



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



Luana Mendonça Dias Santana

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

Araraquara

2020



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



Luana Mendonça Dias Santana

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Coorientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

Araraquara

2020

Santana, Luana Mendonça Dias

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

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

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

Luana Mendonça Dias Santana

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

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

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

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

Araraquara, 9 de abril de 2020

DADOS CURRICULARES

Luana Mendonça Dias Santana

Nascimento: 22/06/1995 - Salvador, Bahia

Filiação: Newdith Mendonça Dias
Wellington Santana de Jesus

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

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

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

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

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

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

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

2019 - atual: Estágio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À

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

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

Sta. Dulce dos Pobres

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

Diversos estudos demonstraram a susceptibilidade de suspensões de *Candida*

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de *C. albicans* desenvolver susceptibilidade, tolerância ou resistência após repetidas aplicações de aPDT mediada por Photodithazine e Curcumina, associada a luz LED.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a viabilidade de culturas planctônicas e biofilme de *C. albicans* entre as aplicações repetidas de aPDT, por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) na presença e ausência de fluconazol;
- Quantificar as espécies reativas de oxigênio produzidas em resposta aos tratamentos do primeiro e último ciclo de aPDT, através da avaliação da tolerância ao estresse oxidativo;
- Avaliar o perfil biomolecular de biofilmes de *C. albicans* após aplicações 1, 4 e 7 de aPDT mediada por PDZ, por meio do teste de RT-qPCR (*reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*), analisando a expressão de possíveis genes relacionados ao estresse oxidativo do fungo e síntese de ergosterol.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Candida albicans*

Candida albicans é um microrganismo comensal presente no trato intestinal genitourinário, flora normal da pele e membranas mucosas². No entanto, a imunossupressão de um indivíduo pode permitir que esse microrganismo atue como um patógeno oportunista, penetrando nos tecidos e desencadeando infecções²⁹. Os indivíduos que possuem patologias que deprimem o sistema imunológico, tais como insuficiência renal, AIDS e diabetes, são mais propensos ao desenvolvimento de candidíase²⁸. No entanto, indivíduos saudáveis podem desenvolver uma infecção mediada por esse fungo, devido a um desequilíbrio imunológico do hospedeiro⁵.

Aspectos relacionados a virulência de *C. albicans* são mediados por fatores como: aderência ao substrato, formação de biofilme e auto-defesa frente ao sistema imunológico do hospedeiro²⁹. A produção de enzimas hidrolíticas, como protease e fosfolipase, também pode ser considerado um fator de virulência e está intimamente relacionado com os danos provocados ao tecido³⁰.

Este fungo possui morfologias distintas como blastoconídios e clamidoconídios (levedura), pseudo-hifas e hifas, que o tornam altamente heterogêneo morfológicamente. A formação de hifas é conhecida por promover a virulência através da invasão de camadas de células epiteliais, penetração de células individuais, rompimento de células endoteliais e lise de macrófagos e neutrófilos. A pseudo-hifa, por sua vez, é considerada uma levedura alongada que não possui capacidade de se separar da célula-mãe durante o ciclo celular. Apesar de possuírem formas diferentes, as pseudo-hifas se assemelham mais com as leveduras do que com as hifas. Tem sido relatado que nem todas as espécies de *Candida* possuem a capacidade de formar hifas, como por exemplo, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis*³¹.

Adicionalmente, *C. albicans* apresenta habilidade para se adaptar a alterações no pH do ambiente^{2,28}, por meio de flexibilidade metabólica e poderosos sistemas de aquisição de nutrientes, como boa resposta ao estresse oxidativo³²⁻³⁴. Além disso, *C. albicans* expressa uma série de genes (como CAT1- *Catalase* e SOD1- *Superoxide dimutase*) que ativam vias que auxiliam na proteção contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio³⁴. Dessa forma, pode-se observar que *C. albicans* possui ampla

gama de ferramentas biológicas que permitem a invasão, sobrevivência e asseguram sua proteção no tecido do hospedeiro³¹.

3.2 Biofilme

O biofilme é composto por um aglomerado de microrganismos organizados estruturalmente e aderidos a uma superfície. A comunicação dos microrganismos para a formação do biofilme pode ocorrer por vias metabólicas, trocas genéticas, e “*quorum sensing*” (mecanismo de sinalização entre os microrganismos). Acredita-se que o ciclo de desenvolvimento do biofilme inclua (1) adesão inicial do microrganismo a superfície (2) formação de microcolônias, (3) maturação, e (4) dispersão do biofilme³⁵. Esta última fase é bem crítica, uma vez que há riscos de transmissão da infecção para novos sítios, possibilitando a formação de novos biofilmes em outros locais³⁶. Esses diferentes estágios conferem ao biofilme uma fisiologia celular e fenotípica diferenciada, que não é encontrado em células planctônicas³⁵.

A célula do biofilme é envolvida por uma matriz extracelular polimérica (MEC), que é o material extracelular produzido pelos próprios microrganismos deste biofilme e consiste em uma conglomeração de diferentes tipos de substâncias poliméricas extracelulares (EPS)³⁷. A MEC possui uma função essencial de conexão célula-a-célula em biofilmes, como também, desempenha vários processos indispensáveis para manutenção dessa estrutura³⁸, devido a alterações que pode sofrer de acordo com o ambiente, temperatura e pH a qual estão expostas³⁷. Os EPSs, por sua vez, são responsáveis por fornecer a adesão e coesão ao biofilme, e assim, contribuir para a sua arquitetura tridimensional. A MEC também atua como um centro de reciclagem, mantendo todos os componentes disponíveis das células lisadas. Isso inclui o DNA, que pode representar um reservatório de genes para a transferência horizontal genética³⁹.

Os biofilmes de *C. albicans* possuem pequenas células ovais em forma de levedura (blastóporos), e longas células tubulares chamadas de hifa⁴⁰. A análise genética de biofilmes de *C. albicans* relatam que tanto as células de levedura, quanto as hifas, são importantes para a formação deste biofilme, sendo que o polimorfismo dessa espécie desempenha um importante papel de virulência⁴. A formação desse biofilme primeiramente se inicia com a adesão das leveduras em um substrato, em seguida, essas células proliferam através da superfície e produzem projeções

alongadas que crescem em formas filamentosas, incluindo hifas ou pseudo-hifas. Após, a Matriz Extracelular (MEC) inicia sua formação à medida que o biofilme amadurece. Por fim, células de levedura não aderentes (forma planctônica) são liberadas do biofilme para o meio circundante⁴¹. Durante a fase de dispersão, foi observado que a maioria das células dispersas estavam sob a forma de levedura, devido ao processo de transição morfológica existente de levedura-hifa na fase inicial do biofilme e hifa-levedura na fase de dispersão⁷. Adicionalmente, *C. albicans* produz β -glicanos via várias glicosiltransferases (esses β -glicanos são polissacarídeos na parede celular e também EPS na matriz), especificamente mediante ligações β -1,3 e β -1,4⁴².

O desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* pode ser influenciado pela superfície que este microrganismo se encontra (substrato), meio de cultura e pH. Um estudo experimental *in vitro* constatou esse fato após realizar a formação do biofilme sobre uma superfície de poliestireno e analisar a adesão e expressão de genes de adesão⁴³. Esses ensaios foram realizados sob diferentes meios [Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 e Yeast Nitrogen Broth (YNB)] e em diferentes valores de pH (5,6 e 7,0). No pH 7.0 foi notado melhor adesão em meio RPMI 1640 e maior transição de leveduras para hifas, que possivelmente influenciaram a formação de um biofilme mais espesso. No entanto, em YNB o biofilme apresentou maior capacidade de adesão à superfície de poliestireno. Além disso, nesse estudo também foi relatado aumento da expressão dos genes relacionados a fase de adesão (ALS3 e EAP1) em biofilmes formados em meio RPMI 1640 no pH 7.0⁴³.

A literatura reporta que no processo de formação do biofilme de *C. albicans* há uma gama de genes atuando em várias categorias funcionais. Inicialmente, os genes EAP1 e ALS são expressos com a finalidade de permitir a adesão do microrganismo ao substrato. Na sequência ocorre a propagação dessas células aderidas que expressam as adesinas ALS3 e HWP1, responsáveis pela ligação célula-a-célula⁴⁴. Existe também a expressão gene EFG1, extremamente importante para a formação das hifas⁴⁵. No processo de maturação do biofilme, há a expressão do fator de transcrição ZAP1, relacionado com a manutenção da produção de polissacarídeos da MEC, além de regular a aderência de leveduras a superfície⁴⁴. O gene BGL2 também está intimamente ligado com a formação EPS da matriz. Por fim, durante a fase de dispersão, ocorre a superexpressão do gene UME6, crucial para o processo de desunião das células⁴⁶. Adicionalmente, o SOD1 (superóxido dismutase citosólico de cobre e zinco) é expresso em situações que *C. albicans* sofre estresse oxidativo⁴⁷.

Nesse contexto, análises quanto ao perfil da expressão gênica de biofilmes de *C. albicans* demonstraram que os genes podem ter papéis positivos ou negativos no processo de desenvolvimento do biofilme, ou seja, um produto genético negativo pode atuar através da inibição de um produto genético positivo. Por exemplo, se o gene HWP1 possuir uma função negativa na fase de adesão, influenciará positivamente na dispersão desse biofilme⁴⁸.

3.3 Resistência Antifúngica

A utilização de terapias antifúngicas convencionais padronizadas pode ter sua indicação limitada devido a resistência que os microrganismos podem apresentar após exposição à droga⁷. A resistência aos medicamentos antifúngicos é considerada como uma possível falha no tratamento, provocando a persistência ou progressão da infecção. Essa resistência pode ser classificada em primária ou secundária^{49,50}. A resistência intrínseca ou primária, ocorre quando um microrganismo apresenta baixa susceptibilidade a uma determinada medicação, previamente a sua exposição ao agente⁵⁰. A literatura relata que existem espécies nas quais todos os isolados conhecidos possuem resistência inata a um antifúngico, a exemplo *C. glabrata* e *C. Krusei*, que possuem resistência intrínseca aos medicamentos antifúngicos, especialmente ao fluconazol⁵¹.

A resistência secundária ou adquirida, é aquela que pode ser desenvolvida pelo microrganismo após longos períodos de exposição a drogas antifúngicas⁵⁰. O desenvolvimento da resistência adquirida pode ocorrer através de vários mecanismos, os quais incluem a superexpressão do alvo da droga, substituições de aminoácidos no alvo da droga que impedem a ligação com a enzima inativadora, sinalização através de vias de resposta ao estresse, regulação positiva de bombas de e-fluxo ou alterações nas vias celulares^{50,51,54}. Essa resistência adquirida pode ser acelerada devido a plasticidade genética de um organismo ou existência de cepas já resistentes. Neste contexto, o efeito combinado desses mecanismos contribuintes leva à seleção de organismos cada vez mais resistentes, ocasionando altos índices de infecção recorrente⁵²⁻⁵⁴.

A variação nos fenótipos de resistência tem sido observada não apenas entre as espécies e isolados da mesma espécie, mas também entre estados distintos de

crescimento para a mesma cepa⁵⁴. A formação de biofilmes fúngicos pode reduzir a susceptibilidade à medicamentos convencionais devido a dificuldade de penetração do antifúngico nas camadas do biofilme para atingir a célula alvo, o que pode diminuir a sensibilidade ao composto. Já foi relatado que em biofilmes de *C. albicans*, a matriz glucana que envolve este biofilme pode atuar como uma barreira física para impedir a biodisponibilidade do agente antifúngico⁵⁵.

As Infecções fúngicas invasivas (IFIs) possuem alta taxa de mortalidade em humanos com prevalência em pacientes imunodeprimidos. Algumas espécies de fungos, a exemplo do gênero *Candida*, possuem índices de prevalência superiores a 50%⁵⁵. Apesar da crescente disponibilidade antifúngica no mercado, dados relatam que esse percentual vem aumentando com o passar dos anos⁵⁶. O uso indiscriminado desses fármacos é facilitado em muitos lugares por sua disponibilidade sem prescrição médica, antifúngicos falsificados abaixo do padrão, e até mesmo a velocidade e volume de deslocamento dos indivíduos⁵⁵. Atualmente, existem quatro classes de antifúngicos disponíveis: polienos, equinocandinas, azóis e flucitosina. Embora a resistência aos polienos permaneça extremamente rara⁵⁷, a resistência aos azóis e equinocandinas já foi relatada na literatura, e dentre as opções antifúngicas ofertadas, os azólicos são considerados a primeira escolha para tratar as IFIs e estão disponíveis em formulações orais e intravenosas⁵⁸.

3.4 Resistência à Antifúngicos da Classe Azólica

A literatura tem relatado diversos mecanismos relacionados a resistência dos azóis, em exemplo, a superexpressão do gene alvo da droga, ERG11, relacionado ao ganho de função no ativador transcricional Upc2. A diminuição da função da enzima Δ -5,6-dessaturase ERG 3 também é capaz de promover alterações em outros componentes da via biossintética do ergosterol. A resistência mediada por ERG3 depende intimamente dos principais reguladores da resposta ao estresse, como a proteína fosfatase calcineurina⁵⁹, a proteína cinase Pkc1⁶⁰, a chaperona molecular Hsp90⁵⁹, e provavelmente outros reguladores que ainda devem ser identificados. De fato, as telas genômicas funcionais identificaram vários genes que abrangem diversos processos celulares importantes para mediar a tolerância ao azol em *C. albicans*⁶¹. A literatura relata que há algumas deficiências importantes, destacando as interações

medicamentosas potencialmente perigosas através de ações com o sistema enzimático citocromo P450^{63,63}.

Outro mecanismo comum de resistência adquirida ao azol é devido a positiva regulação de transportadores multidrogas. Os transportadores de cassete de ligação a CDR1 e CDR2, bem como o principal facilitador MDR1, podem estar todos envolvidos na resistência clínica ao azol de muitas espécies de *Candida*⁶⁴. Foi demonstrado que a regulação positiva de MDR1 habilita simultaneamente a resistência ao azol de *C. albicans*, além de escapar das defesas intrínsecas do hospedeiro através do e-fluxo de peptídeos antimicrobianos⁶⁵. Em *C. albicans*, a expressão de CDR1 e CDR2 é regulada pelo fator de transcrição TAC1 e alelos abrigando mutações de ganho de função identificadas em isolados resistentes⁶⁶. Semelhante a esse mecanismo, há também mutações no gene do fator de transcrição MRR, que levam à regulação positiva de MDR1 em isolados de *C. albicans* resistentes ao azol⁶⁷.

3.5 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

Diante das dificuldades relacionadas a resistência fúngica, atualmente, tem sido desenvolvido pesquisas com o intuito de buscar estratégias para inativação de espécies de *Candida*. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido empregada na inativação de microrganismos e no tratamento de infecções por ser considerada potencialmente efetiva e com poucos efeitos colaterais⁶⁻¹¹. Foi reportado na literatura que a primeira utilização da aPDT foi na área microbiológica, e que essa terapia pode oferecer diversas vantagens no tratamento de infecções originadas por microrganismos, tais como amplo espectro de ação e baixo potencial mutagênico nas células expostas¹⁶. No entanto, em comparação com bactérias, a fotoinativação de fungos parece ser mais difícil de ser atingida devido ao maior tamanho celular desses microrganismos, exigindo uma maior quantidade de oxigênio *singlete* para que a morte celular ocorra⁶⁸.

A aPDT consiste na aplicação de um agente fotossensibilizador (FS), de uma fonte de luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e da presença do oxigênio^{21,68}. O processo de fotossensibilização tem seu início com o tratamento da célula-alvo com o FS. Em seguida, uma fonte de luz com comprimento de onda adequado para ativação do FS deve ser ativada para a iluminação do alvo sensibilizado⁶⁹. A interação da luz com o FS na presença de oxigênio, promove a formação de

espécies reativas de oxigênio que podem induzir a inativação celular¹⁵. Sugere-se que esse mecanismo promova a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, o que leva seus elétrons a um estado excitado⁷⁰. Esse processo de excitação ocorre na presença de oxigênio e FS, que ao ser excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas por meio da transferência de elétrons, hidrogênio, (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II)^{15,69,70}.

O agente fotossensibilizador utilizado para a aPDT pode apresentar uma autodegradação devido a perda de absorbância, ou a perda de fluorescência⁷⁰. Esse efeito pode ser proveniente da utilização de elevadas concentrações do composto, elevadas doses de luz, desfragmentação da luz liberada, bem como, ausência de oxigênio no tecido⁷¹. Além disso, a adição de substâncias surfactantes na composição dos FSs também são capazes de aumentar a fotodegradação dos mesmos, uma vez que essas substâncias promovem desagregação em meio aquoso. Estudos sugerem que a maioria dos processos de fotodegradação sejam oxidativos, produzindo *oxigênio singlete* como produto final⁵⁴.

3.5.1 Photodithazine associado a aPDT

O Photodithazine (PDZ) é um composto de segunda geração, sintetizado laboratorialmente e constituído por uma mistura de clorina Ce6 (60%), clorina p6, e purpurinas 7 e 18. Essas clorinas contêm magnésio e são chamadas de “chlorophylls”, denominadas pigmentos fotossensíveis presentes nos cloroplastos da maioria das plantas, algas e cianobactérias⁷². Esse FS tem sido empregado como um importante coadjuvante na inativação fotodinâmica, em estudos in vivo e in vitro, em que tem sido observado que a associação desse composto com luz pode ser capaz de inativar microrganismos⁶⁻¹¹. Em estudo preliminar foi realizada a medição dos níveis de consumo de oxigênio após o tratamento de aPDT, constatando que o efeito da fotossensibilização mediada por PDZ foi 25% superior à uma clorina e6 (pura) com a mesma concentração. Isso pode estar relacionado a melhor solubilidade de PDZ em água e conseqüentemente ao menor grau de agregação de moléculas de PDZ em solução aquosa⁷³.

A capacidade do FS se degradar durante o tratamento de inativação já foi reportado na literatura⁷¹, o qual a alta proporção de agregados em solução pode inibir

o processo foto-oxidativo e impedir a formação do oxigênio *singlete*. Nesse contexto, o comprometimento da eficácia fotodinâmica do FS pode estar diretamente relacionado com a falta de oxigênio no tecido⁷¹.

Uma pesquisa avaliou a capacidade fotoinativadora da aPDT mediada por PDZ em modelos murinos de candidíase oral⁸. Nesse estudo, os camundongos foram imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans* para indução de candidose oral durante 5 dias. As concentrações de PDZ testadas foram de 75, 100, 125 e 150 mg /L. Após os tratamentos, o fungo foi recuperado da língua dos animais e a quantificação da população microbiana foi determinada (UFC/ml). Os resultados demonstraram que a associação de PDZ (100 mg/L) e luz LED (aPDT) reduziu 4,36 log₁₀ de *C. albicans* presente em lesões induzidas em língua de camundongo, sendo eficaz na inativação de *C. albicans* sem causar qualquer efeito prejudicial sobre os tecidos do hospedeiro. Esses mesmos autores⁷⁴ também avaliaram a eficácia da aPDT mediada por PDZ em modelo murino após sucessivas aplicações da terapia (5 dias consecutivos), com e sem combinação com o antifúngico Nistatina. Os autores concluíram que a aPDT foi tão eficaz quanto Nistatina na inativação de *C. albicans*, reduzindo 3 e 3,2 logs₁₀ respectivamente, 24 h após o tratamento. Os animais submetidos a aPDT também apresentaram remissão completa das lesões orais, enquanto os animais tratados com Nistatina apresentaram remissão parcial de lesões, em ambos os períodos avaliados⁷⁴.

3.5.2 Curcumina associada a aPDT

A curcumina (CUR) é um composto derivado da *Cúrcuma Longa L*, e está sendo utilizada no âmbito medicinal devido as propriedades bioativas que apresenta. A literatura relata que a CUR tem um potencial antioxidante e possui boas propriedades anti-inflamatórias que podem acelerar o processo de cicatrização⁷⁵. A aplicação de uma luz sobre a CUR tem a capacidade de potencializar seu efeito sobre os tecidos e superfícies, como também, algumas patologias orais podem ser tratadas a partir dessa combinação^{9-11,17,18,40,76}.

Na última década, diversos estudos reportaram a capacidade inativadora da CUR^{9-11,17,18,76}. Em 2009, uma pesquisa avaliou o efeito antifúngico dessa substância em 23 cepas de fungos e o efeito inibidor *in vitro* sobre a adesão de espécies de *Candida* em células epiteliais bucais⁷⁶. Essa pesquisa comprovou que entre todos os

isolados testados, o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* foi mais susceptível à curcumina, como também, nessa espécie foi observado o melhor resultado antimicrobiano de CUR quando comparado ao antifúngico fluconazol. Além disso, a CUR (32 mg/L) foi capaz de inibir o crescimento de *Cryptococcus neoformans* e os isolados clínicos de *Candida dubliniensis* Cd22 e Cd28, sendo a espécie *C. albicans* a mais susceptível à CUR (64 mg/L). Também foi demonstrado nesse mesmo estudo que a CUR inibiu a adesão de espécies de *Candida* de pacientes com AIDS a células epiteliais humanas, sendo esse resultado importante para incentivar novas investigações sobre o uso terapêutico da CUR em paciente imunocomprometidos⁷⁶.

A associação da CUR com aPDT no contexto de inativação microbiana de *C. albicans* já foi descrita na literatura. Dovigo et al., 2011 observaram que ao testar nove concentrações de CUR diluídas em DMSO e em associação com diferentes doses de luz LED, a atividade antimicrobiana da curcumina diminuiu gradativamente conforme foi aumentado o tempo de iluminação. Cerca de 70% da curcumina utilizada nesse estudo, após a dose de luz de 0,4 J/cm² foi fotodegradada. Esse fenômeno de destruição fotoquímica denominada *photobleaching* pode ocorrer devido a diminuição da capacidade de absorção da CUR à longos períodos¹⁰. Nesse mesmo estudo foi observado que CUR na concentração de 20 µM a uma potência de luz de 37,5 J/cm², resultou em completa inativação de culturas planctônicas *C. albicans*, enquanto em biofilme, o metabolismo desse fungo diminuiu 87,22% na fluência de 5,28 J/cm². Em outro estudo⁹, esses mesmos autores relataram que foi observada diminuição de 80% na atividade metabólica (XTT) em biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* após aPDT mediada por 40 µM de CUR associada a 5,28 e 18 J/cm².

A curcumina pode apresentar efeito positivo em três estágios do processo de cicatrização tecidual: inflamação, proliferação e remodelação. Na inflamação, o efeito da CUR atua na inibição do fator nuclear B (NF-κB), reduzindo a produção das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucina 1 (IL-1), e diminuindo o processo inflamatório. Na etapa de proliferação, a CUR auxilia nas funções dos processos de reepitelização, migração dos fibroblastos, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Por fim, no estágio de remodelação, a CUR é capaz de aumentar a produção do fator de transformação de crescimento beta (TGF-β), e assim, elevar a proliferação dos fibroblastos. No entanto, a CUR em sua forma livre é limitada devido a sua baixa bioatividade, baixa solubilidade, rápido metabolismo e sensibilidade à luz. Nesse contexto, existe uma necessidade exploratória no

desenvolvimento de nanopartículas que possam encapsular esse composto e prolongar sua sobrevivência no organismo⁷⁶.

3.6 Resistência do Biofilme à aPDT

A literatura já relatou que microrganismos que crescem em modelos de biofilmes são menos susceptíveis a aPDT quando comparado a sua forma planctônica. Para a inativação de biofilme polimicrobiano pode ser necessário maiores concentrações de FS e elevada fluência de luz^{55,68,78}. Estudos reportam que as estruturas e componentes constituintes do biofilme podem dificultar a inativação do mesmo. A presença da parede celular, MEC e adesina intercelular polissacarídea afetam a penetração do FS, como também, participam do processo de atenuação da luz no momento do tratamento⁶⁸. Nesse contexto, já foi relatado que tempos mais longos de pré-irradiação podem ser necessários para inativação do biofilme⁷⁸. Até o momento, nenhum processo regulatório específico é conhecido para a tolerância de biofilme à aPDT.

3.7 Efeito de Doses Sub-Letais de aPDT

Doses sub-letais de aPDT podem promover um processo de estresse ao microrganismo, podendo ocasionar efeitos mutacionais em seu DNA²⁴. Devido ao fato dessa dose não ser suficiente para a completa inativação, a tolerância pode ser manifestada pela necessidade de maiores concentrações da droga⁵⁵. Nesse contexto, as células que sobrevivem as aplicações transitórias do tratamento podem ser denominadas como “tolerantes”, e as que sobrevivem ao tratamento por um longo período como “persistentes”. A formação de células persistentes ocorre quando após o tratamento é observado inativação imediata de grande parte da população, enquanto uma subpopulação clonal (células-filhas) persiste por um período muito mais longo ao tratamento⁷⁹.

Durante a última década foi investigado o potencial de doses sub-letais de aPDT em alguns microrganismos. A seguir estão representados os estudos que apresentam características importantes quanto a aplicação dessas doses, bem como, a técnica utilizada para a exposição (Quadro 1).

Quadro 1- Principais estudos que utilizam doses sub-letais em microrganismos

| Microrganismos e Cepas | Técnica de exposição sub-letal | Luz | Fotossensibilizador | Principais Achados | Referências |
|--|--|---|---|---|---|
| <i>Candida albicans</i> 3518; <i>Staphylococcus aureus</i> 28C65; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> GW-1 | 20 exposições repetidas de aPDT em concentrações de FS correspondentes às concentrações inibitórias mínimas previamente determinadas (CIM). As células sobreviventes foram submetidas às análises | Luz LED com comprimento de onda de 600 a 700 nm e dose de 30 J/cm ² | RLP068 / Cl - Tetracacional de ftalocianina PS Zn (II) na concentração final de 1,78 mM. | <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> foram incapazes de desenvolver resistência a aPDT. No entanto, a CIM do derivado da ftalocianina Zn (II) para <i>S. aureus</i> no escuro aumentou. | Giuliani et al., 2010 ²⁴ |
| <i>Vibrio fischeri</i> ATCC 49387. | 10 ciclos de plaqueamento, congelamento e cultivo das cepas. As células sobreviventes foram submetidas às análises de viabilidade e bioluminescência. | Luz LED branca 380 a 700 nm e dose de 64.8 J/cm ² | a 5,10,15-tris (1-metilpiridínio-4-il) -20-(pentafluorofenil) - porfirina triiodeto (TriPy + -Me- PF) na concentração final de 5,0 µM | <i>V. fischeri</i> não desenvolveu resistência a aPDT. | Tavares et al., 2010 ⁸⁰ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA, AH7 e MSSA. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AJ1, AM2, BM1 and AY4)- isolados clínicos | Aplicação do FS por 72h, seguido da exposição de luz em 0, 24 e 48 h, com intenção de “habituar” as células. A susceptibilidade dos microrganismos sobreviventes a uma variedade de antibióticos foi combinada com a dose sub-letal de aPDT e analisada. | Luz LED com comprimento de onda de 635 nm e dose de 100 ou 200 J/cm ² | Mesotetra (N-metil-4-piridil) porfirina tetra tosilato (TMP) e Azul de metileno (MB) na concentração final de 25 µg/mL | A exposição repetida dos microrganismos à aPDT sub-letal mediada pelos FS's não diminuiu a suscetibilidade aos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento de infecções causadas por essas bactérias. | Cassidy et al., 2010 ⁸¹ |
| <i>A. baumannii</i> (CR-XDR-AB) – isolado clínico; <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 | Amostras irradiadas 1x com diodos emissores de luz. As células sobreviventes foram submetidas às análises de capacidade de formação de biofilme, integridade da membrana, bem como, análise do perfil biomolecular | Luz LED com comprimento de onda de 630 nm e dose 30, 45, 90, 180, e 270 J/cm ² | Azul de toluidina (TBO) na concentração final de 0,22 µm | As células sobreviventes demonstraram redução da atividade metabólica celular, aumento da permeabilidade da membrana externa e inibição dos sistemas de bombas de efluxo | Pourhajibagher et al., 2016 ⁸² |

Quadro 2- continuação. Principais estudos que utilizam doses sub-letais em microrganismos

| | | | | | |
|---|--|---|--|--|---|
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | O potencial antimetabólico e antibiofilme de ICG-, TBO- e MB-SPDT contra <i>E. faecalis</i> foi analisado em 3 doses sub-letais (CIM prévio realizado) usando o ensaio de redução de XTT, ensaio de cristal violeta e microscopia eletrônica de varredura. | Luz LED com comprimento de onda de 660 nm (TBO) e 635 nm (MB) | TBO e MB com concentração final de 6,2 µg/mL | Doses mais altas de aPDT afetaram a capacidade de formação de biofilme e a atividade metabólica. ICG, TBO e MB-em uma dose sub-letal máxima reduziram a formação de biofilme para 42,8%, 22,6% e 19,5%, respectivamente. | Pourhajibagher et al., 2016 ⁸³ |
|---|--|---|--|--|---|

Fonte: Elaboração própria

3.8 Estresse Oxidativo

A vida microbiana evoluiu ao ponto de não necessitar de oxigênio (O₂) para a sua sobrevivência. O O₂ tornou-se uma espécie química reativa, o qual os microrganismos passaram a desenvolver estratégias para se defender⁸⁴. Em contato com as biomoléculas celulares, o oxigênio deriva a formação metabólica de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como Superóxido, Peróxido de hidrogênio e radical hidroxila⁸⁵. Os principais alvos biológicos para esses substratos são DNA, RNA, proteínas e lipídios. Em situações que há produção exacerbada dessas espécies reativas a ponto de o metabolismo do microrganismo não conseguir tolerar, esses subprodutos são expelidos para fora da célula gerando uma condição denominada de estresse oxidativo⁸⁴. Adicionalmente, altas e baixas temperaturas também são capazes de provocar esse fenômeno⁶².

Os radicais livres podem atacar diretamente os ácidos graxos (lipídios) presentes nas membranas celulares e provocar peroxidação lipídica desses componentes, afetando diretamente a fluidez desta membrana. O DNA também é alvo desses subprodutos, que afetam as ligações cruzadas com outras moléculas e bloqueiam sua replicação⁸⁶. O dano oxidativo causado no DNA contribui para a instabilidade genética e possível mutação⁶². Grande parte dos danos celulares são causados por hidroxilas gerados a partir da reação com o H₂O, por meio da reação de Fenton, que requer ferro (ou outro íon metálico divalente como o cobre) e uma fonte de equivalentes redutores para regenerar o metal⁸⁶.

O mecanismo de ação da aPDT é baseado na produção ERO, sendo o oxigênio *singlete* o radical livre mais importante desse processo. A eficácia do FS está diretamente associada com a quantidade de ERO produzido após a aplicação da aPDT^{87,88}. Além disso, o ambiente em que esse tratamento é realizado também interfere na produção exacerbada desse subproduto⁸⁷. Como proteção e em resposta ao estresse oxidativo, *C. albicans* pode expressar genes antioxidantes, entre eles CAP1 (*AP-1 bZIP transcription factor*), CAT1 (*catalase*) e SOD1 (*Cytosolic copper- and zinc-containing superoxide dismutase*) que ativam vias que auxiliam na proteção contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO)^{45,61}.

3.9 Bombas de e-fluxo

As bombas de e-fluxo são proteínas que transportam substratos tóxicos de dentro para fora das células⁸⁹. Essas bombas podem ser específicas para um único substrato, como também, transportar compostos distintos. A dependência de alguns microrganismos a bombas de e-fluxo resistentes à fármaco é um fator determinante na eficiência da aPDT⁷⁴. Uma pesquisa relatou que os corantes do tipo fenotiazianinos atuavam como substratos de bomba de e-fluxo multirresistentes à bactéria. Essa descoberta aconteceu mediante a aplicação do composto NorA (difenilureia INF271, reserpina, 5'-metoxi-hidocarnocarpina e neoesperidosídeo poliaquilado, ADH7) em associação com luz vermelha em *S. aureus*. Mediante isso, a combinação desse composto com possíveis inibidores de bomba de e-fluxo foi crucial para potencializar o efeito da aPDT⁷⁴. A literatura também já demonstrou que a adição do EPI (inibidores de bomba de efluxo) antes da TBO (azul de toluidina) teve um efeito maior do que a adição do EPI após a TBO, o qual a captação celular de TBO foi aumentada por EPI⁹⁰.

Os mecanismos de resistência aos agentes azóis que ocorrem em experimentos in vitro são bem compreendidos, sendo correlacionado com a expressão de bombas de e-fluxo. A superexpressão de algumas proteínas faz com que a droga seja jogada para fora da célula, reduzindo a concentração intracelular do azol⁹¹. Uma pesquisa realizou a combinação do antifúngico de classe azólica Miconazol (25 µg/ml) com a aPDT (7,2 J/cm² -100 µg/ml) e observou redução expressiva da viabilidade de culturas planctônicas de *C. albicans*²⁷. No entanto, não há relatos que afirmem que os antifúngicos de classe azólica em associação com a aPDT possam atuar como um possível inibidor de bombas de e-fluxo.

4 MATERIAL E MÉTODO

A seguir estão descritos os materiais e métodos do presente estudo.

4.1 Materiais de Consumo

- Ácido morfolinepropanesulfônico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).
- Água MilliQ.
- Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, MO, Brasil).
- Alça de inoculação 10 µL, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil).
- Bolinhas de vidro (Bioespec Produtos, Diadema, SP, Brasil)
- Cepas de *C. albicans* ATCC 90028 (CaS) (Rockville, MD, EUA).
- Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Clorofórmio: álcool Isoamílico (CHLO: 48 mL de Clorofórmio -Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA + 2 mL de álcool isoamílico- Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- Curcumina® C1386 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Cubeta de 2 mL (Cartel, SP, Brasil).
- Dispensador de repetição (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)
- Dimetilsulfóxido (DMSO, Química, São paulo, Brasil)
- Fluconazol F8929 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Fosfato de Potássio dihidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL (Cral, Cotia, SP, Brasil).
- Fosfato de sódio monohidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- kit Bio-Rad iScript cDNA Sythesis (Bio- Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA)
- Kit de Purificação “Qiagen Rneasy MinElute Protocol” (Qiagen, Hilder, Alemanha)
- Kit de Extração “Qiagen Rneasy MinElute Protocol” (Qiagen, Hilder, Alemanha)

- Lâmina de vidro (Precision Glass Line).
- Lamínula de vidro (Precision Glass Line, Hamburgo, Alemanha).
- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 0,1 g/L de cloranfenicol- SDA (Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD, EUA).
- Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA).
- Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- NAES -833 uL Acetato de Sódio (3M - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Sonda fluorescente Diacetato 2',7' –diclorofluoresceína-H2-DCF-DA (Life Technologies, San Francisco, CA, EUA).
- Tampão TE pH 8,0 -Tris-EDTA (Thermo fisher, Waltham, MA, EUA).
- Acetato de sódio 3M pH 5,5 (Thermo fisher, Waltham, MA, EUA).
- Microtubos tipo Eppendorfs Graduado de 2 mL (Axygen, Curitiba, PR, Brasil).
- Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm) (BOECO, Diadema, SP, Brasil).
- Placas de 96 poços de fundo “U” e estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).
- Placas de 96 poços de fundo “Chato” e estéril (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil
- Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis e estéreis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil).
- Photodithazine® (PDZ - VETA- GRAND Co., Moscow, Russia)
- Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiras amarelas com filtro para micropipeta 20-200 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiras azuis com filtro para micropipeta 100-1000 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiras para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Pote coletor 50 mL (Alibaba, Shanghai, China).
- RNAlater Tissue Collection: RNA Stabilization Solution Protocol Ambion (Thermo Fisher, Massachusetts, MO, EUA)

- Sistema de filtração de 250 e 500 mL (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil).
- Tubos tipo Falcon de 15 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).
- Tubos tipo Falcon de 50 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).
- β -mercaptoetanol – solução (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.1.1 Instrumentais

- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).
- Bico de Bunsen (J. Prolab, São José do Pinhal, Paraná, Brasil).
- Micropipetas de 0,5 – 10 μ L, 100-1000 μ L e de 20-200 μ L (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Micropipeta Multicanal Discovery Comfort, 12 Canais, 20-200 μ L (HTL, Warsaw, Polônia);
- Pipetador automático Easypet 3 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha);
- Pipetas de 1-10 mL e 1-5 mL (PZ HTL AS, Warsaw, Polônia).
- Provetas graduadas (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).

4.1.2 Equipamentos

- Agitador de tubos Modelo: AP 56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil).
- Autoclave vertical Modelo: AV 60. N°6614 (Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil).
- Alcool 100% P.A (Sigma Aldrich, Missouri, EUA)
- Balança de precisão Modelo: BG 400. N°016450 (GEHAKA – Ind. e Com. Eletroeletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil).
- Banho Maria Modelo 1102 (Fanem, São Paulo, SP, Brasil);
- Biotable luz LED vermelha (São carlos, SP, Brasil)
- Biotable RGB (São carlos, SP, Brasil)
- Câmara de fluxo (BIOSAFE B2, Brasil).

- Centrífuga, Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha).
- Contador de colônias CP 600 PLUS, Modelo: CP-600. Nr-série: 919 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil)
- Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil).
- Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324. Série – 9819011 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil).
- Estufa para secagem e esterelização Modelo: MA 033. Série: 9819 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil).
- Fluorskan- Luminoskan (Thermo Scientific, EUA)
- Freezer -80°C (Thermo Scientific, EUA).
- Incubadora de bancada shaker Modelo: Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil)
- Leitora de Microplacas (FLUOstar Omega S-N 4152596, BMG Labtech, Alemanha)
- Microscópio de Fluorescência Modelo DFC310 FX (Leica, Wetzlar, Alemanha)
- Microscópio de bancada invertido (Optiphas, Van Nuys, CA, EUA);
- Termocicladora CFX96 (Bio- Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA)
- Ultrassom (Kondortech, São Carlos, SP, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Fotossensibilizador e Fonte de Luz

4.2.1.1 Photodithazine®

O fotossensibilizador sintético Photodithazine® foi utilizado. Uma solução de trabalho do PDZ foi preparada antes de cada experimento, diluindo o PDZ estoque (5000 mg/L) em *Phosphate-buffered Saline* (PBS), em uma concentração correspondente a 25 mg/L. Dessa forma, a solução PDZ consistiu em 8 µL da solução estoque de PDZ diluídos em 792 µL de PBS. O volume do FS foi ajustado em dobro do utilizado (ex: 50 mg/L), pois quando o FS é inserido nos orifícios da placa, a concentração cai pela metade. Esta solução trabalho foi mantida no escuro até o momento da sua utilização, sempre preparado no mesmo dia do experimento. O FS foi excitado por um diodo emissor de luz (LED) na região vermelha do espectro (660 nm). O valor da potência de saída do aparelho juntamente com o tempo de iluminação, determina a quantidade de energia aplicada na amostra irradiada, denominada fluência ou dose de luz (J/cm^2). A fórmula empregada para o cálculo da dose é a seguinte: *Dose de luz (J/cm^2) = I (W/cm^2) x t (seg)*. Diante disso, o tempo de iluminação foi de 9 minutos com tempo de pré irradiação de 20 min. Este aparelho é composto de LEDs vermelhos distribuídos uniformemente pelo dispositivo, com potência de saída constante de 34 mW/cm². A dose de luz avaliada foi de 18 J/cm². Os parâmetros do tratamento com aPDT foram selecionados de acordo com estudos prévios, em que a associação do fotossensibilizador PDZ e da luz LED não foram capazes de inativar completamente suspensões de *C. albicans* (doses sub-letais)⁷.

4.2.1.2 Curcumina

Uma solução de 368.38 µM de Curcumina (> 65% de pureza) foi preparada em dimetilsulfóxido e diluída em solução salina para obter a concentração a ser testada para culturas planctônicas e biofilmes: 40 µM (teste CIM previamente realizado). A concentração final de DMSO foi mantida a 2,5%, uma vez que não demonstrou ter efeitos na viabilidade de *C. albicans* (teste CIM previamente realizado). O volume do

FS foi ajustado na concentração duplicada (2X) do que foi utilizado, pois quando o FS é inserido nos orifícios da placa, a concentração cai pela metade. As amostras foram iluminadas com um aparelho de luz LED na região azul do espectro (450 nm), com potência de saída constante de 47 mW/cm², utilizando a dose de luz de 18 J/cm² referente a 6,38 min de iluminação. Os parâmetros de tratamento foram selecionados de acordo com estudos prévios, em que a associação do fotossensibilizador CUR e da luz LED não foram capazes de inativar completamente suspensões de *C. albicans* (doses sub-letais)⁹.

4.2.2 Análise da viabilidade de *C. albicans* entre as aplicações de aPDT

Devido a ausência de uma metodologia consolidada na literatura quanto a capacidade de um microrganismo desenvolver susceptibilidade, tolerância ou resistência frente aPDT, no presente estudo duas metodologias foram desenvolvidas e avaliadas para fins comparativos.

4.2.2.1 Metodologia baseada na recuperação e re-cultivo das células

4.2.2.1.1 Preparo da suspensão

Neste estudo foi utilizado a cepa padrão de *C. albicans* ATCC 90028. Essa cepa armazenada a -80° C foi descongelada e semeada em placas de Petri com meio de cultura SDA (*Ágar Sabourand Dextrose*) suplementado com clorofenicol (50 mg/L) e incubada à 37°C durante 48 h. Decorrido esse período, 5 colônias foram inoculadas em 10 mL de meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) suplementado com 100 mM de glicose e incubadas à 37° C por 16 h. Após a incubação, 500 µL das culturas foram transferidos para novos tubos Falcon contendo 9,5 mL de meio YNB, que foram incubados até as células de *C. albicans* atingirem o meio da fase de crescimento exponencial (ou *mid-log*), correspondente a densidade óptica (DO_{nm}) 0.55 ±0.08. A concentração das suspensões de *C. albicans* foi ajustada em espectrofotômetro DO_{540 nm} de 1.0, que corresponde a uma concentração de 10⁷ UFC/mL. Essas culturas foram centrifugadas e lavadas com solução *Phosphate-buffered Saline* (PBS, pH 7,2) a 4000

x g por 5 min e novamente ressuspensas na solução PBS. Essas células foram usadas para ensaios em cultura planctônica e biofilme (inóculos).

4.2.2.1.2 Ensaio com cultura planctônica

Alíquotas de 100 µL do microrganismo foram distribuídas em microplacas de 96 orifícios para realização dos tratamentos. Para a realização da aPDT (grupo P+L+), o volume de 100 µL na concentração de 25 mg/L de PDZ foi adicionado aos orifícios da placa. Após incubação no escuro por 20 min (tempo de pré-irradiação), as amostras foram irradiadas no aparelho de luz LED na dose final de 18 J/cm² (9 min). Para determinar se apenas a aplicação da luz LED ou do FS possuiu algum efeito, amostras adicionais foram apenas iluminadas (grupo P-L+) ou apenas incubadas com o PDZ (grupo P+L-). O grupo controle foi composto por amostras que não receberam tratamento com o FS e luz (grupo P-L-). Os grupos que não foram iluminados permaneceram incubados no escuro durante todo o tempo de iluminação dos demais grupos. Para realização dos tratamentos, nos grupos com ausência do PDZ (P-L+ e P-L-) foram adicionados 100 µL de PBS. Após os tratamentos, alíquotas das culturas tratadas foram submetidas a diluição seriada e plaqueamento. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, em três ocasiões distintas (n=12) (Tabela 1).

Tabela 1- Parâmetros de tratamento dos grupos experimentais

| Grupos experimentais | [] do FS | [] Dose de luz |
|----------------------|-----------|----------------------|
| P+L+ | 25 mg/L | 18 J/cm ² |
| P+L - | 25 mg/L | - |
| P-L+ | - | 18 J/cm ² |
| P-L- | - | - |

Fonte: Elaboração própria

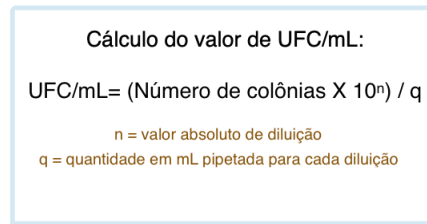
4.2.2.1.3 Formação e processamento do Biofilme

O procedimento de reativação e cultivo do microrganismo de *C. albicans* ATCC 90028 até atingir a fase *mid-log* foi realizado semelhante ao descrito para cultura planctônica (item 4.2.2.1.1). Alíquotas de 100 µL do inóculo foram transferidas para os

orifícios referentes a cada grupo em uma placa de 96 poços. A seguir, foi adicionado o volume de 100 μ L de YNB suplementado com 100 mM de glicose. Essas placas foram incubadas a 37°C sob agitação orbital (75 rpm) durante 1,5 h o qual corresponde a fase de adesão. A seguir, as células foram lavadas duas vezes com solução PBS e 200 μ L de RPMI 1640 tamponado com ácido -3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS) a um pH de 7,8 foi adicionado a cada orifício da placa para a formação de biofilme, seguido de incubação a 37°C. Após 24 h, 100 μ L do meio de cultura foi removido e adicionado 100 μ L do mesmo meio fresco (RPMI + MOPS) e as placas foram novamente incubadas. Finalmente, após 48 h os meios de cultura foram removidos e os tratamentos foram realizados. A aPDT foi realizada utilizando o fotossensibilizador PDZ. Para isso, alíquotas de 100 μ L de FS ajustadas em 25 mg/L foram adicionadas sobre o biofilme, seguido da adição 100 μ L de PBS glicosados (grupos P+L+ e P+L-). Nos grupos com ausência do PDZ (P-L+ e P-L-) foram adicionados 200 μ L de PBS glicosado. Após, as placas foram incubadas no escuro por 20 min (tempo de pré-irradiação) e em seguida os grupos experimentais foram irradiados (P+L+ e P-L+) ou incubados no escuro durante todo tempo de iluminação (P+L- e P-L-), conforme descrito na tabela 1. Após os tratamentos, cada orifício foi raspado por 45 s com auxílio de uma ponteira de 200 μ L⁹², com objetivo de desprender as células aderidas do fundo da placa. Os experimentos foram realizados em quadruplicata em três ocasiões distintas (n=12).

4.2.2.1.4 Diluição seriada e plaqueamento de culturas planctônicas e biofilme

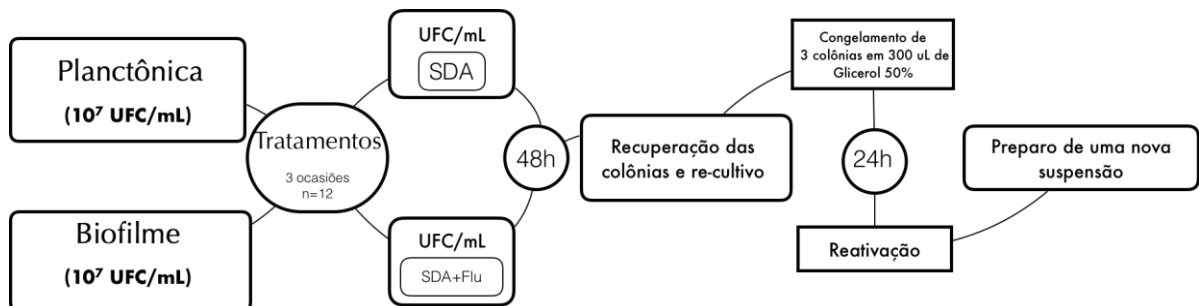
Imediatamente após os tratamentos, alíquotas de 100 μ L dos microrganismos de cada orifício das culturas planctônicas ou de biofilmes foram submetidas a diluições seriadas (- 4) em microtubos contendo PBS. Posteriormente, o plaqueamento foi realizado em duplicata em placas de Petri contendo somente SDA, e em placas contendo SDA suplementado com Fluconazol (sub-mic 8,0 μ g/mL, de acordo com estudos prévios)⁹². Todas as placas foram incubadas aerobiamente a 37 °C por 48 h. Após a incubação, foi realizada a contagem de colônias viáveis e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi determinado conforme descrito na Figura 1.

Figura 1- Cálculo de UFC/mL realizado

Fonte: Elaboração própria

4.2.2.1.5 Recuperação e re-cultivo das suspensões

Para o re-cultivo das suspensões, no mínimo, trinta colônias dos grupos que cresceram em placas de SDA sem suplementação de fluconazol foram recuperadas, com auxílio da alça de inoculação, e congeladas em microtubos contendo 300 μL de glicerol 50%, contendo 3 colônias em cada eppendorf. Para avaliar a habilidade da aPDT em causar resistência, susceptibilidade ou tolerância, após 24h as colônias congeladas foram re-cultivadas em YNB suplementado com 100 mM de glicose e uma nova suspensão padronizada de *C. albicans* (culturas planctônicas e biofilme) foi obtida conforme descrito no item 4.2.2.1.1. O processo de crescimento, aplicação do fotossensibilizador/fonte de luz, diluição e plaqueamento foi realizado conforme descrito nos itens 4.2.2.1.2, 4.2.2.1.3 e 4.2.2.1.4. Repetidos tratamentos foram realizados até o número das colônias viáveis do grupo aPDT (P+L+) serem reduzidas ao ponto de impossibilitar sua recuperação. No mínimo, trinta colônias (totalizando 10 eppendorfs) de cada grupo foram congeladas. A Figura 2 retrata as etapas referente a metodologia descrita.

Figura 2- Fluxograma da metodologia de recuperação e re-cultivo das suspensões

Fluxograma do processo de aplicação (ciclos de tratamento), recuperação e re-cultivo de *C. albicans* cepa ATCC 90028 susceptível ao fluconazol.

Fonte: Elaboração própria

4.2.2.2 Metodologia baseada em aplicações sucessivas de aPDT

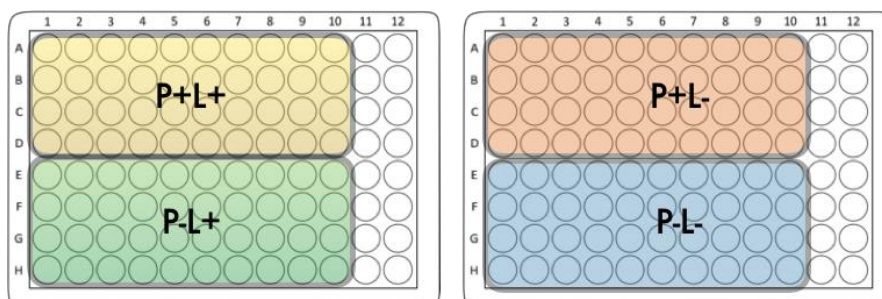
4.2.2.2.1 Preparo da suspensão

O preparo da suspensão para a execução desta metodologia foi realizado conforme o item 4.2.2.1.1. Nessa fase do experimento, as culturas planctônicas foram testadas em associação apenas com PDZ, enquanto o biofilme foi testado em associação com PDZ e CUR.

4.2.2.2.2 Ensaio com cultura planctônica

Para o tratamento de aPDT mediada por PDZ, alíquotas de 100 μ L do microrganismo foram distribuídas em microplacas de 96 orifícios para realização dos tratamentos. O volume de 100 μ L na concentração de 25 mg/L de PDZ foi adicionado aos orifícios da placa dos grupos com presença de FS (P+L+ e P+L-), e nos grupos com ausência de FS (P-L+ e P-L-) o volume final foi completado com 100 μ L de PBS. Após, as placas foram incubadas no escuro por 20 min (tempo de pré-irradiação) e em seguida os grupos experimentais foram irradiados (P+L+ e P-L+) ou incubados no escuro durante todo o tempo de iluminação (P-L+ e P-L-), conforme já descrito na tabela 1. Dez aplicações sucessivas do tratamento foram realizadas (Figura 3). Em seguida, alíquotas das culturas tratadas foram submetidas a diluição seriada e plaqueamento. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, em três ocasiões distintas (n=12).

Figura 3- Layout da placa do experimento (PDZ)



Layout da placa do experimento. Amarelo- grupo submetido a aPDT medida por PDZ (P+L+); verde- grupo submetido a luz (P-L+); rosa- grupo tratado com PDZ (P+L-); azul-grupo controle do experimento (P-L-). O número de colunas corresponde ao número de aplicações realizadas.

Fonte: Elaboração própria

4.2.2.2.3 Formação e processamento do Biofilme

O biofilme de 48 h foi formado conforme descrito no item 4.2.2.1.3. A seguir, foi realizado a aPDT utilizando os fotossensibilizadores PDZ e CUR.

Para a realização da aPDT mediada pela PDZ, alíquotas de 100 μL de FS ajustadas em 25 mg/L foram adicionadas sobre o biofilme de 48 h, seguido da adição 100 μL de PBS (grupos P+L+ e P+L-). Nos grupos com ausência do PDZ (P-L+ e P-L-) foram adicionados 200 μL de PBS. Após, as placas foram incubadas no escuro por 20 min (tempo de pré-irradiação) e em seguida os grupos experimentais foram irradiados (P+L+ e P-L+) ou incubados no escuro durante todo tempo de iluminação (P+L- e P-L-).

Para tratamento de aPDT mediada por CUR, alíquotas de 100 μL do FS CUR ajustadas em 40 μM foram adicionadas sobre o biofilme, seguido da adição 100 μL de PBS (grupos C+L+ e C+L-). Nos grupos com ausência do CUR (C-L+ e C-L-) foram adicionados 200 μL de PBS. Após, as placas foram incubadas no escuro por 20 min (tempo de pré-irradiação) e em seguida os grupos experimentais foram irradiados (C+L+ e C-L+) ou incubados no escuro durante todo tempo de iluminação (C+L- e C-L-), conforme descrito na Tabela 2.

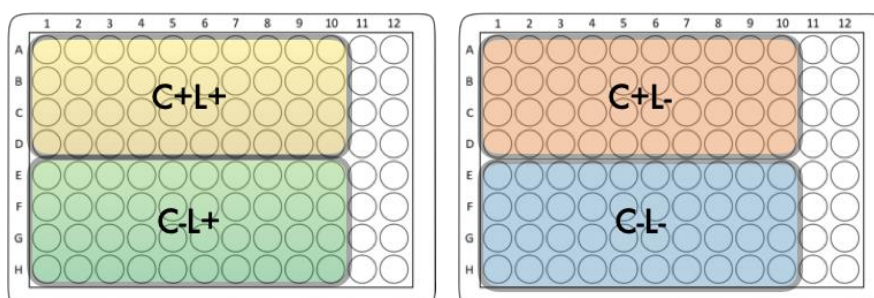
Tabela 2- Parâmetros de tratamento dos grupos experimentais

| Grupos experimentais | [] do FS | [] Dose de luz |
|----------------------|------------------|----------------------|
| C+L+ | 40 μM | 18 J/cm ² |
| C+L- | 40 μM | - |
| C-L+ | - | 18 J/cm ² |
| C-L- | - | - |

Fonte: Elaboração própria

Para ambos fotossensibilizadores, 10 aplicações sucessivas sobre o biofilme foram realizadas (Figuras 3 e 4). Em seguida, cada orifício foi raspado por 45 s, com objetivo de desprender as células aderidas do fundo da placa. As amostras foram transferidas para um tubo falcon e o biofilme foi sonificado no volume ajustado de 5 mL (30 s; 7 w; 170 a 190 J)^{93,94}. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, em três ocasiões distintas (n=12).

Figura 4- Layout da placa do experimento (CUR)



Layout da placa do experimento. Amarelo- grupo submetido a aPDT medida por CUR (C+L+); verde- grupo submetido a luz (C-L+); rosa- grupo tratado com PDZ (C+L-); azul-grupo controle do experimento (C-L-). O número de colunas corresponde ao número de aplicações realizadas.

Fonte: Elaboração própria

4.2.2.2.4 Diluição seriada e plaqueamento de culturas planctônicas e biofilme

Imediatamente após os tratamentos, alíquotas de 100 μ L dos microrganismos de cada orifício das culturas planctônicas ou de biofilmes foram submetidas a diluições seriadas (-4) em uma placa de 96 poços contendo PBS. Posteriormente, o plaqueamento foi realizado em duplicata em placas de Petri contendo somente SDA e em placas contendo SDA suplementadas com fluconazol (sub-mic 8,0 μ g/mL, de acordo com estudo prévio)⁹². Todas as placas foram incubadas aerobiamente a 37 °C por 48 h. Após a incubação, foi realizada a contagem de colônias viáveis e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi determinado (Figura 1).

4.2.2.2.5 Congelamentos das células sobreviventes à aPDT

As células que sobreviveram aos tratamentos foram armazenadas em microtubos e congeladas em um freezer a -80° C para posterior análise de tolerância ao estresse oxidativo, bem como, análise do perfil biomolecular. Para isso, 3 colônias foram inseridas em tubos que continham 100 μ L de glicerol a 50% e em tubos que continham 300 μ L de *RNA Later*. No mínimo, trinta colônias (totalizando 10 microtubos) de cada grupo, em todas as ocasiões, foram congeladas.

4.2.3 Quantificação da produção de ERO após aPDT

Para análise de tolerância ao estresse oxidativo as células de *C. albicans* armazenadas foram descongeladas e reativadas em SDA. A quantificação da produção de ROS⁹⁵ foi realizada após a primeira aplicação, como também, após a última aplicação que foi observado presença de células viáveis. Inicialmente, para a realização do protocolo, a sonda fluorescente Diacetato 2',7' -diclorofluoresceína-H₂-DCF-DA foi ajustada a uma concentração final de 50 mM, sendo esse preparado da seguinte forma: Solução A: 80 µL do composto adicionado a 8 mL de PBS. Solução B: 4 mL da solução "A" adicionado a 3 800 mL de álcool 100% P.A.

Para a realização do teste, 50 µL do inóculo foi transferido para os microtubos correspondentes a cada grupo experimental (tabela 1). Além desses grupos, também foi adicionado o grupo controle negativo (CN), que possuía células de *C. albicans* ajustadas em 10⁷ UFC/mL sem tratamento, como também, o grupo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo este fundamental para a análise comparativa de produção de ERO. Em seguida, 50 µL das soluções fotossensibilizadoras (PDZ ou CUR) foram adicionados aos microtubos. Os microtubos, foram centrifugados e lavados três vezes com solução PBS a 4000 xg por 5 min. Na última lavagem, o meio foi resuspenso em 100 µL de PBS, e em seguida foi adicionado 70 µL da solução do fluoróforo anteriormente preparada. Os microtubos foram envolvidos em papel alumínio e mantidos durante 1 h no agitador orbital (30° C -120 rpm). Após, as amostras foram transferidas para placas de 96 poços transparentes para a realização da iluminação dos grupos (P+L+, P-L+, C+L+, C-L+), na dose de 18 J/cm². Os grupos P-L+ e P-L-, ou, C-L+ e C-L- permaneceram incubados no escuro durante a iluminação. Além disso, o grupo H₂O₂ foi mantido 30 min em agitação orbital (30° C -120 rpm) também durante a iluminação. Por fim, todos os grupos foram transferidos para uma mesma placa preta de 96 poços sem tratamento na superfície. A leitura da placa foi realizada no aparelho Fluoroskan Ascent utilizando o programa *Ascent Software 2.0*, na faixa espectral de excitação de 485 nm e emissão de 538 nm. Os valores obtidos foram tabulados e utilizados para a análise de dados.

4.2.4 Perfil biomolecular das células de *C. albicans* aos tratamentos

A metodologia RT-qPCR foi utilizada para avaliar o perfil de expressão de genes específicos de *C. albicans* relacionados ao estresse oxidativo (Quadro 3), metabolismo e ergosterol (Quadro 4). Todas as análises foram avaliadas e as aplicações 1, 4 e 7 de aPDT mediada por PDZ em *C. albicans* no modelo de biofilme foram elegidas para análise de RT-qPCR.

Quadro 3- Características dos genes relacionados ao estresse oxidativo

| Gene | Descrição dos Genes |
|-------------|---|
| CAP1 | <i>AP-1 bZIP transcription fator</i> . Desempenha um papel na resistência a drogas e na regulação do estresse oxidativo dos genes centrais de estresse de <i>C. albicans</i> ⁹⁶ . |
| SOD1 | <i>Superóxido dismutase</i> . SOD1 é um gene que contribui para a virulência de <i>C. albicans</i> expressando proteínas para que o fungo dribles o estresse oxidativo e sobreviva aos mecanismos de defesa do organismo ^{97,98} . |

Fonte: Elaboração própria

Quadro 4- Características do gene relacionado ao metabolismo do ergosterol

| Gene | Descrição do Gene |
|--------------|---|
| ERG11 | <i>Lanosterol 14-alpha-demethylase</i> . Pertence ao citocromo da família P450, é uma enzima chave na biossíntese de ergosterol catalisando a conversão do lanosterol, por meio da remoção do grupo 14- α -metil ⁹⁹ . |

Fonte: Elaboração própria

As metodologias envolvidas na avaliação da expressão destes genes foram descritas a seguir:

4.2.4.1 qPCR para teste de curva padrão e eficiência de cada primer

A curva padrão de cada *primer* foi previamente confeccionada baseada no produto de PCR dos primers para o DNA genômico de *C. albicans* (resultado da reação de PCR convencional com a concentração ótima de cada *primer* já determinada)^{100,101}. Conforme ilustração na Tabela 3. Inicialmente, todas as curvas foram testadas a partir de teste de qPCR, em que o *Master Mix* para cada gene foi confeccionado a partir da concentração ótima de cada primer acrescido de 0,5 μ L do DNA genômico de *C. albicans*. (Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6).

Tabela 3- Características dos *primers*

| Gene | Concentração ótima (nM) | T _m (°C) | Tamanho do produto (bp) |
|-------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| SOD1 | 400 | 60 | 396 |
| CAP1 | 400 | 50 | 87 |
| ERG11 | 300 | 58 | 159 |

Fonte: Elaboração própria

Tabela 4- Proporção (x1) de H₂O, SYBR e *Primer* para confecção do *M. Mix* utilizado no teste de curva Padrão do gene SOD1

| | x 1 |
|------------------|---------|
| H ₂ O | 11 uL |
| SYBR | 12,5 uL |
| <i>Primer</i> | 1 uL |

Fonte: Elaboração própria

Tabela 5- Proporção (x1) de H₂O, SYBR e *Primer* para confecção do *M. Mix* utilizado no teste de curva Padrão do gene CAP1

| | x 1 |
|------------------|----------|
| H ₂ O | 11,25 uL |
| SYBR | 12,5 uL |
| <i>Primer</i> | 1 uL |

Fonte: Elaboração própria

Tabela 6- Proporção (x1) de H₂O, SYBR e *Primer* para confecção do *M. Mix* utilizado no teste de curva Padrão do gene ERG11

| | x 1 |
|------------------|----------|
| H ₂ O | 11,25 uL |
| SYBR | 12,5 uL |
| <i>Primer</i> | 0,750 uL |

Fonte: Elaboração própria

Os reagentes (SYBR e *Primer*) e a água de grau molecular (H₂O) formaram um único *M. Mix* nas concentrações necessárias para que as reações ficassem em duplicatas na placa de qPCR. Inicialmente, 1,25 uL dos pontos da curva (10⁸, 10⁷, 10⁶,

10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2) foram alíquotados em microtubos de 0,65 mL. O volume de 1,25 uL de H₂O também foi transferido para um único microtubo, representando o NTC (*No Template Control*). Posteriormente, 61,25 uL da solução *M. Mix* foi transferido para os microtubos que já continham os pontos da curva (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2) e NTC. Após vortexar os microtubos, 25 uL foram transferidos para cada duplicata da placa de qPCR. Por fim, a placa foi selada e centrifugada a 4100 rpm, a 4° C por 2 min. Os ciclos foram realizados na termocicladora CFX96 conforme a concentração ótima de cada gene.

➤ Ciclo 1:

- 95° durante 10 minuto (ciclo de desnaturação inicial);

➤ Ciclo 2:

- 94° C durante 15 segundos

- Temperatura de anelamento de cada *primer* durante 30 segundos;

- 68° durante 15 segundos

(Repetir ciclo 2 por 39 vezes)

➤ *Melt Curve*:

- 55° C por 5 segundos

- 95° C

Por fim, os resultados foram avaliados no programa *Bio-Rad CFX Manager*™.

4.2.4.2 Extração de RNA

O protocolo adaptado da separação do “fenol-clorofórmio” foi utilizado para extração de RNA das colônias recuperadas após aplicações 1, 4 e 7¹⁰², conforme descrito a seguir:

- 1- O volume e 300 uL de PBS pH 7,2 gelado foi adicionado no microtubo contendo as colônias, em seguida, as amostras foram centrifugadas 10 000 xg durante 15 min a 4° C com intuito de formação do *pellet*. Em seguida, o descarte do sobrenadante foi realizado para a remoção do glicerol;
- 2- O *pellet* foi lavado duas vezes (2x) com 600 uL de 1x PBS gelado e centrifugado nas mesmas condições descritas na etapa 1;
- 3- Foi adicionado nos microtubos 750 uL de NAES na concentração de 50 mM + 1 mL de EDTA em 0,5 M a 10%, na concentração final de 1% + 43,167 mL de

Água de grau molecular, foram adicionados à solução e o *pellet* foi resuspendido e vortexado por 15 seg, até formar uma suspensão homogênea;

- 4- O volume de 750 uL de Fenol Ácido (5:1, pH 4,5) em cada tubo, seguido de homogeneização;
- 5- A solução foi transferida para um novo microtubo de 2 mL contendo 0,8 g de “bolinhas de vidro” de 0,1 mm, e este, depois de misturado, foi colocado no aparelho de ruptura mecânica de células (*BeadBeater*) por 1 min, seguido da inserção das amostras no gelo por 1 min.

A etapa 5 foi repetida 6 vezes;

- 6- Os microtubos foram novamente centrifugados a 10 000 xg por 5 minutos a 4° C, e a parte aquosa da solução (onde se encontra o material genético) foi recuperada o máximo possível para um novo microtubo. O restante da reação (solução oleosa correspondente a fenol e proteínas) foi descartada;
- 7- Em cada amostra, foi adicionado mais 750 uL do fenol ácido. Os tubos foram gentilmente invertidos, e deixado em temperatura ambiente por 1 min, com intuito de promover maior efetividade do fenol. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados a 12 000 xg por 5 min, a 4° C;
- 8- O tratamento com Fenol ácido (etapa 7) foi repetida;
- 9- A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 750 uL de solução 24:1 de clorofórmio: álcool Isoamílico CHLO: 48 mL de Clorofórmio + 2 mL de álcool isoamílico. Em seguida, o microtubo foi invertido gentilmente, e as amostras foram centrifugadas a 14 000 xg por 5 min à 4° C;
- 10- A parte aquosa foi novamente removida. Esta já se caracteriza como RNA bruto;
- 11- O volume de 60 uL de acetato de sódio 3M a um pH de 5, foram homogeneizados com RNA bruto e posteriormente adicionados 600 uL de isopropanol.
- 12-As amostras foram incubadas *overnight* em freezer -80° C;
- 13- Após, o *pellet* foi recuperado por centrifugação dos tubos em 12 000 xg por 40 min, a 4° C;
- 14- O *pellet* foi lavado 3 vezes utilizando 500 uL de Álcool 75%, com centrifugação de 5 minutos nos intervalos das lavagens, e uma lavagem extra com álcool 99% foi realizada no final para melhor secagem do pellet;
- 15- O excesso do álcool foi removido e os *pellets* foram deixados em temperatura ambiente sobre lenços de papel para que secassem totalmente;

16- Cada *pellet* seco foi então resuspendido em 100 uL de H₂O molecular, e deixados em gelo por 1 h, com intuito de hidratar a amostra. A concentração do RNA bruto foi então quantificada em nanoespectrofotômetro (1,25 uL da amostra) a 260 nm.

Todas as amostras de RNA bruto (250 ng do RNA por *slot*) foram analisadas via eletroforese de gel de agarose (2%), para verificar a integridade do RNA.

4.2.4.3 Purificação do RNA

A Purificação do RNA possui o objetivo de remover qualquer contaminação com DNA. O kit de purificação “Qiagen Rneasy MinElute Protocol” seguindo a metodologia proposta por Cury et al.¹⁰² e recomendação do fabricante.

4.2.4.4 Primeira etapa da purificação

Foi preparado uma solução contendo 10 uL de β-mercaptoetanol para cada 1mL de Buffer RLT (fornecido pelo Kit da *Qiagen*). Assim, foi iniciado o protocolo com as seguintes etapas:

- 1- Os volumes das amostras foram ajustados para 100 uL, por meio de H₂O molecular;
- 2- Foi adicionado o volume de 350 uL de Buffer RLT contendo β-mercaptoetanol nas amostras, seguido de vortexação;
- 3- O volume de 250 uL de álcool 99% foi adicionado. Em seguida, a solução do tubo foi homogeneizada (técnica *up and down*);
- 4- O volume de 750 uL presente em cada microtubo foi colocado em colunas individuais com membranas de purificação do kit Rneasy MinElute instaladas em tubos coletores de 2 mL. Em seguida, as colunas foram centrifugadas a 12 000 xg por 15 segundos. Após, o volume do tubo coletor foi descartado.
- 5- Foram adicionados 350 uL de Buffer RW1 (presente no kit da *Qiagen*) à coluna, e esta foi novamente centrifugada em máxima velocidade (13 000 xg por 15 seg). O volume no tubo coletor foi descartado e um novo tubo coletor foi colocado sob a coluna de purificação;

- 6- Uma solução contendo 10 uL de DNase I solução estoque com 70 uL de Buffer RDD (presente no kit da *Qiagen*) foi inserida sobre a coluna de purificação (contendo a amostra) e esta foi incubada por 15 min, em temperatura ambiente;
- 7- Foram adicionados 500 uL de Buffer RPE (presente no kit da *Qiagen*) sobre a coluna de purificação, e estas foram centrifugadas por 15 seg em velocidade máxima. O volume no tubo coletor posteriormente foi descartado;
- 8- O volume de 500 uL de Alcool 75% foi adicionado sobre as amostras fixadas nas membranas da coluna de purificação, sendo estas centrifugadas por 2 min em velocidade máxima para secar a membrana de purificação;
- 9- O volume no tubo coletor foi descartado, e a amostra foi novamente centrifugada por 5 min, novamente em velocidade máxima para secar a membrana de purificação;
- 10- O tubo coletor foi descartado e a coluna de purificação foi transferida para um microtubo novo;
- 11- Para eluição, adiciona-se 20 uL de H₂O de grau molecular sobre o centro da coluna de purificação (atentando-se para que a água recobrisse toda a membrana) e as amostras foram novamente centrifugadas por 60 seg em velocidade máxima. O eluente foi então armazenado como RNA resultado da primeira etapa de purificação.

A quantidade de RNA e pureza das amostras foram analisadas por um nanoespectrofotômetro (DO 260 nm e Razão DO 260/280), utilizando 1,25 uL da amostra para leitura em duplicata, e os valores de rendimento foram tabelados.

4.2.4.5 Segunda etapa de purificação

A segunda etapa de purificação consiste em tratamento com Dnase I em solução. As amostras no volume de 100 uL foram incubadas com a enzima Turbo DNase com o equivalente a 2 uL da enzima para cada 10 µg e RNA. A incubação foi realizada em banho seco na temperatura de 37° C por 30 min.

4.2.4.6 Terceira etapa de purificação

A terceira etapa de purificação consiste na remoção da enzima Turbo DNase através de colunas do kit de purificação (Rneasy MinElute clean-up do kit Qiagen).

- 1- Foi adicionado a cada amostra o volume de 350 uL de Buffer RLT, este contendo o β -mercaptoetanol. Em seguida, as amostras foram vortexadas;
- 2- O volume de 250 uL de álcool 99% foi adicionado as amostras, seguido de homogeneização (técnica “*up and down*”);
- 3- O volume de 700 uL da amostra foi colocado nas membranas de purificação do kit *Rneasy MinElute* instaladas em tubos coletores de 2 mL. Estas foram centrifugadas em velocidade máxima por 15 seg e o volume no tubo coletor foi descartado;
- 4- Foram adicionados 500 uL de Buffer RPE sobre a coluna de purificação, e as amostras foram centrifugadas por 15 seg em velocidade máxima. O volume no tubo coletor foi descartado;
- 5- Foram adicionados 500 uL de etanol 75% sobre a amostra fixada na membrana da coluna de purificação, e esta foi centrifugada por 2 min na velocidade máxima, com intuito de secagem da membrana;
- 6- O tubo coletor foi descartado e a coluna de purificação foi transferida para um microtubo novo;
- 7- O volume de 20 uL de H₂O molecular foi cuidadosamente adicionado sobre o centro da coluna, atentando-se para que a água recobrisse toda a membrana. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas por 60 seg em velocidade máxima. O eluente foi então armazenado com o RNA puro.

A quantidade de RNA e pureza das amostras foram analisadas por um nanoespectrofotômetro (DO 260nm e Razão DO 260/280), utilizando 1,25 uL da amostra para leitura em duplicata, e os valores de rendimento foram tabelados. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese de gel de agarose (2%) para analisar a integridade e ausência de DNA. Foi utilizado 0,250 µg do total do RNA para cada canaleta.

4.2.4.7 Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA, o kit Bio-Rad iScript cDNA Synthesis foi utilizado. Para corrida de síntese do cDNA é necessário um volume de 35 uL do RNA purificado (20 uL para 2 RT+, 10 uL para RT- e 0,5 uL para o GEL). Nesse contexto foi utilizada a quantidade de 16 amostras das aplicações sem a presença do fluconazol, e 16 amostras referente às aplicações realizadas na presença de fluconazol. Em seguida, a amostra foi transferida para um novo microtubo, em que posteriormente foi adicionado o volume suficiente de água molecular para completar 35 uL (ex: 31,04 µL). Dessa forma, em cada tubo estéril foi pipetado:

- Água de grau molecular – volume variado dependendo do volume do RNA;
- 4 µL – 5x iScript Reaction mix (iScript cDNA Synthesis Kit);
- 1 µL Reverse Transcriptase;
- 1 µg de RNA.

Para o preparo do RT-, os mesmos componentes acima foram usados, exceto a transcriptase reversa, onde seu volume foi substituído por Água de grau molecular. O RT- revela se houve contaminação da amostra com DNA.

O ciclo para conversão de RNA em cDNA foi realizado usando a termocicladora, nas seguintes condições:

- 5 min a 25° C;
- 20 min a 46° C;
- 1 min a 95° C;
- 4°C a infinito;

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

4.2.4.8 Quantificação da expressão gênica utilizando RT-qPCR

O cDNA foi amplificado com os *primers* descritos na Tabela 7. O *primer* do gene ERG11 (metabolismo do ergosterol) foi padronizado em estudo anterior do grupo de pesquisa¹⁰¹; o gene SOD1 (estresse oxidativo) por Zhu et al¹⁰³ e o CAP1 (estresse oxidativo) por Alonso et al¹⁰⁰. Para realizar as reações de qPCR, a concentração ótima

de cada *primer* previamente determinada foi levada em consideração para confecção do *M. Mix* (Tabela 7).

Tabela 7- Características dos *primers* utilizados para análise de expressão gênica

| Gene | Primers | Concentração ótima (nM) | T _m (°C) Ciclo qPCR |
|--------------|---|----------------------------|--------------------------------------|
| SOD1 | F – TTG AAC AAG AAT CCG AAT CC | 400 | 60 |
| | R – AGC CAA TGA CAC CAC AAG CAG | | |
| CAP1 | F – AGT CAA TTC AAT GTT CAA G | 400 | 50 |
| | R – AAT GGT AAT GTC CTC AAG | | |
| ERG11 | F- CCC CTA TTA ATT TTT TCC CTA ATT AC | 300 | 58 |
| | R- CAC GTT CTT TTC TCA CTT TAA TTT CTT TC | | |

Fonte: Elaboração própria

A seguir está um exemplo dos volumes de reagentes utilizados para o *primer* ERG11 (concentração ótima de 300 nM) referente a uma placa de qPCR completa (96 poços).

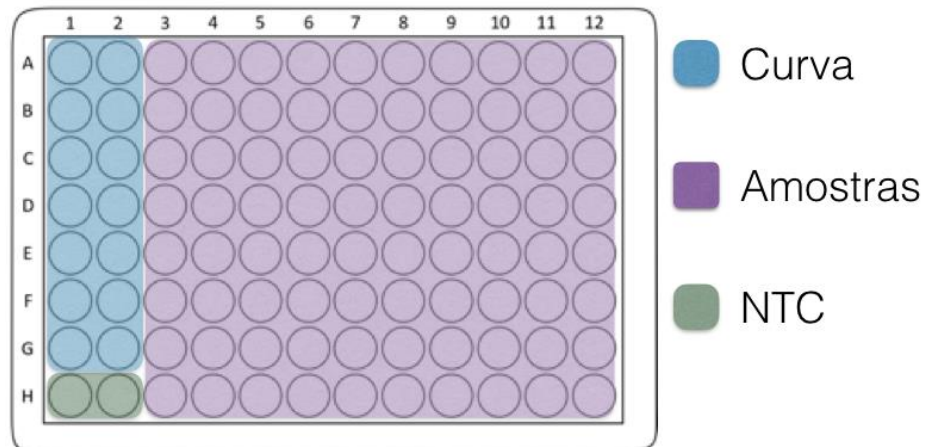
- ➔ 11,25 uL de de Água de grau moléculas;
- ➔ 12,5 uL de SYBR Green Supermix;
- ➔ 0,750 uL do primer a 10 uM;
- ➔ 0,5 uL da amostra

Calcula-se o volume necessário dos componentes, multiplicando o número de poços utilizados por 1,4; com o objetivo de promover um volume “residual”. Dessa forma, foram alíquotados 61,25 uL do *M. Mix* em microtubos que já continham 1,25 µL de cDNA sintetizado ou H₂O molecular (*No Template Control*- NTC). Em seguida, 25 uL foram distribuídos em duplicata de cada poço na placa de qPCR (Figura 5). Após feito isso, a placa foi selada, centrifugada (4 100 rpm, a 4° C por 2 min) e os ciclos térmicos se repetiram conforme a temperatura de anelamento de cada primer:

- Ciclo 1:
 - 95° durante 10 minuto (ciclo de desnaturação inicial);

- Ciclo 2:
 - 94° C durante 15 segundos
 - Temperatura de anelamento de cada *primer* durante 30 segundos;
 - 68° durante 15 segundos
 (Repetir ciclo 2 por 39 vezes)
- *Melt Curve*:
 - 55° C por 5 segundos
 - 95° C

Figura 5- Exemplo de *Layout* da placa de qPCR



Fonte: Elaboração própria

Os resultados apresentados pelo *software Bio-Rad CFX Manager* foram analisados a fim de observar se os tratamentos possuíram efeito na expressão gênica.

4.3 Análise Estatística

4.3.1 Análise da viabilidade das células de *C. albicans*

4.3.1.1 Metodologia baseada na recuperação e re-cultivo

A análise experimental *in vitro* possui como variável de resposta (dependente) manifesta quantitativa contínua: UFC/mL. As variáveis independentes qualitativas nominais são: grupos de tratamento sem associação com fluconazol (P+L+; P+L- P-L+ e P-L-); grupos de tratamento com associação ao fluconazol (P+L+; P+L-; P-L+ e P-L-) e aplicações (1, 2 e 3 para culturas planctônicas e 1, 2, 3, 4 e 5 para biofilme). A análise

exploratória dos dados foi realizada (estatística descritiva). Os resultados de UFC/mL foram transformados em logarítimo na base 10. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado e apontou ausência de distribuição normal. Para avaliar a homocedasticidade, o teste de Levene foi utilizado e os dados demostram-se heterocedásticos quanto a sua variância. Dessa forma, o teste estatístico elegido foi o de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para a realização das comparações múltiplas. O *SPSS (versão 2.0)* foi utilizado, com nível de significância de 5%.

4.3.1.2 Metodologia baseada nas aplicações sucessivas de aPDT

A análise experimental *in vitro* possui como variável de resposta (dependente) manifesta quantitativa contínua: UFC/ml. As variáveis independentes são: grupos de tratamento sem associação com fluconazol (P+L+; P+L-; P-L+; P-L- e C+L+; C+L-; C-L+; C-L-) e grupos de tratamento com associação ao fluconazol (P+L+; P+L-; P-L+ e P-L- e C+L+; C+L- ; C-L+; C-L e as aplicações (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), que são classificadas como quantitativas ordinais. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado e apontou ausência de distribuição normal. Para avaliar a homocedasticidade, o teste de Levene foi utilizado e os dados demostram-se heterocedásticos quanto a sua variância. Dessa forma, por se tratar de amostras independentes, o teste estatístico de Kruskal-Wallis foi aplicado dentro de cada grupo experimental, seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. O *SPSS (versão 2.0)* foi utilizado, com nível de significância de 5%.

4.3.2 Análise da quantificação da produção de ERO após aplicações sucessivas de aPDT

A análise experimental *in vitro* possui como variável manifesta quantitativa contínua a fluorescência (produção de ERO). As variáveis independentes qualitativas nominais são: grupos experimentais (P+L+; P+L- P-L+; P-L-; H₂O₂; Inóculo sem tratamento e C+L+; C+L-; C-L+; C-L-; H₂O₂; Inóculo sem tratamento). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado e a distribuição dos dados foi normal. Para avaliar a homocedasticidade, o teste de Levene foi utilizado e os dados demostraram-se heterocedásticos quanto a sua variância. Diante disso, o teste ANOVA- one way com correção de Welch foi utilizado, seguido do pós-teste de Games-Howell para

comparações múltiplas. O *Software SPSS (versão 2.0)* foi utilizado, com nível de significância de 5%.

4.3.3 Análise da expressão gênica após aplicações sucessivas de aPDT (Apl 1, Apl 4 e Apl 7)

A análise experimental *in vitro* possui como variável dependente quantitativa contínua a expressão do gene (Cópias/mL). As variáveis independentes qualitativas nominais são: grupos experimentais (P+L+; P+L- P-L+; P-L-) e Aplicações (Apl 1, Apl 4, Apl 7). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado e apontou presença de distribuição normal dos dados. Para avaliar a homocedasticidade, o teste de Levene foi utilizado e os dados demonstraram-se homocedásticos quanto a sua variância. Diante disso, o teste ANOVA-two way foi aplicado, seguido do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. O *Software SPSS (versão 2.0)* foi utilizado, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

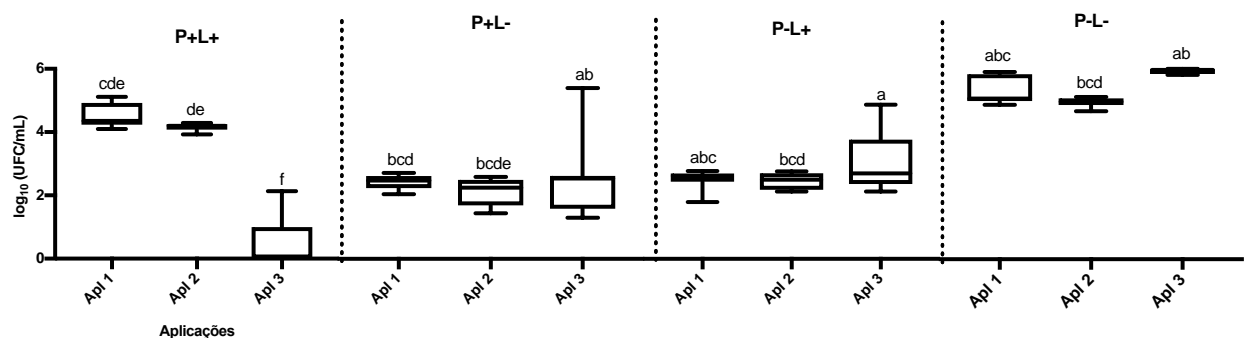
5.1 Análise da viabilidade de células de *C. albicans*

5.1.1 Metodologia baseada na recuperação e re-cultivo

Foram necessárias 3 aplicações (ciclos) de aPDT para inativar completamente as células de *C. albicans* em culturas planctônicas. Já no modelo de biofilme, foram necessárias 5 aplicações para a completa inativação.

O ensaio realizado com culturas planctônicas demonstrou diferença estatística no grupo tratamento (P+L+) entre a primeira (Apl 1) e terceira (Apl 3) aplicação, com redução de 91,04% no valor de UFC/mL (Figura 6). No entanto, podemos notar que não houve diferença entre a primeira e última aplicação nos grupos, controle da luz (P-L+), controle do fotossensibilizador (P+L-) e controle do experimento (P-L-). Na terceira aplicação não foram observadas colônias viáveis suficientes que possibilitassem recuperação e continuação do protocolo estabelecido.

Figura 6- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de cultura planctônica de *C. albicans* após tratamento com aPDT.



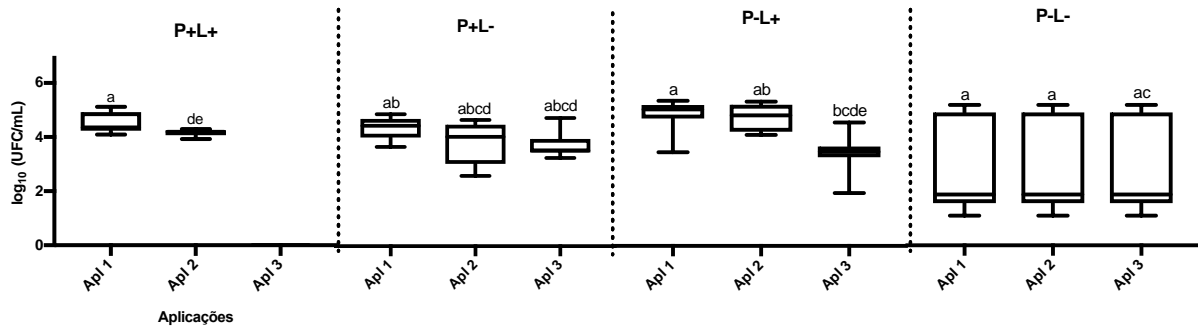
Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. P+L+: grupo tratamento com fotossensibilizador e luz; P+L-: grupo controle somente com fotossensibilizador; P-L+: grupo controle somente com luz; P-L-: grupo controle positivo; Apl: ciclo de aplicação. Letras iguais denotam semelhança estatística (n= 12).

Fonte: Elaboração própria

Nos grupos que *C. albicans* foram cultivadas em meio suplementado antifúngico Fluconazol, foi observado diferença estatística no grupo tratamento (P+L+) entre a primeira (Apl 1) e a segunda aplicação (Apl 2). Além disso, foi observado redução de

100% no valor de UFC/mL na terceira aplicação (Apl 3), ou seja, ausência de viabilidade. No entanto, foi também observado diferença estatística entre a primeira e terceira aplicação no grupo onde a luz foi aplicada isoladamente (P-L+) (Figura 7).

Figura 7- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de cultura planctônica de *C. albicans* após tratamento com aPDT cultivado em meio suplementado com antifúngico Fluconazol

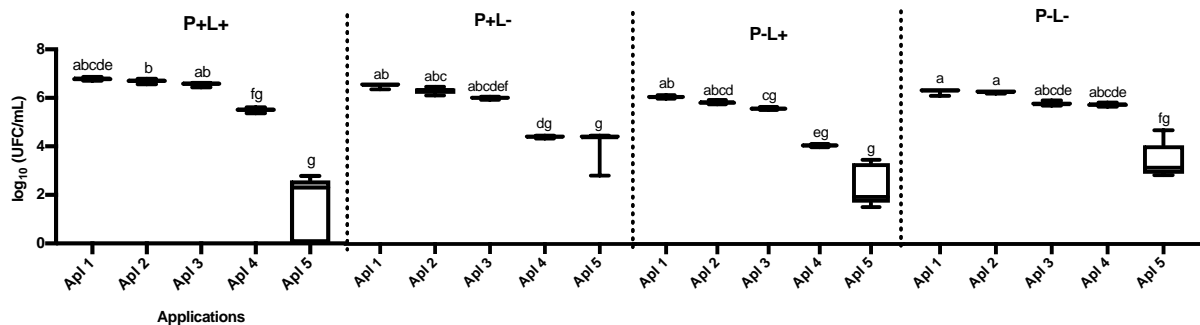


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. P+L+: grupo tratamento com fotossensibilizador e luz; P+L-: grupo controle somente com fotossensibilizador; P-L+: grupo controle somente com luz; P-L-: grupo controle positivo; Apl: ciclo de aplicação. Letras iguais denotam semelhança estatística (n= 12).

Fonte: Elaboração própria

Em modelo de biofilme foi observado diferença estatística entre a primeira (Apl 1) e última aplicação (Apl 5) em todos os grupos testados (Figura 8). Nos grupos P+L+, P+L-, P-L+ e P-L- houve redução de 52,60%, 39,21%, 39,24% e 25,15% respectivamente. Houve igualdade entre os grupos experimentais de todas aplicações iniciais (Apl 1), bem como, entre as últimas aplicações (Apl 5).

Figura 8- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilme de *C. albicans* após tratamento com aPDT.

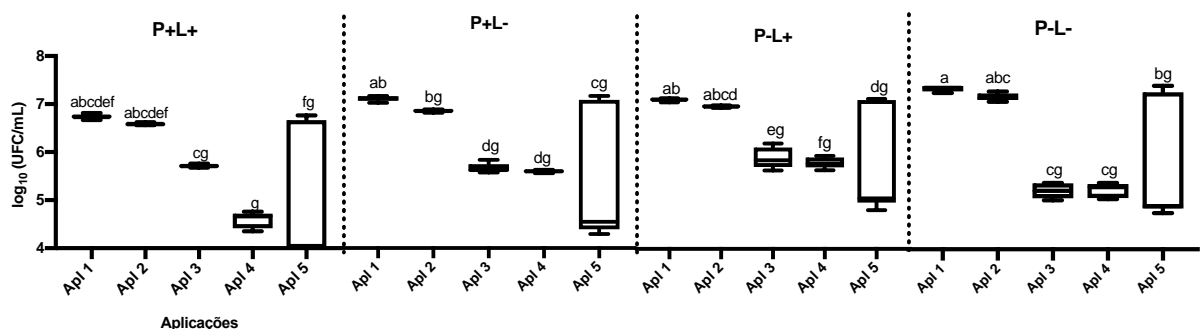


Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. P+L+: grupo tratamento com fotossensibilizador e luz; P+L-: grupo controle somente com fotossensibilizador; P-L+: grupo controle somente com luz; P-L-: grupo controle positivo; Apl: ciclo de aplicação. Letras iguais denotam semelhança estatística (n = 12).

Fonte: Elaboração própria

Nos biofilmes que foram plaqueados em meio suplementado com antifúngico fluconazol, foi novamente observado diferença estatística entre a primeira (Apl 1) e última aplicação (Apl 5) em todos os grupos testados (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Nos grupos P+L+, P+L-, P-L+ e P-L- houve redução de 75,37%, 24,30%, 22,33% e 14,08% respectivamente. Semelhante aos resultados do ensaio sem suplementação de antifúngico, houve igualdade entre os grupos experimentais de todas aplicações iniciais (Apl 1), bem como, entre as últimas aplicações (Apl 5).

Figura 9- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilme de *C. albicans* após tratamento com aPDT cultivado em meio suplementado com antifúngico Fluconazol.



Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. P+L+: grupo tratamento com fotossensibilizador e luz; P+L-: grupo controle somente com fotossensibilizador; P-L+: grupo controle somente com luz; P-L-: grupo controle positivo; Apl: ciclo de aplicação. Letras iguais denotam semelhança estatística (n = 12).

Fonte: Elaboração própria

5.1.2 Metodologia baseada nas aplicações sucessivas de aPDT

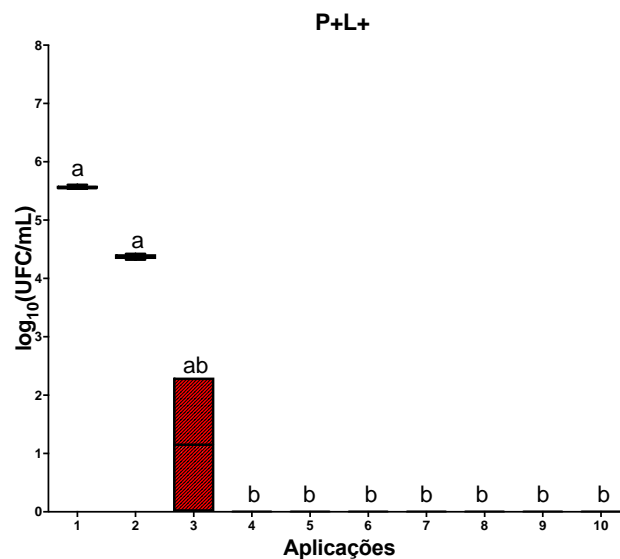
5.1.2.1 aPDT mediada por Photodithazine associada a luz LED

5.1.2.1.1 Culturas planctônicas plaqueadas em ausência de fluconazol

Na análise dos resultados de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a aPDT mediada por PDZ (P+L+) foi observado diferença estatística entre a primeira e quarta aplicação, com uma diminuição de 4,5 \log_{10} (64,2%) da viabilidade. A partir da quarta aplicação não foi observado crescimento de células viáveis (

Figura 10). A Figura 11 mostra a sobrevivência em \log_{10} de culturas planctônicas de *C. albicans* após aplicações (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) de aPDT mediada por PDZ.

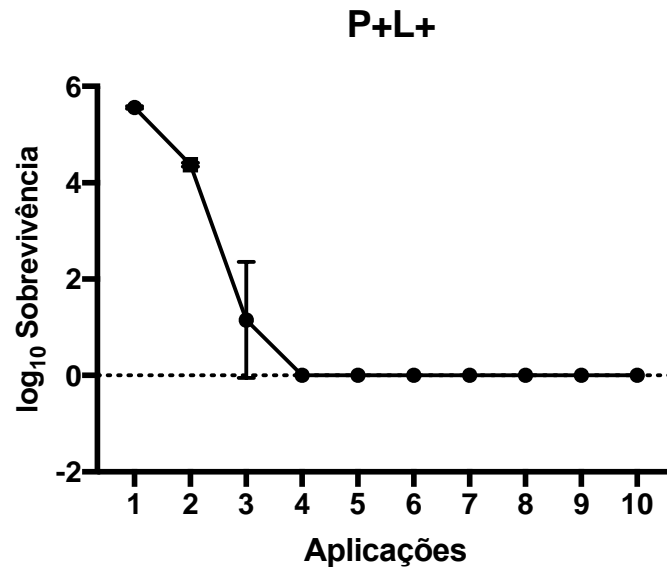
Figura 10- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a aPDT (P+L+).



Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

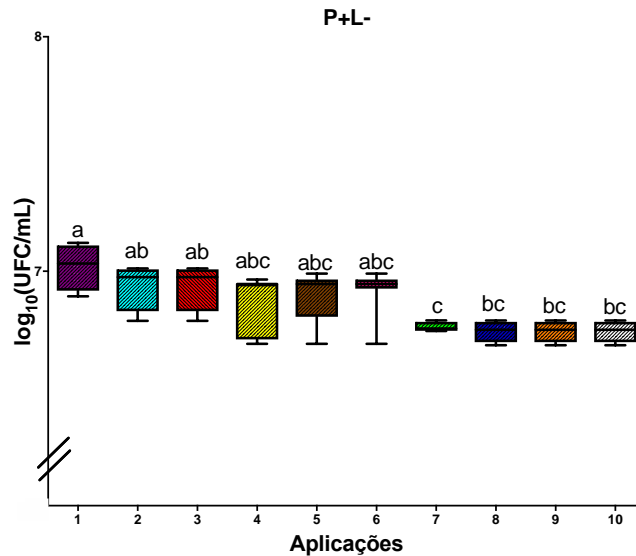
Figura 11- Diferentes \log_{10} de sobrevivência de culturas planctônicas de *C. albicans* após exposição longitudinal de aplicações de aPDT mediada por PDZ .



Fonte: Elaboração própria

Na análise dos resultados de culturas planctônicas de *C. albicans* tratadas com PDZ (P+L-) foi observado diferença estatística entre a primeira e sétima aplicação, com uma diminuição de 0,2 \log_{10} da viabilidade (Figura 12). Os resultados apresentaram semelhança estatística entre as aplicações 1, 2, 3, 4, 5, e 6. Além disso, foi observado que as aplicações 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10 também se comportaram de maneira semelhante. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de 0,4 \log_{10} .

Figura 12- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* tratadas com PDZ (P+L-).

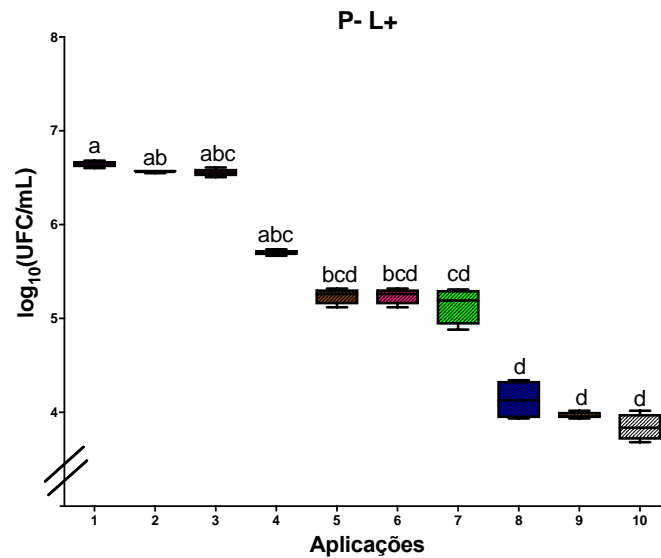


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise dos resultados de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a luz LED (P-L+) foi observado diferença estatística entre a primeira e quinta aplicação, com uma diminuição de 1,4 \log_{10} na viabilidade. Foi observado semelhança estatística entre as Aplicações 1, 2, 3 e 4. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de 2,8 \log_{10} . Além disso, também foi observado semelhança estatística entre aplicações 5, 6, 7, 8, 9, 10 (Figura 13).

Figura 13- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a luz (P-L+).

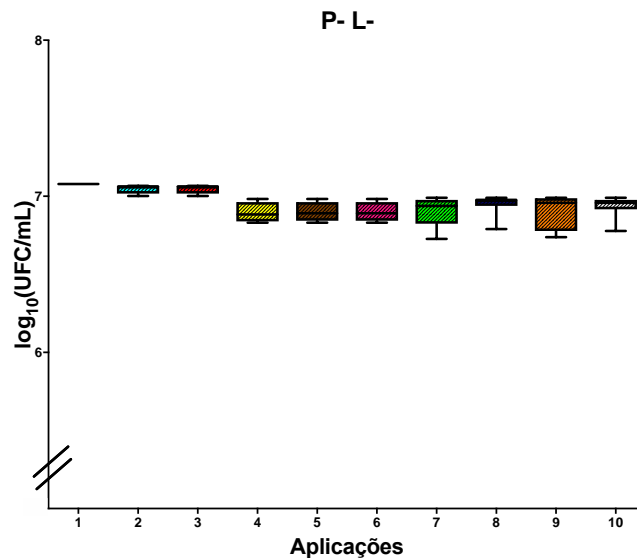


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise do controle do experimento não foi observado diferença estatística ($P < 0,05$) (Figura 14).

Figura 14- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* sem tratamento (P-L-).

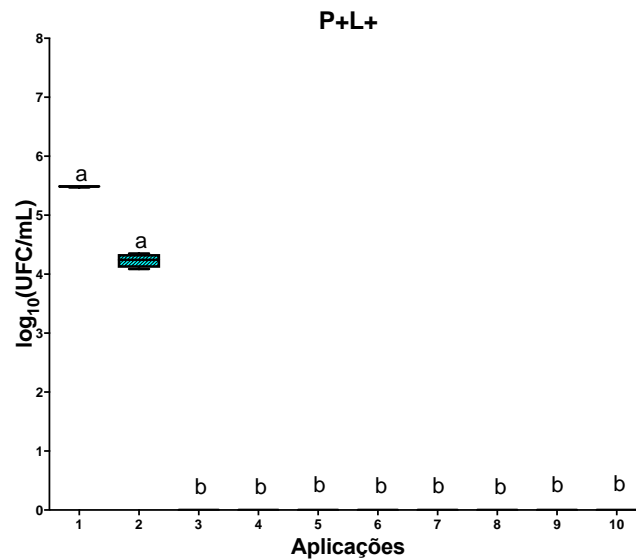


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Aplicação 1- roxo; aplicação 2- azul claro; aplicação 3- vermelho; aplicação 4- amarelo; aplicação 5- marrom; aplicação 6- rosa; aplicação 7- verde; aplicação 8- azul escuro; aplicação 9- laranja; aplicação 10- cinza. ($p > 0,05$) ($n=12$).

5.1.2.1.2 Culturas planctônicas plaqueadas em presença de fluconazol

Na análise dos resultados de culturas planctônicas de *C. albicans* plaqueadas em SDA contendo fluconazol e submetidas a aPDT mediada por PDZ (P+L+) foi observado diferença estatística entre a primeira e terceira aplicação, com uma diminuição de 100% da viabilidade (Figura 15). A partir da terceira aplicação não foi observado crescimento de células viáveis. A Figura 16 mostra a sobrevivência em \log_{10} de culturas planctônicas de *C. albicans* cultivadas em fluconazol após aplicações (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) de aPDT mediada por PDZ.

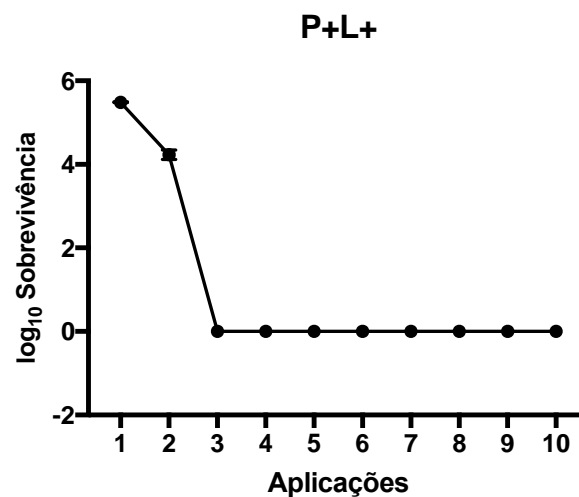
Figura 15- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a aPDT (P+L+) cultivadas em fluconazol.



Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Figura 16- Diferentes \log_{10} de sobrevivência de culturas planctônicas de *C. albicans* cultivadas em fluconazol após exposição longitudinal de aplicações de aPDT mediada por PDZ .

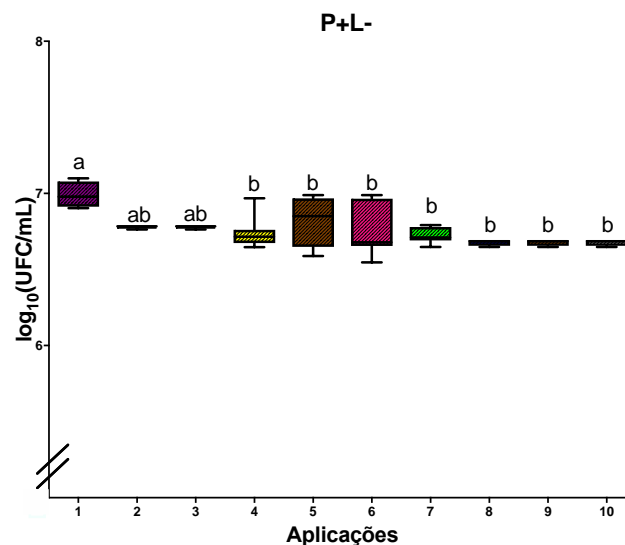


Fonte: Elaboração própria

Na análise dos resultados de culturas planctônicas de *C. albicans* cultivados em fluconazol tratados com PDZ (P+L-) foi observado diferença estatística entre a primeira

e quarta aplicação (redução de 0,3 \log_{10} na viabilidade), sendo as aplicações 1, 2 e 3 estatisticamente semelhantes (Figura 17). Além disso foi observado resultados semelhantes entre a segunda e décima aplicação. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 0,36 \log_{10} .

Figura 17- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* tratadas com PDZ (P+L-) cultivadas em fluconazol.

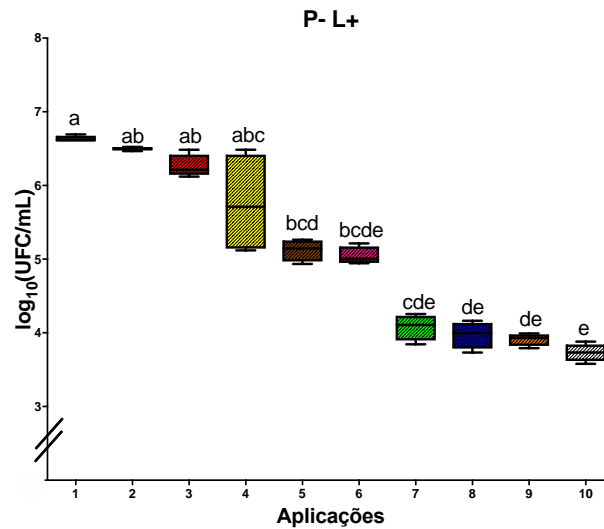


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($P < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise dos resultados de culturas planctônicas de *C. albicans* cultivados em fluconazol submetidas a luz LED (P-L+) foi observado diferença estatística entre a primeira e quinta aplicação (Figura 18). Os resultados também demonstraram semelhança estatística da segunda à sexta aplicação 1,5 \log_{10} . Além disso, também foi observado semelhança estatística da sexta até a décima aplicação. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 2,9 \log_{10} .

Figura 18- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a luz (P-L+) cultivadas em fluconazol.

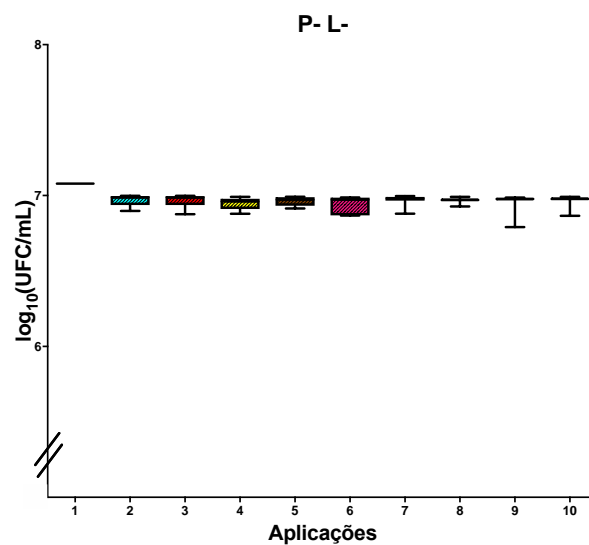


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise do controle do experimento (P-L-) não foi observado diferença estatística ($P > 0,05$) (Figura 19).

Figura 19- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de culturas planctônicas de *C. albicans* sem tratamento (P-L-) cultivadas em fluconazol.



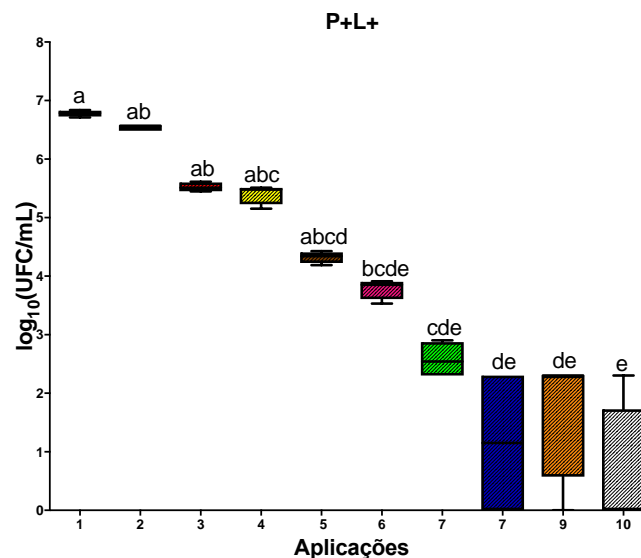
Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo ($p > 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

5.1.2.1.3 Biofilme plaqueado em ausência de fluconazol

Na análise de aPDT mediada por PDZ (P+L+) em biofilme de *C. albicans* foi observado diferença estatística entre a primeira e sexta aplicação, com uma diminuição de 1,3 \log_{10} da viabilidade (Figura 20). As aplicações 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram resultados estatisticamente semelhantes. A partir da sexta até a décima aplicação, os resultados também se comportaram de maneira semelhante. A redução entre a primeira e décima aplicação foi de 6,2 \log_{10} . A Figura 21 mostra a sobrevivência em \log_{10} de biofilme de *C. albicans* mediado por PDZ.

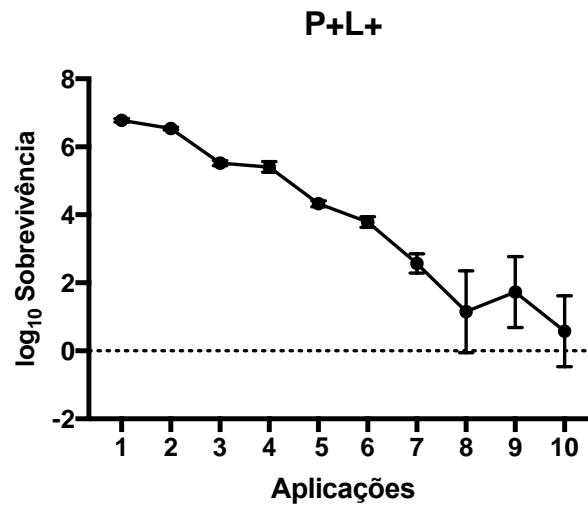
Figura 20 - Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* submetidos a aPDT (P+L+)



Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

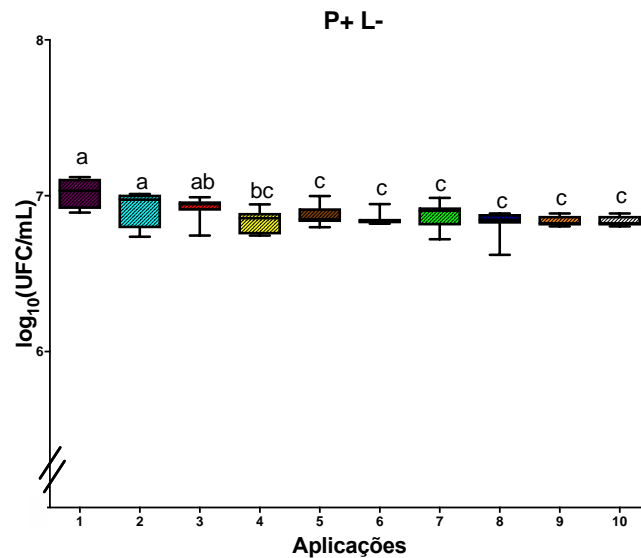
Figura 21- Diferentes \log_{10} de sobrevivência de biofilme de *C. albicans* após exposição longitudinal de aplicações de aPDT mediada por PDZ.



Fonte: Elaboração própria

Na análise do biofilme de *C. albicans* tratados com o PDZ (P+L-) foi observado diferença estatística entre a primeira e quarta aplicação, com uma diminuição de 0,78 \log_{10} da viabilidade (Figura 22). Foi observado semelhança estatística entre as três primeiras aplicações. A partir da terceira até a décima aplicação os resultados também se comportaram de maneira semelhante. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 0,8 \log_{10} .

Figura 22- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* tratados com (PDZ+L+)

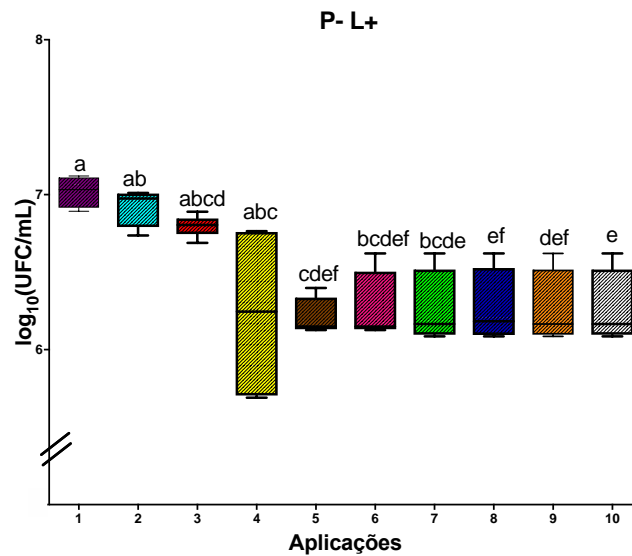


Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise do biofilme de *C. albicans* submetidos a luz LED (P-L+) foi observado diferença estatística entre a primeira e quinta aplicação, com uma diminuição de 0,5 \log_{10} da viabilidade (Figura 23). A partir da sexta até a décima aplicação os resultados foram estatisticamente semelhantes entre si. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 1,7 \log_{10} .

Figura 23- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* submetidos a luz (P-L+).

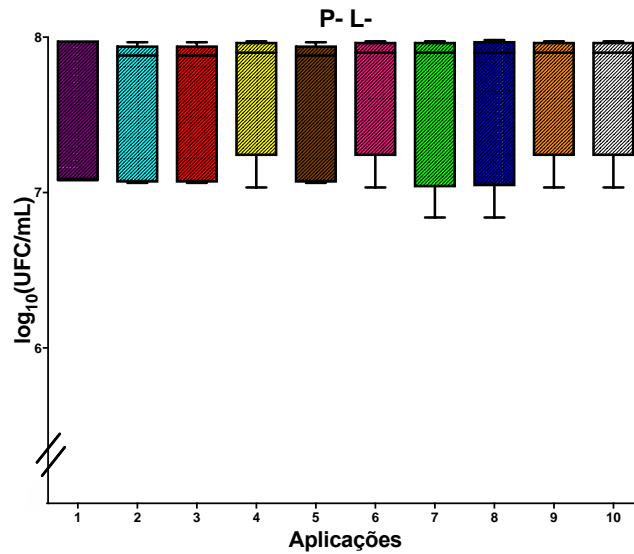


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise do controle do experimento não foi observado diferença estatística ($P > 0,05$) (Figura 24).

Figura 24- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* sem tratamento (P-L-).



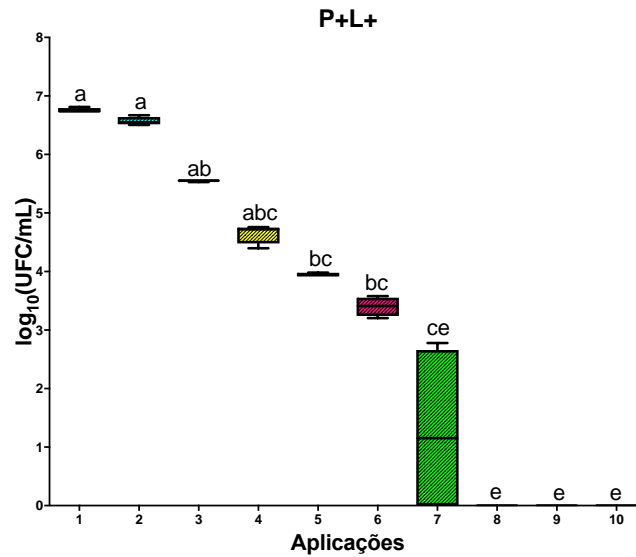
Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. ($p > 0,05$) ($n = 12$).

Fonte: Elaboração própria

5.1.2.1.4 Biofilme plaqueado em presença de fluconazol

Na análise dos resultados da aPDT mediada por PDZ (P+L+) em biofilme de *C. albicans* cultivados em fluconazol foi observado diferença estatística entre a primeira e quinta aplicação, com uma diminuição de 3 \log_{10} na viabilidade (Figura 25). A partir da aplicação 8 não foi observado células viáveis. As aplicações 3, 4, 5 e 6 se comportaram de maneira semelhante, bem como as 7, 8, 9 e 10. A Figura 26 mostra a sobrevivência em \log_{10} de biofilme de *C. albicans* cultivados em fluconazol após aplicações de aPDT (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) mediada por PDZ.

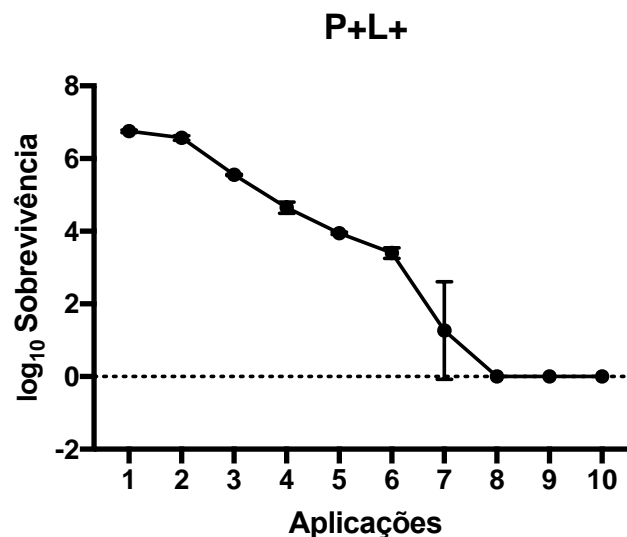
Figura 25- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* submetidos a aPDT (P+L+) cultivados em fluconazol.



Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

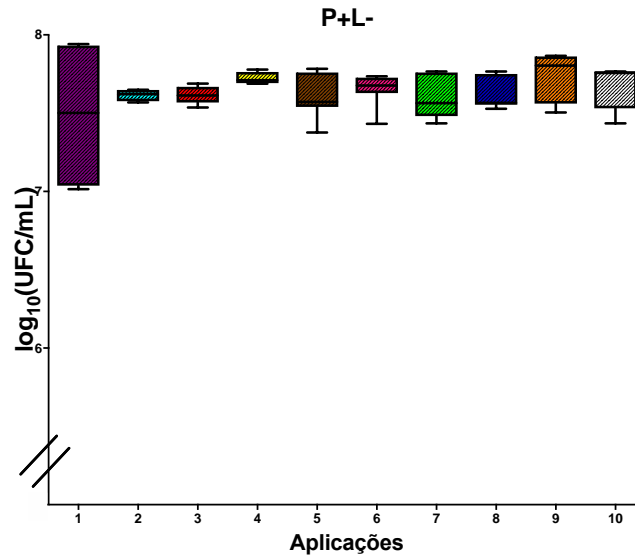
Figura 26- Diferentes \log_{10} de sobrevivência de biofilmes de *C. albicans* cultivados em fluconazol após exposição longitudinal de aplicações de aPDT mediada por PDZ.



Fonte: Elaboração própria

Na análise realizada em biofilme tratados com PDZ (P+L-) e cultivado em fluconazol não foi observado diferença estatística entre as aplicações (Figura 27).

Figura 27- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de biofilmes de *C. albicans* tratados com PDZ (P+L-) cultivados em fluconazol.

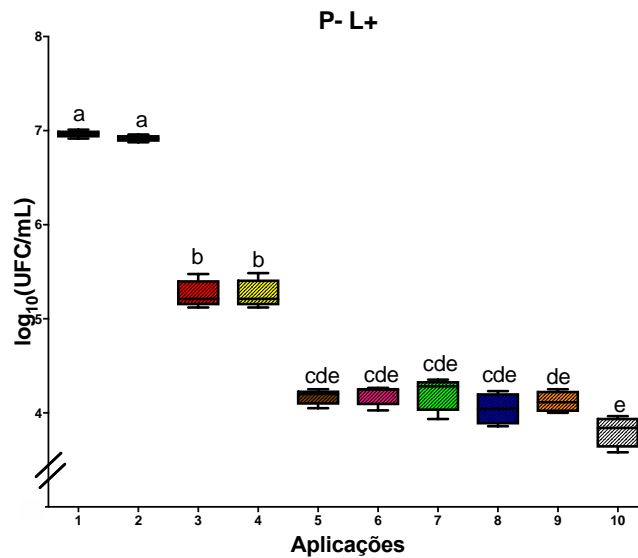


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo ($p > 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise realizada em biofilmes submetidos a luz LED (P-L+) e cultivados em fluconazol foi observado diferença estatística entre a primeira e terceira aplicação, com redução de 1,7 \log_{10} de viabilidade (Figura 28). As aplicações 1 e 2 se comportaram de maneira semelhante, bem como as aplicações 3 e 4. Além disso, foi observado semelhança nas aplicações 5, 6, 7, 8, 9 e 10. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 3,15 \log_{10} .

Figura 28- \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* submetidos a luz (P-L+) cultivados em fluconazol.

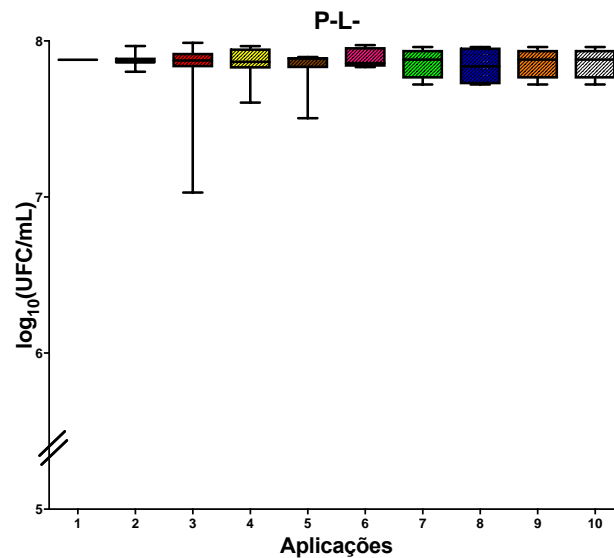


Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise do controle do experimento não foi observado diferença estatística ($P < 0,05$) (Figura 29).

Figura 29- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* sem tratamento (P-L-) cultivados em fluconazol.



Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo ($p > 0,05$) ($n=12$).

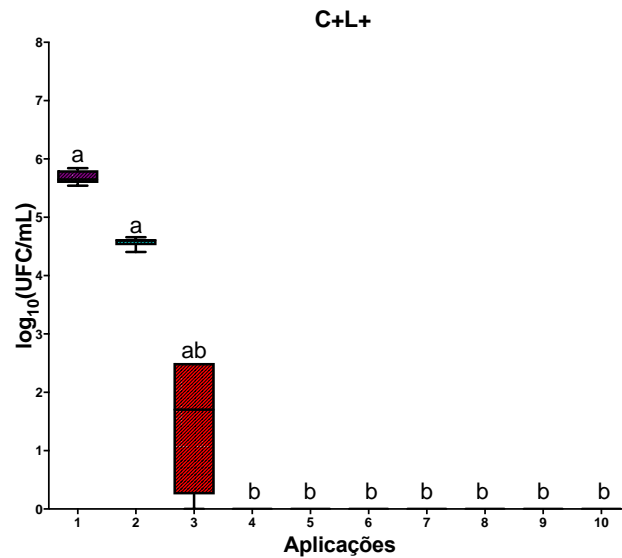
Fonte: Elaboração própria

5.1.2.2 aPDT mediada por Curcumina associada a luz LED

5.1.2.2.1 Culturas planctônicas plaqueadas em ausência de fluconazol

Na análise dos resultados da aPDT mediada por Curcumina (C+L+) realizado em culturas planctônicas de *C. albicans* cultivadas em ausência de fluconazol foi observado diferença estatística entre a primeira e quarta aplicação, com uma diminuição de 59,8% (4,1 \log_{10}) da viabilidade (Figura 30). A partir da quarta aplicação não foi observado crescimento de células viáveis. A Figura 31 mostra sobrevivência em \log_{10} de culturas planctônicas de *C. albicans* após aplicações (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) de aPDT mediada por CUR.

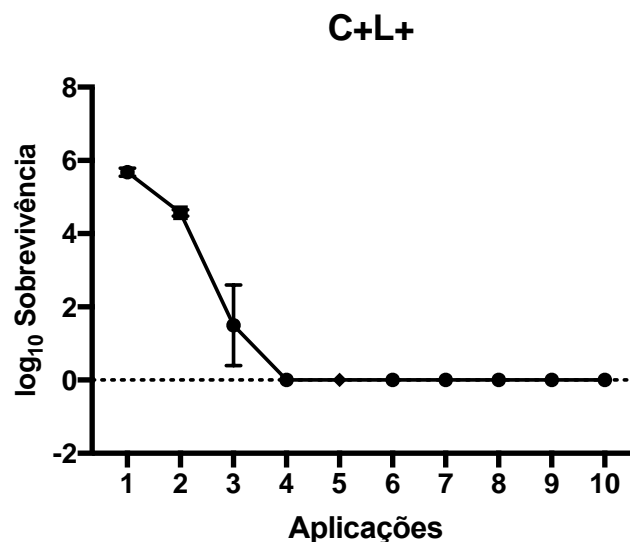
Figura 30- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a aPDT (C+L+).



Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

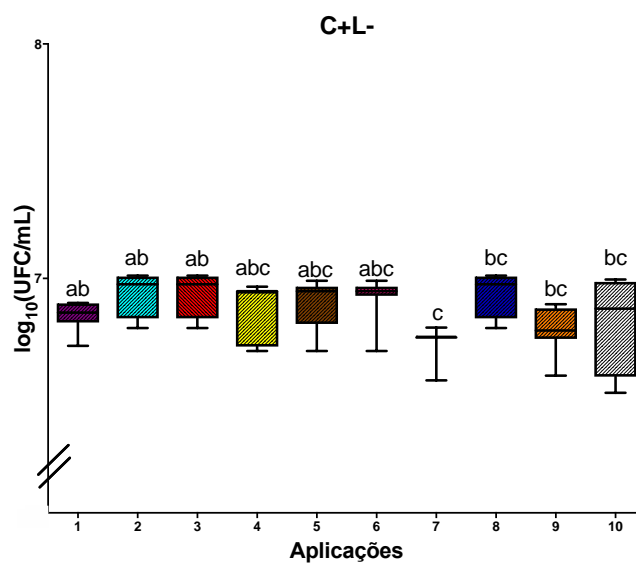
Figura 31- Diferentes \log_{10} de sobrevivência de cultura planctônica de *C. albicans* após exposição longitudinal de aplicações de aPDT mediada por CUR ($n=12$).



Fonte: Elaboração própria

Na análise de culturas planctônicas de *C. albicans* tratadas com CUR (C+L-) foi observado diferença estatística entre a primeira e sétima aplicação, com uma diminuição de 0,78 log₁₀ da viabilidade (Figura 32). A partir da quarta aplicação, os ciclos se comportaram de maneira semelhante. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 0,8 log₁₀.

Figura 32- Valores de log₁₀(UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* tratada com CUR (C+L-).

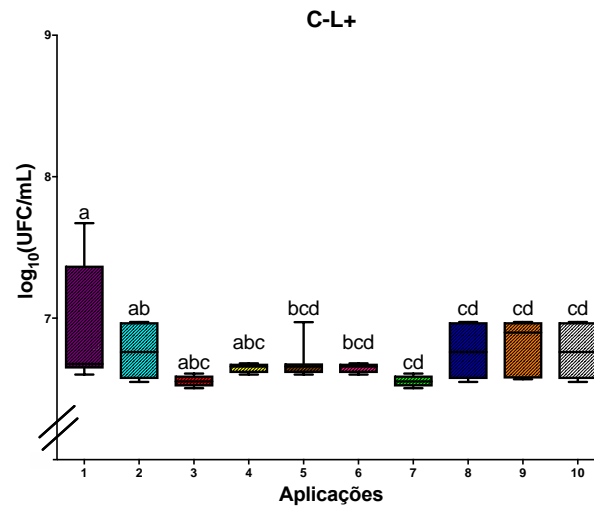


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise de culturas planctônicas de *C. albicans* tratadas com luz LED (C-L+) foi observado diferença estatística entre a primeira e quinta aplicação, com uma diminuição de 0,70 log₁₀ da viabilidade (Figura 33). A partir da aplicação 3, todas as aplicações se comportaram de maneira semelhante. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 0,79 log₁₀.

Figura 33- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* tratada com CUR (C+L-).

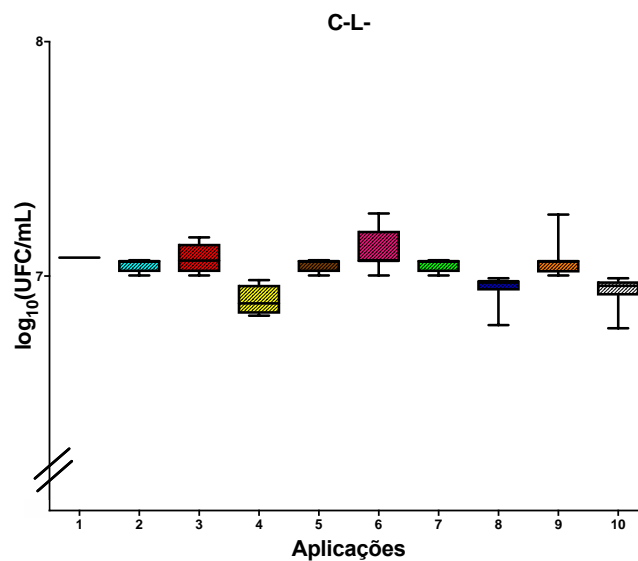


Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise do controle do experimento não foi observado diferença estatística ($P > 0,05$) (Figura 34).

Figura 34- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* sem tratamento (P-L-) cultivados em fluconazol.



Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo ($p > 0,05$) ($n=12$).

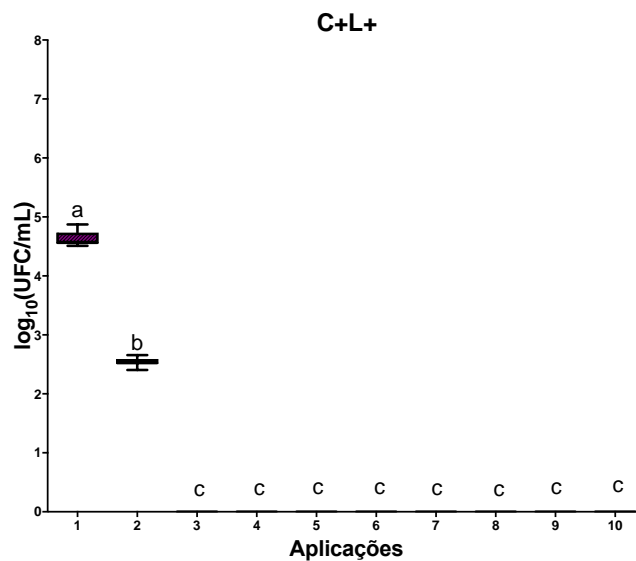
Fonte: Elaboração própria

5.1.2.2.2 Culturas planctônicas plaqueadas em presença de Fluconazol

Na análise dos resultados da aPDT mediada por Curcumina (C+L+) realizado em culturas planctônicas de *C. albicans* cultivadas em presença de Fluconazol, foi observado diferença estatística entre a primeira e terceira aplicação, com uma diminuição de 100% da viabilidade (

Figura 35). Entre a primeira e segunda aplicação a diminuição de viabilidade foi de 29% (- 2,09 log₁₀). A partir da terceira aplicação não foi observado crescimento de células viáveis. A Figura 36 mostra sobrevivência em log₁₀ de culturas planctônicas de *C. albicans* cultivadas em fluconazol após aplicações (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) de aPDT mediada por CUR.

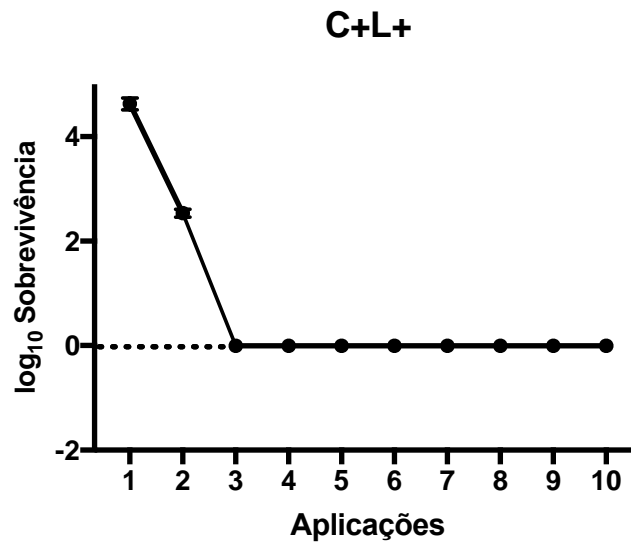
Figura 35- Valores de log₁₀(UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a aPDT (C+L+) cultivados em fluconazol.



Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

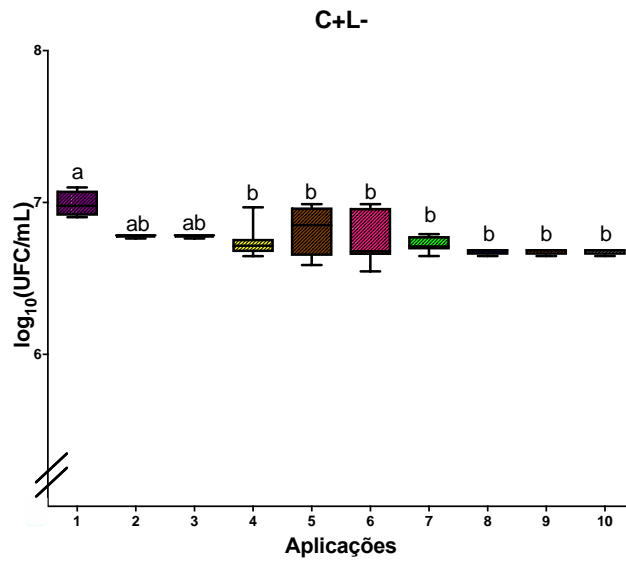
Figura 36- Diferentes \log_{10} de sobrevivência de cultura planctônica de *C. albicans* após exposição longitudinal de aplicações de aPDT mediada por CUR



Fonte: Elaboração própria

Na análise de culturas planctônicas de *C. albicans* tratadas com CUR (C+L-) e cultivadas e fluconazol, foi observado diferença estatística entre a primeira e quarta aplicação, com uma diminuição de 0,78 \log_{10} da viabilidade (Figura 37). A partir da segunda aplicação, os ciclos se comportaram de maneira semelhante. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 0,9 \log_{10} .

Figura 37- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* tratadas com CUR (C+L-) e cultivados em fluconazol.

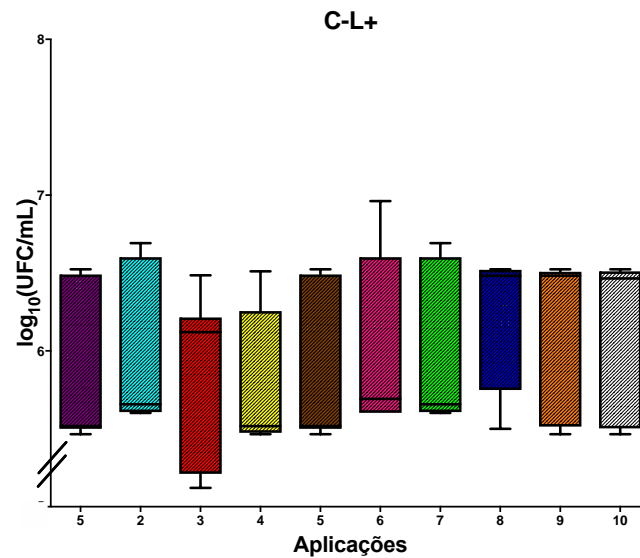


Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise de culturas planctônicas de *C. albicans* cultivadas em Fluconazol e tratadas com Luz LED (C-L+) não foi observado diferença estatística ($P < 0,05$) (Figura 38).

Figura 38- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de culturas planctônicas de *C. albicans* tratadas com CUR (C+L-) e cultivados em fluconazol.

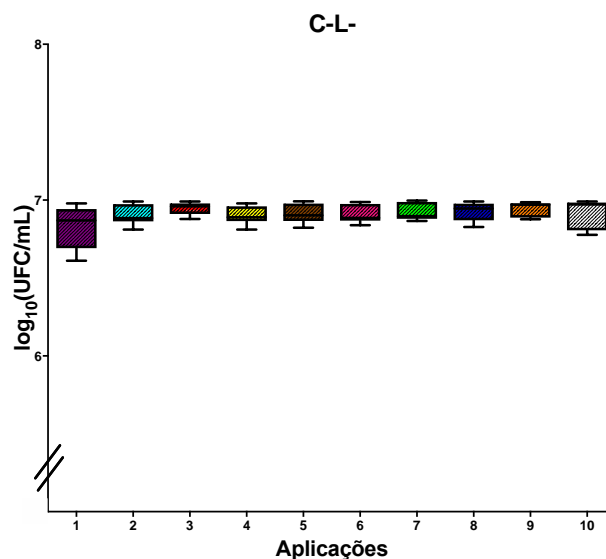


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. ($p > 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Na análise do controle do experimento não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$) (Figura 39).

Figura 39- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de culturas planctônicas de *C. albicans* sem tratamento(C-L-) e cultivados em fluconazol.



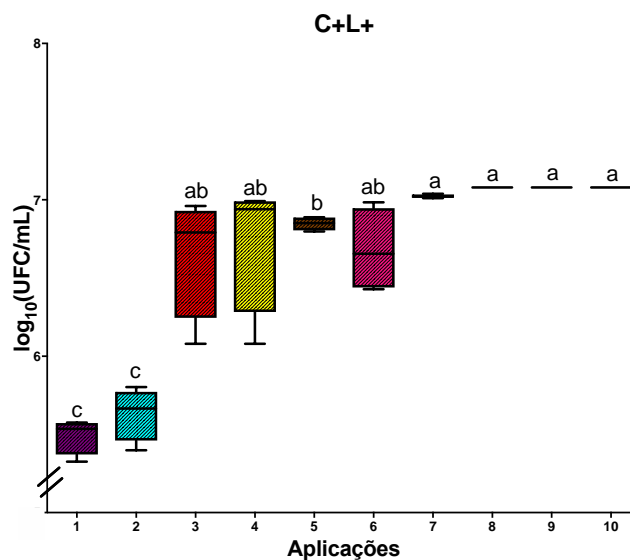
Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. ($p > 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

5.1.2.2.3 Biofilme plaqueado em ausência de fluconazol

Na análise dos resultados da aPDT mediado por Curcumina (C+L+) realizado em biofilmes de *C. albicans* foi observado diferença estatística entre a primeira e terceira aplicação, com um aumento de 1,39 log₁₀ de viabilidade (Figura 40). As aplicações 3, 4, 5 e 6 se comportaram de maneira semelhante. Além disso, as aplicações 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 10 também foram estatisticamente semelhantes. A Figura 41 mostra a sobrevivência em log₁₀ do biofilme de *C. albicans* após as aplicações de aPDT (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) mediada por curcumina.

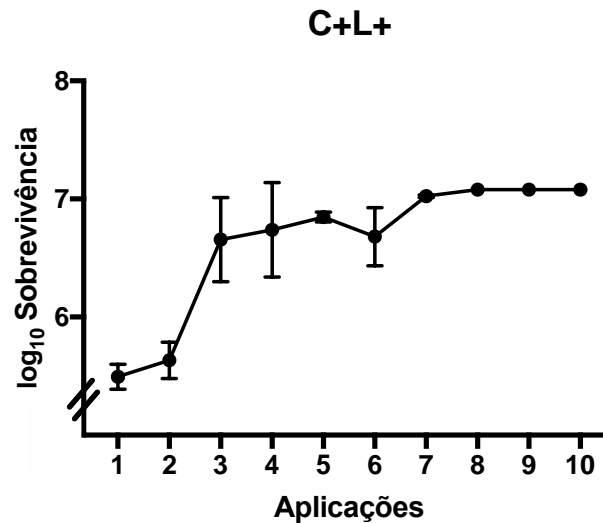
Figura 40- Valores de log₁₀(UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* submetidos a aPDT (C+L+).



Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($P < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

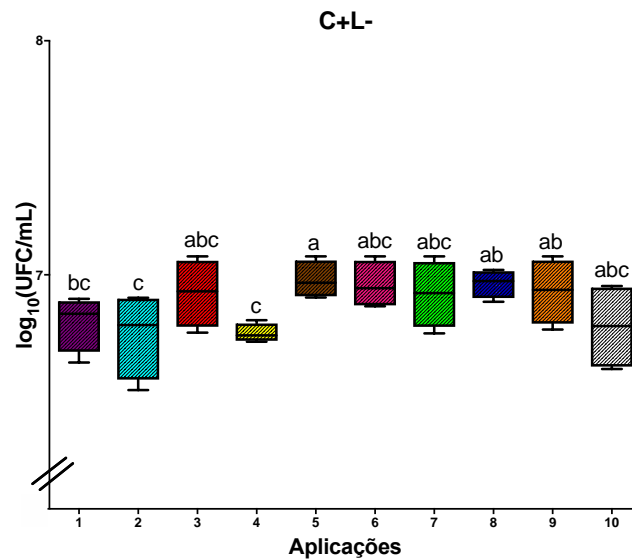
Figura 41- Diferentes \log_{10} de sobrevivência de biofilmes de *C. albicans* após exposição longitudinal de aplicações de aPDT mediada por CUR.



Fonte: Elaboração própria

No ensaio realizado em biofilmes de *C. albicans* tratados somente com Curcumina (C+L-) foi observado diferença estatística entre a primeira e quinta aplicação (Figura 42). Por outro, a primeira aplicação (6,94 \log_{10}) e a quinta aplicação foram estatisticamente semelhantes a décima aplicação (6,68 \log_{10}).

Figura 42- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* tratados com CUR (C+L-).

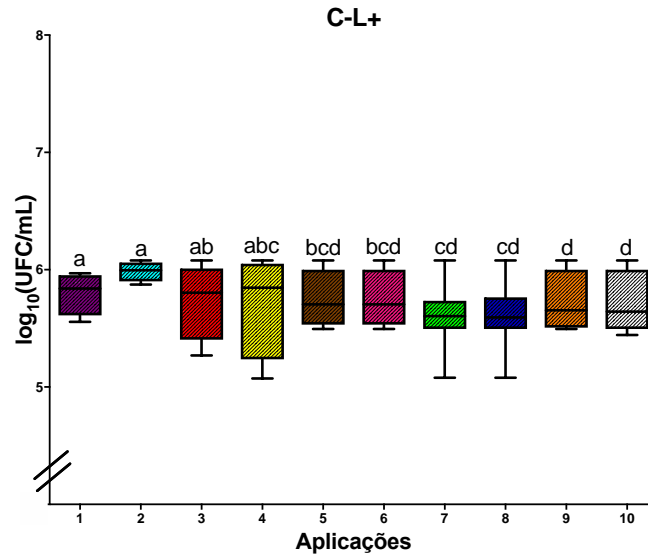


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

Os resultados obtidos no ensaio realizado em biofilmes de *C. albicans* submetido a luz LED (C-L+) foi observado semelhança estatística entre as aplicações 1, 2, 3 e 4, bem como, também foi observado semelhança estatística entre aplicações 3, 4, 5 e 6 (Figura 43). A partir da quinta aplicação os resultados se comportaram de forma semelhante estatisticamente. A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 1 \log_{10} .

Figura 43- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de biofilmes de *C. albicans* submetidos a luz (C-L+).

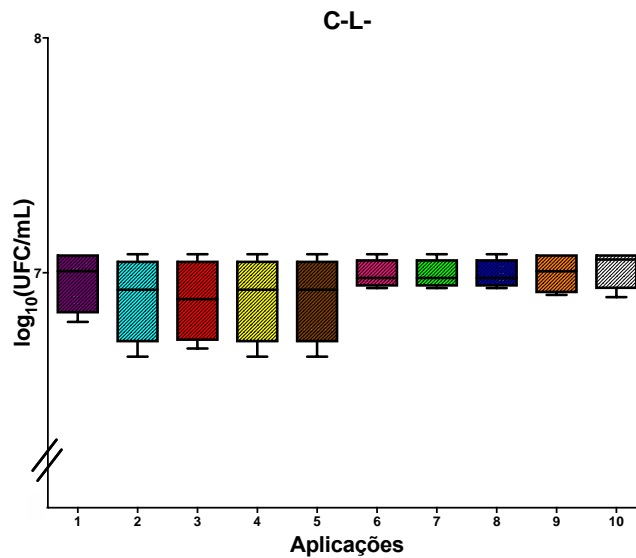


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

No ensaio realizado em biofilmes de *C. albicans* sem tratamento, não foi observado diferença estatística entre as aplicações ($p \geq 0,05$), dessa forma, todas as aplicações se comportaram de maneira semelhante (Figura 44).

Figura 44- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de biofilmes de *C. albicans* sem tratamento (C-L-).



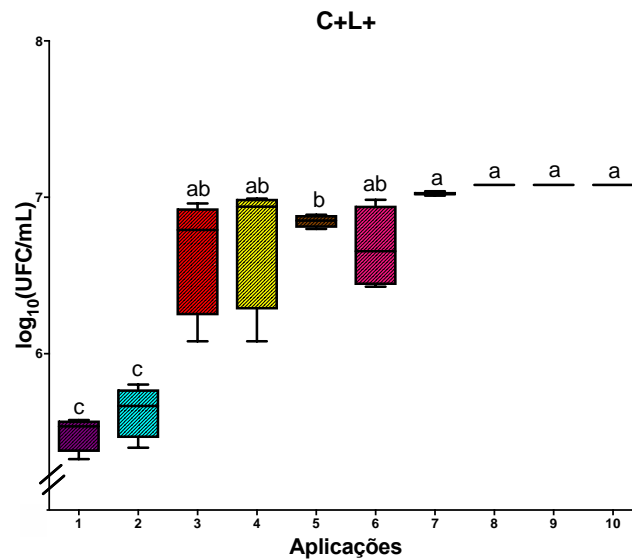
Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo ($p > 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

5.1.2.2.4 Biofilme plaqueado em presença de Fluconazol

Na análise dos resultados da aPDT mediada por Curcumina (C+L+) em biofilme de *C. albicans* cultivados em fluconazol foi observado diferença estatística entre a primeira e terceira aplicação, com aumento de 0,9 \log_{10} da viabilidade (Figura 45). As aplicações 1 e 2 se comportaram de maneira semelhante, bem como, as aplicações 3, 4, 5 e 6. Além disso, as aplicações 7, 8, 9 e 10 também se comportaram de forma semelhante. O aumento de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de 1,38 \log_{10} . A Figura 46 mostra a sobrevivência em \log_{10} de biofilme de *C. albicans* cultivados em fluconazol após aplicações de aPDT (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) mediada por CUR.

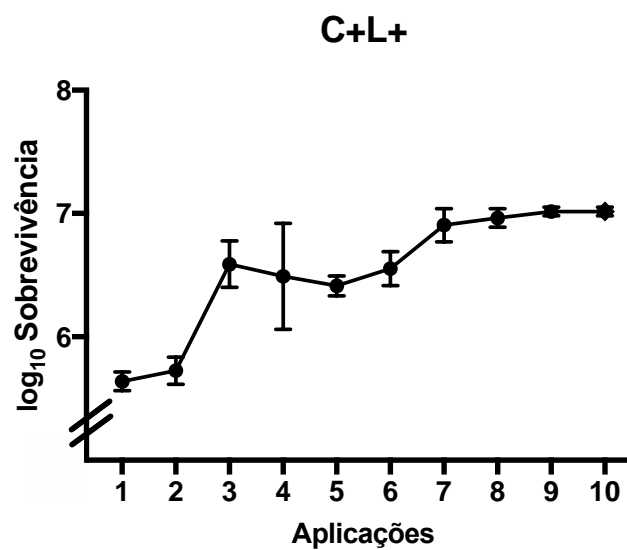
Figura 45- Valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de biofilmes de *C. albicans* submetidos a aPDT (C+L+) cultivados em fluconazol.



Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

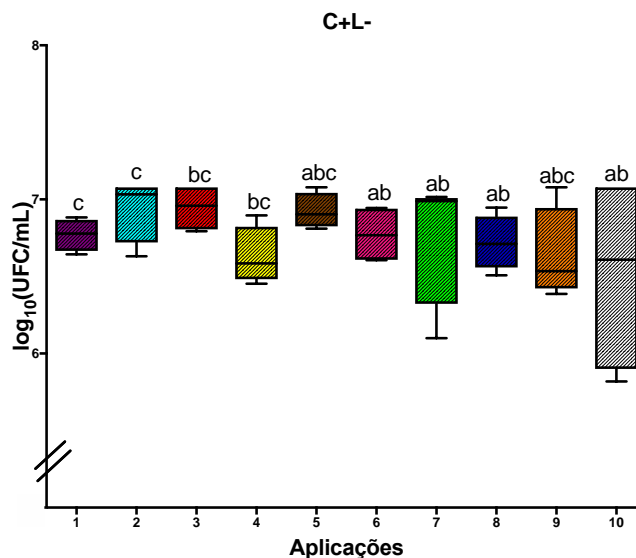
Figura 46- Diferentes \log_{10} de sobrevivência de biofilmes de *C. albicans* plaqueados em meio suplementado com fluconazol após aplicações de aPDT mediada por curcumina.



Fonte: Elaboração própria

Quando os biofilmes foram tratados somente com a Curcumina (C+L-) e plaqueados em fluconazol foi observado diferença estatística entre a primeira e sexta aplicação, com redução de 0,2 log₁₀, entretanto, a sexta aplicação se comportou de forma semelhante a décima aplicação (Figura 47).

Figura 47- Valores de log₁₀(UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* tratados com CUR (C+L-) cultivados em fluconazol.

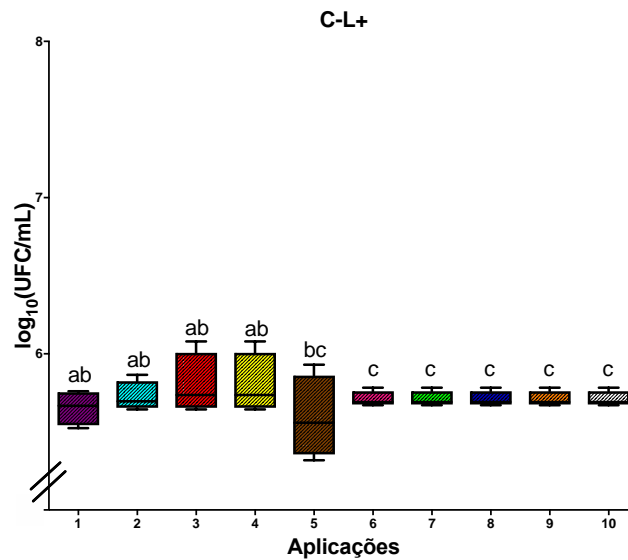


Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

No ensaio realizado em biofilmes de *C. albicans* plaqueados em meio suplementado com fluconazol associado a luz LED (C-L+), foi observado semelhança estatística entre as Aplicações 1, 2, 3, 4 e 5, bem como, também foi observado semelhança estatística entre aplicações 5, 6, 7, 8, 9 e 10 (Figura 48). A redução de viabilidade entre a primeira e décima aplicação foi de aproximadamente 1 log₁₀.

Figura 48- Valores \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* submetidas a luz (C-L+) cultivados em fluconazol.

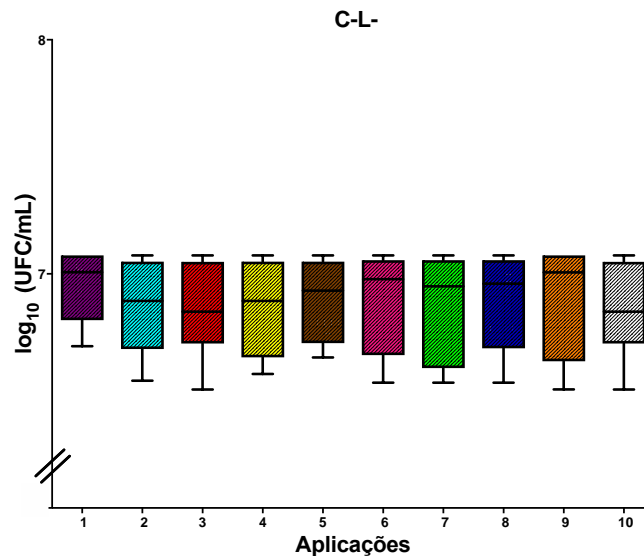


Limite superior da caixa: 3° quartil; limite inferior da caixa: 1° quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

No ensaio realizado em biofilmes de *C. albicans* sem tratamento, não foi observado diferença estatística entre as aplicações ($p > 0,05$), dessa forma, todas as aplicações se comportaram de maneira semelhante (Figura 49).

Figura 49- Valores de \log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* sem tratamento CUR (C-L-) cultivados em fluconazol.



Limite superior da caixa: 3º quartil; limite inferior da caixa: 1º quartil; barras de erro: valores mínimo e máximo. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (aplicações) de acordo com o pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

5.1.3 aPDT mediada por PDZ

5.1.3.1 Culturas planctônicas plaqueadas em ausência de fluconazol

No ensaio de produção intracelular de ERO realizado após a primeira aplicação de aPDT mediada por PDZ em culturas planctônicas de *C. albicans* (Figura 50-a), foi observado que o grupo P+L+ se comportou de maneira semelhante ao grupo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso, o grupo P+L+ foi estatisticamente diferente do grupo tratado com luz (P-L+), com FS (P+L-) e controle negativo (CN). No ensaio que foi realizado após a terceira aplicação de aPDT (P+L+) (Figura 50- b), foi observado que o grupo aPDT apresentou maiores valores de produção de ERO (média de 0,18 U.A) e estatisticamente diferentes do grupo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (média de 0,16 U.A). Também foi observado que o grupo tratado com luz (P-L+) apresentou valores intermediários (média de 0,08 U.A) e estatisticamente diferentes do grupo H_2O_2 . Além disso, os grupos controles do FS (P+L-) e controle do experimento (P-L-) se comportaram de maneira semelhante, sendo o grupo P-L- estatisticamente semelhante ao controle negativo (CN).

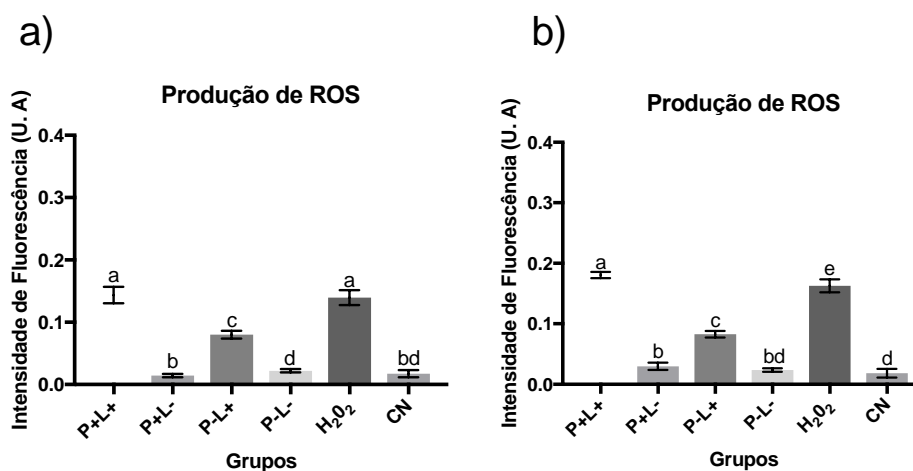


Figura 50- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da produção de ERO, medidos como intensidade de fluorescência por oxidação de H₂DCF-DA fluorimétrica, de culturas planctônicas de *C. albicans* após primeira aplicação (a) e terceira aplicação (b), submetidos a aPDT (P+L+), PDZ (P+L-), somente luz (P-L+), sem tratamento (P-L-), Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) controle negativo- grupo com células tratadas em sem fluoróculo (CN). U.A- unidades arbitrárias. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (grupos) de acordo com o pós-teste de Games-Howell ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

5.1.3.2 Biofilme plaqueado em ausência de fluconazol

No ensaio de produção intracelular de ERO realizado após a primeira aplicação de aPDT mediada por PDZ em biofilme de *C. albicans* (Figura 51- a), foi observado os maiores valores de produção intracelular de ERO (média de 0,28 U.A) para o grupo aPDT (P+L+), sendo este grupo estatisticamente diferente dos demais grupos avaliados. Além disso, foi observado que o grupo controle de luz (P-L+) apresentou valores intermediários (média de 0,16 U.A). O grupo tratado com o FS apresentou valores estatisticamente semelhantes ao grupo sem tratamento (P-L-), sendo este semelhante ao controle negativo (CN).

No ensaio que foi realizado após a sétima aplicação de aPDT em biofilme de *C. albicans* (Figura 51- b), semelhante ao observado após a primeira aplicação, o grupo tratado com aPDT (P+L+) apresentou os maiores valores de produção intracelular de ERO (média de 0,38 U.A), e estatisticamente diferente quando comparado aos demais grupos avaliados. O grupo tratado com luz (P-L+) também apresentou resultados intermediários e estatisticamente diferente dos demais grupos. Além disso, o grupo sem

tratamento (P-L-) demonstrou ser estatisticamente semelhante ao controle negativo (CN).

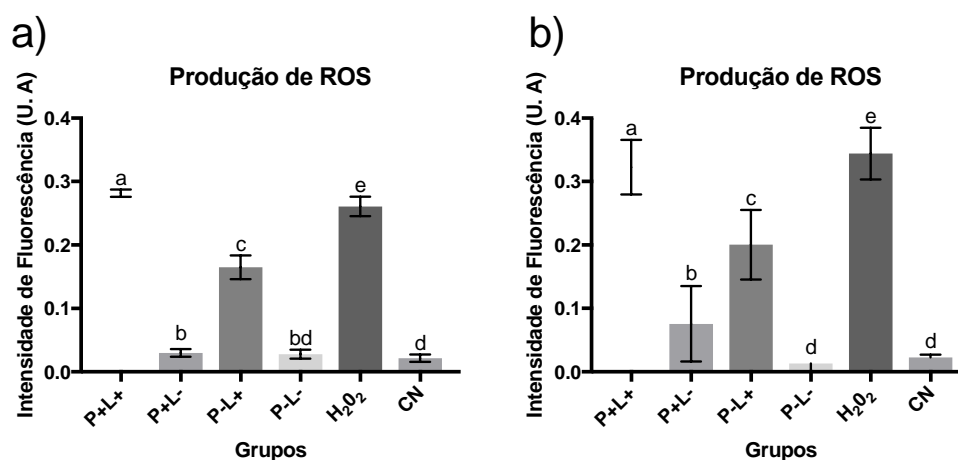


Figura 51- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da produção de ERO , medidos como intensidade de fluorescência por oxidação de H₂DCF-DA fluorimétrica, de biofilme de *C. albicans* após primeira aplicação (a) e sétima aplicação (b), submetidos a aPDT (P+L+), PDZ (P+L-), somente luz (P-L+), sem tratamento (P-L-), Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) controle negativo- grupo com células tratadas em sem fluoróforo (CN). U.A- unidades arbitrárias. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (grupos) de acordo com o pós-teste de Games-Howell (p<0,05) (n=12).

Fonte: Elaboração própria

5.1.4 aPDT mediada por Curcumina

5.1.4.1 Culturas Planctônicas plaqueadas em ausência de fluconazol

No ensaio de produção intracelular de ERO realizado após a primeira aplicação de aPDT mediada por CUR em culturas planctônicas de *C. albicans* (Figura 52- a), foi observado que o grupo C+L+ foi estatisticamente diferente dos demais grupos experimentais, com médias intermediárias. O grupo C-L+ foi estatisticamente semelhante ao grupo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Além disso, os grupos C+L-, C-L- foram estatisticamente semelhantes, apresentando as menores médias da análise. No ensaio que foi realizado após a terceira aplicação de aPDT (Figura 52- b), foi novamente observado, observado que o grupo C-L+ apresentou os maiores valores de média da análise, em comparação com o controle. O grupo C+L+ apresentou maior produção de ERO que a aplicação 1, quando comparado ao controle negativo (CN).

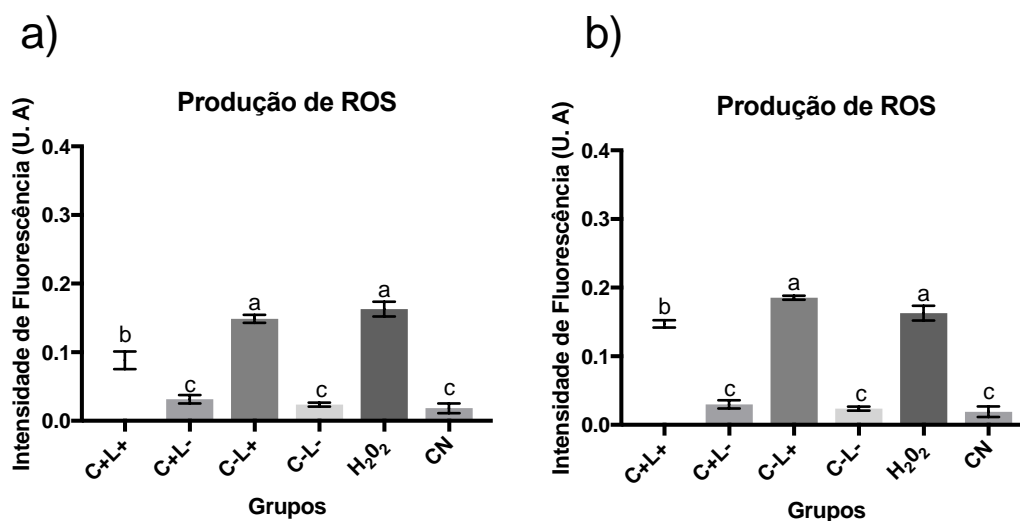


Figura 52- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da produção de ERO , medidos como intensidade de fluorescência por oxidação de H₂DCF-DA fluorimétrica, de culturas planctônicas de *C. albicans* após primeira aplicação (a) e terceira aplicação (b), submetidos a aPDT (C+L+), CUR (C+L-), somente luz (C-L+), sem tratamento (C-L-), Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) controle negativo- grupo com células tratadas em sem fluoróforo (CN). U.A- unidades arbitrárias. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (grupos) de acordo com o pós-teste de Games-Howell (p<0,05) (n=12).

Fonte: Elaboração própria

5.1.4.2 Biofilme plaqueado em ausência de fluconazol

No ensaio de produção intracelular de ERO realizado após a primeira aplicação de aPDT mediada por CUR em biofilme de *C. albicans* (Figura 53- a), foi observado os maiores valores de produção intracelular de ERO (média de 0,28 U.A) para o grupo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo este grupo estatisticamente diferente dos demais grupos avaliados. Além disso, foi observado que o grupo aPDT (C+L+) apresentou valores intermediários (média de 0,20 U.A). O grupo tratado com o FS apresentou valores estatisticamente semelhantes ao grupo tratado somente com luz (C-L+). O grupo controle do experimento (C-L-) e controle negativo (CN) também se comportaram de forma semelhante.

No ensaio que foi realizado após a décima aplicação de aPDT em biofilme de *C. albicans* (Figura 53- b), semelhante ao observado após a primeira aplicação, o grupo H₂O₂ apresentou os maiores valores de produção intracelular de ERO (média de 0,36 U.A), e estatisticamente diferente quando comparado aos demais grupos avaliados. O grupo aPDT (C+L+), controle do FS (C+L-) e controle da luz (C-L+) se comportaram de

forma semelhante. Além disso, o grupo sem tratamento (C-L-) demonstrou ser estatisticamente semelhante ao controle negativo (CN).

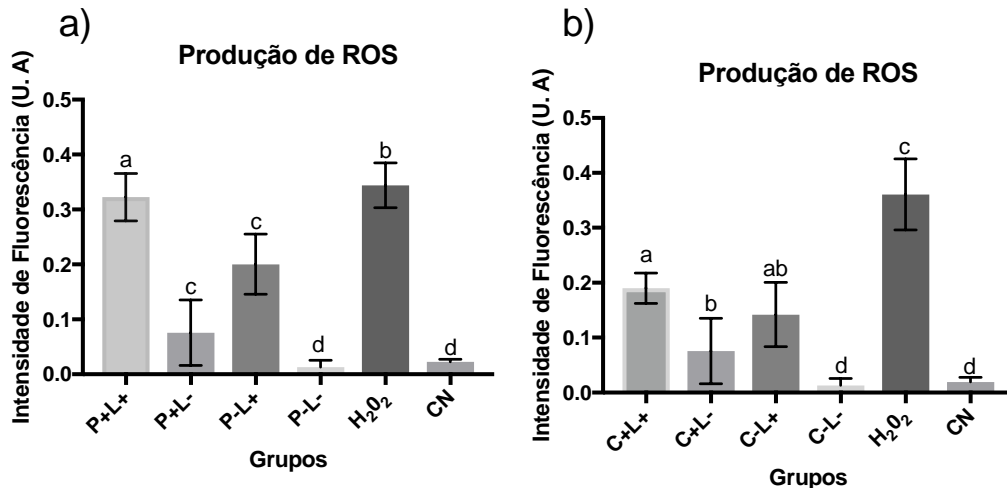


Figura 53- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da produção de ERO, medidos como intensidade de fluorescência por oxidação de H₂DCF-DA fluorimétrica, de biofilme de *C. albicans* após primeira aplicação (a) e décima aplicação (b), submetidos a aPDT (C+L+), CUR (C+L-), somente luz (C-L+), sem tratamento (C-L-), Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) controle negativo- grupo com células tratadas em sem fluoróculo (CN). U.A- unidades arbitrárias. Letras distintas denotam diferença estatística entre colunas (grupos) de acordo com o pós-teste de Games-Howell ($p < 0,05$) ($n=12$).

Fonte: Elaboração própria

5.2 Expressão gênica de *C. albicans* após aPDT mediada pelo PDZ associada a luz LED (Apl 1; Apl 4; Apl 7)

5.2.1 qPCR para teste de cada curva padrão e eficiência de cada primer

O produto de PCR obtido pela técnica de PCR convencional foi utilizado para testar a eficiência da curva padrão de cada primer previamente desenhado em estudos anteriores^{100,101}. Uma alíquota de 0,5 µL das diluições seriadas 2×10^8 a 2×10^2 cópias/µL e Água de grau molecular (*No Template Control*) foi ajustada em um volume final de 25 µL. O Primer para confeccionar o *Master Mix* foi ajustado na concentração final de 10 mM (forward e reverse). Foi utilizado 12,5 µL de 2X SYBR Green Supermix, até completar o volume de 25 µL. Os ciclos de cada gene variaram conforme a temperatura de anelamento de cada primer (T_m), conforme descrito na Tabela 8.

Tabela 8- Característica dos *primers*

| Gene | Concentração ótima (nM) | T _m (°C) | Tamanho do produto (bp) |
|-------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| SOD1 | 400 | 60 | 396 |
| CAP1 | 400 | 50 | 87 |
| ERG11 | 300 | 58 | 159 |

Fonte: Elaboração própria

A equidistância entre os pontos na curva de concentração formada pela corrida de qPCR é denominada *amplification plot* (Figura 54). A primeira curva de amplificação, em duplicata foi detectada próximo ao ciclo 10, e possui diluição de produto de PCR em 2×10^7 cópias/ μL . A segunda, também em duplicata, foi detectada entre o ciclo 10 e ciclo 20, com diluição de produto de PCR em 2×10^6 . Esse padrão se repetiu até a última curva (também em duplicata), após o ciclo 30 (2×10^7). A Figura 54 foi obtida durante o ensaio realizado para testar a eficiência de cada *primer*.

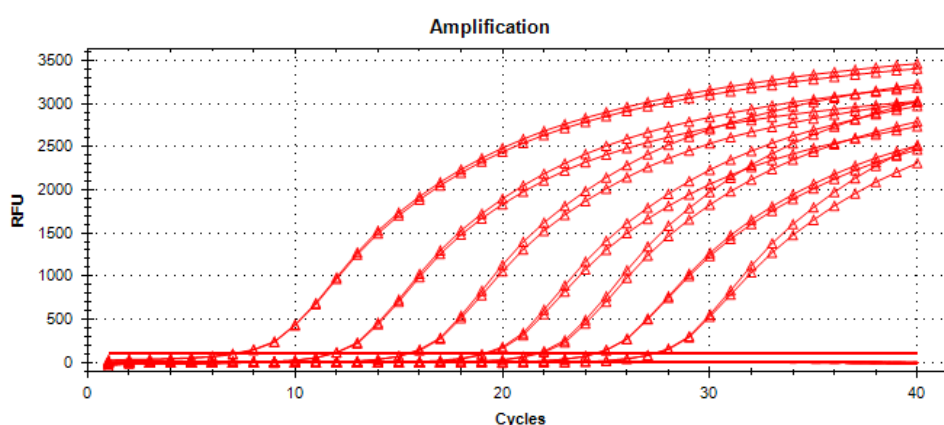
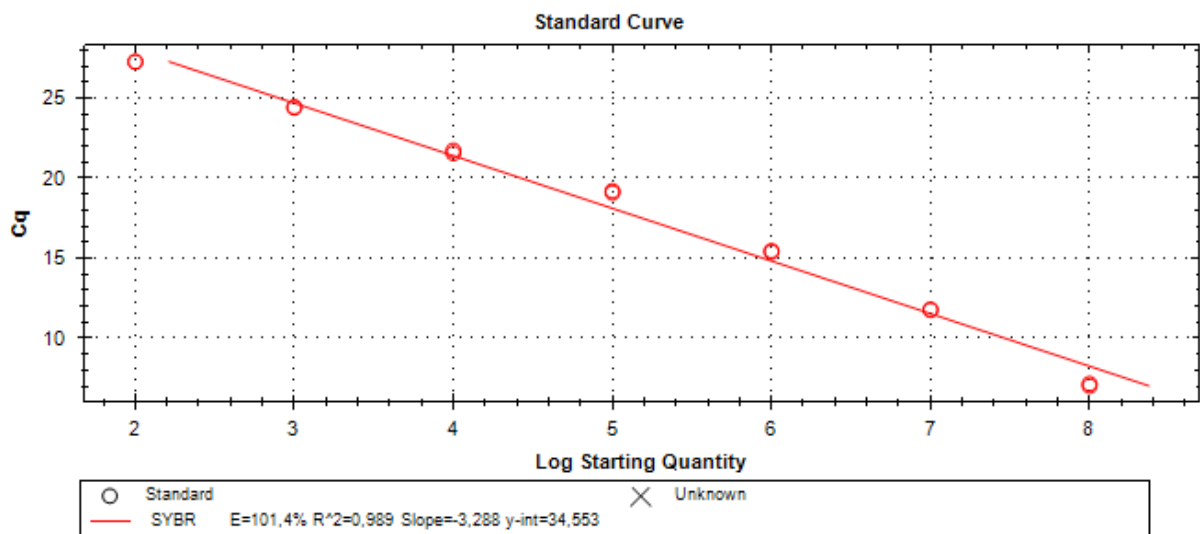
Figura 54- Exemplo de gráfico de *amplification plot*

Gráfico gerado pelo software Bio-Rad CFX™ Manager para o gene ERG11, para qual a concentração ótima foi confirmada em 300 nM. O NTC (No Template Control) não foi detectado

Fonte: Elaboração própria

O coeficiente de R^2 exposto no *software* (abaixo da *Standard curve*) após a corrida de qPCR também é outra opção para analisar a eficiência da curva, que deve estar próximo de 1,000 (Figura 55). O coeficiente E (abaixo da *Standard curve*) possui como função demonstrar a eficiência do primer utilizado na corrida de qPCR e idealmente deve variar entre 90 a 110%¹⁰⁵. No presente estudo foi considerado entre 95% a 105%.

Figura 55- Exemplo de *Standard Curve*



Curva padrão gerado pelo software Bio-Rad CFX™ Manager para o gene ERG11, observa-se os pontos da diluição, valores da eficiência (E), R^2 e *Slope*.

Fonte: Elaboração própria

O *melt peak* também foi analisado, onde, a presença de apenas um pico na reação demonstra ausência de contaminação de material genético e não formação de produtos inespecíficos pelo *primer* utilizado e detecção de apenas um gene (Figura 56). Dados similares foram observados para todos os *primers* testados. Nesse contexto, todas os *primers* utilizados no presente estudo foram padronizados nestas características (E= 95-105%; $R^2= \pm 1$; Slope: -3.3) e puderam ser utilizados de forma segura para avaliar a expressão gênica de *C. albicans* nas amostras recuperadas após os tratamentos.

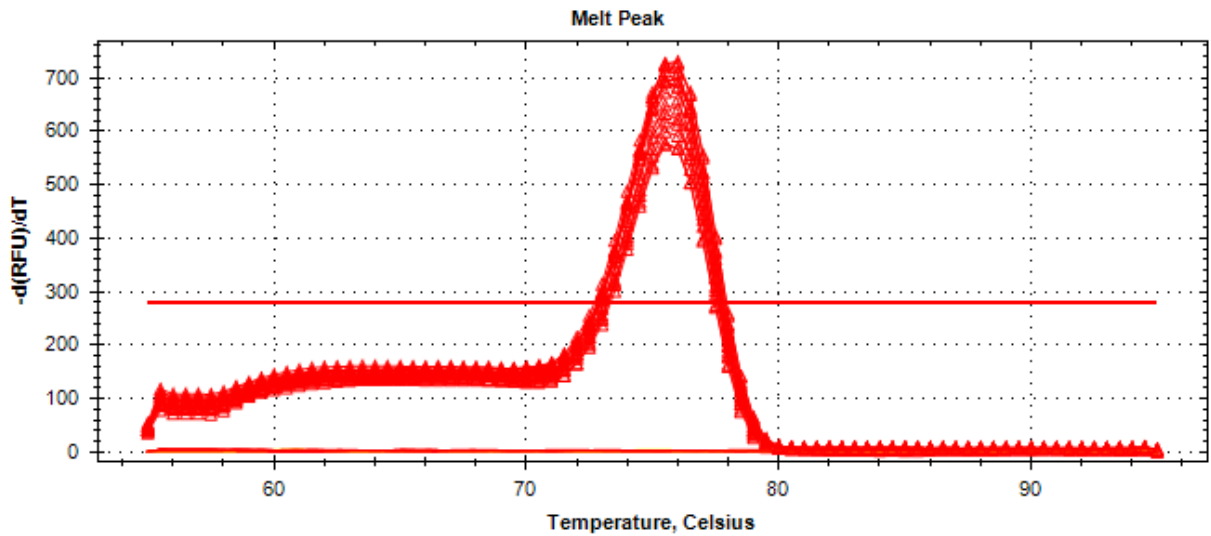
Figura 56- Exemplo de *Melt Peak*

Gráfico de Melt Peak gerado pelo software Bio-Rad CFX™ Manager para o gene ERG11. A presença de 1 (um) pico demonstra que apenas um gene foi detectado.

Fonte: Elaboração própria

5.2.2 Extração de RNA das amostras recuperadas após Apl 1, Apl 4 e Apl 7

A extração foi realizada com o objetivo de obter um rendimento necessário para realizar os protocolos estabelecidos, bem como, analisar a integridade do RNA em gel de agarose. Seguindo a metodologia proposta, o RNA das amostras foi isolado e denominado como RNA bruto.

Tabela 9 - Dados do rendimento de RNA das amostras recuperadas após aplicação 1

| Amostra | LEITURA 1 (NG/ μ L) | LEITURA 2 (NG/ μ L) | MÉDIA (NG/ μ L) | RENDIMENTO RNA (μ G) | INTEGRIDADE DO GEL* |
|------------|----------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------|------------------------|
| P+L+ 1 | 233,76 | 230 | 231,88 | 22,72 | ok |
| P+L+ 2 | 1504,88 | 1501,3 | 1503,09 | 147,30 | ok |
| P+L-1 | 671,52 | 714,2 | 692,86 | 67,90 | ok |
| P+L- 2 | 912,92 | 812,2 | 862,56 | 84,53 | ok |
| P-L+ 1 | 1280,56 | 1267,1 | 1273,83 | 124,84 | ok |
| P-L+ 2 | 1078,64 | 1078,61 | 1078,625 | 105,71 | ok |
| P-L- 1 | 555,76 | 552,1 | 553,93 | 54,29 | ok |
| P-L-2 | 277,52 | 280,5 | 279,01 | 27,34 | ok |
| P+L+ (F) 1 | 440,72 | 441 | 440,86 | 43,20 | ok |
| P+L+ (F) 2 | 528,64 | 529,9 | 529,27 | 51,87 | ok |
| P+L- (F) 1 | 785,12 | 756,9 | 771,01 | 75,56 | ok |
| P+L- (F) 2 | 106,4 | 103,2 | 104,8 | 10,27 | ok |
| P-L+ (F) 1 | 1250,64 | 1111,4 | 1181,02 | 115,74 | ok |
| P-L+ (F) 2 | 1357,68 | 1401,3 | 1379,49 | 135,19 | ok |
| P-L- (F) 1 | 387,68 | 367,4 | 377,54 | 37,00 | ok |
| P-L- (F) 2 | 1174,24 | 1170,8 | 1172,52 | 114,91 | ok |

Valores da Leitura 1(ng/ μ l), Leitura 2(ng/ μ l), Média(ng/ μ l), Rendimento do RNA (μ g) e Integridade do gel. Ok=Integridade do material genético.

Fonte: Elaboração própria

Tabela 10- Dados do rendimento de RNA das amostras recuperadas após aplicação 4

| Amostra | LEITURA 1 (NG/μL) | LEITURA 2 (NG/μL) | MÉDIA (NG/μL) | RENDIMENTO RNA (μG) | INTEGRIDADE DO GEL* |
|----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| P+L+ 1 | 122,2 | 189 | 155,6 | 15,25 | ok |
| P+L+ 2 | 1301,3 | 1201,2 | 1251,25 | 122,62 | ok |
| P+L-1 | 1670,4 | 1670,4 | 1670,4 | 163,70 | ok |
| P+L- 2 | 1890,2 | 1890,2 | 1890,2 | 185,24 | ok |
| P-L+ 1 | 876,1 | 876,6 | 876,35 | 85,88 | ok |
| P-L+ 2 | 956,3 | 967,3 | 961,8 | 94,26 | ok |
| P-L- 1 | 919,9 | 919,6 | 919,75 | 90,14 | ok |
| P-L-2 | 300,5 | 376,3 | 338,4 | 33,16 | ok |
| P+L+ (F) 1 | 550,67 | 550,68 | 550,675 | 53,97 | ok |
| P+L+ (F) 2 | 789,5 | 790,7 | 790,1 | 77,43 | ok |
| P+L- (F) 1 | 666,9 | 660 | 663,45 | 65,02 | ok |
| P+L- (F) 2 | 556,9 | 559,2 | 558,05 | 54,69 | ok |
| P-L+ (F) 1 | 1250,94 | 1250,78 | 1250,86 | 122,58 | ok |
| P-L+ (F) 2 | 1389,7 | 1378,2 | 1383,95 | 135,63 | ok |
| P-L- (F) 1 | 1578,5 | 1578,2 | 1578,35 | 154,68 | ok |
| P-L- (F) 2 | 1189,8 | 1187 | 1188,4 | 116,46 | ok |

Valores da Leitura 1(ng/μl), Leitura 2(ng/μl), Média(ng/μl), Rendimento do RNA (μg) e Integridade do gel. Ok=Integridade do material genético.

Fonte: Elaboração própria

Tabela 11- Dados do rendimento de RNA das amostras recuperadas após aplicação 7

| Amostra | LEITURA 1 (NG/μL) | LEITURA 2 (NG/μL) | MÉDIA (NG/μL) | RENDIMENTO RNA (μG) | INTEGRIDADE DO GEL* |
|----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| P+L+ 1 | 546,20 | 546,30 | 546,25 | 53,53 | ok |
| P+L+ 2 | 532,20 | 531,90 | 532,05 | 52,14 | ok |
| P+L-1 | 1134,50 | 1139,80 | 1137,15 | 111,44 | ok |
| P+L- 2 | 1890,20 | 1870,00 | 1880,10 | 184,25 | ok |
| P-L+ 1 | 876,10 | 898,00 | 887,05 | 86,93 | ok |
| P-L+ 2 | 1140,50 | 1140,20 | 1140,35 | 111,75 | ok |
| P-L- 1 | 805,60 | 800,10 | 802,85 | 78,68 | ok |
| P-L-2 | 300,50 | 376,30 | 338,40 | 33,16 | ok |
| P+L+ (F) 1 | 400,80 | 550,00 | 475,40 | 46,59 | ok |
| P+L+ (F) 2 | 789,50 | 800,00 | 794,75 | 77,89 | ok |
| P+L- (F) 1 | 1113,50 | 1118,99 | 1116,25 | 109,39 | ok |
| P+L- (F) 2 | 326,70 | 326,90 | 326,80 | 32,03 | ok |
| P-L+ (F) 1 | 1240,80 | 1240,60 | 1240,70 | 121,59 | ok |
| P-L+ (F) 2 | 1378,30 | 1500,00 | 1439,15 | 141,04 | ok |
| P-L- (F) 1 | 983,30 | 970,20 | 976,75 | 95,72 | ok |
| P-L- (F) 2 | 1187,40 | 1180,40 | 1183,90 | 116,02 | ok |

Valores da Leitura 1 (ng/μl), Leitura 2 (ng/μl), Média (ng/μl), Rendimento do RNA (μg) e Integridade do gel. Ok=Integridade do material genético.

Fonte: Elaboração própria

Conforme observado na Tabela 9, Tabela 10 e Tabela 11, todas as amostras referentes aos grupos sem suplementação do fluconazol (P+L+, P+L-, P-L+, P-L-) e com suplementação do fluconazol (P+L+(F), P+L-(F), P-L+(F), P-L-(F)) apresentaram rendimento satisfatório e RNA íntegro durante a etapa de extração.

5.3 Purificação do RNA das amostras

As amostras previamente extraídas foram submetidas as etapas de purificação do RNA com rendimento entre (1- 45 μg). Os valores finais de rendimento após a quantificação do RNA das amostras estão representados na Tabela 12, 13 e 14.

Tabela 12 - Dados do rendimento de RNA das amostras recuperadas após aplicação 1 após terceira etapa de purificação

| Amostra | LEITURA 1 (NG/μL) | LEITURA 2 (NG/μL) | MÉDIA (NG/μL) | RENDIMENTO RNA (μG) | INTEGRIDADE DO GEL* |
|----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| P+L+ 1 | 210,6 | 200,3 | 205,45 | 20,13 | ok |
| P+L+ 2 | 1000,44 | 1005,67 | 1003,055 | 98,30 | ok |
| P+L-1 | 559,3 | 559,3 | 559,3 | 54,81 | ok |
| P+L- 2 | 900,4 | 900,56 | 900,48 | 88,25 | ok |
| P-L+ 1 | 1250,98 | 1000,98 | 1125,98 | 110,35 | ok |
| P-L+ 2 | 1000,5 | 110,56 | 555,53 | 54,44 | ok |
| P-L- 1 | 550,7 | 550,1 | 550,4 | 53,94 | ok |
| P-L-2 | 277,4 | 278,4 | 277,9 | 27,23 | ok |
| P+L+ (F) 1 | 334,1 | 300,1 | 317,1 | 31,08 | ok |
| P+L+ (F) 2 | 522,8 | 522,3 | 522,55 | 51,21 | ok |
| P+L- (F) 1 | 785,2 | 700,5 | 742,85 | 72,80 | ok |
| P+L- (F) 2 | 100,5 | 100,9 | 100,7 | 9,87 | ok |
| P-L+ (F) 1 | 1244,1 | 1244 | 1244,05 | 121,92 | ok |
| P-L+ (F) 2 | 1320 | 1234,9 | 1277,45 | 125,19 | ok |
| P-L- (F) 1 | 346,9 | 411,9 | 379,4 | 37,18 | ok |
| P-L- (F) 2 | 1140,24 | 1149,8 | 1145,02 | 112,21 | ok |

Valores da Leitura 1 (ng/μl), Leitura 2 (ng/μl), Média (ng/μl), Rendimento do RNA (μg) e Integridade do gel. Ok=Integridade do material genético.

Fonte: Elaboração própria

Tabela 13 - Dados do rendimento de RNA das amostras recuperadas após aplicação 4 após terceira etapa de purificação

| Amostra | LEITURA 1 (NG/μL) | LEITURA 2 (NG/μL) | MÉDIA (NG/μL) | RENDIMENTO RNA (μG) | INTEGRIDADE DO GEL* |
|----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| P+L+ 1 | 119,98 | 119,87 | 119,925 | 11,75 | ok |
| P+L+ 2 | 1210,9 | 1200 | 1205,45 | 118,13 | ok |
| P+L-1 | 1560,4 | 1500,9 | 1530,65 | 150,00 | ok |
| P+L- 2 | 1700,8 | 1780,3 | 1740,55 | 170,57 | ok |
| P-L+ 1 | 832,2 | 845 | 838,6 | 82,18 | ok |
| P-L+ 2 | 935 | 928,98 | 931,99 | 91,34 | ok |
| P-L- 1 | 919,98 | 919,88 | 919,93 | 90,15 | ok |
| P-L-2 | 210,03 | 248,5 | 229,265 | 22,47 | ok |
| P+L+ (F) 1 | 547,87 | 543,3 | 545,585 | 53,47 | ok |
| P+L+ (F) 2 | 658,2 | 653,2 | 655,7 | 64,26 | ok |
| P+L- (F) 1 | 666,9 | 663,2 | 665,05 | 65,17 | ok |
| P+L- (F) 2 | 559,1 | 550 | 554,55 | 54,35 | ok |
| P-L+ (F) 1 | 1134,2 | 1134 | 1134,1 | 111,14 | ok |
| P-L+ (F) 2 | 1246,2 | 1245 | 1245,6 | 122,07 | ok |
| P-L- (F) 1 | 1468,1 | 1453,2 | 1460,65 | 143,14 | ok |
| P-L- (F) 2 | 1172,2 | 1171,9 | 1172,05 | 114,86 | ok |

Valores da Leitura 1 (ng/μl), Leitura 2 (ng/μl), Média (ng/μl), Rendimento do RNA (μg) e Integridade do gel. Ok=Integridade do material genético.

Fonte: Elaboração própria

Tabela 14- Dados do rendimento de RNA das amostras recuperadas após aplicação 7 após terceira etapa de purificação

| Amostra | LEITURA 1 (NG/μL) | LEITURA 2 (NG/μL) | MÉDIA (NG/μL) | RENDIMENTO RNA (μG) | INTEGRIDADE DO GEL* |
|------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------------|------------------------|
| P+L+ 1 | 438,9 | 437,3 | 438,1 | 42,93 | ok |
| P+L+ 2 | 534,0 | 532,2 | 533,1 | 52,24 | ok |
| P+L-1 | 1136,9 | 1134,3 | 1135,6 | 111,29 | ok |
| P+L- 2 | 1245,0 | 1232,8 | 1238,9 | 121,41 | ok |
| P-L+ 1 | 546,0 | 532,7 | 539,4 | 52,86 | ok |
| P-L+ 2 | 1110,8 | 1134,8 | 1122,8 | 110,03 | ok |
| P-L- 1 | 765,8 | 745,3 | 755,6 | 74,04 | ok |
| P-L-2 | 300,8 | 299,5 | 300,2 | 29,42 | ok |
| P+L+ (F) 1 | 346,7 | 328,9 | 337,8 | 33,10 | ok |
| P+L+ (F) 2 | 777,2 | 777,2 | 777,2 | 76,17 | ok |
| P+L- (F) 1 | 1112,1 | 1110,0 | 1111,1 | 108,88 | ok |
| P+L- (F) 2 | 326,7 | 326,9 | 326,8 | 32,03 | ok |
| P-L+ (F) 1 | 1110,4 | 1145,9 | 1128,2 | 110,56 | ok |
| P-L+ (F) 2 | 1356,3 | 1124,9 | 1240,6 | 121,58 | ok |
| P-L- (F) 1 | 904,3 | 901,3 | 902,8 | 88,47 | ok |
| P-L- (F) 2 | 1182,9 | 1185,8 | 1184,4 | 116,07 | ok |

Valores da Leitura 1 (ng/μl), Leitura 2 (ng/μl), Média (ng/μl), Rendimento do RNA (μg) e Integridade do gel. Ok=Integridade do material genético.

Fonte: Elaboração própria

A perda do rendimento após as etapas de purificação observadas nos dados apresentados pode ser justificada pela instabilidade e sensibilidade do RNA a fatores como temperatura e momento do processamento das amostras. No entanto, ainda assim, as amostras mantiveram um padrão de rendimento satisfatório e foram submetidas ao tratamento com Turbo DNase (Ambion), como também, à terceira etapa de purificação com kit RNeasy MinElute (Qiagen). Os dados após a terceira etapa estão descritos na Tabela 14.

Os resultados demonstraram que as amostras apresentaram rendimento satisfatório superior a 3,5 μg de RNA. Essa é a quantidade mínima necessária para analisar a expressão por grupo, pois é necessário:

- 0,5 μg de RNA para realizar a corrida de gel de agarose e checar a integridade do material genético
- 2 μg para a síntese de cDNA – amostras (RT+ em duplicata)
- 1 μg para a síntese de cDNA – controle negativo (RT-)

As amostras foram checadas quanto a sua integridade em gel de agarose 2%, conforme o exemplo em Figura 57 e Figura 58. A integridade das bandas demonstram que há integridade do RNA ribossomal para todas as amostras. Observa-se também ausência de DNA.

Figura 57- Imagem representativa da corrida do gel de agarose a 2% referente às amostras cultivadas na ausência de fluconazol

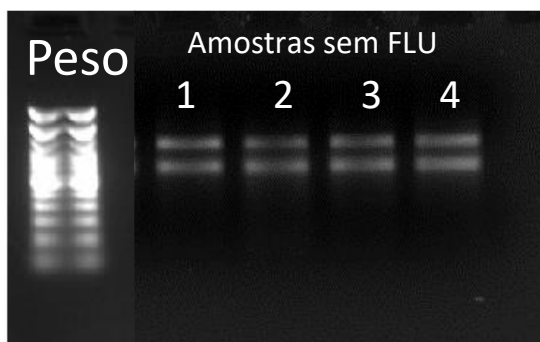


Imagem gerada através do equipamento *BIO RAD Molecular Image Gel Doc™ XR+ with images Lab Software* após Eletroforese em gel de Agarose 2% do RNA dos diferentes grupos. 1: P+L+; 2: P+L-; 3: P-L+; 4: P-L

Fonte: Elaboração própria

Figura 58- Imagem representatia da corrida do gel de agarose a 2% referente às amostras que foram cultivados na presença de fluconazol

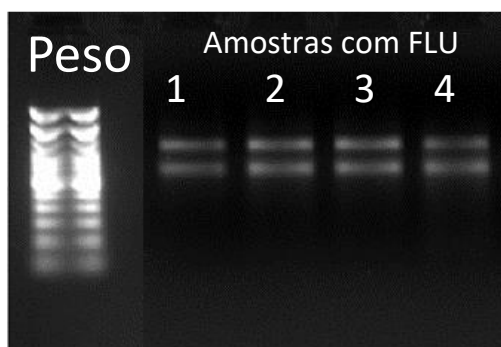


Imagem gerada através do equipamento *BIO RAD Molecular Image Gel Doc™ XR+ with images Lab Software* após Eletroforese em gel de Agarose 2% do RNA dos diferentes grupos. 1: P+L+; 2: P+L-; 3: P-L+; 4: P-L-

Fonte: Elaboração própria

5.4 qPCR para a avaliação da expressão gênica

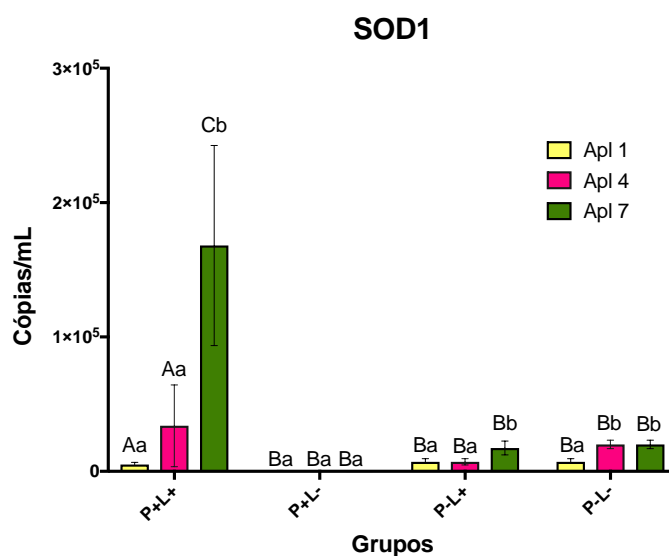
A placa de qPCR apresentava a curva de concentração de cada primer com as características ideais previamente estabelecidas, bem como, o cDNA das amostras de

todos os grupos. Em todas as reações de qPCR foi constatado condições ideais para a curva de cada primer (Melt curve- 1 pico; E= 95-105%; $R^2 = \pm 1$; Slope: aproximadamente - 3.3). O *Threshold* foi fixado em 100 para todos os primers.

Os resultados demonstraram que os diferentes tratamentos influenciaram na expressão do gene SOD1, após a primeira (Apl1), quarta (Apl 4) e sétima aplicação (Apl 7) (Figura 59). Nos biofilmes cultivados na ausência do fluconazol, foi observado que a Aplicação 7 (Apl 7) do grupo submetido à aPDT (P+L+) foi estatisticamente diferente das demais aplicações de todos os grupos experimentais, apresentando as maiores médias de expressão gênica (Cópias-mL). As aplicações 1 e 4 do grupo P+L+ demonstraram ser estatisticamente semelhantes, no entanto, a aplicação 1 apresentou os menores valores de expressão frente a comparação. Todas as aplicações (Apl 1, Apl 4 e Apl 7) dos grupos P+L-, P-L+ e P-L- demonstraram ser estatisticamente semelhante entre si. No grupo P+L- foi observado ausência de expressão gênica na aplicação 1, 4 e 7.

Na comparação das aplicações dentro dos grupos experimentais, a aplicação 7 se comportou estatisticamente diferente à aplicação 1 e 4, apresentando os maiores valores de expressão gênica da análise. Em relação ao grupo P+L-, as três aplicações se comportaram de maneira semelhante, com ausência de expressão gênica. No grupo submetido à luz LED (P-L+), foi observado que a sétima aplicação (Apl 7) apresentou os maiores valores de expressão da comparação e foi estatisticamente diferente das aplicações 1 e 4. No grupo P-L-, a aplicação 1 (Apl 1) foi estatisticamente diferente das aplicações 4 (Apl 4) e 7 (Apl 7), apresentando as menores médias da comparação dentro do grupo.

Figura 59- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da expressão do gene SOD1 em cada grupo experimental do biofilme de *C. albicans* após primeira (Apl 1- amarelo), quarta (Apl 4- rosa) e sétima (Apl 7- verde) aplicação de de aPDT mediada por PDZ (P+L+), controle do FS (P+L-), controle da luz (P-L+) e controle do experimento (P-L-).



Apl- ciclo de aplicação. Letra maiúsculas distintas entre as colunas denotam diferença estatística entre as aplicações (Apl 1, Apl 4 e Apl 7). Letra minúsculas distintas denotam diferença estatística entre colunas dentro de cada grupo experimental (P+L+, P+L-, P-L+ e P-L- Grupos); de acordo com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=8$).

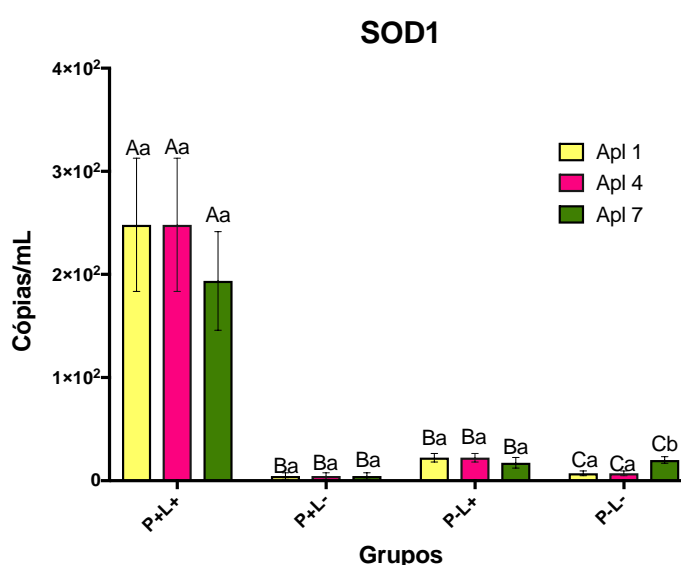
Fonte: Elaboração própria

Nos biofilmes cultivados na presença de fluconazol, os resultados também demonstraram que os diferentes tratamentos influenciaram na expressão do gene SOD1, após a primeira (Apl1), quarta (Apl 4) e sétima aplicação (Apl 7) (Figura 60). As aplicações 1, 4 e 7 do grupo P+L+, foram estatisticamente diferentes à todas as demais aplicações da análise, apresentando as maiores médias de expressão gênica. As aplicações 1, 4 e 7 do grupo P-L- também demonstraram diferença estatística às demais aplicações presentes na análise.

Nos grupos P+L- e P-L+ as aplicações 1, 4 e 7 demonstraram ser estatisticamente semelhantes entre si. Dentro do grupo P+L+, P+L- e P-L+, não foi observado diferença estatística entre as aplicações. Por outro lado, no grupo P-L- foi

notado que Apl 7 foi estatisticamente diferente das demais aplicações, possuindo as maiores médias de expressão da comparação.

Figura 60- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da expressão do gene SOD1 em cada grupo experimental do biofilme de *C. albicans* cultivados em Fluconazol após primeira (Apl 1- amarelo), quarta (Apl 4- rosa) e sétima (Apl 7- verde) aplicação de de aPDT mediada por PDZ (P+L+), controle do FS (P+L-), controle da luz (P-L+) e controle do experimento (P-L-).



Apl- ciclo de aplicação. Letra maiúsculas distintas entre as colunas denotam diferença estatística entre as aplicações (Apl 1, Apl 4 e Apl 7). Letra minúsculas distintas denotam diferença estatística entre colunas dentro de cada grupo experimental (P+L+, P+L-, P-L+ e P-L- Grupos); de acordo com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=8$).

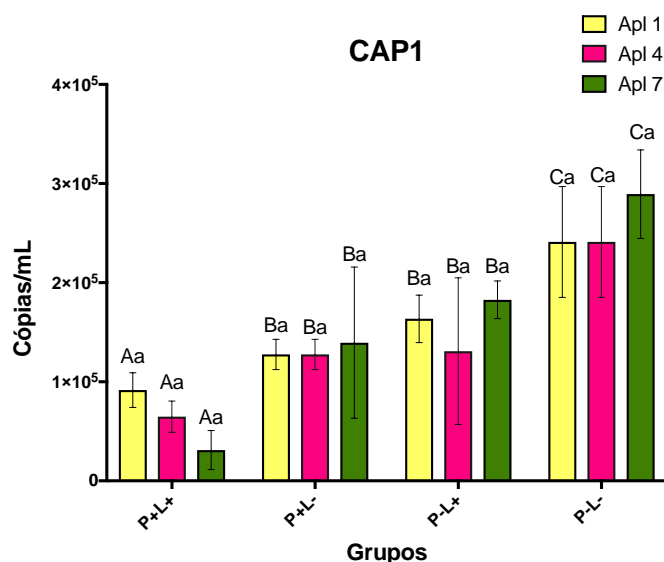
Fonte: Elaboração própria

Nos biofilmes cultivados na ausência de fluconazol, os resultados relataram que os diferentes tratamentos possuem efeito sobre a expressão do gene CAP1, após a primeira (Apl1), quarta (Apl 4) e sétima aplicação (Apl 7) (Figura 61). Apl 1, Apl 4 e Apl 7 do grupo P+L+, foram estatisticamente diferentes à todas as outras aplicações da análise, apresentando as menores médias de expressão gênica. Os resultados também demonstraram que Apl 1, Apl 4 e Apl 7 do grupos P-L- apresentaram-se estatisticamente diferente das demais aplicações, possuindo os maiores valores de expressão gênica da análise. No entanto, Apl 1, Apl 4 e Apl 7 dos grupos P+L- e P-L+

se comportaram de maneira semelhante, possuindo médias intermediárias de expressão gênica.

De acordo com as análises realizadas dentro dos grupos experimentais, os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre as aplicações 1, 4 e 7, sendo assim, todas as aplicações se comportaram de maneira semelhante dentro de cada grupo.

Figura 61- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da expressão do gene CAP1 em cada grupo experimental do biofilme de *C. albicans* após primeira (Apl 1- amarelo), quarta (Apl 4- rosa) e sétima (Apl 7- verde) aplicação de de aPDT mediada por PDZ (P+L+), controle do FS (P+L-), controle da luz (P-L+), controle do experimento (P-L-).



Apl- ciclo de aplicação. Letra maiúsculas distintas entre as colunas denotam diferença estatística entre as aplicações (Apl 1, Apl 4 e Apl 7). Letra minúsculas distintas denotam diferença estatística entre colunas dentro de cada grupo experimental (P+L+, P+L-, P-L+ e P-L- Grupos); de acordo com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=8$).

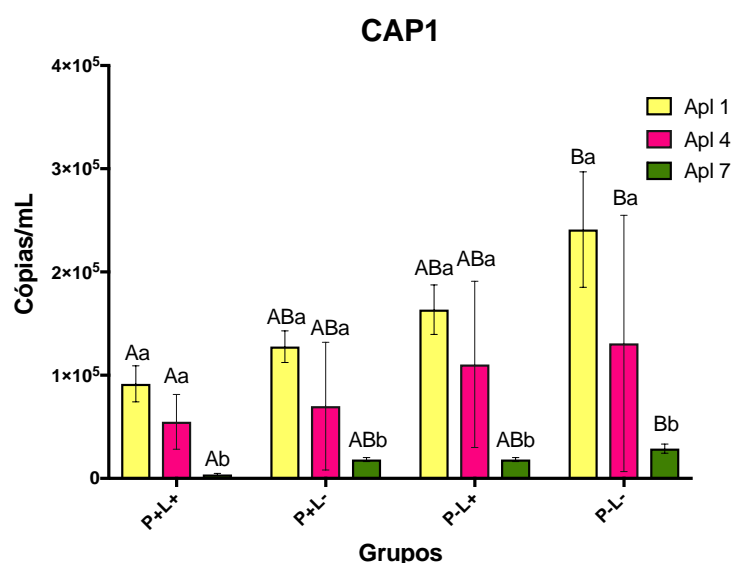
Fonte: Elaboração própria

Nos biofilmes cultivados na presença de fluconazol, os resultados também demonstraram que os diferentes tratamentos influenciaram na expressão do gene CAP1, após a primeira (Apl 1), quarta (Apl 4) e sétima aplicação (Apl 7) (Figura 62). As aplicações 1, 4 e 7 dos grupos P+L+, P+L- e P-L+ foram estatisticamente semelhantes entre si. Os resultados também relataram que as aplicações 1, 4 e 7 do grupo P+L+ são estatisticamente diferentes das aplicações 1, 4 e 7 do grupo P-L-, que por sua vez,

possuiu os maiores valores de expressão gênica da análise. A aplicação 1, 4 e 7 dos grupos P-L-, P+L- e P-L+ também se comportaram estatisticamente semelhantes entre si.

De acordo com as análises realizadas dentro de cada grupo experimental, a aplicação 7 demonstrou ser estatisticamente diferente das aplicações 1 e 4, em todos os grupos experimentais, possuindo as menores médias de expressão gênica. Dentro do grupo P+L+, após a aplicação 7, não foi observado expressão do gene CAP1.

Figura 62- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da expressão do gene CAP1 em cada grupo experimental do biofilme de *C. albicans* cultivados em fluconazol após primeira (Apl 1- amarelo), quarta (Apl 4- rosa) e sétima (Apl 7- verde) aplicação de de aPDT mediada por PDZ (P+L+), controle do FS (P+L-), controle da luz (P-L+), controle do experimento (P-L-).



Apl- ciclo de aplicação. Letra maiúsculas distintas entre as colunas denotam diferença estatística entre as aplicações (Apl 1, Apl 4 e Apl 7). Letra minúsculas distintas denotam diferença estatística entre colunas dentro de cada grupo experimental (P+L+, P+L-, P-L+ e P-L- Grupos); de acordo com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=8$).

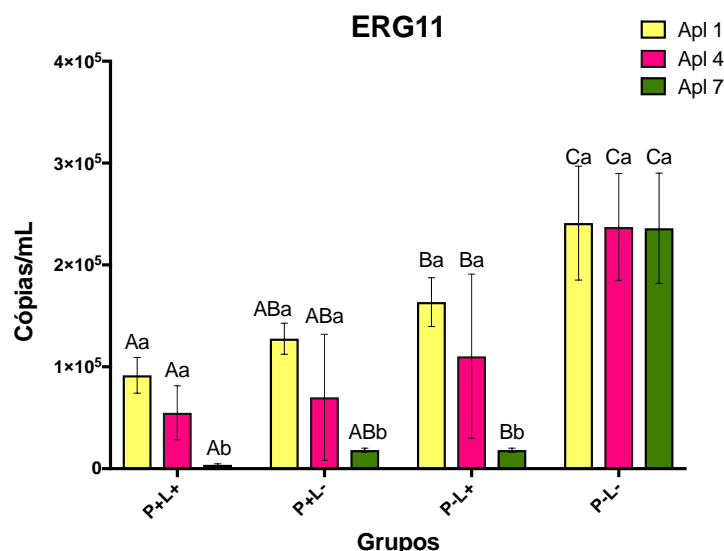
Fonte: Elaboração própria

Em relação ao gene ERG11, foi observado que os diferentes tratamentos também influenciaram na expressão gênica após as Aplicações 1, 4 e 7 (Figura 63). Nesse contexto, os resultados demonstraram que as aplicações 1, 4 e 7 do grupo P+L+ possuem os menores valores de expressão da análise, e se comportaram

estatisticamente semelhante à todas as aplicações do grupo P+L-, no entanto, diferente das aplicações 1, 4 e 7 dos grupos P-L+ e P-L-. Além disso, todas as aplicações do grupo P+L- foram estatisticamente semelhantes às aplicações do grupo P+L+ e P-L+. Por fim, as aplicações 1, 4 e 7 do grupo P-L- foram estatisticamente diferentes dos demais grupos, possuindo as maiores médias de expressão gênica da análise.

De acordo com as comparações realizadas dentro de cada grupo experimental, a aplicação 7 novamente demonstrou ser estatisticamente diferente das aplicações 1 e 4 nos grupos P+L+, P+L- e P-L+, possuindo as menores médias de expressão gênica da análise. As aplicações 1, 4 e 7 do grupo P-L- se comportaram de maneira semelhante entre si. Semelhante a análise anterior, não houve expressão do gene ERG 11 na aplicação 7 do grupo P+L+.

Figura 63- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da expressão do gene ERG11 em cada grupo experimental do biofilme de *C. albicans* após primeira (Apl 1- amarelo), quarta (Apl 4- rosa) e sétima (Apl 7- verde) aplicação de de aPDT mediada por PDZ (P+L+), controle do FS (P+L-), controle da luz (P-L+) e controle do experimento (P-L-).



Apl- ciclo de aplicação. Letra maiúsculas distintas entre as colunas denotam diferença estatística entre as aplicações (Apl 1, Apl 4 e Apl 7). Letra minúsculas distintas denotam diferença estatística entre colunas dentro de cada grupo experimental (P+L+, P+L-, P-L+ e P-L- Grupos); de acordo com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=8$).

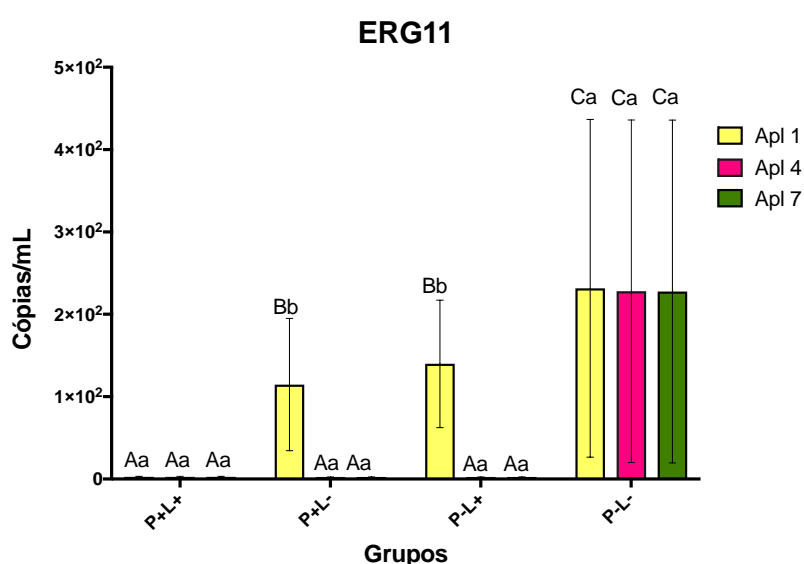
Fonte: Elaboração própria

Os resultados demonstraram que os diferentes tratamentos influenciaram na expressão do gene ERG11, após a primeira (Apl1), quarta (Apl 4) e sétima aplicação

(Apl 7), na presença do fluconazol Figura 64. As aplicações 1, 4 e 7 do grupo P+L+ e aplicações 4 e 7 do grupo P+L- e P-L+, demonstraram ser estatisticamente semelhantes entre si, apresentando ausência de expressão gênica. A aplicação 1 do grupo P+L- e aplicação 1 do grupo P-L+ também foram estatisticamente semelhantes entre si, no entanto, possuindo valores intermediários de expressão gênica na análise. As aplicações 1, 4 e 7 do grupo P-L- apresentaram os maiores valores de expressão gênica da análise, sendo estas estatisticamente diferente das demais aplicações.

De acordo com as comparações realizadas dentro de cada grupo experimental, as aplicações do grupo P+L+ se comportaram estatisticamente semelhantes entre si. Nos grupos P+L- e P-L+, a aplicação 1 demonstrou ser estatisticamente diferente das aplicações 4 e 7, com os maiores valores de expressão dentro da comparação. Por outro lado, no grupo P-L- foi observado semelhança estatística entre as aplicações 1, 4 e 7.

Figura 64- Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da expressão do gene ERG11 em cada grupo experimental do biofilme de *C. albicans* cultivados em fluconazol após primeira (Apl 1- amarelo), quarta (Apl 4- rosa) e sétima (Apl 7- verde) aplicação de de aPDT mediada por PDZ (P+L+), controle do FS (P+L-), controle da luz (P-L+), controle do experimento (P-L-).



Apl- ciclo de aplicação. Letra maiúsculas distintas entre as colunas denotam diferença estatística entre as aplicações (Apl 1, Apl 4 e Apl 7). Letra minúsculas distintas denotam diferença estatística entre colunas dentro de cada grupo experimental (P+L+, P+L-, P-L+ e P-L- Grupos); de acordo com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=8$).

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise da viabilidade de células de *C. albicans*

6.2 aPDT mediada por PDZ e CUR

Questionamentos quanto a possível capacidade de um microrganismo desenvolver resistência antimicrobiana mediada pela terapia fotodinâmica (aPDT) vêm incentivando novas investigações^{24,81,56,105}. A aplicação repetida de um tratamento antimicrobiano em baixas concentrações (sub-letais) pode tornar uma população microbiana resistente, ou no mínimo, tolerante²⁵. A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ocasionadas por aplicações sub-letais de aPDT pode não ser suficiente para promover a inativação de um microrganismo, no entanto, o acúmulo de ERO na célula pode provocar alterações mutacionais responsáveis por selecionar as cepas menos suscetíveis ou mais resistentes que sobreviveriam ao tratamento²⁶. Na literatura pertinente, até o presente momento não há relatos de trabalhos que avaliaram resistência antimicrobiana de *C. albicans* frente aPDT mediada pelos fotossensibilizadores Photodithazine e Curcumina.

Na metodologia baseada na recuperação e recultivo de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a aPDT mediada por PDZ foi observado 91,04 % de redução na viabilidade entre o primeiro (Apl 1) e último tratamento (Apl 3), o equivalente a 5,1 log₁₀, comparado ao grupo controle do experimento (P-L-). Em relação a metodologia baseada nas aplicações sucessivas de aPDT, os resultados demonstraram que houve uma diminuição 64,2 % entre a primeira (Apl 1) e terceira aplicação (Apl 3), e a partir da quarta aplicação (Apl 4) não foi observado presença de colônias viáveis. A análise de viabilidade das células de *C. albicans* submetidas à repetidos ciclos de aPDT mediada por CUR foi realizada somente na metodologia de aplicações sucessivas de aPDT. Os resultados demonstraram que após a quarta aplicação de aPDT em culturas planctônicas de *C. albicans* plaqueadas em ausência de fluconazol foi observado ausência de viabilidade (-100%). A redução entre a primeira (Ap 1) e terceira aplicação (Apl 3) foi de 59,8%. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os resultados de Giuliani et al²⁴ que observaram 3 log₁₀ de redução em *C. albicans* com eficácia de morte equivalente 99,9% após 20 ciclos de aPDT mediada por um derivado de ftalocianina (1,3 µg/ml) associado a luz LED (30 J/cm²). Entretanto, a principal

limitação deste trabalho é que os autores não determinaram a viabilidade do microrganismo entre as aplicações do tratamento e avaliaram o desenvolvimento de resistência somente analisando a concentração inibitória mínima (CIM) a cada 5 ciclos. Além disso, outra diferença entre os estudos são os tipos dos fotossensibilizadores avaliados, que apresentam mecanismos de ação distintos. O RLP068/CI é um fotossensibilizador catiônico de baixo peso molecular que se adere a parede e membranas celulares, a clorina e6 necessita penetrar na célula e acumular metabólitos para ser excitada pela fonte de luz⁶⁹, enquanto que a CUR pode se ligar às células durante o tempo de pré-irradiação¹⁰. A redução da viabilidade de culturas planctônicas de *C. albicans* frente a PDT mediada por PDZ após uma única aplicação foi relatada por Dovigo et al.⁷. Esses autores testaram diferentes doses de Luz LED (18, 25,5 e 37,5 J/cm²) associada a crescentes concentrações de PDZ (25, 50 e 75 µg/ml) e constataram que a aplicação de 50 e 75 µg/mL de PDZ associado a 37,5 J/cm² resultou na inativação completa de isolados clínicos de *C. albicans*. Os resultados de Dovigo et al.⁷ apontaram que a dose sub-letal (25 µg/mL de PDZ associada a 18 J/cm²) reduziu a viabilidade de *C. albicans* em aproximadamente 1,6 log₁₀, valor próximo ao encontrado no presente estudo após o primeiro ciclo de aPDT mediada por PDZ (1,4 log₁₀ e 1,9 log₁₀, respectivamente). Estudos anteriores já relataram completa inativação de culturas planctônicas de *C. albicans* submetidas a um único ciclo de aPDT associada a CUR (20 µm) e luz LED azul (37,5 J/cm²– 455 nm)¹⁰. Sendo assim, a aPDT mediada por PDZ e CUR, quando aplicada em dose sub-letal, não foi capaz de desenvolver resistência em suspensões de *C. albicans*. A redução expressiva da viabilidade entre a primeira e terceira aplicação confirma tal hipótese.

Na metodologia baseada na recuperação e recultivo de culturas planctônicas submetidas a aPDT mediada por PDZ que foram plaqueadas em meio ágar com suplementação do antifúngico fluconazol, foi constatado completa inativação do fungo após o terceiro ciclo de aPDT (Apl 3). Os resultados da metodologia baseada nas aplicações sucessivas de aPDT mediada por PDZ e CUR demonstraram diminuição de 100% da viabilidade entre a primeira (Apl 1) e terceira aplicação (Apl 3), ou seja, a partir da terceira aplicação também não foi observado a presença de células viáveis. Esses resultados demonstram que o fluconazol potencializou o efeito de aPDT em suspensões de *C. albicans* foram plaqueadas em presença do antifúngico. Clinicamente, ocorre absorção do fluconazol por via gastrointestinal, conferindo a esse fármaco elevadas concentrações na saliva e plasma em até 2 horas após a ingestão¹⁰⁵. Os derivados

azólicos possuem como alvo a enzima lanosterol 14a-desmetilase (CYP-51), codificado pelo gene ERG 11^{106,107}. A inibição dessa enzima propicia o acúmulo de precursores de esterol na membrana do fungo, alterando e fragilizando essa estrutura¹⁰⁷. Esse antifúngico atua sobre *C. albicans* promovendo desde alterações topográficas de tubos germinativos¹⁰⁷, até as possíveis alterações metabólicas frente a adaptação ao estresse oxidativo¹⁰⁸. Snell et al.²⁷ avaliaram a viabilidade de culturas planctônicas de *C. albicans* (SC 5314) após aPDT mediada por azul de metileno (7,2 J/cm² -100 µg/ml) em combinação com fluconazol a 25 µg/mL e constataram que o tratamento não aumentou a inativação de *C. albicans*, como também, não resultou em inibição transitória do crescimento. Esses resultados não corroboram com os observados no presente estudo, no qual foi observado potencialização de aPDT quando o fungo foi plaqueado em meio suplementado com o antifúngico fluconazol. Essa divergência pode ser justificada pela forma de aplicação do antifúngico. Snell et al.²⁷ realizaram o tratamento das amostras com 25 µg/ml fluconazol 2h antes da aplicação de aPDT, e, no presente estudo, *C. albicans* foi submetida a aPDT e, então, cultivada em meio ágar contendo 8 µg/mL de fluconazol por 48 h. Além disso, diferentes FSs e cepas foram testadas, o que dificulta uma comparação direta dos resultados. Davies et al.¹⁰⁹ observaram 40% de redução do metabolismo de *C. albicans* após a aPDT mediada por uma porfirina (TMP-1363) combinada com o antifúngico miconazol (25 µg/mL). Segundo os autores, o antifúngico aumenta a sensibilidade da *C. albicans* a aPDT. Na literatura pertinente, há uma gama de informações em relação ao uso isolado do fluconazol sobre *C. albicans*, no entanto, o presente estudo se torna o pioneiro na combinação com aPDT mediada por PDZ no contexto da mimetização de um ambiente sistemicamente suplementado com antifúngico.

Os resultados do presente estudo também demonstraram que na metodologia baseada na recuperação e re-cultivo, entre o primeiro (Apl 1) e quinto ciclo (Apl 5), a aPDT mediada por PDZ promoveu redução equivalente a 4,5 log₁₀ na viabilidade dos biofilmes de *C. albicans* que foram plaqueados em ágar com ausência de fluconazol. Em relação a metodologia baseada nas aplicações sucessivas, em associação com PDZ, foi constatado uma redução de 6,2 log₁₀ após dez aplicações. Esses resultados comprovam que o biofilme de *C. albicans* é mais tolerante a aPDT quando comparado a culturas planctônicas^{7,9}. Embora o mecanismo de polimorfismo de *C. albicans* seja considerado essencial para sua sobrevivência¹⁰⁹, esse fungo em sua forma livre não possui uma organização tridimensional e estruturada quando comparado ao biofilme¹¹⁰.

Dessa forma, os achados do presente estudo confirmam que a presença de uma matriz extracelular polimérica (MEC) em biofilme de *C. albicans* fornece proteção adicional para as células e dificulta a inativação das mesmas⁹². No biofilme, o microrganismo ocupa menos de 10% do seu peso seco, enquanto os outros componentes representam 90% da sua MEC¹¹¹. Estudos demonstram que a resistência conferida aos antifúngicos convencionais tem sido relacionada a dificuldade de penetração do composto nas multicamadas do biofilme¹¹², dessa forma, com base nos resultados obtidos no presente estudo, podemos sugerir que processo semelhante pode ocorrer com o FS no momento da aplicação do composto no biofilme. Quishida et al.¹¹³ submetem biofilmes mistos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *Streptococcus mutans* formados em corpos de prova de resina acrílica a três aplicações sucessivas de aPDT mediada pelo PDZ (175 e 200 mg/L) e Luz LED (37,5 J/cm²) e não relataram redução da viabilidade de *C. albicans* após os ciclos de aPDT. Esse fato pode ser atribuído a relação de simbiose existente entre esses três microrganismos. A presença do *S. mutans* no biofilme multiespécie contendo *C. albicans* e *C. glabrata* pode favorecer o crescimento dessas duas espécies de fungos, estimulando a coagregação mútua destes microrganismos e dificultando ainda mais sua inativação⁹². Além disso, o desenvolvimento de um biofilme multiespécie pode ser capaz de aumentar a produção de substâncias poliméricas (EPS) excretadas para o meio extracelular⁴⁸.

A redução na viabilidade encontrada na metodologia baseada na recuperação e re-cultivo entre a primeira e quinta aplicação de aPDT mediada por PDZ em biofilmes plaqueados em *ágar* suplementado com fluconazol foi equivalente a 5,5 log₁₀. Na metodologia baseada em aplicações sucessivas de aPDT, foi observado redução de 6 log₁₀ entre a primeira (Apl 1) e sétima aplicação (Apl 7), e a partir da oitava aplicação (Apl 8) não foi observado presença de colônias viáveis. Considerando que os padrões de inativação não foram modificados, podemos sugerir que a presença do antifúngico é capaz de potencializar a aPDT independente do modelo testado.

Os resultados demonstraram que a viabilidade de biofilmes de *C. albicans* submetidos à sucessivas aplicações de aPDT mediada por CUR possuiu um comportamento oposto ao observado com PDZ, uma vez que foi notado aumento na viabilidade de *C. albicans* de após a terceira aplicação (1,39 log₁₀) quando comparado ao controle, além disso, após a sexta aplicação foi observado um comportamento homogêneo e sem aumento de viabilidade até a décima aplicação, que pode estar relacionado à capacidade de adaptação do biofilme à terapia. Comportamento

semelhante foi observado quando o fungo foi plaqueado em ágar suplementado com fluconazol com aumento de viabilidade de $1,38 \log_{10}$. No entanto, para afirmar que a aPDT mediada por CUR promoveu resistência em biofilmes de *C. albicans*, testes complementares (ex: sequenciamento genético; desorganização dos EPS) precisam ser realizados, a fim de investigar se a resistência desse microrganismo foi proveniente do modelo de biofilme, ou, da célula do fungo.

Os conceitos e estratégias usadas para distinguir os termos resistência, tolerância e persistência à antibióticos em cepas bacterianas foram discutidos por Brauner et al.⁷⁹. Segundo os autores, a resistência é a capacidade herdada de um microrganismo crescer em altas concentrações do antibiótico; tolerância é a capacidade herdada (ou não) de um microrganismo sobreviver a exposição transitória de antibiótico, independente da duração do tratamento, sem alterar o CIM; e, persistência, foi definida como a capacidade de uma sub-população clonal sobreviver a altas concentrações de antibióticos. Considerando que essas definições podem ser utilizadas na classificação de cepas bacterianas frente a antibióticoterapias, até o presente momento, não há relatos na literatura da existência de um “*break point*” que possa classificar os microrganismos frente doses sucessivas de aPDT, dessa forma, espera-se que esse estudo possa contribuir para esse entendimento.

Os resultados também demonstraram que a aplicação isolada da luz LED vermelha (P-L+) na metodologia baseada na recuperação e re-cultivo promoveu redução na viabilidade de culturas planctônicas ($3,4 \log_{10}$) e biofilmes ($2,5 \log_{10}$) de *C. albicans*. Quando submetido a sucessivas aplicações de luz LED vermelha, a redução de viabilidade após a décima aplicação (Apl 10) de luz LED vermelha foi de $2,8 \log_{10}$ em culturas planctônicas e $1,7 \log_{10}$ em biofilmes. A literatura relata que a luz LED 600 nm também pode ser eficaz na inativação de microrganismos^{80,114}. Sucessivas aplicações de luz LED azul também promoveram diminuição na viabilidade de $1 \log_{10}$ em culturas planctônicas e $0,79 \log_{10}$ em biofilmes de *C. albicans*. Amin et al.¹¹⁴ investigaram o potencial de *P. aeruginosa* no desenvolvimento de tolerância frente luz LED azul a 48 J/cm^2 após 10 ciclos sub-letais e concluíram que este microrganismo não foi capaz de desenvolver tolerância à exposição de luz, resultando em redução na viabilidade de $3,54 \log_{10}$ após o décimo ciclo. Semelhante a estes resultados, Zhang et al.¹¹⁵ submeteram isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* multirresistente a 10 ciclos de doses sub-letais de luz azul ($450\text{nm}-14,6 \text{ mW/cm}^2$) e não observaram desenvolvimento de resistência após as aplicações. Na literatura pertinente, há uma

limitação de trabalhos que analisaram o desenvolvimento de resistência de microrganismos frente sucessivos ciclos fototerápicos. Embora, no presente estudo, também tenha sido observado diminuição de viabilidade do microrganismo após ciclos de exposição da luz, as condições utilizadas por Amin et al.¹¹⁴ e Zhang et al.¹¹⁵ são distintas, o que dificulta a comparação dos resultados.

Na metodologia baseada na recuperação e re-cultivo, em ambas abordagens de biofilme (com e sem suplementação de fluconazol), foi observado redução na viabilidade de todos os grupos controles utilizados (P+L-, P-L+ e P-L-). Esses resultados podem ser atribuídos ao fato da mesma célula ser recuperada e re-cultivada entre os intervalos dos ciclos^{116,117}. Esse achado não inviabiliza a efetividade do grupo tratamento, tendo em vista que foi encontrado expressiva redução entre a primeira e quinta aplicação de aPDT.

A metodologia baseada em aplicações sucessivas de aPDT foi realizada a fim de observar como a viabilidade de *C. albicans* poderia ser afetada após aplicações consecutivas da terapia, eliminando a fase de recuperação das colônias armazenadas a -80° C. Curiosamente, uma das informações mais relevantes quanto a distinção destas metodologias é referente ao comportamento do grupo controle do experimento (P-L-), uma vez que na metodologia baseada nas aplicações sucessivas foi observado ausência de diferença estatística entre as 10 aplicações realizadas. Diante disso, como mencionado anteriormente, é possível sugerir que o congelamento das amostras entre os ciclos de aPDT pode também interferir na viabilidade dos biofilmes de *C. albicans*^{116,117}. Essa hipótese pode ser justificada quando comparamos o grupo aPDT das duas metodologias, uma vez que, na metodologia baseada na recuperação e recultivo foram necessários 5 aplicações de aPDT para que o número de colônias diminuíssem ao ponto de não permitir recuperação, enquanto que na metodologia da aplicação sucessiva, foram necessárias 7 aplicações para que a viabilidade reduzisse ao ponto de não ser observado a presença de colônias viáveis.

Nas condições avaliadas no presente estudo, não foi observado desenvolvimento de resistência de *C. albicans* à aPDT mediada por PDZ, em ambas metodologias, os biofilmes foram mais tolerantes que as culturas planctônicas, suportando mais aplicações. Provavelmente, essa maior tolerância observada pode ser atribuída a presença da MEC, que fornece uma proteção adicional ao biofilme^{37,41,92} e dificulta a penetração do FS⁶⁹. Em relação a aPDT mediada por CUR, foi observado completa erradicação de culturas planctônicas de *C. albicans* após sucessivas

aplicações, no entanto, houve uma dificuldade em eliminar esse fungo no modelo de biofilme, sugerindo maior tolerância do biofilme.

6.3 Quantificação de ERO após aPDT

6.3.1 aPDT mediada por PDZ

A terapia Fotodinâmica (TFD) é considerada um tratamento minimamente invasivo para controle de infecção, sendo mediada pelo estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio, que são responsáveis pela inativação da célula alvo¹¹⁸. A metodologia utilizada para mensurar ERO gerado durante a aplicação da aPDT em *C. albicans* já foi descrito anteriormente na literatura⁹⁵, e consiste na utilização da sonda fluorocromo H2DCF-DA, que é capaz de penetrar nas membranas biológicas da célula e ser hidrolisado ao ânion carboxilato de DCFH. Então, a oxidação de dois elétrons do DCFH resulta na formação de um produto fluorescente, denominada diclorofluoresceína (DCF), que pode ser monitorado pela intensidade de fluorescência captada¹¹⁹.

Após primeira aplicação de aPDT mediada por PDZ em culturas planctônicas de *C. albicans*, os resultados demonstraram que o grupo submetido à aPDT foi estatisticamente diferente do grupo controle negativo (CN), com um aumento de 430% na produção de ERO. Após a terceira aplicação, o grupo P+L+ também se comportou estatisticamente diferente do CN com um aumento de 683%, demonstrando potencialização na produção de ERO. Foi observado que o ERO produzido durante a excitação da clorina e6 é de origem intracelular, uma vez que esse FS penetra na célula e acumula metabólitos ao ser excitado pela fonte de luz²⁰. Dessa forma, provavelmente, o aumento de ERO observado após a terceira aplicação de aPDT ocorreu devido ao acúmulo de metabólitos intracelulares que acentuou o estresse oxidativo sofrido pela célula do fungo.

As culturas planctônicas de *C. albicans* que foram submetidas a luz LED (P-L+) referente às aplicações 1 e 3 apresentaram valores intermediários de produção de ERO, estatisticamente diferentes do grupo aPDT (P+L+) e controle do experimento (P-L-). A literatura relata que a luz LED pode promover fotoexcitação de porfirinas endógenas e desencadear um processo de estresse oxidativo no microrganismo¹²⁰. Além disso, o presente estudo demonstrou redução na viabilidade (4,5 log₁₀) de culturas

planctônicas de *C. albicans* após sucessivos ciclos de luz LED vermelha, demonstrando que a fototerapia também pode atuar na inativação de microrganismos^{80,105}. Em estudo anterior foi constatado que pulsações contínuas de luz UV com fluência de 7,2 J/cm² (intervalo de 45 seg) reduziram 7,8 log₁₀ de *C. albicans* e promoveu superprodução de ERO nas células¹²¹. A literatura relata que através da formação de radicais livres, a luz UV pode causar modificações de proteínas e peroxidação lipídica¹²². Além disso, a penetração da luz UV nos microrganismos está limitada à distância entre a luz e o DNA exposto¹²³. Considerando que as condições de utilização, ativação e propagação da luz UV são distintas às da luz LED^{122,123}, comparação diretas entre os estudos não podem ser realizadas.

As células de levedura são aeróbicas e sobre condições fisiológicas normais produzem ERO intracelular no processo de respiração mitocondrial¹²⁴. Essas espécies reativas geradas pelas mitocôndrias, são reduzidos por enzimas protetoras, como *superóxido dimutase* e *catalase*¹²⁵. Diante disso, a presença de fluorescência nos grupos P+L-, P-L- e CN pode ser atribuído a mecanismos estruturais de sobrevivência celular¹²⁴, tendo em vista que uma situação fisiológica como despolarização mitocondrial da membrana pode resultar no acúmulo de ERO no citoplasma, o que pode transmitir determinada quantidade de estresse oxidativo para a célula.

Em relação ao primeiro ciclo (Apl 1) de aPDT mediada por PDZ em biofilmes de *C. albicans*, os resultados demonstraram que o grupo P+L+ foi estatisticamente diferente dos demais grupos experimentais, com um aumento equivalente a 740% na produção de ERO em relação ao controle do experimento (CN). Após a sétima aplicação (Apl 7), foi observado um aumento de 870% em relação ao controle, demonstrando assim uma potencialização na produção de ERO em relação a aplicação 1. Além disso, os resultados demonstraram que, independente do número de aplicações, o grupo P+L+ apresentou os maiores valores de média de produção de ERO comparado ao grupo H₂O₂. Os biofilmes são comunidades complexas de microrganismos aderidos a uma superfície e envolvidos por uma MEC³⁶. Estudos anteriores demonstraram que a presença da MEC pode dificultar a penetração do FS limitando a ação da aPDT em biofilme de *C. albicans*¹²⁷. Considerando que a terapia fotodinâmica é uma terapia de múltiplos alvos, as espécies reativas de oxigênio produzidas na aplicação de aPDT pode atuar tanto na matriz do biofilme (EPS), como na superfície celular (proteínas e DNA)¹²⁸. Diante disso, a elevada produção de ERO em biofilmes pode estar relacionado a complexidade desse modelo, que possui um

maior número de alvos celulares, já que sobre as mesmas condições em culturas planctônicas foi observado médias inferiores. Além disso, também é possível observar que o número de aplicações de aPDT mediada por PDZ influenciou na redução da viabilidade dos biofilmes *C. albicans* o que pode ser atribuído ao estresse oxidativo originado pelas aplicações sucessivas de aPDT (Apl 7). Dessa forma, podemos sugerir que o aumento da produção de ERO está relacionado a diminuição da viabilidade de *C. albicans* frente aPDT.

6.3.2 aPDT mediada por Curcumina

Na primeira aplicação (Apl 1) de aPDT mediada por CUR em culturas planctônicas de *C. albicans*, os resultados demonstraram que o grupo submetido à aPDT (C+L+) se comportou estatisticamente diferente ao grupo controle negativo (CN), com aumento de 381%. Após a terceira aplicação (Apl 3), foi observado aumento de 667%, demonstrando uma potencialização na produção de ERO quando comparado a Apl 1. Esses resultados corroboram com estudo de Carmello et al.⁹⁵ em que foi observado aproximadamente 400% de aumento da ERO em culturas planctônicas de *C. albicans* após uma única aplicação de aPDT mediada por Curcumina (2.5 μ M) associado a luz LED azul (455 nm – 37,5 J/cm²). No entanto, considerando que as ERO são produzidas onde o FS se localiza, não podemos afirmar que essas espécies geradas na terapia mediada por CUR são de origem intracelular, pois não há evidências se a curcumina age na superfície da membrana, ou no interior da célula¹⁰.

Os resultados demonstraram que as culturas planctônicas de *C. albicans* que foram submetidas as aplicações 1 e 3 de luz LED azul (455 nm) se comportaram estatisticamente diferentes do CN, com aumento de ERO de 430% e 670%, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com Carmello et al.⁹⁵ que também constataram que a intensidade de fluorescência do grupo submetido a uma única aplicação de luz LED azul (455 nm- 37,5 J/cm²) foi mais acentuada que no grupo submetido a aPDT. Estes autores também observaram que a luz por si só gerou caudas de cometa significativamente mais longas, uma indicação de dano ao DNA de *C. albicans* quando comparado ao controle negativo. Tem sido relatado que os microrganismos são capazes de detectar a luz azul e produzir respostas fisiológicas causadas pelos receptores dessa luz, de forma que a excitação de cromóforos dessa luz dentro das mitocôndrias possa ser capaz de induzir a produção de ROS¹²⁹. Além

disso, estudos já relataram que o comprimento de onda utilizado no presente estudo pode causar estresse oxidativo, que está associado a sensibilização de porfirinas intracelulares responsáveis por promover a transferência de energia para o oxigênio ¹²⁰.

Em relação ao primeiro ciclo de aPDT (Apl 1) mediada por CUR em biofilmes de *C. albicans*, os resultados demonstraram que o grupo C+L+ foi estatisticamente diferente dos demais grupos experimentais, com um aumento de 220% em relação ao controle negativo do experimento (CN). Após a décima aplicação (Apl 10), o grupo submetido a aPDT novamente se comportou estatisticamente diferente dos demais tratamentos, no entanto, o aumento em relação a CN foi 80% (com a porcentagem de diferença entre os grupos inferior a aplicação 1). Esses resultados demonstram que houve redução na produção de ERO do grupo C+L+ conforme foram realizadas as aplicações (Apl 1: 0,281 e Apl 10: 0,184 U.A). Por outro lado, no presente estudo, foi observado um aumento gradativo na viabilidade dos biofilmes de *C. albicans* após sucessivas aplicações de aPDT mediada pela CUR associada a luz LED azul. Nesse contexto, podemos sugerir que as sucessivas aplicações de aPDT mediada por CUR não produziram ERO suficientes para reduzir a viabilidade deste microrganismo considerando que foi observado aumento exponencial na viabilidade das células.

6.4 Expressão gênica após ciclos de aPDT mediada por PDZ (Apl 1; Apl 4; Apl 7)

Dentre as muitas técnicas existentes para identificar os principais fatores de virulência responsáveis pelo desenvolvimento de uma infecção no hospedeiro, o teste biomolecular denominado de RT-qPCR tem sido bastante utilizado devido a sua eficácia e fidelidade¹³⁰. Este teste não apenas demonstra a qualidade de um determinado gene frente à um tratamento, mas apresenta quantitativamente quanto esse tratamento é capaz de alterar a sua expressão¹³¹. No presente estudo foi avaliado a relação entre os genes associados a síntese do ergosterol e estresse oxidativo com objetivo de investigar o perfil biomolecular das células de *C. albicans* que sobreviveram às sucessivas aplicações de aPDT mediada por PDZ associada a luz LED vermelha.

O gene SOD1 demonstrou ter sua expressão significativamente induzida na aplicação 7 do grupo aPDT (P+L+), com os maiores valores de expressão gênica da análise. A super expressão da aplicação 7 em relação à aplicação 1 foi equivalente a

96% (1,50E+07 Cópia/mL). Esses resultados estão de acordo com estudos que relatam que altos níveis de SOD1 são responsáveis por proteger a células de *C. albicans* frente aos radicais livres ocasionados pelo estresse oxidativo¹³². Um estudo anterior¹⁰¹ avaliou o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) mediada por PDZ (200 mg/L) associada a luz LED vermelha (50 J/cm²) na expressão de gene SOD1 em cepas de *Candida albicans* resistente a fluconazol (ATCC 96901) presente nas línguas dos camundongos submetidos a cinco tratamentos tópicos consecutivos. Semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, esses autores também relataram aumento da expressão deste gene (+ 1,920 cópias/mL) após às terapias. O SOD1 compõe uma classe de genes (SOD's) que atuam em um processo de desintoxicação celular¹³³, o que pode justificar o aumento da expressão deste gene na aplicação 7, uma vez que nesta aplicação as células de *C. albicans* sofreram um processo sucessivo de acúmulo de ERO intracelular²⁶ proveniente dos ciclos realizados. Esses resultados são condizentes com a análise de quantificação de ERO realizada no presente estudo em que foi constatado que sete aplicações sucessivas de aPDT estimulam a produção de espécies reativas.

Em relação aos biofilmes de *C. albicans* que foram cultivados na presença do antifúngico fluconazol, foi possível observar uma diminuição da expressão do gene SOD1 quando comparados aos biofilmes que não foram cultivados em fluconazol (10⁵ á 10²). Os resultados demonstraram que, diferente do que foi relatado na análise anterior, as aplicações 1, 4 e 7 se comportaram estatisticamente semelhantes entre si, possuindo as maiores médias da análise. Dessa forma, a presença do fluconazol parece não ter sido capaz de interferir no efeito dentro do grupo P+L+, no entanto, promoveu diferença na comparação do grupo P+L+ com as demais aplicações dos grupos experimentais presente na análise (P+L-, P-L+ e P-L-).

Os resultados demonstraram que o gene CAP1 teve sua expressão reduzida pelas aplicações de aPDT (P+L+), apresentando as menores médias de expressão da análise e sendo estatisticamente diferente dos demais grupos. Esses resultados corroboram com os obtidos em estudo prévio¹³⁴ em que foi observado redução na expressão do gene CAP1 após uma única aplicação de aPDT mediada por PDZ (100 e 200 mg/L) e LED vermelho (37,5 J/cm² ou 50 J/cm²). Em outro estudo in vivo, esses mesmos autores relataram que aPDT mediada por luz LED vermelha associada a PDZ promoveu redução na expressão do gene CAP1 (diferença de aproximadamente 0,33) em cepas resistentes (96901) de *C. albicans* recuperadas de camundongos¹⁰¹. A

literatura relata que CAP1 é um fator de transcrição e atua em resposta ao estresse oxidativo¹³⁵. Dessa forma, a redução da expressão do gene CAP1 no grupo submetido à aPDT pode sugerir que o tratamento tornou *C. albicans* mais vulnerável aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Também foi observado que não houve diferença entre as aplicações dentro do grupo experimental P+L+. Considerando que o CAP1 está diretamente relacionado à virulência fúngica⁹⁶, é possível sugerir que, a aPDT, independentemente do número de aplicações, reduziu a virulência do fungo.

Em relação aos biofilmes de *C. albicans* que foram cultivados na presença do fluconazol, não foi observada expressão do gene CAP1 após sete aplicações de aPDT (grupo P+L+), sendo esta diferente das demais aplicações (1 e 4). Ao observar as análises de expressão do gene CAP1 sem e com o fluconazol, é possível notar que em todos os grupos experimentais a expressão gênica na aplicação 7 foi significativamente reduzida, como também, diferente das demais aplicações. Nesse contexto, podemos sugerir que a presença do fluconazol pode acentuar a vulnerabilidade dos mecanismos de defesa deste fungo após sete aplicações sucessivas de aPDT, provavelmente fragilizando ainda mais as células.

Os resultados demonstraram que nos biofilmes de *C. albicans* cultivados na ausência do fluconazol as aplicações de aPDT reduziram gradativamente a expressão do gene ERG11, de forma que, após a aplicação 7 não foi observada expressão. Esses resultados estão de acordo com Jordão et al.¹⁰¹, que também relataram diminuição da expressão do gene ERG11 (-0,92 cópias/mL) após cinco aplicações de aPDT mediada por luz LED em cepas resistentes ao fluconazol. O gene ERG11 está intimamente relacionado na biossíntese do ergosterol da membrana fúngica¹⁰⁶ e também desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das hifas e virulência em *C. albicans*¹³⁶. Além disso, os biofilmes de *C. albicans* submetidos à aPDT apresentaram as menores médias de expressão da análise, sugerindo diminuição gradativa da produção de ergosterol disponibilizado na membrana¹³⁷. A redução de um componente estrutural como o ergosterol torna a membrana de uma célula eucariótica permeável para entrada de substâncias, tornando as células vulneráveis às terapias¹³⁸.

Em relação aos biofilmes que foram submetidos a aPDT e plaqueados na presença de fluconazol, foi observada ausência de expressão do gene ERG11 em todas as aplicações (1, 4 e 7). Esse resultado é importante para a compreensão do papel do antifúngico fluconazol no protocolo realizado. A enzima C-14 α -lanosterol-demethylase, secretada pelo ERG11, é o alvo de ligação dos antifúngicos azólicos¹³⁹.

Esta ligação promove a inibição da via biossintética do ergosterol, o que resulta em um acúmulo de intermediários tóxicos de esteróis, podendo alterar a estabilidade da membrana e impedir o crescimento do fungo^{139,140}. A literatura também relata que a alteração da expressão do gene ERG11 em leveduras pode ser considerado um dos mecanismos de resposta à resistência azólica¹⁴¹. Diante disso, a presença do fluconazol após aPDT pode ter sido capaz de interferir na biossíntese do ergosterol, fragilizando as células que já se encontravam comprometidas pela aPDT, resultando em ausência de expressão do gene ERG11. Nesse contexto, os resultados demonstraram que o fluconazol potencializou os tratamentos de aPDT.

De forma geral, foi observado nas análises relacionadas aos genes SOD1, CAP1 e ERG11, que os biofilmes de *C. albicans* submetidos à luz LED (P-L+) também apresentaram redução na expressão destes genes. Em estudo anterior foi observado que sucessivos ciclos fototerápicos de doses sub-letais de luz LED não são capazes de promover resistência em microrganismos como *P. aureuginosa*¹¹⁴ e *Acinetobacter baumannii*¹¹⁵, no entanto, não foi investigado o perfil biomolecular das células sobreviventes a estes tratamentos. O estresse oxidativo causado pela luz LED em um comprimento de onda de 455 nm foi avaliado em estudos anteriores¹²⁰ e foi observado que a luz pode promover excitação das porforinas endógenas presentes no interior da célula e produzir ERO. De maneira semelhante aos genes CAP1 e SOD1; o ERG11 também está envolvido no mecanismo de adaptação ao estresse oxidativo,¹³⁶ de forma que é possível sugerir que a redução na expressão deste gene nos biofilmes submetidos a luz LED pode estar associada a mecanismos intracelulares de fotoexcitação.

7 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

1. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(3):283-8.
2. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res.* 1995; 74(5):1152-61.
3. Samaranayake LP. Host factors and oral candidosis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, editors. *Oral candidosis.* London: Butterworth; 1990. p. 66–103.
4. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(2):382-402.
5. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans Candida spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002; 50(4):243-6.
6. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of candida albicans to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(3):392–401.
7. Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of Candida using Photodithazine®. *Biofouling.* 2013; 29(9):1057-67.
8. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against Candida albicans. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; 14(7):1319-28.
9. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of Candida to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(9):927-34.
10. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, Bagnato VS, Kurachi C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against Candida albicans. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(4):895-903.
11. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, Pavarina AC. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of Candida albicans in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013; 51(3):243-51.
12. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras.* 1996; 42(3):229-36

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

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

25. McMahon MA, Tunney MM, Moore JE, Blair IS, Gilpin DF, McDowell DA. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Lett Appl Microbiol*. 2008; 47(4):263-8.
26. Hassan HM, Moody CS. Regulation of manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Anaerobic induction by nitrate. *J Biol Chem*. 1987 15;262(35):17173-7.
27. Snell SB, Foster TH, Haidaris CG. Miconazole induces fungistasis and increases killing of *Candida albicans* subjected to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2012; 88(3):596-603.
28. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5(2):125-57.
29. Matsubara VH, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2016;62(9):1143-53.
30. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo, et al. *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2):288–305.
31. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011; 10(9):1173-82.
32. Ruchel R. Proteinases of pathogenic fungi. *Mycoses* 1999; 42:48–52.
33. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schäfer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol*. 2000; 174(5):362-74.
34. Dantas Ada S, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*. 2015; 5(1):142-65.
35. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11:382-402.
36. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*. 2010; 89(3):205-18.
37. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal super glue: The biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathog*. 2016; 12(9):1.
38. Jackson KD, Starkey M, Kremer S, Parsek MR, Wozniak DJ. Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J Bacteriol*. 2004; 186:4466–75.

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

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

64. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2(2):73-85.
65. Hampe IAI, Friedman J, Edgerton M, Morschhäuser J. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. *PLoS Pathog*. 2017; 13(9):e1006655.
66. Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A, et al. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*. 2006; 172(4):2139-56.
67. Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, BlaB-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2007; 3(11):e164.
68. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(6):2329-35.
69. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008; 163:19-2.
70. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 2001; 57:9513-47.
71. Ferreira J, Menezes PFC, Kurachi C, Sibata C, Allison RR, Bagnato VS. Photostability of different chlorine photosensitizers. *Laser Phys Lett*. 2008; 5:156-61.
72. De Simone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Phys Ther*. 1999; 79:839-46.
73. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P et al. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin (e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1402-10.
74. Carmello JC, Alves F, G Basso F, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG, et al. Treatment of Oral Candidiasis Using Photodithazine®-Mediated Photodynamic Therapy In Vivo. *PLoS One*. 2016; 11(6):e0156947.
75. Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci*. 2014; 116(1):1-7.

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

88. Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plésiat P, Pechère JC, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(5):1055-65.
89. Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photochem Photobiol.* 2010; 86(6):1343-9.
90. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontol.* 2010; 98(1):15-25.
91. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Oral Microbiol.* 2018; 10(1):1476644.
92. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2):167-93.
93. Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, Stavnsberg C, Jensen PØ, Tolker-Nielsen T, et al. The Inoculation Method Could Impact the Outcome of Microbiological Experiments. *Appl Environ Microbiol.* 2018; 14:85-95.
94. Carmello JC, Pavarina AC, Oliveira R, Johansson B. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2015; 15(4):fov018.
95. Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamon RD. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun.* 1998; 66(5): 1953–61.
96. Martchenko M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(2): 456–67.
97. Hwang CS, Rhie G, Oh J, Huh W, Yim H, Kang S. Copper- and zinc- containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology.* 2002; 148: 3705–13.
98. Wu Y, Wu M1, Wang Y, Chen Y, Gao J, Ying C. ERG11 couples oxidative stress adaptation, hyphal elongation and virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2018; 1-18(7).

99. Alonso GC, Pavarina AC, Sousa TV, Klein MI. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. *J Microbiol Methods*. 2018; 147:(1)1-13.
100. Jordão CC, Klein MI, Carmello JC, Dias LM, Pavarina AC. Gene expression of fluconazole-resistant *Candida albicans* submitted to in vivo treatments with photodynamic therapy and nystatin. *Front*. 2020 (accepted for publication).
101. Cury JA, Seils J, Koo H. Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms. *Braz Oral Res*. 2008; 22(3): 216-22.
102. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28830
103. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT- PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1(3): 1559–82.
104. Ebden P, Neill P, Farrow PR. Sputum levels of fluconazole in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33(6):963-4.
105. Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, et al. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(12):2708-17.
106. Ellepola AN, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *Candida albicans*. *J Oral Pathol Med*. 1998; 27(5):213-9.
107. Katragkou A, Alexander EL, Eoh H, Raheem SK, Roilides E, Walsh TJ. Effects of fluconazole on the metabolomic profile of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71(3):635-40.
108. Davies A, Gebremedhin S, Yee M, Padilla RJ, Duzgunes N, Konopka K, et al. Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole. *J Physiol Pharmacol*. 2016; 67(5):777-83.
109. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis: clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol*. 2011; 37(4):328-36.
110. Balzer M, Witt N, Flemming HC, Wingender J. Faecal indicator bacteria in river biofilms. *Water Sci Technol*. 2010; 61(5):1105-11.
111. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol*. 2018; 45:70-76.

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

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

137. Romano RA, Pratavieira S, Silva APD, Kurachi C, Guimarães FEG. Light driven photosensitizer uptake increases *Candida albicans* photodynamic inactivation. *J Biophotonics*. 2017; 10(11): 1538-46.
138. Asai K, Tsuchimori N, Okonogi K, Perfect JR, Gotoh O, Yoshida Y. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(5): 1163-9.
139. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Front Microbiol*. 2017; 7: 2173.
140. Silver PM, Oliver BG, White TC. Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Euk Cell*. 2004; 3(6):1391-7.

Não autorizo a publicação desse trabalho até 9 de abril de 2022

(Direitos autorais de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 9 de abril de 2020

Luana Mendonça Dias Santana