

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 03/06/2026.



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



Amanda Bellini

Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de *Candida albicans* em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana

Araraquara

2022



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



Amanda Bellini

Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de *Candida albicans* em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr)–Universidade Estadual Paulista (UNESP) para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

Araraquara

2022

B444i	Bellini, Amanda Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana / Amanda Bellini. -- Araraquara, 2022 83 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientadora: Ana Cláudia Pavarina 1. <i>Candida albicans</i>. 2. Biofilmes. 3. Matriz extracelular. 4. Fotoquimioterapia. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Amanda Bellini

Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de *Candida albicans* em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana

Comissão avaliadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – Universidade Estadual Paulista (UNESP) para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Reabilitação Oral.

Presidente e orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

2^a examinadora (titular): Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge

3^a examinadora (titular): Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena Dias Panariello

4^a examinadora (suplente): Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti

5^a examinadora (suplente): Prof^a. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 03 de junho de 2022.

DADOS CURRICULARES

Amanda Bellini

Nascimento: 14/07/1997 – Matão – São Paulo

Filiação: Claudia Cristina Chiozzini Bellini

Luis Paulo Ferreira Bellini

2015-2019: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – Universidade Estadual Paulista (UNESP).

2017/2018: Bolsista PIBIC no projeto intitulado “Influência de *Lactobacillus casei* na composição da matriz do biofilme de *Candida albicans* resistente a fluconazol”.

2018/2019: Bolsista PIBIC no projeto intitulado “Avaliação da composição da matriz extracelular do biofilme de *Lactobacillus rhamnosus* e *Candida albicans* resistente a fluconazol”.

2019/2019: Bolsista PIBIC no projeto intitulado “Pode a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana mediada por Curcumina desenvolver resistência em *Candida albicans*?”.

2020-2022: Pós-graduação em Odontologia, área de concentração em Reabilitação Oral, em andamento, curso de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – Universidade Estadual Paulista (UNESP).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Claudia e Luis Paulo**, que se esforçaram muito para que eu pudesse estar em Araraquara, superando a distância física, a saudade e sempre me dando apoio e incentivo para que mais esse sonho fosse realizado.

À minha irmã, **Rafaela**, meu maior orgulho e amor, por ser a pessoa que sempre esteve ao meu lado, sendo o meu alicerce, me dando forças e me divertindo nos momentos de maiores dificuldades.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Pavarina**, que me orienta desde 2017 e que confiou no meu potencial para realizar esse projeto que estará para sempre guardado na minha memória e no meu coração.

Às professoras das minhas bancas da pré-qualificação, qualificação e defesa, **Prof^a. Dr^a. Marlise, Prof^a. Dr^a. Josimere, Prof^a. Dr^a. Janaína, Prof^a. Dr^a. Beatriz, Prof^a. Dr^a. Fernanda e Prof^a. Dr^a. Karin** que foram muito atenciosas e fizeram comentários essenciais para a finalização desse trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, **Luana, Karine, Kallen, César, Ana Luiza, Tábata e Cláudia**, que me deram apoio e foram extremamente dedicados para finalização desse projeto.

Às minhas amigas de Araraquara, **Vitória, Mariely, Iolanda e Camyla**, que foram as minhas companheiras de jantares, caminhadas e que sempre ouviram os meus desabafos.

Aos meus amigos de Matão, **Lucas, Júlia, Giovanni, Marcos, Hugo, Marina, Maria Luiza e Juliana**, que entenderam a minha ausência e me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Aos meus amigos do LEO Clube, **Vitor, Felipe, Emanuely, João e Rodrigo**, que, mesmo com a distância física, conseguiram estar ao meu lado em momentos especiais da minha vida.

A todos os alunos da **Turma 92** que, durante o estágio docência, me acolheram de uma forma muito carinhosa e sempre tiveram paciência comigo, aceitando os meus erros e elogiando os meus acertos.

Aos usuários dos **Laboratórios de Microbiologia Aplicada e de Biologia Molecular** que sempre me trataram com carinho, empatia e estiveram disponíveis para me ajudar em momentos difíceis.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP** que me acolheu com 17 anos no ano de 2015 para uma jornada de 7 anos e meio que superou absolutamente todas as minhas expectativas.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 e 88887.513788/2020-00.

Agradeço ao **Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão** (CEPID-FAPESP-2013/07276-1) pelo apoio oferecido no desenvolvimento dessa pesquisa.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que participaram, ativamente ou não, da realização desse trabalho.

“Sagacidade além da medida é o maior tesouro do homem.”

Luna Lovegood citando Rowena Ravenclaw*

* Rowling J. K. Harry Potter e a Ordem da Fênix. Rio de Janeiro: Rocco; 2003.

Bellini A. Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de *Candida albicans* em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) promove a inativação de *Candida albicans* em suspensão, entretanto, a completa inativação do fungo em biofilmes ainda não foi observada. A tolerância de *C. albicans* em biofilme é multifatorial e tem sido associada a fatores como o efeito protetor da matriz extracelular (MEC) do biofilme que dificulta a penetração de antifúngicos e outros fármacos. Dessa forma, esse estudo avaliou a influência da MEC na susceptibilidade de *C. albicans* em biofilme à aPDT, mediada por Photoditazine® (PDZ) associado ao diodo emissor de luz (LED). Foram formados biofilmes de *C. albicans* (ATCC 90028). Após 48 horas, todos os biofilmes foram submetidos às seguintes condições de tratamento: I) aPDT [os biofilmes foram incubados por 20 minutos com PDZ (25 mg/L) e iluminados com LED (660 nm, 18 J/cm²); n=6]; II) DNase+aPDT [os biofilmes foram incubados por 5 minutos com DNase I (20 unidades/mL) e submetidos à aPDT; n=6]; III) sonicação+aPDT [os biofilmes foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) e submetidos à aPDT; n=6]; ou IV) DNase+sonicação+aPDT [os biofilmes foram incubados com DNase I, sonicados e submetidos à aPDT; n=6]. A seguir, nos biofilmes remanescentes foram realizadas dez aplicações sucessivas de aPDT. Os seguintes métodos foram utilizados para avaliar a eficácia das diferentes estratégias de tratamentos sobre os biofilmes: contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), quantificação do peso seco (total e insolúvel), das proteínas solúveis e insolúveis, análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP), polissacarídeos solúveis em álcali (ASP), DNA extracelular (eDNA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk, Levene e ANOVA two-way, com nível de significância de 5%. Os resultados de UFC foram avaliados após cada uma das aplicações e de componentes da MEC foram quantificados após as aplicações 1, 5 e 10. Os resultados demonstraram redução na viabilidade celular em todas as condições, a maior redução (5,7 log₁₀) foi observada na décima aplicação da condição I (aPDT). Não houve diferença significativa nos valores de peso seco total, peso seco insolúvel e ASP em nenhuma condição experimental. Foi observada redução dos valores de proteínas solúveis após quinta e décima aplicações (p<0,001) em todas as condições e dos valores de proteínas insolúveis somente após a primeira aplicação nas condições I e IV (p<0,001). Os valores de WSP e eDNA apresentados após os tratamentos foram significativamente menores quando comparados ao grupo controle (P-L-; p<0,001) em todas as condições experimentais. A MEV demonstrou aparecimento de deformidades nas paredes celulares e redução no número de células e aglomerados celulares. As estratégias avaliadas para desestruturação do biofilme não aumentaram a susceptibilidade de *C. albicans* à aPDT.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Biofilmes. Matriz extracelular. Fotoquimioterapia.

Bellini A. Influence of extracellular matrix on susceptibility of *Candida albicans* in biofilm after successive applications of antimicrobial photodynamic therapy [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) promotes the inactivation of *Candida albicans* in suspension, however, complete inactivation of fungus in biofilms has not yet been observed. The tolerance of *C. albicans* biofilms is multifactorial and has been associated with factors such as the protective effect of the extracellular matrix (ECM) of the biofilm, making it difficult for antifungals and other drugs to penetrate. Thus, this study evaluated the influence of ECM on the susceptibility of *C. albicans* biofilms to aPDT, mediated by Photoditazine® (PDZ) associated with light-emitting diode (LED). Biofilms of *C. albicans* strain (ATCC 90028) were formed. After 48 hours, biofilms were submitted to the following treatment conditions: I) aPDT [biofilms were incubated for 20 minutes with PDZ (25mg/L) and illuminated with LED (660 nm, 18 J/cm²; n=6]; II) DNase+aPDT [biofilms were incubated for 5 minutes with DNase I (20 units/mL) and submitted to aPDT; n=6]; III) sonication+aPDT [biofilms were sonicated for 30 seconds (7 W 170 to 190 J) and submitted to aPDT; n=6]; or IV) DNase+sonication+aPDT [biofilms were incubated with DNase I, sonicated and submitted to aPDT; n=6]. After, ten successive applications of aPDT were performed on the remaining biofilms. The following methods were used to evaluate the effectiveness of different strategies on biofilms: colony forming units count (CFU), quantification of dry weight (total and insoluble), soluble and insoluble proteins, analysis of water-soluble polysaccharides (WSP), alkali-soluble polysaccharides (ASP), extracellular DNA (eDNA) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The Shapiro-Wilk, Levene and two-way ANOVA tests were used, with significance level of 5%. CFU results were evaluated after each application and ECM components were quantified after applications 1, 5 and 10. The results showed cell viability reduction in all experimental conditions, the greatest reduction (5.7 log₁₀) was observed in tenth application of condition I (aPDT). There was no significant difference in the values of total dry weight, insoluble dry weight and ASP in any experimental condition. A reduction in values of soluble protein was observed after the fifth and tenth applications (p<0.001) in all conditions and in values of insoluble proteins only after the first application under conditions I and IV (p<0.001). The WSP and eDNA values presented after the treatments were significantly lower when compared to the control group (P-L-; p<0.001) in all experimental conditions. SEM showed the appearance of deformities in the cell walls and a reduction in the number of cells and cell slusters. The strategies evaluated for biofilm disruption did not increase the susceptibility of *C. albicans* to aPDT.

Keywords: *Candida albicans*. Biofilms. Extracellular matrix. Photochemotherapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO.....	15
2.1 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 <i>Candida albicans</i> e Biofilme.....	16
3.2 Resistência Antifúngica.....	17
3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	18
3.4 Desestruturação Química por meio da Utilização de Enzimas.....	21
3.5 Desestruturação Mecânica por meio de Sonicação.....	22
4 MATERIAL E MÉTODO.....	24
4.1 Material.....	24
4.1.1 Materiais de consumo.....	24
4.1.2 Instrumentais.....	25
4.1.3 Equipamentos.....	26
4.2 Método.....	26
4.2.1 Formação de biofilme de <i>Candida albicans</i>	26
4.2.2 Preparo do fotossensibilizador e parâmetros de irradiação.....	27
4.2.3 Preparo da enzima DNase I.....	28
4.2.4 Condições experimentais.....	28
4.2.4.1 <i>Condição I: os biofilmes foram submetidos à aPDT</i>	28
4.2.4.2 <i>Condição II: os biofilmes foram tratados com DNase e, a seguir, submetidos à aPDT</i>	29
4.2.4.3 <i>Condição III: os biofilmes foram submetidos a sonicação e, a seguir, submetidos à aPDT</i>	30
4.2.4.4 <i>Condição IV: os biofilmes foram tratados com DNase, seguida da sonicação e da aPDT</i>	31
4.2.5 Avaliação da eficácia dos tratamentos avaliados.....	32
4.2.5.1 <i>Contagem de unidades formadoras de colônias</i>	33
4.2.5.2 <i>Peso seco total</i>	34
4.2.5.3 <i>Quantificação de proteínas</i>	34
4.2.5.3.1 <i><u>Proteínas solúveis da matriz</u></i>	35
4.2.5.3.2 <i><u>Proteínas insolúveis do biofilme</u></i>	35
4.2.5.4 <i>Análise de polissacarídeos solúveis em água</i>	36
4.2.5.5 <i>Peso seco insolúvel</i>	36
4.2.5.6 <i>Análise de polissacarídeos solúveis em álcali</i>	37
4.2.5.7 <i>Análise de DNA extracelular</i>	38
4.2.5.8 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	39
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	40
5.1 Análise Estatística de Unidades Formadoras de Colônias.....	40
5.2 Análise Estatística da Caracterização do Biofilme.....	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 Unidades Formadoras de Colônias.....	41
6.2 Caracterização do Biofilme.....	46

6.2.1 Resultados da caracterização do biofilme após a primeira aplicação de aPDT.....	46
6.2.1.1 <i>Peso seco total (mg)</i>	46
6.2.1.2 <i>Peso seco insolúvel (mg)</i>	47
6.2.1.3 <i>Proteínas solúveis da matriz (μg)</i>	47
6.2.1.4 <i>Proteínas insolúveis do biofilme (μg)</i>	47
6.2.1.5 <i>WSP (μg)</i>	48
6.2.1.6 <i>ASP (μg)</i>	49
6.2.1.7 <i>eDNA (ng)</i>	49
6.2.2 Resultados da caracterização do biofilme após a quinta aplicação de aPDT.....	52
6.2.2.1 <i>Peso seco total (mg)</i>	52
6.2.2.2 <i>Peso seco insolúvel (mg)</i>	52
6.2.2.3 <i>Proteínas solúveis da matriz (μg)</i>	52
6.2.2.4 <i>Proteínas insolúveis do biofilme (μg)</i>	53
6.2.2.5 <i>WSP (μg)</i>	54
6.2.2.6 <i>ASP (μg)</i>	54
6.2.2.7 <i>eDNA (ng)</i>	55
6.2.3 Resultados da caracterização do biofilme após a décima aplicação de aPDT.....	57
6.2.3.1 <i>Peso seco total (mg)</i>	57
6.2.3.2 <i>Peso seco insolúvel (mg)</i>	57
6.2.3.3 <i>Proteínas solúveis da matriz (μg)</i>	57
6.2.3.4 <i>Proteínas insolúveis do biofilme (μg)</i>	58
6.2.3.5 <i>WSP (μg)</i>	58
6.2.3.6 <i>ASP (μg)</i>	59
6.2.3.7 <i>eDNA (ng)</i>	59
6.2.4 Resultados da comparação nos grupos submetidos ao tratamento fotodinâmico após as condições avaliadas nas aplicações 1, 5 e 10.....	61
6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	63
7 DISCUSSÃO.....	71
8 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral e trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis são colonizados por fungos do gênero *Candida* spp; *Candida albicans* tem sido descrita como a espécie mais prevalente e patogênica deste gênero¹. Em alguns casos, esse fungo pode causar infecções mucocutâneas superficiais, como Candidose Orofaríngea (OPC, do inglês *oropharyngeal candidiasis*) e formas disseminadas da infecção¹. A OPC tem sido relatada em pacientes que utilizam medicamentos imunossupressores após transplante de órgãos, antibióticos de amplo espectro, diabéticos, terapias antineoplásicas, nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida e em usuários de próteses dentárias^{2,3}.

As infecções causadas por *C. albicans* geralmente estão associadas ao biofilme, que é uma microestrutura complexa de células aderidas a uma superfície e agrupadas dentro de uma matriz extracelular (MEC), composta de substâncias derivadas de lise celular ou produzidas e secretadas pelas próprias células⁴. Uma das funções da MEC é proteger os patógenos incorporados na mesma da ação de antimicrobianos, dificultando a penetração de fármacos no biofilme e reduzindo a susceptibilidade dos microrganismos contra terapias medicamentosas frequentemente utilizadas⁴. Dessa forma, essa estrutura contribui para a preservação de biofilmes e para manutenção das interações estáveis entre célula-célula e célula-superfície e com o meio ambiente⁵.

Para tratamento da OPC têm sido utilizados os antifúngicos poliênicos, azóis e equinocandinas⁶. Os medicamentos de uso tópico, como, por exemplo, a nistatina e o miconazol têm se mostrado eficazes no alívio dos sinais e sintomas clínicos da doença, entretanto, muitas vezes não eliminam completamente as espécies de *Candida*, uma vez que, os efeitos diluentes da saliva e movimentos da musculatura bucal normalmente reduzem a dose desses agentes a concentrações sub-terapêuticas, o que reduz a eficácia dos medicamentos². Consequentemente, infecções recorrentes são frequentes após a utilização do antifúngico. A prescrição de antifúngico sistêmico (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) tem sido instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e em episódios de infecções recorrentes⁶, porém tem sido relatada a ocorrência de efeitos hepatotóxicos ou nefrotóxicos². Além disso, a utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC tem resultado no desenvolvimento de resistência em espécies de

*Candida*⁷. Considerando o aumento na incidência de patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade dos medicamentos utilizados, estudos têm buscado estratégias para eliminar microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais.

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade de tratamento que tem sido utilizada no combate ao câncer e para a inativação de microrganismos⁸. O processo fotodinâmico requer a utilização de um agente fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS e a presença de oxigênio⁹. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz de comprimento de onda adequado deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação celular⁸.

Os FSS mais utilizados na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) são predominantemente das famílias das porfirinas¹⁰ e das fenotiazinas¹¹. Além disso, uma nova classe de FS vem sendo empregada em aPDT, os FSS de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas reduzidas, que apresentam forte banda de absorção na região vermelha (625-740 nm) do espectro fotomagnético. O Photodithazine® (PDZ) é uma clorina e6 solúvel em água e tem sido utilizada com sucesso na aPDT contra o câncer devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete¹² e também na eliminação de microrganismos¹³⁻¹⁵.

Com aPDT tem sido observada completa inativação de culturas planctônicas de *C. albicans*, entretanto, o mesmo padrão de comportamento não foi observado em biofilmes¹⁵. Quando submetidas à aPDT, tem sido observado células de *C. albicans* sobreviventes a esse tratamento, denominadas “*persisters cells*”¹⁶. A sobrevivência desses microrganismos pode ser atribuída à complexa estrutura dos biofilmes, fornecendo proteção aos mesmos e tolerância às drogas¹⁷, o que torna os biofilmes de *Candida* spp. menos susceptíveis à aPDT quando comparados com culturas planctônicas dessas espécies. A persistência do biofilme de *C. albicans* após aplicações de aPDT pode ser atribuída a presença da MEC do biofilme? Para elucidar esta questão, torna-se importante a utilização de estratégias capazes de desestruturar a MEC do biofilme para facilitar a penetração do fotossensibilizador e da luz nas multicamadas do biofilme expondo as células à aPDT.

Entre as estratégias para a desestruturação da MEC do biofilme de microrganismos, podemos citar o emprego de enzimas^{18,19}. Foi verificado que o tratamento de biofilmes maduros com 50 µg/mL de DNase resultou numa diminuição de 30% de biomassa de biofilme, de forma semelhante à observada para os tratamentos com proteinase K². A susceptibilidade do biofilme de *C. albicans* a anfotericina B foi aumentada pelo tratamento do biofilme com DNase²⁰. A incubação de biofilmes de 48 horas de cepas de *C. albicans* susceptíveis e resistentes ao fluconazol por 5 minutos com diferentes enzimas hidrolíticas mostrou que a enzima DNase reduziu significativamente o eDNA e proteínas solúveis da MEC de ambas as cepas de *C. albicans*; e polissacáridos solúveis em água (WSP) de *C. albicans* resistente¹⁹. A redução de proteínas solúveis e do teor de WSP pela DNase indica que esses componentes da MEC podem estar entrelaçados com o eDNA¹⁹.

Além da desestruturação da MEC do biofilme de microrganismos com o uso de enzimas^{18,19}, podemos desestruturar a MEC com a utilização de métodos mecânicos²¹. Portanto, podemos sugerir que, se conseguirmos degradar a MEC do biofilme, seja por métodos químicos ou físicos, pode ser possível potencializar o efeito da aPDT. Considerando esses aspectos e levando em consideração que, até o momento, não há evidências na literatura quanto a influência da MEC na susceptibilidade dos biofilmes de *C. albicans* frente sucessivas aplicações de aPDT, o objetivo deste estudo é avaliar a influência da MEC na susceptibilidade de biofilmes de *C. albicans* a sucessivas aplicações de aPDT utilizando como estratégias de desestruturação da MEC a enzima DNase e o método mecânico de sonicação.

8 CONCLUSÃO

-Aplicações sucessivas de aPDT reduziram a viabilidade celular de biofilmes de *C. albicans*, independentemente do tipo de estratégia avaliada;

-Não houve diferença estatística significativa nos valores de peso seco total, peso seco insolúvel e ASP em nenhuma das condições avaliadas;

-Os tratamentos demonstraram redução na quantidade de proteínas solúveis da matriz após a quinta e décima aplicação de aPDT em todas as condições;

-As proteínas insolúveis do biofilme foram reduzidas nas condições I e IV somente após a primeira aplicação de aPDT;

-Houve redução significativa nas quantidades de WSP e eDNA em todas as condições avaliadas;

-A MEV demonstrou aparecimento de deformidades nas paredes celulares, além de redução no número de células e aglomerados celulares;

-As estratégias avaliadas para desestruturação do biofilme não aumentaram a susceptibilidade de *C. albicans* à aPDT.

REFERÊNCIAS*

1. Robertson J, McGoverin C, Vanholsbeeck F, Swift S. Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. *Front Microbiol.* 2019 Apr 12;10:801.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002 Aug;78(922):455-9.
3. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol.* 2019 Mar;13(1):25-32.
4. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol.* 2008 Jul 22;18(14):1017-24.
5. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol.* 2007 Nov;189(22):7945-7.
6. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013 Jan;62(Pt 1):10-24.
7. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.* 2002 Feb;2(2):73-85.
8. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956;28:350-6.
9. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008;163(1):1-12.
10. Rabiee N, Yarak MT, Garakani SM, Garakani SM, Ahmadi S, Lajevardi A, et al. Recent advances in porphyrin-based nanocomposites for effective targeted imaging and therapy. *Biomaterials.* 2020 Feb;232:119707.
11. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol.* 2016 Oct;33:67-73.
12. Banfi S, Caruso E, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem.* 2004 Sep 15;12(18):4853-60.
13. Carmello JC, Alves F, Basso FG, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG, et al. Treatment of Oral Candidiasis Using Photodithazine®-Mediated Photodynamic Therapy In Vivo. *PLoS One.* 2016 Jun 2;11(6):e0156947.
14. Dias LM. Potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana no desenvolvimento de resistência em *Candida albicans*. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.
15. 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.
16. Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Neves MG, Tomé JP, Tomé AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs.* 2010 Jan 20;8(1):91-105.

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

17. Ribeiro AP, Andrade MC, da Silva JF, 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 Jan-Feb;89(1):111-9.
18. Kaplan JB. Biofilm matrix-degrading enzymes. *Methods Mol Biol.* 2014;1147:203-13.
19. Panariello BHD, Klein MI, Alves F, Pavarina AC. DNase increases the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Sep;27:124-31.
20. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses.* 2012 Jan;55(1):80-5.
21. Alves F, Pavarina AC, Mima EGO, McHale AP, Callan JF. Antimicrobial sonodynamic and photodynamic therapies against *Candida albicans*. *Biofouling.* 2018 Apr;34(4):357-67.
22. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994;5(2):125-57.
23. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res.* 1995 May;74(5):1152-61.
24. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. *PLoS Pathog.* 2016 Sep 29;12(9):e1005828.
25. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 2010 Mar;89(3):205-18.
26. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006 Aug;55(Pt 8):999-1008.
27. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio.* 2014 Aug 5;5(4):e01333-14.
28. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Feb;51(2):510-20.
29. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 2008 Nov;4(11):e1000213.
30. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol.* 2016 Apr;14(5):320-30.
31. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Apr;11(2):382-402.
32. VEDIYAPPAN G, ROSSIGNOL T, d'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 May;54(5):2096-111.
33. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* 2010 May;169(5):323-31.

34. Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3259-66.
35. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:85-105.
36. Panariello BHD, Klein MI, Dias LM, Bellini A, Costa VB, Barbugli PA, et al. *Lactobacillus casei* reduces the extracellular matrix components of fluconazole-susceptible *Candida albicans* biofilms. *Biofouling*. 2021 Oct-Nov;37(9-10):1006-21.
37. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun;38(5):468-81.
38. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Feb;93(2):155-60.
39. 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 Apr;50(4):1402-10.
40. Hidalgo KJR, Carmello JC, Jordão CC, Barbugli PA, Costa CAS, Mima EGO, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy in Combination with Nystatin in the Treatment of Experimental Oral Candidiasis Induced by *Candida albicans* Resistant to Fluconazole. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019 Sep 18;12(3):140.
41. de Sousa DL, Lima RA, Zanin IC, Klein MI, Janal MN, Duarte S. Effect of Twice-Daily Blue Light Treatment on Matrix-Rich Biofilm Development. *PLoS One*. 2015 Jul 31;10(7):e0131941.
42. da Silveira PV, Panariello BHD, Costa CAGA, Maule SM, Janal MN, Zanin ICJ, et al. Twice-daily red and blue light treatment for *Candida albicans* biofilm matrix development control. *Lasers Med Sci*. 2019 Apr;34(3):441-7.
43. Paramonova E, Krom BP, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms. *Microbiology (Reading)*. 2009 Jun;155(Pt 6):1997-2003.
44. Hou Y, Yang M, Jiang H, Li D, Du Y. Effects of low-intensity and low-frequency ultrasound combined with tobramycin on biofilms of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2019 Feb 1;366(3):fnz026.
45. Niavarzi S, Pourhajibagher M, Khedmat S, Ghabraei S, Chiniforush N, Bahador A. Effect of ultrasonic activation on the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy: Evaluation of penetration depth of photosensitizer and elimination of *Enterococcus faecalis* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Sep;27:362-6.
46. 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 Jun 4;10(1):1476644.
47. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*. 2008;3(12):1909-24.
48. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

49. Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 8;104(19):8113-8.
50. Zago CE, Silva S, Sanitá PV, Barbugli PA, Dias CM, Lordello VB, et al. Dynamics of biofilm formation and the interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One*. 2015 Apr 13;10(4):e0123206.
51. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Dent Assoc*. 2012 Mar;143(3):270-7.
52. Nett JE, Crawford K, Marchillo K, Andes DR. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug;54(8):3505-8.
53. Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA, Reinicke EL, Sanchez H, Andes DR. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of *non-albicans Candida* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1918-20.
54. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Dec;9(6):588-94.
55. Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun*. 2007 May;75(5):2126-35.
56. 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. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb;54(2):637-42.
57. Garcia BA, Panariello BHD, Freitas-Pontes KM, Duarte S. *Candida* biofilm matrix as a resistance mechanism against photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Dec;36:102525.
58. Abreu-Pereira CA, Klein MI, Lobo CIV, Gorayb Pereira AL, Jordão CC, Pavarina AC. DNase enhances photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* biofilms. *Oral Dis*. 2022 Feb 8.
59. Nett JE, Andes DR. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. *J Fungi (Basel)*. 2020 Feb 3;6(1):21.
60. Bales PM, Renke EM, May SL, Shen Y, Nelson DC. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLoS One*. 2013 Jun 21;8(6):e67950.
61. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2005 Mar;93(3):288-93.
62. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 31;112(13):4092-7.
63. Gonçalves B, Fernandes L, Henriques M, Silva S. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*. 2020 May;36(5):621-30.

- 64.** Garcez AS, Núñez SC, Azambuja N Jr, Fregnani ER, Rodriguez HM, Hamblin MR, et al. Effects of photodynamic therapy on Gram-positive and Gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. *Photomed Laser Surg.* 2013 Nov;31(11):519-25.