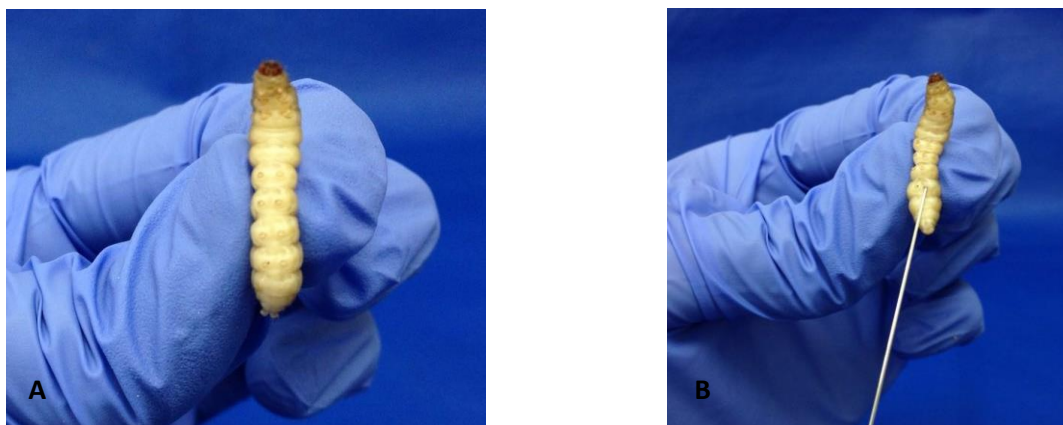
esterilizada; o segundo álcool absoluto diluído a 95% em água destilada; o terceiro com água destilada esterilizada e o quarto solução salina tampão fosfato (NaCl 0,9%) esterilizada - PBS. Em cada tubo, a agulha foi mergulhada e cinco movimentos no êmbolo da seringa para cima e para baixo foram executados.

Figura 5 – Seringas Hamilton com capacidade de 10 μ L



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6 – Inoculação de *C. albicans* em *G. mellonella*



Legenda: a) *G. mellonella* em posição ventral, demonstrando *proleg*; b) Inoculação na última *proleg* esquerda da larva de *G. mellonella*.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Infecção por *C. albicans* em *G. mellonella* e análise da curva de sobrevivência

Para o preparo das suspensões padronizadas de *C. albicans*, foi utilizada a metodologia descrita por Fuchs et al. (2010). Após o período de incubação de 24 h, as células fúngicas foram isoladas por centrifugação a 5000 rpm por 10 min (*MPW 350- Med. Instruments*), sendo o sobrenadante descartado. O depósito restante foi ressuspensionado em PBS, e misturado em agitador de tubos (vortex) por 30 s. Esta lavagem de células foi repetida mais duas vezes.

O ajuste para a obtenção de suspensão com o número de células desejado para cada experimento foi feito utilizando-se hemocítmetro.

Com o propósito de confirmar o número de células fúngicas no inóculo utilizado, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). A partir de diluições seriadas do inóculo, alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h. Decorrido este tempo foi efetuada a contagem e calculado o número de UFC/mL.

Suspensões de cada cepa de *C. albicans* contendo 10^5 a 10^7 células/larva foram injetadas nas larvas para realização da curva de sobrevivência e seleção da concentração a ser utilizada no estudo. Após a inoculação, os animais foram acondicionados em placas de Petri e incubados a 37°C no escuro. Diariamente, o número de larvas mortas foi anotado para realização da curva de sobrevivência. Foram consideradas mortas larvas que não apresentaram nenhum movimento ao toque por uma pinça metálica (Figura 7). Os animais mortos, assim que identificados, foram removidos do grupo.

Figura 7 –*G. mellonella* mortas, melanizadas



Legenda: a) *G. mellonella* melanizadas em placas de Petri imóveis; b) *G. mellonella* melanizada em visão aproximada na posição dorsal e ventral.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Testes para padronização da concentração do fotossensibilizador e da energia laser

Para a escolha da concentração de fotossensibilizador a ser utilizada no estudo, foi medida a potência do laser ao passar por *G. mellonella*, utilizando-se para isso um medidor de potência (Laser Check – MM Optics). A larva foi colocada entre duas lâminas em posição ventral, o medidor de potência foi posicionado abaixo da lâmina inferior à larva, o laser foi incidido por cima da lâmina superior para que pudesse atingir o corpo da larva. Foi obtida a medida de potência da luz que passou pela larva com diferentes concentrações de fotossensibilizador (75 μM , 100 μM , 150 μM , 300 μM e 600 μM), antes e após sua administração.

A fim de complementar as informações a respeito da capacidade de absorção de luz pela larva de *G. mellonella*, foi realizada uma análise da distribuição de luz no corpo do animal por meio de fotografias submetidas à análise do Programa *Fiji* do *Image J*. Esse programa é um pacote de

processamento de imagens com *plugins* para a análise de imagens científicas. Para isso o laser foi aplicado isoladamente ou associado ao fotossensibilizador.

Para avaliar a distribuição do laser bem como sua profundidade de ação no corpo da larva as fotografias foram analisadas conforme o *plugin Interactive 3D surface PLOT* pertencente ao programa *Fiji*. Esse *plugin* cria gráficos de superfície interativos de todos os tipos de imagem, a luminância de uma imagem é interpretada como altura para o gráfico (eixo z).

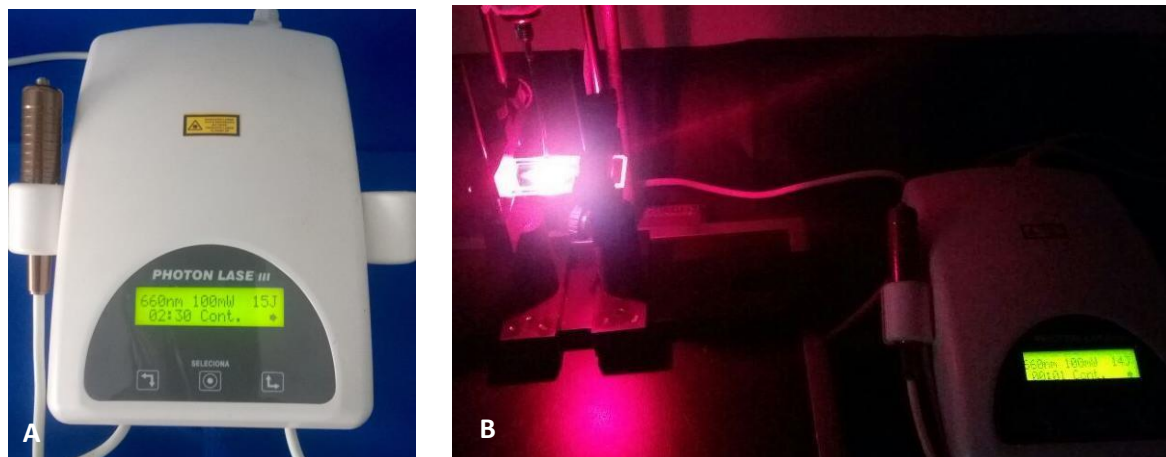
A seguir, a concentração de fotossensibilizador que permitiu melhor distribuição da luz ao longo da espessura do corpo do animal, após sua administração foi escolhida para os ensaios de TFD.

Em relação à escolha da energia do laser mais efetiva a ser utilizada no experimento, foram testadas as energias de 6 J e 15 J. Foi realizada a TFD com estas medidas de energia, aquela que induziu melhor taxa de sobrevivência das larvas foi escolhida.

3.5 Realização da terapia fotodinâmica em *G. mellonella* infectadas por *C. albicans*

Para realização da TFD em *G. mellonella* foi seguida a metodologia de Chibebe Jr et al. (2013), com algumas modificações. Como fotossensibilizador foi utilizado azul de metileno (Sigma – Aldrich, São Paulo, Brasil) no volume de 10 µL (em concentração determinada durante o estudo) e como fonte de luz um laser em baixa intensidade de Arseneto de Gálio Alumínio (Photon Lase III, DMC, São Carlos/ SP, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), potência de 100 mW (com energia definida durante o estudo) (Figura 8).

Figura 8 – Fonte de luz: equipamento laser diodo de baixa intensidade emitido em 660nm



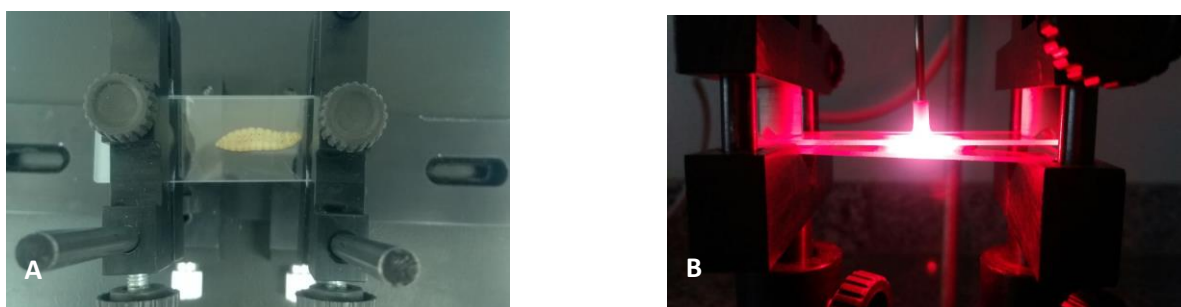
Legenda: a) Visão anterior do equipamento laser que foi utilizado; b) Equipamento laser em baixa intensidade durante aplicação da TFD.
Fonte: Elaborada pela autora.

As larvas infectadas com cepas de *C. albicans*, após 30 min da infecção, receberam injeção de azul de metileno na última *proleg* direita. A seguir, permaneceram 30 min no escuro (tempo pré-irradiação) para proporcionar uma boa dispersão do fotossensibilizador pelo corpo do animal.

Então, o laser foi aplicado de acordo com os parâmetros previamente definidos. Cada larva foi colocada entre duas lâminas em posição ventral, sob um suporte, nas quais a luz foi incidida pela lâmina superior. O ambiente foi mantido escuro durante o experimento (Figura 9).

Em cada experimento, foram sempre realizados os seguintes grupos experimentais: “*Candida* + Foto + Laser”, “*Candida* + PBS + Laser”, “*Candida* + Foto”, “*Candida* + PBS”, “PBS+PBS”, “*No injection*”. Com 15 larvas por grupo, totalizando 90.

Figura 9 – Larvas em suporte para realização da TFD



Legenda: a) Visão superior de *G. mellonella* posicionada entre duas lâminas em ventral, no suporte para TFD; b) Visão anterior de *G. mellonella* posicionada durante a TFD, com a ponteira no sentido da incidência de laser.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a realização de TFD, as larvas foram incubadas em estufa a 37°C e analisadas após as primeiras 18 h, seguindo por sete dias para determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*.

3.6 Análise da densidade hemocitária de *G. mellonella*

Foi utilizada a metodologia descrita por Fuchs et al. (2010), Scorzoni et al. (2013) e Zdybicka-Barabas e Cytryńska (2011) com algumas modificações.

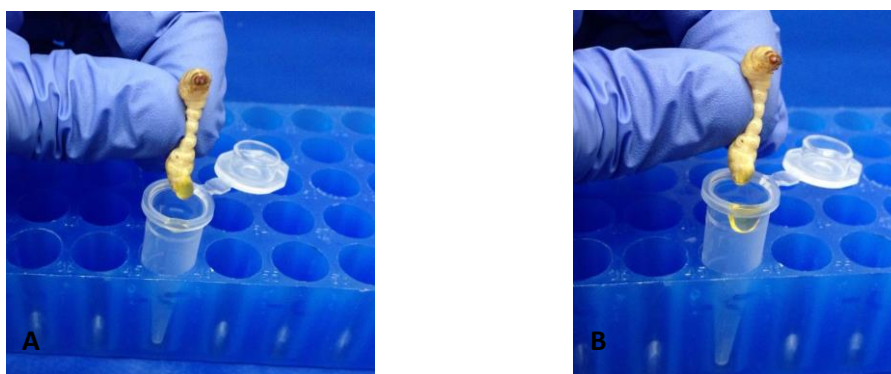
Para o estudo da resposta imunológica, as larvas de *G. mellonella* foram infectadas por *C. albicans* e tratadas com TFD conforme os parâmetros determinados anteriormente. Após foram realizados os testes de densidade hemocitária, utilizando os seguintes grupos experimentais: “*Candida* + Foto + Laser”, “*Candida* + PBS + Laser”, “*Candida* + PBS”, “PBS+PBS”, sendo que para cada grupo foi realizado um *pool* de 3 larvas por ensaio, realizado em triplicata, correspondendo a 9 larvas por grupo, totalizando 36.

Inicialmente foi realizada uma avaliação da densidade de hemócitos de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* e não tratadas por TFD. Para isso células de *C. albicans* padronizadas em concentrações de 10^5 cels/larva e 10^6 cels/larva foram injetadas em *G. mellonella*. A seguir as larvas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C e avaliadas após 3, 6, 18, 24 e 48 h.

Com base nos resultados obtidos, partiu-se para a análise da densidade de hemócitos em larvas tratadas com TFD. Nessa análise, as larvas foram infectadas com 10^6 cels/larva, submetidas à TFD, e após 3,6 e 18 h a hemolinfa foi coletada para a contagem de hemócitos.

Para a coleta da hemolinfa as larvas foram imobilizadas em placa de Petri gelada por cerca de 20 min, em seguida foram cortadas com bisturi na parte ventral no sentido céfalo-caudal e espremidas para a retirada da hemolinfa que foi coletada em microtubos de 1,5 mL. A seguir 10 μL de cada hemolinfa coletada foram diluídos em 990 μL de *IPS* (tampão anticoagulante estéril – 150 nM de cloreto de sódio, 5 nM de cloreto de potássio, 10 nM de tris-HCL PH 6,9, 10 nM de EDTA e 30 nM de citrato de sódio) em microtubos gelados (Figura 10). Para a contagem dos hemócitos foi utilizado hemocitômetro.

Figura 10 – Retirada de hemolinfa das larvas de *G. mellonella*



Legenda: a) Larva após ser cortada com bisturi, espremidas para retirada de hemolinfa; b) Hemolinfa coletada em microtubo.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 Análise estatística

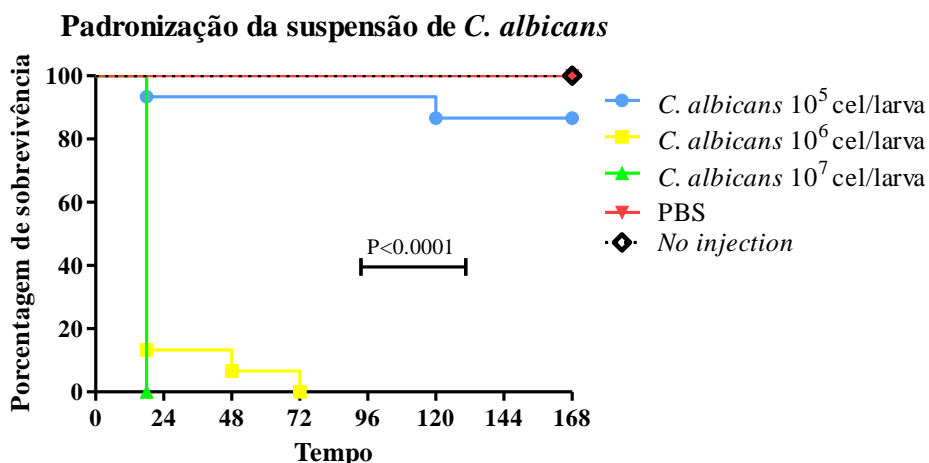
Para os experimentos de sobrevivência em *G. mellonella* foi realizada a curva de sobrevivência utilizando o método *Kaplan-Meier* e o nível de significância entre a sobrevivência das mesmas foi calculado através do teste *Log-rank (Mantel-Cox)*. Os resultados da análise imunológica foram submetidos à análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Em todos os testes foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*, considerando-se nível de significância de 5%.

4 RESULTADO

4.1 Análise da curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas por diferentes concentrações de *C. albicans*

Quando analisada a curva de sobrevivência de *G. mellonella* com diferentes concentrações de suspensões inoculadas de *C. albicans* nas larvas, (Figura 11) foi observado que nos grupos controles, tanto PBS, quanto *No injection* (sem inoculação), 100% das larvas sobreviveram durante os sete dias de análise. O grupo de larvas inoculado com a concentração injetada de *C. albicans* 10^5 células/larva apresentou 13,3% de morte das larvas, já o grupo infectado pela concentração de 10^6 células/larva apresentou 100% de morte de *G. mellonella* em 72 h. Com relação à concentração de *C. albicans* a 10^7 células/larva ocorreu morte de 100% de *G. mellonella* em apenas 18 h. Assim a concentração de 10^6 células/larva foi adotada para todos os experimentos subsequentes desse estudo, pois apresentou uma dose letal, mas com tempo hábil para administração de uma terapia.

Figura 11 – Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas com diferentes concentrações de *C. albicans*

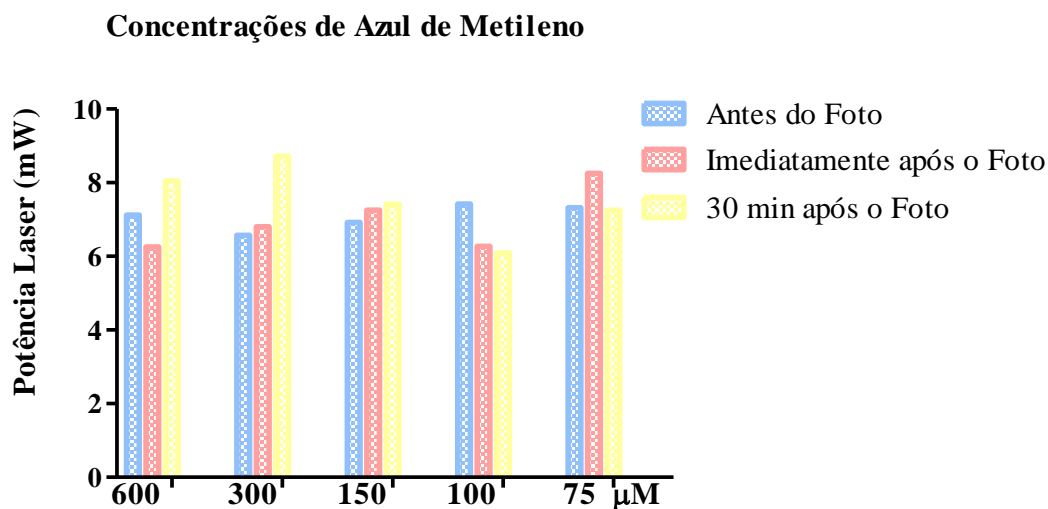


Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Avaliação dos efeitos do laser e fotossensibilizador em larvas de *G. mellonella* não infectadas por *C. albicans*

Para cada concentração de fotossensibilizador foram obtidas 4 medidas de potência da luz utilizada, que ocorreram em três momentos diferentes: antes da administração do fotossensibilizador, após a aplicação imediata do fotossensibilizador e após 30 min da administração do mesmo. A partir destes valores foi realizada média referente a cada concentração, a melhor resposta correspondeu à concentração que apresentou redução na média da potência da luz incidida. Indicando que a luz estaria absorvida no interior da larva após a aplicação do fotossensibilizador. Foi realizada a análise das médias obtidas pelas diferentes concentrações e verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre elas (Figura 12). Assim a concentração de Azul de metileno de 100 μ M foi escolhida para o estudo.

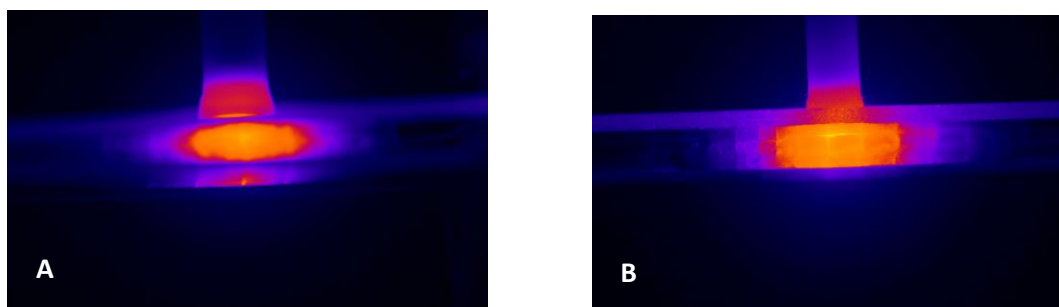
Figura 12 – Análise das médias de potência laser mensuradas com diferentes concentrações de fotossensibilizador ao longo do tempo



Legenda: Foto corresponde ao fotossensibilizador.
Fonte: Elaborada pela autora.

Com o uso do programa *Fiji* foi possível observar a distribuição de luz no corpo do animal, com a aplicação do laser isoladamente ou associado ao fotossensibilizador (Figura 13).

Figura 13 – Imagens ilustrando a passagem do laser em *G. mellonella*

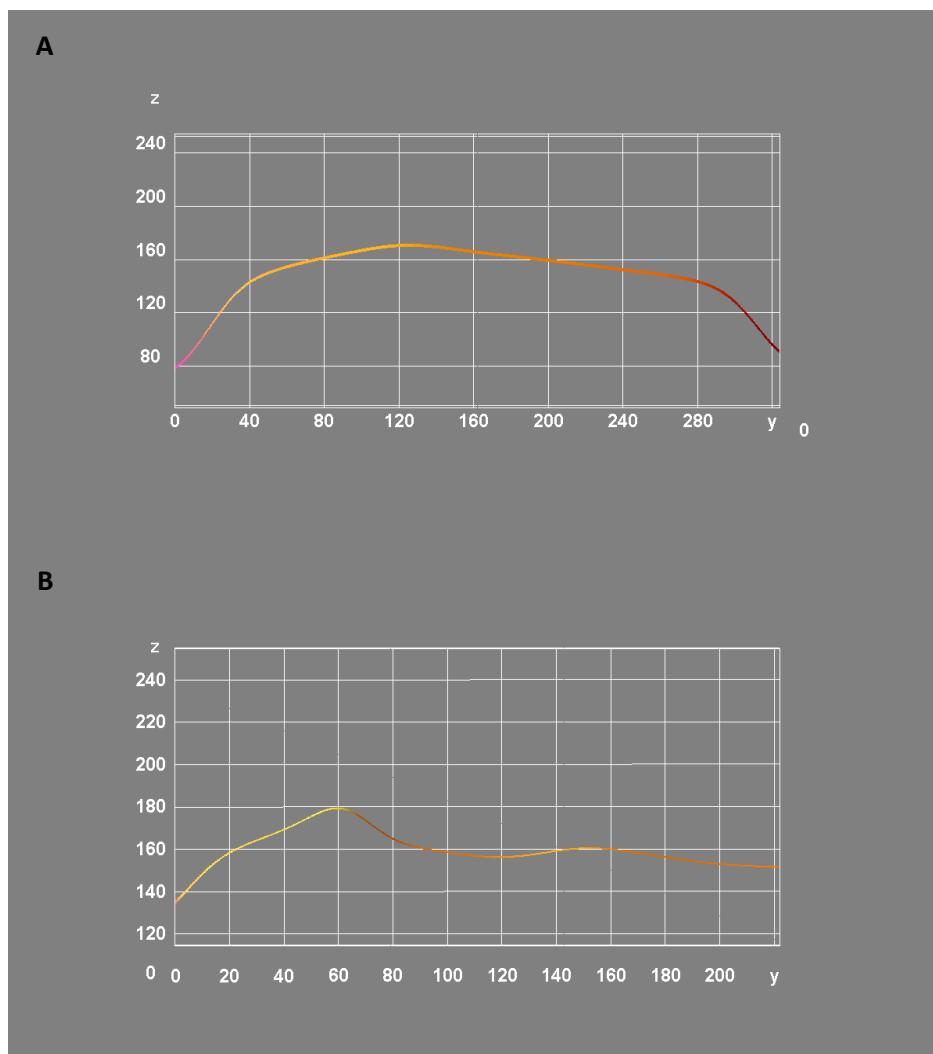


Legenda: a) Passagem do laser em *G. mellonella* sem o uso de fotossensibilizador; b) Passagem de laser em *G. mellonella* com o uso de fotossensibilizador 100 μM.
Fonte: Elaborada pela autora.

Quando as imagens foram analisadas conforme o *plugin Interactive 3D surface PLOT*, pertencente ao programa *Fiji*, foi possível avaliar a profundidade da ação do laser no corpo do inseto bem como qual a média de potência agindo no laser em cada ponto (Figura 14). Adotou-se a altura média da larva sob as duas lâminas correspondente a 3 mm equivalente a 320 no eixo y da figura A e 220 da figura B, e 77 mW de potência usada na irradiação correspondente a 240 no eixo z da figura A e 250 no eixo z da figura B. Sem o fotossensibilizador o início de uma distribuição de luz uniforme no animal se deu em 0,36 mm, mantendo-se até 2,5 mm de profundidade no corpo da larva, com uma potência de 44,91 mW, atingindo um pico de 54,54 mW em 1 mm de altura. Com o uso do fotossensibilizador associado observou-se no gráfico, 0,27 mm abaixo da cutícula do animal se iniciou distribuição uniforme de luz atingindo a potência de aproximadamente 49,28 mW, isso se manteve até 2,45 mm da larva, atingindo um pico de potência de 55,44 mW em 0,81 mm.

Na figura 15, foi avaliada a distribuição de luz no comprimento do inseto. Adotou-se o comprimento da larva de 2 cm, equivalendo a 2300 no eixo x da figura A e 1700 da figura B, e 77 mW de potência usada na irradiação correspondente a 250 no eixo z de ambas as figuras. Sem o fotossensibilizador uma distribuição uniforme de luz no animal se deu por 32% do seu comprimento. Com o uso do fotossensibilizador observou-se no gráfico que a luz foi distribuída por 39,5% do corpo de *G. mellonella*.

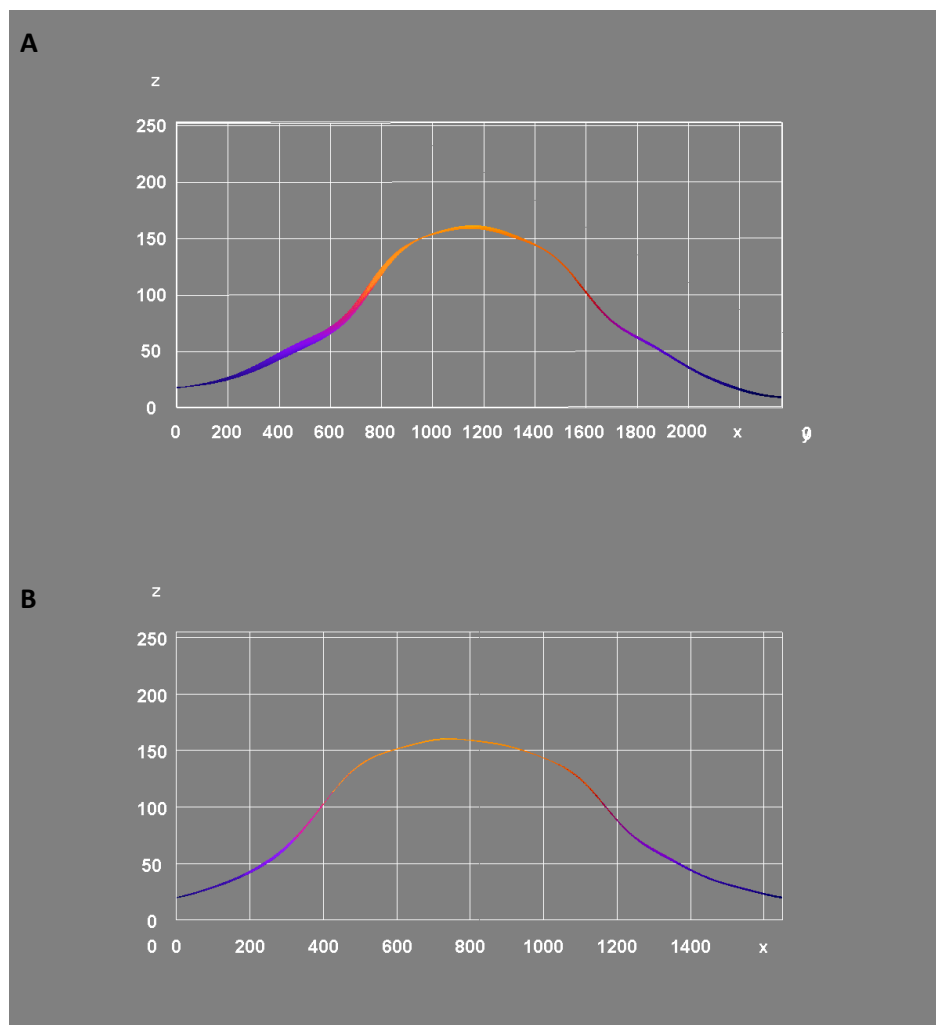
Figura 14 – Plotagem correspondente à profundidade de penetração laser na larva de *G. mellonella*



Legenda: Eixo z corresponde à potência laser, eixo y corresponde à altura do corpo da larva. a) Plotagem correspondente a profundidade de ação do laser na *G. mellonella* sem o uso de fotossensibilizador, eixo z (240 = 77mW), eixo y (320 = 3 mm altura da larva); b) Plotagem correspondente a profundidade de ação do laser na *G. mellonella* com o uso de fotossensibilizador, eixo z (250 = 77mW), eixo y (220 = 3 mm altura da larva).

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 15 – Plotagem correspondente à distribuição do laser no comprimento do corpo da larva de *G. mellonella*



Legenda: Eixo z corresponde à potência laser (250 = 77 mW), eixo y corresponde ao comprimento do corpo da larva. a) Plotagem correspondente a distribuição da luz laser na *G. mellonella* sem o uso de fotossensibilizador, eixo x (2300 = 2cm comprimento da larva); b) Plotagem correspondente a distribuição da luz laser na *G. mellonella* com o uso de fotossensibilizador, eixo x (1700 = 2cm comprimento da larva).

Fonte: Elaborada pela autora.

A seguir, foi realizada a curva de sobrevivência de *G. mellonella* com a aplicação isolada de laser nas energias de 6 J e 15 J, para avaliar se a incidência de laser seria letal as larvas. Verificou-se que nenhuma das energias do laser testadas, bem como os grupos controle, PBS e *No injection*, estimularam a morte

das larvas nos 7 dias analisados. Mantendo 100% de sobrevivência de todas *G. mellonella*.

O mesmo resultado foi obtido quando testada a TFD, que consiste na associação do fotossensibilizador 100 μM e das energias laser de 6 e 15 J, e quando analisada a presença somente do fotossensibilizador. Mantendo 100% de sobrevivência de todas *G. mellonella*.

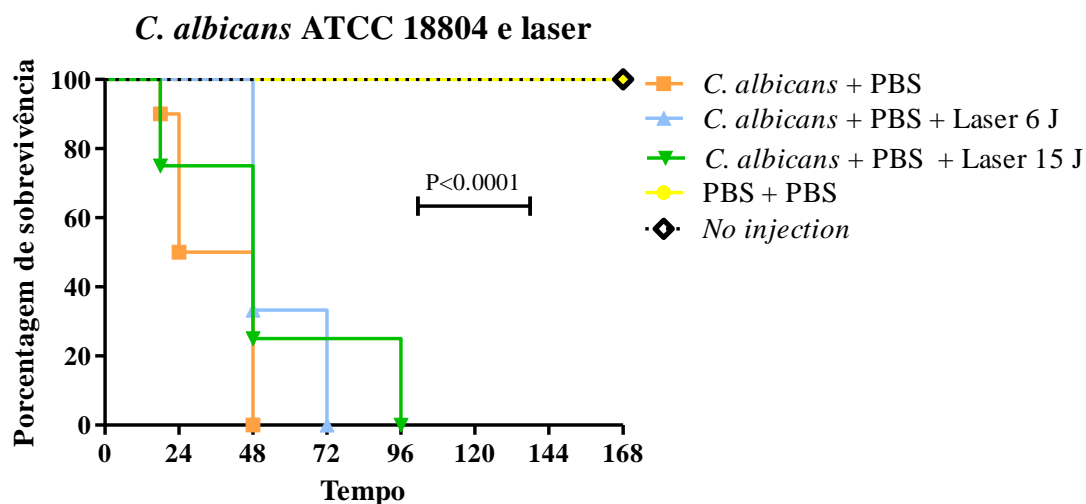
Obtidos os resultados acima, foi dada continuidade no estudo, com início dos testes do modelo invertebrado com infecção.

4.3 Análise da terapia laser e da TFD em *G. mellonella* infectada com *C. albicans* ATCC 18804

Primeiramente as larvas de *G. mellonella* foram submetidas à infecção com a cepa ATCC 18804 de *C. albicans*. A seguir, foram irradiadas com laser nas energias de 6 e 15 J. Foi possível observar que somente a aplicação laser, aumentou a sobrevivência das larvas, quando comparado ao grupo infectado com *Candida* que não obteve tratamento (Figura 16).

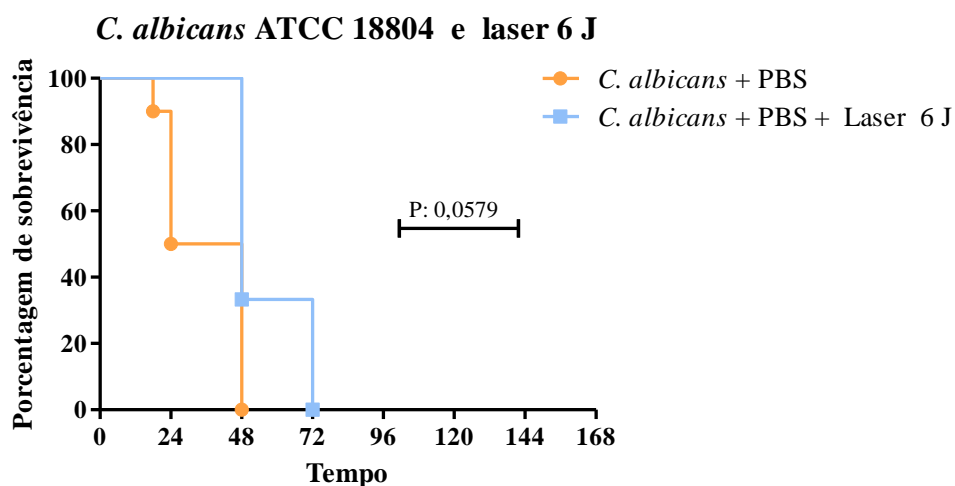
Para facilitar a análise estatística entre os grupos, as energias de 6 e 15 J foram analisadas em gráficos separados (Figuras 17 e 18).

Figura 16 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* ATCC 18804 e tratadas com diferentes energias do laser



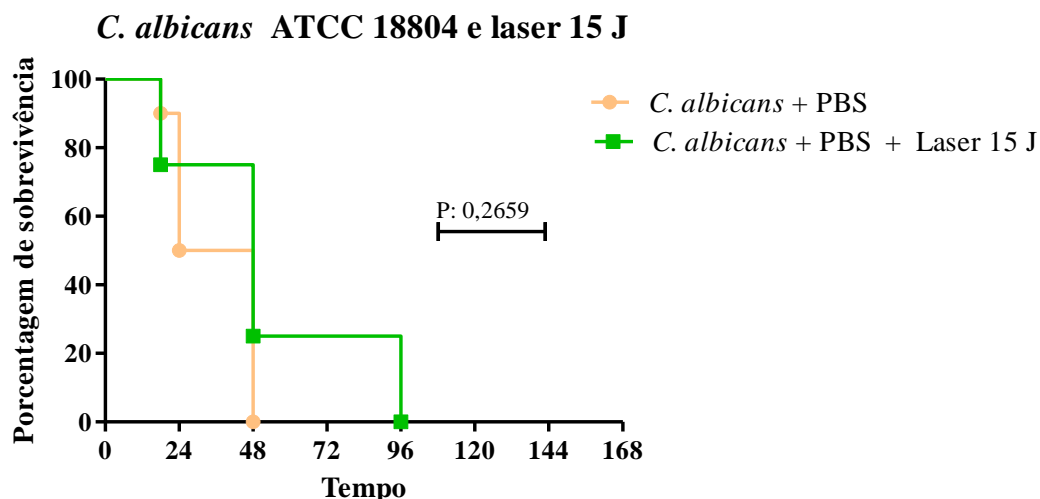
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* (ATCC 18804) e tratadas com laser 6 J



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* (ATCC 18804) e tratadas com laser 15 J



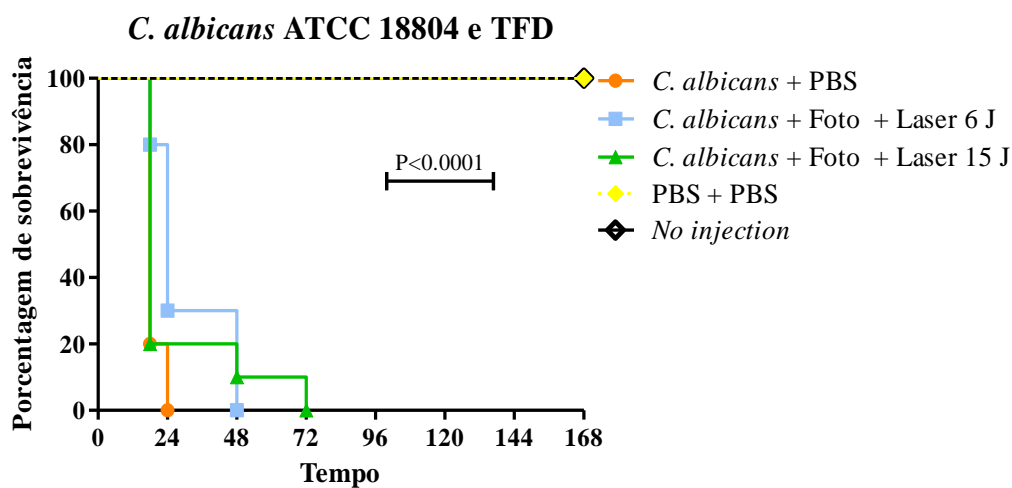
Fonte: Elaborada pela autora.

Nos gráficos anteriores foi possível observar que no grupo *Candida* + PBS houve 100% de morte das larvas em 48 h, já nos grupos *Candida* + PBS + Laser 6 J a morte das larvas se deu apenas em 72 h e no grupo *Candida* + PBS + Laser 15 J em 96 h. Assim os grupos que receberam tratamento apresentaram aumento da sobrevivência das larvas, porém esse aumento não foi acompanhado de diferença estatística.

Quando foi realizada a TFD, houve aumento da sobrevivência das larvas com relação ao grupo controle *Candida* + PBS, tanto para a energia de 6 J como para a de 15 J (Figura 19).

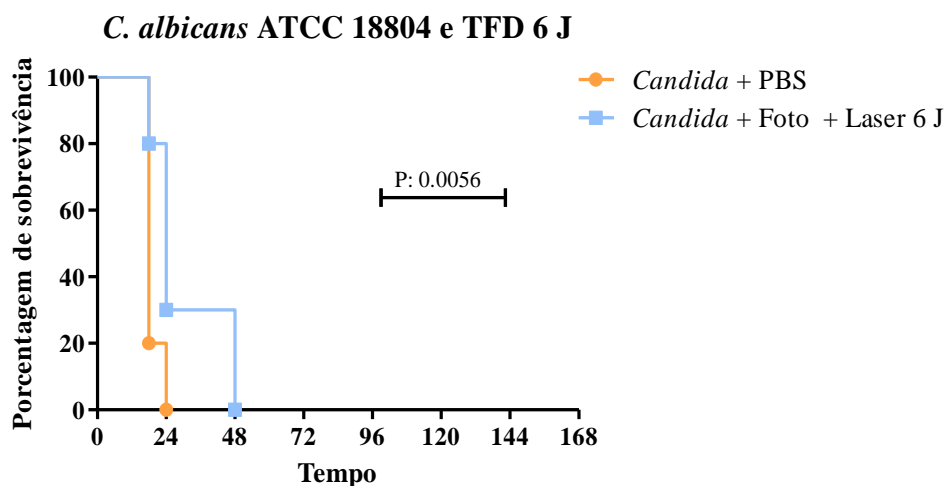
Para análise estatística e mais fácil interpretação entre os grupos, as energias de 6 J e 15 J foram analisadas distintamente (Figuras 20 e 21). Houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo TFD com o uso da energia de 6 J, o qual proporcionou aumento na sobrevivência das larvas para 48 h.

Figura 19 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* (ATCC 18804) e tratadas com TFD



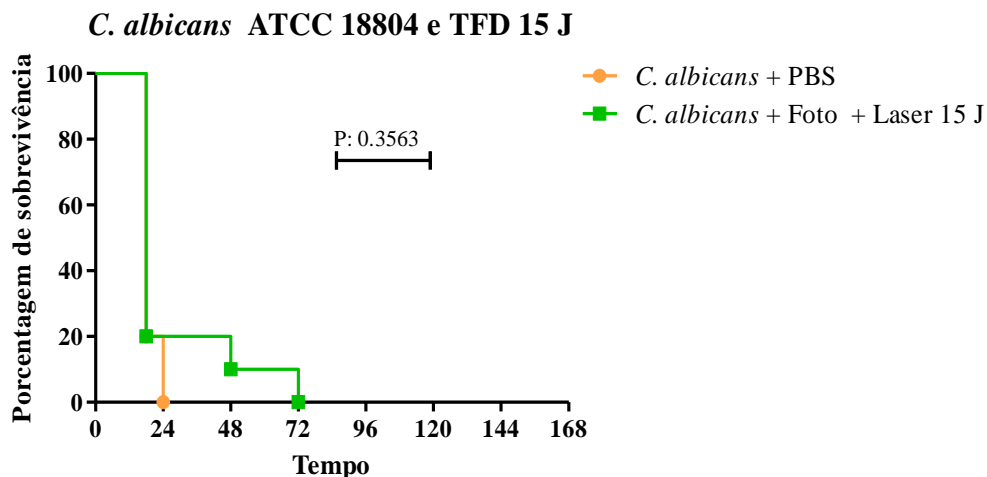
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* (ATCC 18804), tratadas com TFD 6 J



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* (ATCC 18804), tratadas com TFD 15 J



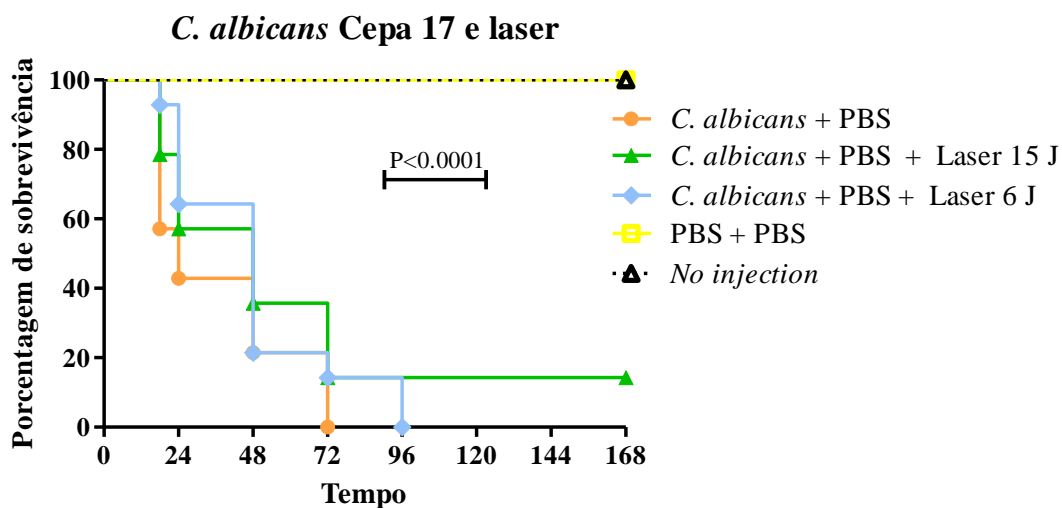
Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Análise dos efeitos da energia laser e da TFD em larvas de *G. mellonella* infectadas com cepa clínica de *C. albicans*

Assim que realizados os testes com a cepa ATCC 18804 de *C. albicans*, foram iniciadas as análises de sobrevivência com a cepa clínica 17 de *C. albicans* (Figura 22). Observou-se que a energia laser de 6 e 15J proporcionaram as larvas infectadas maior sobrevida em relação ao grupo *Candida* + PBS.

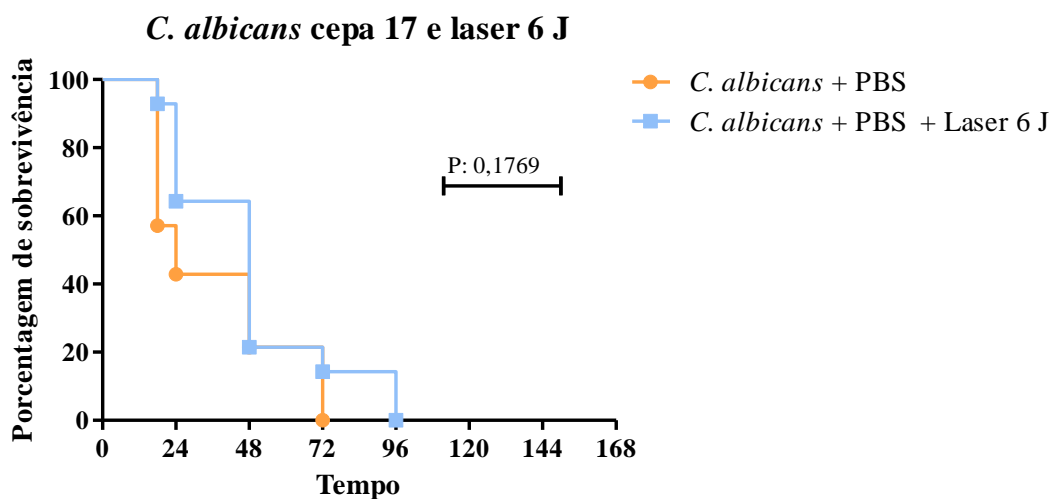
Quando comparado o grupo *Candida* + PBS ao grupo *Candida* + PBS + Laser 6 J isoladamente, foi observado que ocorreu melhora na sobrevivência das larvas (Figura 23). Aumentando a sobrevida de 72 h para 96 h, respectivamente, sem diferença estatística significativa ($P= 0,1769$). Já o grupo *C. albicans* + PBS + Laser 15 J aumentou a sobrevida para 168 h ($P= 0,1890$) (Figura 24).

Figura 22 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* (Cepa clínica 17), tratadas com diferentes energias laser e grupos controle



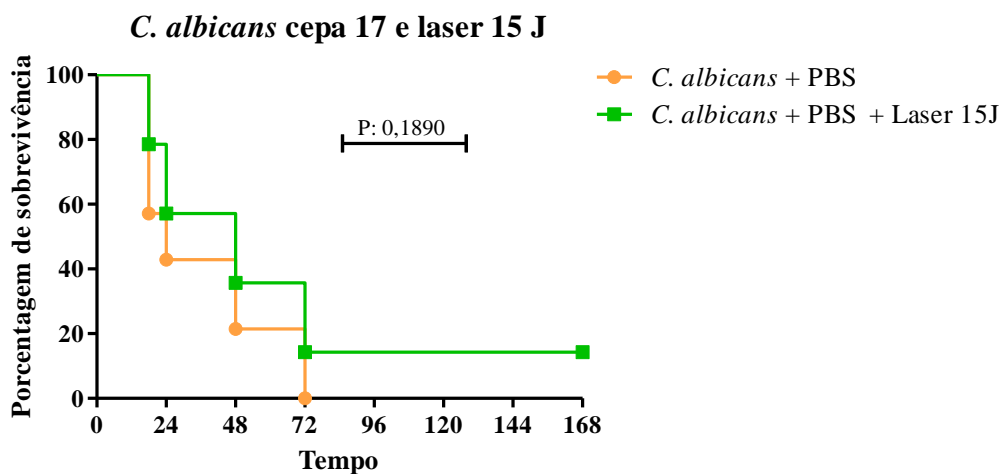
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* (Cepa clínica 17), tratadas com laser 6 J



Fonte: Elaborada pela autora.

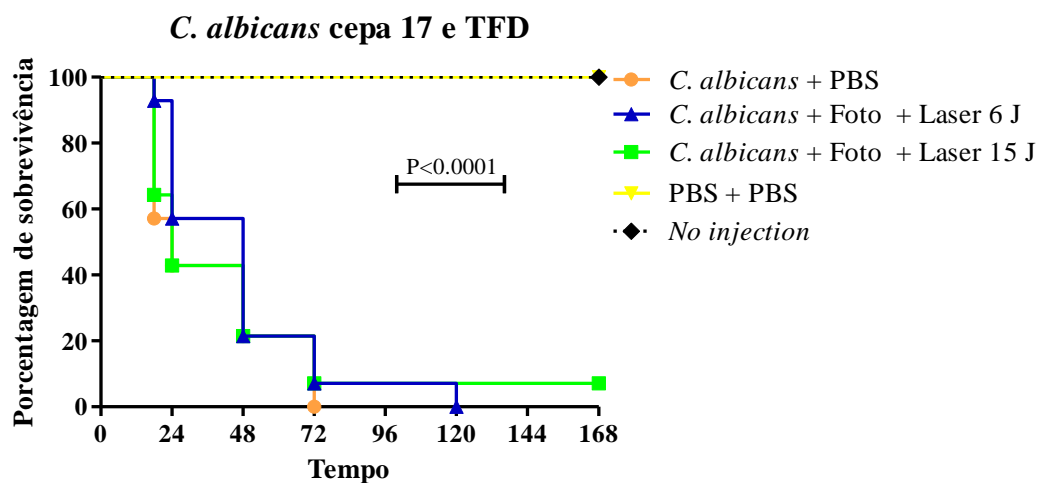
Figura 24 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* (Cepa clínica 17), tratadas com laser 15 J



Fonte: Elaborada pela autora.

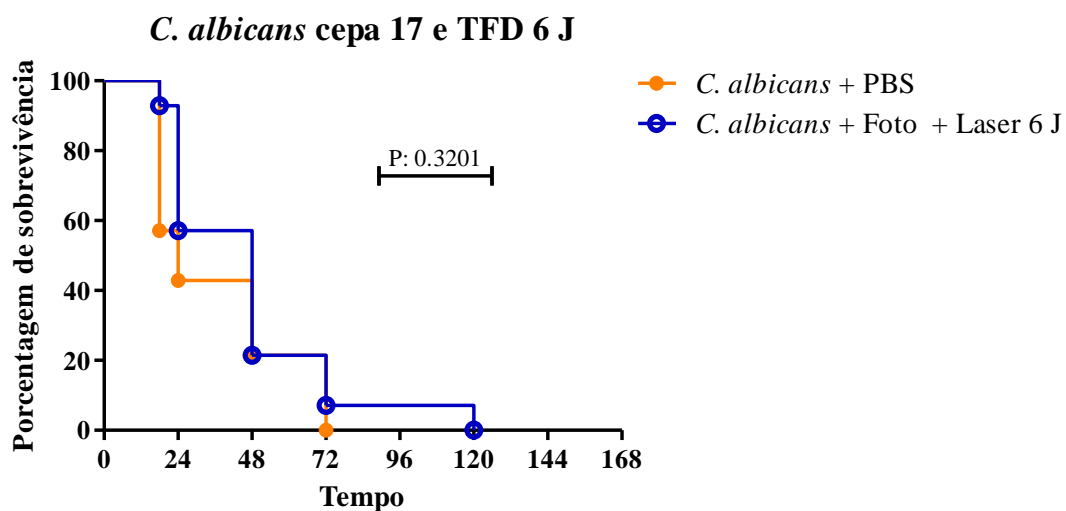
Na administração do tratamento com a TFD, houve aumento da sobrevivência das larvas com relação ao grupo controle *Candida* + PBS, com o uso da energia de 6 e 15 J (Figura 25). Para análise estatística entre os grupos, as energias de 6 J e 15 J foram analisadas separadamente (Figuras 26 e 27). A TFD aumentou a sobrevivência das larvas tanto com o uso da energia de 6 J ($P=0,3201$), quanto 15 J ($P=0,7377$).

Figura 25 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* Cepa clínica 17, tratadas com TFD



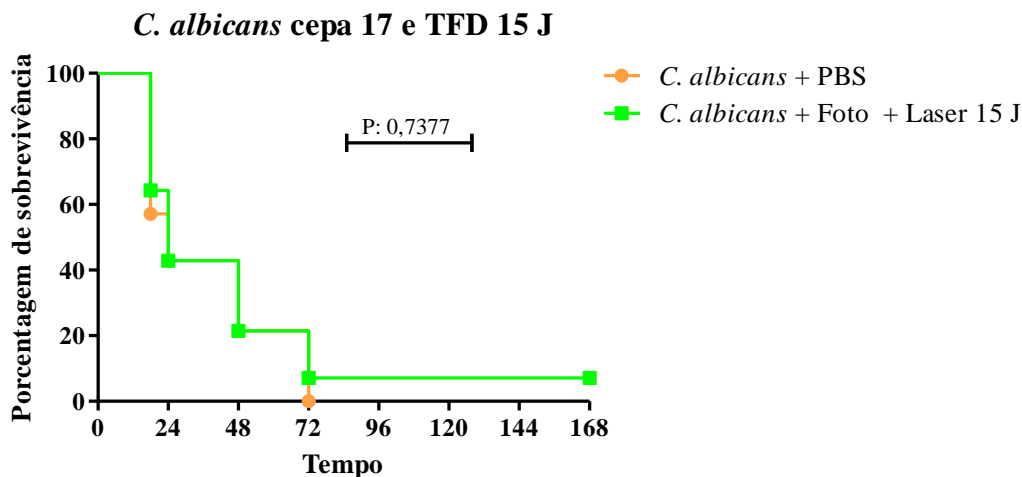
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 26 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* Cepa clínica 17, tratadas com TFD 6 J



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 27 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* Cepa clínica 17, tratadas com TFD 15 J

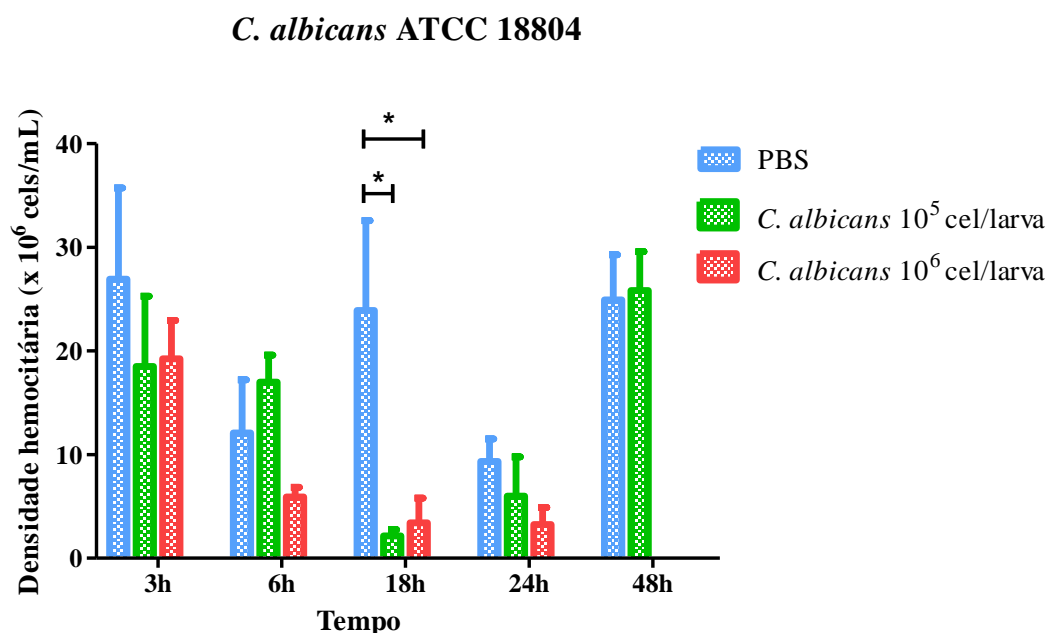


Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Análise da densidade hemocitária de *G. mellonella*

Para analisar o comportamento do sistema imune de *G. mellonella* após a infecção com *C. albicans* foram determinados os números de hemócitos viáveis na hemolinfa das larvas decorridos os tempos de 3, 6, 18, 24 e 48 h de infecção. Observando a Figura 28, foi verificado que no período inicial de 3 h ambas as suspensões de *C. albicans* administradas às larvas, 10^5 cels/larva e 10^6 cels/larva, causaram redução do número de hemócitos quando comparadas ao grupo controle. Nota-se ainda que com o passar do tempo este padrão se repete, sendo que no tempo de 18 h houve diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos ($P= 0,0436$), mas sem diferença entre os grupos com infecção. Sendo que a última contagem possível do grupo com *Candida* padronizada em 10^6 cels/larva foi em 24 h, pois com 48 h todas as larvas desse grupo já estavam mortas.

Figura 28 – Análise da densidade hemocitária de *G. mellonella* infectada com diferentes concentrações de *C. albicans* ATCC 18804



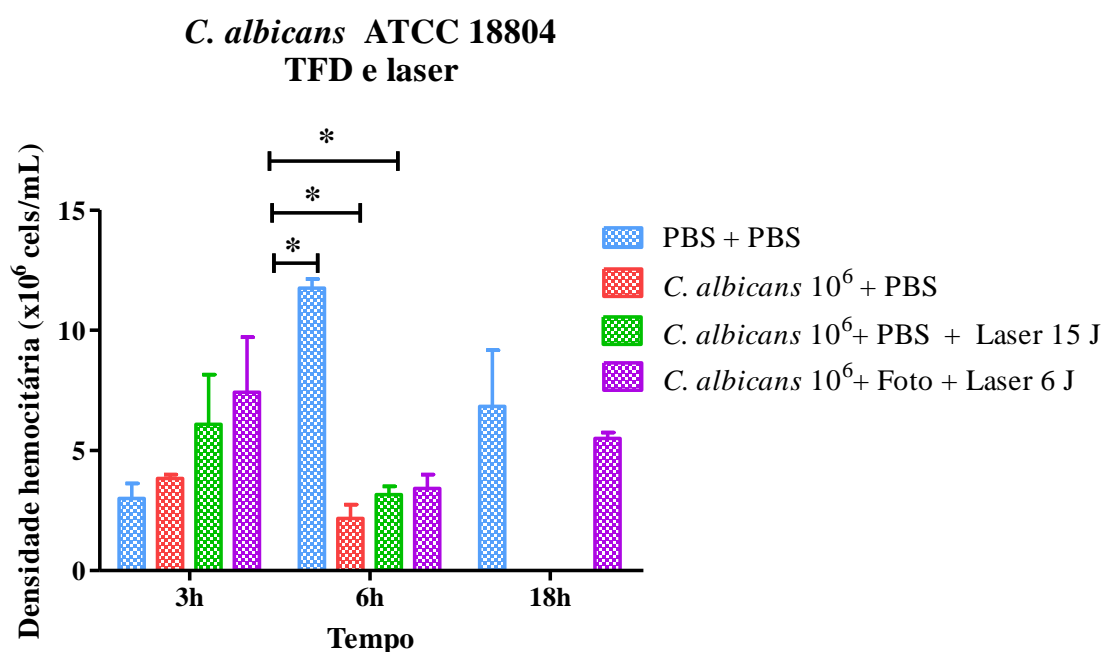
Legenda: O uso do asterisco * corresponde à presença de diferença estatística entre os grupos analisados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com o intuito de verificar a ação da TFD no sistema imune de *G. mellonella* após a infecção com *C. albicans* foram determinados os números de hemócitos viáveis na hemolinfa das larvas após os tempos de 3, 6 e 18 h de infecção (Figura 29). Verificou-se que no período inicial de 3 h o grupo controle positivo, apenas infectado com *C. albicans* sem tratamento apresentou baixo número de hemócitos o que diferiu do grupo tratado com laser de 15 J e aquele tratado com TFD 6 J. Com 6 h todos os grupos infectados apresentam diferença estatística com o grupo controle ($P < 0.001$), e os grupos tratados ainda se mostraram com maior contagem de hemócitos que o grupo sem tratamento. Passadas 18 h somente foi possível realizar a contagem do grupo controle negativo, PBS e do grupo tratado com TFD 6 J, visto que nos demais as larvas já

se encontravam mortas. O grupo submetido à TFD após 18 h apresentou aumento do número de hemócitos quando comparado ao mesmo grupo de 6 h, o que sugere que esta terapia proporcionou um aumento no número de células de defesa das larvas com o tempo.

Figura 29 – Análise da densidade hemocitária de *G. mellonella* infectada com *C. albicans* ATCC 18804 e submetida à terapia laser e TFD



Legenda: O uso do asterisco * corresponde à presença de diferença estatística entre os grupos analisados.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

Com o crescente aumento da resistência de fungos as terapias medicamentosas existentes, pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca de terapias alternativas no combate as infecções causadas por tais patógenos (Arvanitis et al., 2013). Uma das terapias que se mostrou amplamente recomendada foi a TFD.

A TFD até hoje não mostrou induzir resistência em micro-organismos, o que possibilita seu uso amplo e repetido, apresenta alta especificidade não comprometendo as áreas ao redor do tecido tratado e também possui amplo espectro de ação servindo como terapia tanto para infecções causadas por micro-organismos quanto às neoplasias (Gonzáles, Maisch, 2012; Dovigo et al., 2013).

Para a realização de pesquisas para novos tratamentos é preciso o uso de modelos experimentais. Um modelo que vem sendo usado é a larva *G. mellonella*, um invertebrado que não possui restrições éticas de uso, podendo ser utilizado em grande quantidade, com custo baixo para sua manutenção (Arvanitis et al., 2013; Cook, McArthur, 2013). Este inseto apresenta o sistema imune comparável ao nosso, composto por resposta imune celular e humoral. No qual sua resposta celular tem como agente principal o hemócito, célula que se assemelha as células de defesa encontradas em humanos (Ligęza-Żuber, 2012, Wu et al., 2016).

Nos ensaios de sobrevivência as larvas do grupo controle PBS + PBS não apresentaram morte, o que indicou que não houve morte em virtude da injúria traumática causada pela injeção ou técnica de manipulação do animal, houve controle da técnica utilizada pelo operador. Também no grupo *No injection* não houve morte de nenhuma das larvas, isso confirmou a qualidade da criação das larvas utilizadas. Todos os grupos infectados que foram tratados, *C.*

albicans + PBS + Laser 6 J; *C. albicans* + PBS + Laser 15 J; *C. albicans* + Foto + Laser 6 J e *C. albicans* + Foto + Laser 15 J, apresentaram melhora na sobrevivência das larvas, com diferença estatística apenas no grupo em que foi administrada a TFD 6 J com relação ao grupo com *candida* sem tratamento. A TFD 6 J promoveu a sobrevivência das larvas até 48 h, 24 h além daquelas que não receberam tratamento.

Esses resultados se assemelham aos encontrados por Chibebe Jr et al. (2013), que avaliaram o efeito da TFD em larvas infectadas com duas cepas de *Candida*, e verificaram que a TFD utilizada com o uso de azul de metileno bem como em nosso estudo prolongou a vida das larvas, com infecção causada pela cepa CAN 14.

Merigo et al. (2017), estudaram o uso de diferentes densidades de energia Laser associadas ou não a diferentes tipos de fotossensibilizadores em infecção fúngica causada por *C. albicans in vitro* e *in vivo*, e também obtiveram resultados semelhantes aos nossos. Foram testados os fotossensibilizadores, azul de toluidina, curcumina e eritrosina com seus respectivos lasers em comprimentos de onda diferentes, vermelho 650 nm, luz azul 450 nm, luz verde 532 nm, com densidade de energia de 10 J/cm^2 , bem como o uso de laser isolado, como em nosso estudo. Todos os grupos tratados apresentaram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo apenas infectado com *Candida*, com o aumento da sobrevivência das larvas. O que sugere que tanto o uso da terapia laser quanto o uso da TFD se mostraram efetivos no controle da candidose no modelo de *G. mellonella*.

Porém a ação da luz visível associada ao fotossensibilizador depende dos parâmetros utilizados na TFD como o comprimento de onda do laser, a densidade de potência que atinge o tecido (Queiroga et al., 2011), e a concentração de fotossensibilizador utilizada. No caso do azul de metileno utilizado em nosso estudo, quando em concentrações muito elevadas pode ser

tóxico para o tecido do hospedeiro podendo exacerbar o quadro inflamatório, além de seu excesso ser capaz de formar uma barreira óptica durante a irradiação. Assim impossibilitando a passagem da luz e a ação da TFD (Suzuki, 2014).

Com relação à cepa clínica de *Candida* 17 todos os grupos tratados, *C. albicans* + PBS + Laser 6 J; *C. albicans* + PBS + Laser 15 J; *C. albicans* + Foto + Laser 6 J e *C. albicans* + Foto + Laser 15 J, também apresentaram aumento na sobrevivência das larvas infectadas e tratadas em relação ao grupo controle, com infecção que não recebeu terapia. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Chibebe Jr et al. (2013) quando analisaram em seu estudo a efetividade da TFD sob o isolado clínico de *C. albicans* da cavidade bucal de pacientes com candidose orofaríngea resistentes a azóis também observaram melhora nas sobrevivência das larvas infectadas, porém não obtiveram diferença estatística significativa. Sugerindo que a TFD possa não ser tão efetiva em cepas clínicas que apresentem resistência a antifúngicos.

Outra hipótese pode estar relacionada a diferenças existentes em micro-organismos pertencentes à mesma espécie. Fungos e bactérias de mesma espécie podem apresentar diferentes padrões de susceptibilidade a TFD, isso devido a alguns determinantes metabólicos intrínsecos existentes em cada um como a defesa enzimática contra espécies reativas de oxigênio e bombas de efluxo que reconhecem moléculas de fotossensibilizadores (Prates et al., 2011).

No estudo de Chibebe Jr et al. (2013) observou-se que a TFD em larvas infectadas com isolados clínicos resistentes a antifúngicos associada ao uso de antifúngicos promovia aumento da sobrevivência das larvas quando comparados aos grupos onde o uso da TFD foi isolado. Sugerindo a TFD aliada à terapia antifúngica poderia ser efetiva em infecções em larvas de *G. mellonella* causadas por cepas clínicas resistentes.

Na avaliação do comportamento do sistema imune de *G. mellonella* após a infecção com *C. albicans* ATCC 18804 a suspensão usada 10^6 cels/larva apresentou redução gradativa do número de hemócitos quando comparada a concentração de 10^5 cels/larva e o grupo controle apenas com PBS. Sendo que com 18 h houve diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos. Bergin et al. (2003) obtiveram como resultado de seu estudo com diferentes cepas de fungos, dentre as quais espécies de *candida*, que larvas inoculadas com isolados mais patogênicos apresentaram redução mais significativa na densidade hemocitária, já larvas inoculadas com isolados de baixa patogenicidade demonstraram apenas uma pequena alteração na densidade de hemócitos. Os resultados desses estudos sugerem que a flutuação ou alteração no número de hemócitos pode ser usada para determinar a patogenicidade de micro-organismos.

Isso vai de encontro com os resultados encontrados na análise de densidade de hemócitos em nosso estudo, em que a concentração 10^6 cels/larva apresentou maior queda do número de hemócitos ao longo do tempo, e esses resultados coincidem com a curva de sobrevivência com diferentes concentrações de *C. albicans*, na qual a suspensão inoculada em larvas de 10^6 cels/larva foi a que apresentou morte mais rápida das larvas quando comparada a concentração de *Candida* de 10^5 cels/larva.

Com o intuito de verificar a ação da TFD no sistema imune de *G. mellonella* após a infecção com *C. albicans* ATCC 18804 foram determinados os números de hemócitos viáveis na hemolinfa das larvas após os tempos de 3, 6 e 18 h de infecção. Houve aumento do número de hemócitos nos grupos tratados com relação ao grupo infectado em todos os tempos analisados, o que sugere que esta terapia proporcionou um aumento no número de células de defesa das larvas com o tempo.

Similar ao nosso estudo Tanaka et al. (2012) buscaram avaliar o efeito da TFD na resposta imune porém murinos foram o modelo experimental. Utilizaram em seu estudo a TFD associada ao azul de metileno, de forma terapêutica e profilática na infecção de artrite em joelhos de modelos de ratos, causada por *Staphylococcus aureus*. Observaram que a TFD aplicada de forma terapêutica promoveu migração e acúmulo de neutrófilos no local da infecção e esta foi reduzida. A TFD quando utilizada antes da inoculação bacteriana promoveu acúmulo rápido de neutrófilos no local, já que resultou na inibição do estabelecimento da infecção, sugerindo a ativação da resposta imune inata mediada pela ação da TFD.

Ainda faltam estudos da influencia de TFD e terapia laser no sistema imune em modelos experimentais para que se possa concluir seu efeito. São necessários testes de diferentes dosimetrias do laser e concentrações de fotossensibilizadores a fim de elaborar um melhor protocolo para o tratamento de infecções fúngicas.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se com esse estudo que a TFD e a terapia laser influenciaram de maneira positiva na melhora da infecção por *C. albicans*, cepa ATCC 18804 e isolado clínico 17, em modelo hospedeiro de *G. mellonella*.

REFERÊNCIAS*

- Arvanitis M, Bloom JG, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Sep;1832(9):1378-83. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.03.008. Epub 2013 Mar 19.
- Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect*. 2003 Dec;5(15):1389-95. doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.019.
- Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, Venturini M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem Photobiol*. 2012 May-Jun;88(3):512-22. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01107.x.
- Casas A, Venosa GD, Hasan T, AI Batlle. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem*. 2011;18(16):2486-515.
- Chibebe Junior J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microbiol*. 2013 Oct 1;13:217. doi: 10.1186/1471-2180-13-217.
- Cook SM, McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*. 2013 Jul 1;4(5):350-3. doi: 10.4161/viru.25240.
- Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol*. 2012 Apr 10;3:120. doi: 10.3389/fmicb.2012.00120.
- Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, Brunetti IL, Costa CAS, Jacomassi DP, et al. Investigation of the Photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011 Jul-Aug;87(4):895-903. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Dovigo LN, Carmello JC, Costa CAS, 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 Apr;51(3):243-51. doi: 10.3109/13693786.2012.714081.

François A, Salvadori A, Bressenot A, Bezdetnaya L, Guillemin F, D'Hallewin MA. How to avoid local side effects of bladder photodynamic therapy: Impact of the Fluence Rate. *J Urol*. 2013 Aug;190(2):731-6. doi: 10.1016/j.juro.2013.01.046.

Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JBE, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010 Nov-Dec;1(6):475-82.

Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol*. 2012 Jan;116(1):1-10. doi: 10.1016/j.funbio.2011.10.001.

Huang YY, Tanaka M, Vecchio D, Diaz MG, Chang J, Morimoto Y, et al. Photodynamic therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012 Jul;8(5):479-94. doi: 10.1586/eci.12.37.

Jacobsen ID. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence*. 2014 Feb 15;5(2):237-9. doi: 10.4161/viru.27434.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SFG, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol*. 2011 Nov 4;11:247. doi: 10.1186/1471-2180-11-247.

Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence*. 2012a Oct 1;3(6):474-6. doi: 10.4161/viru.22493.

Junqueira JC, Vilela SF, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa AC, Rasteiro VMC, et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012b Jan-Feb;54(1):17-24.

Krupka AKW, Czuba Z, Szliszka E, Król W, Eroń AS. The role of photosensitized macrophages in photodynamic therapy. *Oncol Rep*. 2011 Jul;26(1):275-80. doi: 10.3892/or.2011.1262.

Ligęza-Żuber M. Mechanisms of *Galleria mellonella* cellular immune response after infection with entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. *Ann Parasitol*. 2012;58(4):227-8.

Lionakis MS. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. New tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence*. 2011 Nov-Dec;2(6):521-7. doi: 10.4161/viru.2.6.18520.

Merigo E, Conti S, Ciociola T, Fornaini C, Polonelli L, Lagori G, et al. Effect of different wavelengths and dyes on *Candida albicans*: In vivo study using *Galleria mellonella* as an experimental model. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Jan 24. pii: S1572-1000(16)30226-5. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.01.181.

Mroz P, Hamblin MR. The immunosuppressive side of PDT. *Photochem Photobiol Sci*. 2011 May;10(5):751-8. doi: 10.1039/c0pp00345j.

Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GP, Hamblin MR. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jul;66(7):1525-32. doi: 10.1093/jac/dkr160.

Queiroga AS, Trajano VN, Lima EO, Ferreira AF, Queiroga AS, Limeira FA Jr. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. by different doses of low power laser light. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2011 Dec;8(4):332-6. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.08.005.

Rodrigues GB, Dias-Baruffi M, Holman N, Wainwright M, Braga GUL. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013 May;10(2):141-9. doi: 10.1016/j.pdpdt.2012.11.004.

Rogers GS. Continuous Low-Irradiance Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Paradigm. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012 Oct 1;10 Suppl 2:S14-7.

Sabino CP, Ribeiro MS. Dosimetria na terapia fotodinâmica antimicrobiana. In: Núñez SC, Ribeiro MS, Garcez AS. *PDT Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. p. 27-38.

Sahu A, Choi WI, Lee JH, Tae G. Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*. 2013 Aug;34(26):6239-48. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.066.

Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS One*. 2013;8(3):e60047. doi: 10.1371/journal.pone.0060047.

Suzuki LC, Yoshimura TM, Kato IT, Prates RA, Ribeiro MS. Estudo comparativo entre dois comprimentos de onda no efeito fotodinâmico em biofilmes de *Candida albicans*. Congresso brasileiro de Engenharia Biomédica; 2014; Uberlândia; MG.

Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, et al. Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial arthritis via neutrophil accumulation. *PLoS One*. 2012;7(6):e39823. doi: 10.1371/journal.pone.0039823.

Trevijano-Contador N, Zaragoza O. Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. *Virulence*. 2014 May 15;5(4):454-6. doi: 10.4161/viru.28775.

Uppuluri P, Chaturvedi AK, Jani N, Worley RP, Monteagudo C, Mylonakis E, et al. Physiologic expression of the *Candida albicans* pescadillo homolog is required for virulence in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis. *Eukaryot Cell*. 2012 Dec;11(12):1552-6. doi: 10.1128/EC.00171-12.

Vatansever F, Kawakubo M, Chung H, Hamblin MR. Photodynamic therapy stimulates anti-tumor immune response in mouse models: the role of regulatory T cells, anti-tumor antibodies, and immune attack on brain metastases. *PROC SPIE*. 2013 Feb 22;8582: doi: 10.1117/12.2001902.

Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2011 Jan;158(1):90-8. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.10.001.

Wu G, Xu L, Yi Y. *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportional cellular and humoral immune responses. *Immunol Lett*. 2016 Jun;174:45-52. doi: 10.1016/j.imlet.2016.04.013.