



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

**FERNANDA FREIRE**

**EXPRESSÃO DOS GENES ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1  
DE *Candida albicans* EM BIOFILMES APÓS INATIVAÇÃO  
FOTODINÂMICA**

2017

**FERNANDA FREIRE**

**EXPRESSÃO DOS GENES ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 DE  
*Candida albicans* EM BIOFILMES APÓS INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA**

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

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2017

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

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

Freire, Fernanda

Expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 de *Candida albicans* em biofilmes após inativação fotodinâmica. / Fernanda Freire. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.  
62 f. : il.

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

Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge.

1. Biofilmes. 2. Fatores de virulência. 3. PCR em tempo real. 4. Inativação fotodinâmica. 5. *Candida albicans*. I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Tit. Martha Simões Ribeiro**

Universidade de São Paulo (USP)

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Campus de São Paulo

**Profa. Assistente Célia Regina Gonçalves e Silva**

Universidade de Taubaté (UNITAU)

Instituto Básico de Biociências

Campus de Taubaté

São José dos Campos, 30 de novembro de 2017.

## DEDICATÓRIA

À **Deus** que guiou, guia e continuará guiando cada dia de minha vida. A quem peço ajuda nos momentos difíceis, força para continuar minha caminhada e agradeço cada conquista.

Às pessoas que mais amo nessa vida. Meus pais, **Dinorá Freire** e **Edson Hanna Salhab**, que me criaram, deram educação, alegria e toda a ajuda necessária em todos os momentos em que precisei. Sem vocês eu não chegaria onde cheguei hoje. Meu agradecimento eterno por tudo o que vocês fizeram por mim.

À minha avó materna **Iracema Freire** (*in memoriam*), que foi minha avó, meu avô, minha mãe e meu pai. A mulher mais guerreira que já conheci, que estava pronta a qualquer hora para ajudar qualquer pessoa, que mantinha seu sorriso lindo no rosto a todo momento, que criou suas três filhas sozinha e que ajudou a me criar desde que nasci até quando ela se foi para junto de quem ela mais amava, Deus. Saudade e amor eternos.

Aos meus irmãos **Lucas Freire Salhab**, **Henrique Pace Salhab** e **Evandro Pace Salhab** pela presença, carinho e alegria que vocês dão aos meus dias. Amo muito vocês.

À toda minha família, tias, tios, primas e primos que também se alegram comigo em cada momento feliz e que não medem esforços para estarem ao meu lado quando preciso. Muito obrigada por tudo.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge** pela confiança, dedicação, carinho, incentivos e transmissão de seu conhecimento não só para mim, mas para todos os alunos que já tiveram o prazer de conhecê-lo. Agradeço demais o privilégio de ter sido sua orientada, mais do que isso, sua última orientada e de fazer parte dessa sua carreira brilhante. Aprendi muito com toda sua experiência de vida profissional. Não tenho palavras para agradecer tudo o que senhor já fez por mim!! É como se fosse um pai da vida acadêmica!! E nunca vou esquecer o fato do senhor ter se aposentado, mas ter feito questão de continuar comigo até o fim!! “Meu compromisso com você já é antigo”, disse uma vez. Muito obrigada por tudo. Estará para sempre em meu coração!!

À aluna de Pós-Doutorado **Patrícia Pimentel de Barros** por toda sua paciência e dedicação em me ensinar tudo o que sabe sobre biologia molecular, para que eu pudesse dar continuidade em meus experimentos, tanto no mestrado quanto no doutorado!! Foi um prazer ter trabalho durante esses 6 anos ao seu lado!! Você é uma mulher incrível!! Cheia de garra e com um coração enorme!! Muito obrigada por tudo e principalmente por me apoiar e dar todo o suporte que precisei no momento mais difícil da minha vida!! Nunca me esquecerei disso!! Te adoro!!

## AGRADECIMENTOS

À **Profa. Adjunta Juliana Campos Junqueira** que está sempre pronta a nos ajudar. Te admiro muito como pessoa, mãe, esposa e professora. Meus agradecimentos por sua ajuda sempre que precisei, desde a Iniciação Científica até o fim do Doutorado. Mesmo não sendo minha orientadora, sempre se ofereceu para aconselhar e prestar atenção em meus estudos como se fosse uma!! Meu muito obrigada!!

À **Profa. Doutora Luciane Dias de Oliveira** pelo carinho e dedicação a todos nós. Foi muito bom lembrar as aulas dadas por você durante a graduação enquanto assistia suas aulas no estágio de docência. Sempre te admirei e me inspiro muito em você.

À **Profa. Cristiane Aparecida Pereira** por toda a ajuda e incentivo desde que comecei com a Iniciação Científica até hoje. Muito obrigada por tudo o que você fez por mim durante a graduação e Pós-Graduação. Serei sempre grata. E muito obrigada por se tornar minha grande amiga!! Te adoro!!

À minha primeira aluna de iniciação científica, hoje com muito orgulho, aluna de Mestrado do nosso programa, **Damara da Silva Ávila**, que me ajudou em meus experimentos. Muito obrigada por estar no laboratório comigo e se tornar mais que uma aluna, uma amiga.

Ao aluno **Rodnei Dennis Rossoni** que traçou praticamente os mesmos passos que os meus, desde que saímos, no mesmo ano da Graduação, em 2011. Foram mestrado, doutorado, doutorado sanduíche e muitas risadas, ajuda e companheirismo!! Muito bom saber que posso contar com você e ter sua amizade!! Muito obrigada por tudo!!

Aos meus **colegas** de mestrado e doutorado que passam as mesmas dificuldades e alegrias. Obrigada por compartilhar toda a experiência de vida pessoal e profissional. Vocês são essenciais para que o dia-a-dia do laboratório seja mais harmonioso.

Aos técnicos do laboratório **Sérgio e Domingos** por toda a colaboração e paciência.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista **(Unesp)**, Campus de São José dos Campos e ao programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, seus docentes, discentes, coordenadora, secretários e todos aqueles que de alguma forma colaboram para que ele exista e seja feito da melhor maneira possível. Obrigada pela dedicação.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo) pelas bolsas de doutorado e BEPE concedidas (processos: 2013/22897-2 e 2014/25772-9, respectivamente).

*“Nunca saberemos o quão forte somos até que ser forte seja a única escolha.”*

*Autor desconhecido*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 PROPOSIÇÃO.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Amostras.....	18
3.2 Estudo e quantificação dos biofilmes.....	18
3.2.1 Formação de biofilme <i>in vitro</i> para quantificação de células viáveis.	19
3.2.2 Análise da biomassa (peso seco) .....	20
3.2.3 Estudo da filamentação.....	20
3.3 Formação de biofilme <i>in vitro</i> para realização da inativação fotodinâmica.....	21
3.4 Fotossensibilizadores e fontes de luz.....	22
3.5 PCR em Tempo Real.....	24
3.5.1 Extração e dosagem de RNA.....	24
3.5.2 Avaliação da expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1.....	24
3.5.2.1 Tratamento com DNase e Transcrição Reversa do RNA por PCR em Tempo Real.....	25
3.5.2.2 Amplificação por qRT-PCR.....	26
3.6 Análise dos resultados.....	28
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Estudo e quantificação dos biofilmes.....	30
4.1.1 Formação de biofilme <i>in vitro</i> para quantificação de células viáveis...	30
4.1.2 Análise da biomassa (peso seco) .....	31
4.1.3 Estudo da filamentação.....	33
4.2 Avaliação da eficiência dos iniciadores ( <i>primers</i> ) utilizados no estudo	35
4.3 Concentração do RNA extraído de todas as amostras.....	36

<b>4.4 Seleção do gene de referência para utilização na inativação fotodinâmica utilizando-se laser com azul de metileno e LED com eritrosina.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5 Ação da inativação fotodinâmica utilizando-se laser com azul de metileno e LED com eritrosina atuando nos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1.....</b>	<b>40</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>61</b>

Freire F. Expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 de *Candida albicans* em biofilmes após inativação fotodinâmica [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

## RESUMO

Os micro-organismos estão se tornando cada vez mais resistentes aos antimicrobianos e cepas de *Candida albicans* resistentes aos antifúngicos tem sido isoladas, assim, torna-se importante e necessário a realização de pesquisas que avaliem os efeitos de novos métodos terapêuticos, como a inativação fotodinâmica antimicrobiana (aPDI). Assim, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da inativação fotodinâmica sobre biofilmes de *Candida albicans*, avaliando seus efeitos sobre a expressão dos genes TEC1 (fator de transcrição), HWP1 (proteína de parede celular das hifas), EFG1 (regulador transcricional relacionado com a morfogênese), BCR1 (regulador da formação de biofilme e da parede celular), CPH1 (regulador transcricional envolvido na morfogênese) e ALS3 (adesina) de *C. albicans*. Foram avaliadas 30 amostras isoladas de pacientes portadores de HIV e 30 amostras de pacientes com estomatite protética, quanto a produção de biofilme, peso seco e filamentação. Destas, foram selecionadas as amostras mais virulentas de cada grupo que apresentaram melhor capacidade de formação de biofilme e filamentação. Assim, foi utilizada uma amostra clínica de *C. albicans* isolada de paciente portador de HIV, uma amostra clínica de *C. albicans* isolada de paciente com estomatite protética e uma cepa padrão ATCC 18804. A quantificação da expressão dos genes foi relacionada à produção desses genes nas amostras clínicas e na cepa de referência utilizando-se ensaio de PCR em tempo real. Para a aPDI, foram utilizados os fotossensibilizadores azul de metileno a 300 µM e eritrosina a 400 µM sensibilizados com laser de Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo de baixa potência (vermelho visível, 660 nm) e LED verde (532 ± 10 nm), respectivamente. Foram avaliados quatro grupos experimentais para a aPDI: a) F+L+: sensibilização com o corante e irradiação com luz; b) F+L-: somente tratamento com o fotossensibilizador; c) F-L+: somente irradiação com luz e d) F-L-: sem sensibilização com o corante e ausência de luz. Os resultados foram analisados por *t-test*, com um nível de significância de 5%. Após a análise fenotípica, as amostras Ca30 e 39 S foram selecionadas para a realização da aPDI. Como esperado, apenas para o grupo F+L+, quando comparado com o grupo F-L-, todos os genes analisados foram sub expressos após a aPDI. O *fold-decrease* para os genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 foram 0,73; 0,39; 0,77; 0,71; 0,67 e 0,60; para laser, respectivamente, e 0,66; 0,61; 0,50; 0,43; 0,54 e 0,66; para LED, respectivamente. Pode-se concluir que a aPDI mostrou uma redução na expressão dos genes de *C. albicans*, sugerindo a diminuição de sua virulência.

Palavras-chave: Biofilmes. Fatores de virulência. PCR em tempo real. Inativação fotodinâmica. *Candida albicans*.

Freire F. Expression of the Candida albicans genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 and EFG1 in biofilms after photodynamic inactivation [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp); Institute of Science and Technology; 2017

## ABSTRACT

Micro-organisms are becoming increasingly resistant to antimicrobial agents and Candida albicans resistant strains to antifungal has been isolated, so it is important and necessary to carry out studies that evaluates the effects of new therapeutic methods, such as antimicrobial photodynamic inactivation (aPDI). The objective of this study was verify the effects of aPDI on C. albicans biofilms, evaluating its effects on genes expression: TEC1 (transcription factor), HWP1 (cell wall protein hyphae), EFG1 (transcriptional regulator related to morphogenesis), BCR1 (regulator of biofilm formation and cell wall), CPH1 (transcriptional regulator involved in morphogenesis) and ALS3 (adhesin) of C. albicans. Were evaluated 30 samples isolated from patients with HIV and 30 samples from patients with denture stomatitis, as the production of biofilm, dry weight and filamentation. Of these, the most virulent strains of each group that presented better biofilm formation capacity and filamentation were selected. Therefore, were used a clinical sample of C. albicans isolated from HIV positive patient, a clinical sample of C. albicans isolated from patient with denture stomatitis and a standard strain ATCC 18804. The quantification of gene expression was related to the production of these genes in clinical samples and in the reference strain using PCR assay in real time. For aPDI, were used the photosensitizer methylene blue at 300  $\mu$ M and erythrosine at 400  $\mu$ M, sensitized with low power laser Indium-Gallium-Aluminum-Phosphorus (visible red, 660 nm) and green LED ( $532 \pm 10$  nm), respectively. Were evaluated four groups for aPDI: a) P+L+: sensitization with the photosensitizer and irradiation with light; b) P+L-: only treatment with the photosensitizer; c) P-L+: only irradiation with light and d) P-L-: without sensitization with the dye and absence of light. The results were analyzed by t-test, with a significance level of 5%. After the phenotypic analysis, the samples Ca30 and 39 S were selected for aPDI. As expected, only in the group P+L+ when compared with the group P-L-, all analyzed genes were downregulated after aPDI. The fold-decrease for the genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 and EFG1, were 0.73, 0.39, 0.77, 0.71, 0.67 and 0.60, for laser, respectively, and 0.66, 0.61, .050, 0.43, 0.54 and 0.66, for LED, respectively. It could be concluded that aPDI showed a reduction in the expression of C. albicans genes, suggesting its virulence decrease.

Keywords: Biofilms. Virulence factors. Real-time PCR. Photodynamic inactivation. Candida albicans.

## 1 INTRODUÇÃO

Espécies de fungos pertencentes ao gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente em candidoses e candidemia em todo o mundo, são uma das principais causas de infecções oportunistas (Das et al., 2011; Pfaller et al., 2012; Nucci et al., 2013; Guinea, 2014; Wisplinghof et al., 2014; Bassetti et al., 2015). Esta tendência tem sido observada ao longo da última década e ainda é o caso, mesmo em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, Dinamarca, Noruega e Finlândia (Guinea, 2014). *C. albicans* é um micro-organismo comensal humano, e pode colonizar a pele, superfícies mucosas, o trato gastrointestinal e gênito-urinário feminino (Underhill, Iliev, 2014). Um fator importante que contribui para a patogênese da candidose é a formação de biofilme, e *C. albicans* tem a capacidade de formar biofilme em superfícies inertes e biológicas (Seddiki et al., 2015).

Estomatite protética é uma reação inflamatória comum, de etiologia multifatorial, que normalmente está associada com espécies de *Candida*, particularmente *C. albicans*, devido à sua alta virulência, capacidade de se aderir e de formar biofilmes em tecidos da cavidade oral e superfícies de próteses totais (Darwazeh et al., 2010; Lazarin et al., 2014; Gleiznys et al., 2015).

Usuários de prótese intra-oral estão comumente associados com estomatite protética. Essa doença é caracterizada por mucosa inflamada, particularmente sob a superfície da prótese e os pacientes podem se queixar de sensação de ardor, desconforto ou gosto ruim, mas a maioria dos casos são assintomáticos. EP é uma lesão inflamatória da mucosa palatal sob próteses totais ou parciais removíveis e afeta pelo menos 65% dos usuários. Existem muitos fatores que influenciam o estabelecimento e a persistência da EP: trauma pela prótese, uso contínuo da prótese, fluxo salivar diminuído, limpeza inadequada da prótese, material da base da prótese, tempo de utilização da prótese, imunidade celular comprometida, tabagismo, fatores dietéticos, pH do biofilme e microbiota bucal (Coco et al., 2008; Gasparoto et al., 2009).

Pereira et al. (2013b) isolaram, quantificaram, identificaram e compararam micro-organismos de 100 indivíduos usuários de prótese total superior removível, sendo que 50 tinham EP e 50 não tinham a lesão. Foram coletadas amostras da

superfície da prótese, do palato duro e através de enxágue bucal. *C. albicans* foi a espécie mais isolada em todos os grupos, seguida de *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Martins et al. (2016) isolaram e determinaram a incidência de espécies de *Candida* em próteses orais. A coleta foi feita em 66 pacientes e *C. albicans* foi a espécie de micro-organismo mais isolada (63%).

A candidose bucal é a manifestação fúngica mais comum ocorrida em pacientes com AIDS (Coogan et al., 2006). É reportado que 84-100% dos indivíduos HIV positivos desenvolverão pelo menos um episódio de colonização por *Candida* spp. e acima de 90% desenvolverão candidose pseudomembranosa sintomática. A candidose constitui um indicador da progressão da infecção por HIV, revelando falha imunológica dos pacientes, pois a imunidade celular específica desempenha importante papel na prevenção da candidose bucal (Samaranayake YH, Samaranayake, 2001; Gaitán-Cepeda et al., 2005; Samaranayake LP et al., 2009).

Junqueira et al. (2012) coletaram amostras da cavidade bucal de 60 pacientes HIV positivos e após identificação das espécies pelo sistema API20C, a mais comumente isolada foi *C. albicans* (51,56%). Além disso, os autores demonstraram que as cepas isoladas foram resistentes ao fluconazol e anfotericina B, antifúngicos importantes no tratamento de candidoses.

Em um estudo semelhante conduzido por Maheshwari et al. (2016), em um total de 128 isolados de *Candida*, obtidos de 88 pacientes HIV-positivo, 7 diferentes espécies foram identificadas e *C. albicans* foi a mais comumente isolada (50%).

O tratamento da candidose bucal em pacientes HIV positivos é dificultado em virtude de episódios recorrentes e exposição intermitente e contínua a terapia antifúngica que favorece a seleção de cepas resistentes. Estudos demonstraram que *C. albicans* e cepas não-*albicans* estão desenvolvendo resistência aos antifúngicos indicados para tratamento de candidose bucal, como fluconazol e anfotericina B (Winteger et al., 2007). O fluconazol é o antifúngico de escolha para tratamento de candidose bucal em indivíduos com HIV, entretanto Mulu et al. (2013) observaram perfis de 12,2%, 7,7% e 4,7% de resistência aos azóis fluconazol, cetoconazol e itraconazol, para cepas não-*albicans* e *C. albicans*, respectivamente, de 177 isolados da cavidade bucal de pacientes com AIDS. Desses, 139 isolados (81%) eram de *C. albicans*.

A anfotericina B tem sido utilizada como uma alternativa para tratamento de candidose bucal devido a emergente resistência aos azóis (Samaranayake LP et al., 2009). A resistência a este antifúngico por *Candida*, apesar de ser rara, já foi relatada, além disso, a anfotericina B apresenta efeitos colaterais consideráveis (Winteger et al., 2007; Samaranayake LP et al., 2009).

Sabe-se que a virulência de *C. albicans* está ligada a seus fatores intrínsecos, que contribuem para o desenvolvimento de candidoses. Os principais são a formação de hifas, o dimorfismo, as alterações fenotípicas, a aderência, o sinergismo com as bactérias, seus mecanismos de interferência com o sistema de defesa do hospedeiro e a produção de enzimas hidrolíticas (Hube, 2004; Wilson et al., 2009). Além disso, a formação de biofilme protege efetivamente as células fúngicas contra condições ambientais adversas, incluindo mecanismos de defesa do hospedeiro e a ação de antifúngicos (Pierce, Lopez-Ribot, 2013).

Com o aumento das infecções oportunistas causadas pelo gênero *Candida* em pacientes imunodeprimidos e conseqüente surgimento de cepas emergentes resistentes aos antifúngicos convencionais, são requeridas novas opções de tratamento para candidose bucal com finalidade de melhorar o arsenal terapêutico. Desta forma, a inativação fotodinâmica antimicrobiana (aPDI) tem sido relatada como uma nova opção para redução de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal (Souza SC et al., 2006; Souza RC et al., 2010; Pereira et al., 2011; Freire et al., 2014, 2016).

O mecanismo de ação da aPDI foi investigado com algum detalhe, mas ainda não é completamente elucidado (Hamblin, 2016). A aPDI envolve a absorção de um fóton de luz (com um comprimento de onda que corresponde à banda de absorção do corante, também chamado fotossensibilizador (FS), que conduz à excitação deste ao seu estado singleto. Este FS em estado singleto pode sofrer um cruzamento intersistemas, e mudar seu estado de energia para seu estado tripleto. Este último pode reagir com o oxigênio do ambiente, em seu estado fundamental por dois caminhos fotoquímicos diferentes, chamados Tipo 1 e Tipo 2. O Tipo 1 envolve uma transferência eletrônica para produzir radicais superóxidos e, em seguida, radicais hidroxilas (HO). O Tipo 2 envolve a transferência de energia para produzir o estado singleto de oxigênio excitado (O<sub>2</sub>). Ambos HO e O<sub>2</sub> são espécies de oxigênio

altamente reativas (ROS) que podem danificar quase todos os tipos de biomoléculas (proteínas, lípidos e ácidos nucleicos) e matar células (Broekgaarden et al., 2015).

O fotossensibilizador azul de metileno é um corante tricíclico (Malik et al., 2010) que atua como indicador redox que é azul em um ambiente oxidante e torna-se incolor após redução. Este, combinado com luz foi relatado como sendo benéfico na supressão do *C. albicans* (Souza RC et al., 2010; Martins et al., 2011; Pereira et al., 2011, Freire et al., 2015, 2016). Pereira et al. (2011), avaliaram o efeito da aPDI *in vitro* usando azul de metileno (0,1 mg/mL – 300 µM) como fotossensibilizador e laser de baixa potência (InGaAlP – 660 nm – 98 s) como fonte de luz, em biofilmes individuais e mistos de *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Após a aplicação da aPDI e desprendimento do biofilme, foi realizada a contagem de UFC/mL. Reduções ( $\log_{10}$ ) de biofilme das espécies individuais foram melhores (2,32-3,29) do que as de biofilme com espécies associadas (1,00- 2,44). Estes resultados comprovam que a aPDI mediada por azul de metileno pode ser um bom recurso para o controle de biofilmes orais.

A eritrosina é um composto cíclico, que absorve a luz na região visível (500-550 nm) e, por conseguinte, capaz de iniciar reações fotoquímicas. Sua principal aplicação na odontologia é a evidenciação da presença de biofilme dental (Metcalf et al., 2006; Wood et al., 2006). Costa et al. (2012), utilizaram LED como fonte de luz e rosa bengala e eritrosina como fotossensibilizadores para a inativação fotodinâmica em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. Os resultados revelaram uma significativa redução nas culturas planctônicas (1,97 log e 3,45 logs) e em biofilmes (<1 log) para a aPDI realizada com rosa bengala e eritrosina, respectivamente. Pereira et al. (2013a) também utilizaram LED combinado com rosa bengala e eritrosina para terapia fotodinâmica, porém, em biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* e verificaram a redução de 0,62 e 0,52 log (CFU/mL) para *S. mutans* e 0,95 e 0,88 log (UFC/mL) para *S. sanguinis*, respectivamente.

A busca por mecanismos de ação diferentes contra leveduras do gênero *Candida*, que possibilitem sua utilização em tratamento das diversas formas de candidose, em pacientes portadores ou não do HIV, assim como da estomatite protética, direciona para a aPDI mediada por novos corantes e fontes de luz acessíveis e de baixo custo, que além de ser de fácil acesso para aplicação na cavidade bucal,

contribui para a diminuição do tempo de tratamento e não compromete a microbiota local (Wainwright, 1998).

Os genes alvo de *C. albicans* escolhidos para este estudo foram ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1, relacionados à aderência, formação de biofilme e hifas. Os genes EFG1 e TEC1 são fatores de transcrição e estão relacionados à morfogênese, os quais formam um circuito regulador da diferenciação das hifas (Hnisz et al., 2012). CPH1 é um fator de transcrição e regula a morfogênese de *C. albicans* (Maiti et al., 2015). O gene BCR1 está entre os principais reguladores de biofilme (Finkel, Mitchell, 2011). Estudos anteriores indicaram que as suas adesinas alvo ALS1-3 e HWP1 medeiam a interação célula-célula em biofilmes (Nobile et al., 2008), mas estudos de Finkel et al. (2012) observaram que BCR1, através da ALS1, também regula a adesão célula-substrato. Acredita-se que os genes alvo de BCR1 são induzidos no desenvolvimento de hifas (Nobile, Mitchell, 2005).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo, Freire et al. (2015) demonstraram que a inativação fotodinâmica, utilizando-se laser a 660 nm e azul de metileno, atuou na expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* de amostras clínicas de *C. albicans* provenientes de pacientes HIV-positivo. A diminuição da expressão desses genes, consideradas enzimas hidrolíticas, deve diminuir a virulência das leveduras, atuando em sua penetração e invasibilidade nos tecidos. Avaliar a expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1, relacionados à aderência, formação de biofilme e hifas, utilizando-se duas fontes de luz e dois corantes diferentes, além de podermos observar se a aPDI diminui a virulência de *C. albicans* por meio desses genes, também poderemos verificar qual será o melhor protocolo de aPDI para este caso.

Não foram encontrados estudos na literatura que associem a expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 de *C. albicans* após a realização da inativação fotodinâmica, a qual apresenta aplicação como uma opção terapêutica para o tratamento de doenças infecciosas, incluindo a candidose bucal. A aPDI pode ser uma opção ou um tratamento coadjuvante à quimioterapia antimicrobiana, melhorando o tratamento de infecções orais, aumentando a eficácia e reduzindo seu custo. Neste estudo, investigou-se os efeitos da fotossensibilização utilizando azul de metileno e laser de baixa potência e eritrosina sensibilizada com LED verde em biofilmes de *C. albicans*, verificando-se a expressão desses genes.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 de *C. albicans*, por meio da PCR em tempo real, de uma cepa padrão (18804) e amostras clínicas, selecionadas a partir de testes fenotípicos de biofilme e filamentação, após a inativação fotodinâmica antimicrobiana utilizando-se laser a 660 nm de comprimento de onda atuando no fotossensibilizador azul de metileno e o corante eritrosina sensibilizado com LED verde a  $532 \pm 10$  nm.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostras**

Foram utilizadas 30 amostras clínicas de *C. albicans* provenientes de pacientes portadores de HIV do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (Junqueira et al., 2012), 30 amostras clínicas de *C. albicans* de pacientes com lesão de estomatite protética do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista (Pereira et al., 2013bDa) e uma cepa padrão ATCC 18804. As amostras clínicas foram selecionadas após o estudo e quantificação dos biofilmes detalhados no item 3.2. A amostra mais virulenta de cada grupo foi selecionada para o estudo da inativação fotodinâmica e a quantificação da expressão dos genes. O projeto de pesquisa para coleta das amostras clínicas foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (274/2009) e pelo Comitê de Ética desta Universidade (012/2010-PH/CEP) e estas estão armazenadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos.

#### **3.2 Estudo e quantificação dos biofilmes**

Foram avaliadas 30 amostras isoladas de pacientes portadores de HIV e 30 amostras de pacientes com estomatite protética, quanto a quantificação de células viáveis e produção de biomassa. Após esses dois testes, 14 amostras foram selecionadas para o teste da filamentação conforme o item 3.2.3. Destas, foi selecionada a amostra mais virulenta de cada grupo para o estudo da inativação fotodinâmica e a quantificação da expressão dos genes.

### 3.2.1 Formação de biofilme *in vitro* para quantificação de células viáveis

O biofilme foi formado em fundo de placas de 96 poços de fundo plano (Costar Corning, New York, EUA) de acordo com o protocolo de Seneviratne et al. (2008) e Costa et al. (2013), com modificações. A ativação das cepas que estão congeladas (-75°C) foi feita em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories PVT. LTD, Índia) com Cloranfenicol (Alamar Tecno-Científica Ltda) e mantidas em estufa a 37°C por 24 h. Após, foi preparado um inóculo de *C. albicans* em caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB – Himedia) suplementado com 100 mM de glicose, diluído 10 vezes em água destilada estéril (10X), que foi incubado em estufa a 37°C por 16 h. Depois desse período, o inóculo foi lavado duas vezes com solução de NaCl 0,9% estéril e foram feitas suspensões padronizadas em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal, São Paulo, Brasil) contendo  $10^7$  células/mL em caldo YNB (10X). Foram colocados 100 µL da suspensão de leveduras nos poços das placas. A placa foi incubada por 1 h e 30 min em estufa a 37°C sob agitação de 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, Brasil) para aderência inicial. Após, as placas foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% estéril e foi colocado 100 µL de caldo YNB (10X). A seguir, a placa foi mantida em agitação de 75 rpm a 37°C por 48 h. O caldo foi trocado após 24 h.

Após a formação dos biofilmes os poços foram lavados com 250 µL de solução de NaCl 0,9% estéril. A seguir, foram adicionados 250 µL de solução de NaCl 0,9% estéril e os biofilmes foram rompidos por homogeneização dos poços por 30 s em homogeneizador ultrasônico (Sonics Vibra Cell, Connecticut, EUA) com amplificação de 25%. Após, foram realizadas diluições seriadas das soluções dos biofilmes e alíquotas de 100 µL de cada diluição foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose e incubados a 37°C por 48 h. Após o período de incubação, foram determinadas as unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e os valores transformados em logaritmo de base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ).

### 3.2.2 Análise da biomassa (peso seco)

A metodologia para formação de biofilme foi baseada no estudo de Nobile e Mitchell (2005) e Junqueira et al. (2011). Os biofilmes foram desenvolvidos em discos de poliestireno de 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (n=10), em placas de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA). Os discos foram pesados individualmente em balança analítica digital e esterilizados por radiação gama a 20 kGy (Cobalto 60) por 6 h. Previamente ao desenvolvimento dos biofilmes, cada disco foi pré-tratado com 2 mL de soro fetal bovino – SFB (Aldrich Chemical, Wisconsin, EUA), e incubados a 37°C/24 h em agitação de 75 rpm. Após o período de incubação, o SFB foi aspirado, e os discos lavados com 2 mL de PBS (Gibco).

O biofilme foi formado conforme o item 3.3, porém as suspensões microbianas foram preparadas e padronizadas em meio *Spider* (caldo nutriente a 1%, D-manitol a 1% e fosfato de potássio dibásico a 0,4%, pH 7,2) em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm e densidade óptica de 0,5. Aos discos pré-incubados com SFB foram adicionados 500 µL de cada suspensão microbiana, e as placas foram incubadas a 37°C/90 min em agitação de 75 rpm para aderência dos micro-organismos. Após, os discos foram transferidos para poços contendo 2 mL de PBS para remoção dos micro-organismos não aderidos, e incubados com 2 mL de meio *Spider* 37°C em agitação de 75 rpm, para formação de biofilmes por 60 h.

Decorrido o tempo de incubação, os discos foram transferidos para poços vazios e deixados em temperatura ambiente por 48 h, para sua completa secagem. Posteriormente, os discos foram pesados novamente, e a avaliação quantitativa do peso seco do biofilme foi realizada pela subtração do peso do disco inicial do seu peso final.

### 3.2.3 Estudo da filamentação

O estudo da filamentação *in vitro*, foi avaliado nas seguintes amostras clínicas: Ca30, C32, C11, C10, C33 e C29 (provenientes de pacientes com estomatite

protética) e 39S, 40, 76S, 21S, 86S, 24S, 31 e 109S (provenientes de pacientes portadores do vírus HIV). Essas amostras foram pré-selecionadas de acordo com os dois estudos prévios (formação de biofilme e análise da biomassa), pois tiveram valores mais altos dentre as 10 primeiras amostras e foram as escolhidas para o teste de filamentação.

Após o crescimento de 24 h de *C. albicans* em caldo YNB, as culturas foram centrifugadas para o preparo de suspensões padronizadas a  $10^7$  células/mL, de acordo com o item 3.2.1.

Em placa de cultura de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA), foi adicionado 1 mL de água destilada suplementada com 10% de soro fetal bovino e 100 mL da suspensão padronizada de *C. albicans*.

A placa contendo os inóculos foi incubada a 37°C em estufa bacteriológica. Após 24 h de incubação, 50 µL do inóculo contido em cada poço foi depositado sobre lâminas microscópicas com 10 campos previamente demarcados. A leitura foi realizada levando em conta o centro de cada quadrado na lâmina.

O material sobre a lâmina foi recoberto com lamínula, sendo observado em microscópio óptico (Carl Zeiss, Primo Star, Alemanha) na objetiva de 40x. Foram realizados 5 ensaios para cada grupo experimental, em duplicata, em momentos diferentes. As imagens foram analisadas quanto a morfologia de *C. albicans* e quantificação de hifas.

Foram avaliados e contados 10 campos microscópios em cada lâmina, totalizando 100 campos para cada amostra, sendo padronizado o ponto médio de cada campo e atribuindo-se escores de acordo com o número de hifas presentes. Escore 0: hifas ausentes; 1: 1 a 20 hifas; 2: 21 a 40 hifas; 3: 40 a 50 hifas e 4: mais de 50 hifas (Ribeiro et al., 2017).

### **3.3 Formação de biofilme *in vitro* para realização da inativação fotodinâmica**

O biofilme foi formado em fundo de placas de 24 poços de fundo plano (Costar Corning, Nova York, EUA). A ativação das cepas que estão congeladas (-75°C) foi feita em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories

PVT. LTD, Índia) com Clofanfenicol (Alamar Tecno-Científica Ltda) e mantidas em estufa a 37°C por 24 h. Após, foi preparado um inóculo de *C. albicans* em caldo YNB suplementado com 100 mM de glicose, diluído 10 vezes em água destilada estéril (10X), que foi incubado em estufa a 37°C por 16 h. Depois desse período, o inóculo foi lavado duas vezes com solução de NaCl 0,9% estéril e foram feitas suspensões padronizadas em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal, São Paulo, Brasil) contendo  $10^7$  células/mL em caldo YNB (10X). Foram colocados 1 mL da suspensão de leveduras nos poços das placas. A placa foi incubada por 1 h e 30 min em estufa a 37°C sob agitação de 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, Brasil) para aderência inicial. Após, as placas foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% estéril e foi colocado 1 mL de caldo YNB (10X). A seguir, a placa foi mantida em agitação de 75 rpm a 37°C por 48 h. O caldo foi trocado após 24 h. Foram avaliados oito grupos experimentais (4 para o laser e 4 para o LED) para cada amostra:

- a) F+L+: sensibilização com o corante e irradiação com luz;
- b) F+L-: somente tratamento com o fotossensibilizador;
- c) F-L+: somente irradiação com luz;
- d) F-L-: sem sensibilização com o corante e ausência de luz.

Cada grupo experimental foi feito em uma placa de 24 poços diferente (n=20 para cada grupo), totalizando n=80 para cada amostra.

Posteriormente, os grupos F+L+ e F+L- receberam 1 mL da solução de corante. Os grupos F-L+ e F-L- receberam 1 mL de solução de NaCl 0,9% estéril. As placas foram, então, agitadas por 5 minutos (tempo de pré irradiação) em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). A seguir, os grupos F+L+ e F-L+ foram irradiados de acordo com o protocolo descrito no item 3.4.

### **3.4 Fotossensibilizadores e fontes de luz**

Foram utilizados dois grupos para a aPDI. No primeiro grupo, o corante azul de metileno (AM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foi sensibilizado com laser de

InGaAlP (Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo) (D.M.C. Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil)) vermelho visível. No segundo grupo, foi utilizado Diodo Emissor de Luz (LED) verde (MMOptics, São Carlos, Brasil) como fonte de luz e eritrosina (ER) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) como fotossensibilizador.

O corante azul de metileno teve uma concentração de 300  $\mu\text{M}$  e a eritrosina de 400  $\mu\text{M}$ . Ambos foram preparados todas as vezes antes de usar, por dissolução do pó em água destilada e filtrada através de uma membrana filtro de 0,22 micrômetros (Millipore, São Paulo, Brasil). Após a filtração, a solução do corante foi armazenada no escuro.

O laser de InGaAlP, emitiu luz a 660 nm (vermelho visível). O comprimento de onda do laser corresponde à absorção máxima do corante azul de metileno. Os parâmetros utilizados foram mensurados no medidor de potência óptica PM100D Thorlabs® equipado com um sensor fotodiodo S130C (0,7  $\text{cm}^2$ ): potência de 50 mW, energia de 15 J, tempo de 300 s, taxa de fluência de 71,42  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ , e fluência de 21,42  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . A ponteira do laser foi colocada a uma distância de 1,75 cm em cada poço da placa de 24 poços junto a um anteparo negro fosco para evitar o espalhamento de luz.

O Diodo Emissor de Luz (LED) verde, tem comprimento de onda de  $532 \pm 10$  nm. O corante eritrosina absorve luz visível na faixa de 500-550 nm. Os parâmetros utilizados foram mensurados no medidor de potência óptica PM100D Thorlabs® equipado com um sensor fotodiodo S130C (0,7  $\text{cm}^2$ ) e são exatamente os mesmos do laser, possibilitando uma melhor comparação entre as duas fontes de luz. A ponteira do LED foi colocada sobre a tampa em cada poço da placa de 24 poços junto a um anteparo negro fosco para evitar o espalhamento de luz.

A irradiação dos biofilmes foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar e com luz apagada, onde foi utilizado um anteparo negro fosco com orifício de diâmetro coincidente ao da entrada do poço evitando-se assim o espalhamento de luz.

### 3.5 PCR em Tempo Real

#### 3.5.1 Extração e dosagem de RNA

Após a irradiação dos biofilmes, foi retirada a solução de NaCl 0,9% estéril ou os corantes e foi colocado 1 mL de Trizol no primeiro poço, o qual foi transferido para os seguintes até a remoção total de biofilme. A ponta da ponteira auxiliou no desprendimento do biofilme ao passá-la com resistência no fundo dos poços. O Trizol contendo as células do biofilme formado foi transferido para microtubos de 2 mL, já identificados, e armazenados em freezer a  $-75^{\circ}\text{C}$  para posterior extração do RNA.

A extração de RNA foi realizada utilizando-se Trizol LS Reagent (Ambion, Inc., Carlsbad, CA, USA), conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

A solução de RNA foi quantificada pelo aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a leitura os tubos foram armazenados em freezer a  $-75^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.5.2 Avaliação da expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1

As amostras clínicas foram submetidas à avaliação da expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 em relação ao gene de referência (ACT1, LSC2, RIP1 ou PMA1), também denominados genes normalizadores ou endógenos (*housekeeping*), através do site (\*) e métodos *Delta CT*, *BestKeeper*, *NormFinder* e *Genorm*. Essa avaliação foi realizada nos 4 grupos da aPDI (F-L-, F+L-, F-L+ e F+L+). Os iniciadores para cada gene deste trabalho foram descritos por seus respectivos autores de acordo com o Quadro 1. As sequências dos iniciadores foram confirmadas no site doNcbi/ Gene Bank, e são específicas para a espécie *C.albicans*.

---

\* <http://www.leonxie.com/referencegene.php>

Quadro 1 - Genes de *Candida albicans* cuja expressão foi avaliada pela inativação fotodinâmica

GENE	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
ACT1*	orf19.5007	Integridade estrutural do citoesqueleto celular	Nailis et al. (2006).
LSC2*	orf19.1860	Proteína presente nas células - B-subunidade da Succinil CoA sintetase	Nailis et al. (2006).
RIP1*	orf19.5893	Enzima ubiquinol-citocromo c redutase	Nailis et al. (2006).
PMA1*	orf19.5383	ATPase da membrana plasmática	Nailis et al. (2006).
TEC1	orf19.5908	Fator de transcrição	Hnisz et al. (2012).
HWP1	orf19.1321	Proteína de parede celular das hifas	Hnisz et al. (2012).
EFG1	orf19.610	Principal regulador transcricional envolvido na morfogênese	Hnisz et al. (2012).
BCR1	orf19.723	Regula a formação de biofilme e da parede celular	Finkel et al. (2012).
CPH1	orf19.4433	Fator transcricional e regula a formação de pseudo-hifa	Maiti, et al. (2015).
ALS3	orf19.1816	Adesina - aderência à célula hospedeira	Nailis et al. (2010).

Legenda: \*genes de referência

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.5.2.1 Tratamento com DNase e Transcrição Reversa do RNA por PCR em Tempo Real

O RNA total extraído foi tratado com DNase I (Turbo DNase Treatment and Removal Reagents - Ambion Inc., Carlsbad, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante, para remover o DNA contaminante. A seguir, o RNA foi transcrito para cDNA utilizando-se o Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para a transcrição reversa, foram adicionados em um microtubo de 200 µL, os seguintes reagentes: 1000 ng de RNA tratado com DNase, 1 µL de random

hexamers (50 ng/  $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de Anneling Buffer e água DEPC para completar um volume final de 8  $\mu\text{L}$ . O microtubo foi, então, incubado a 65°C por 5 min e depois ficou no gelo por pelo menos 1 min. Com o tubo no gelo foi acrescentado 10  $\mu\text{L}$  de 2X First-Strand Reaction Mix e 2  $\mu\text{L}$  de SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix. O tubo foi agitado em *vortex* por 5 seg e centrifugado por 30 seg. Depois foi incubado a 25°C por 10 min, a 50°C por 50 min e a 85°C por 5 min em termociclador (LineGene K-Bioer Technology). Após a transcrição o tubo foi armazenado a -20°C até sua posterior utilização na qRT-PCR.

### 3.5.2.2 Amplificação por qRT-PCR

Os produtos da qRT-PCR foram amplificados para a quantificação relativa da expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1. A expressão genética é apresentada através da concentração dos genes alvo, descritos acima, em relação à concentração do gene de referência selecionado (ACT1, LSC2, RIP1 ou PMA1) e representa a expressão média obtida de reações distintas da qRT-PCR.

Para a estimativa precisa da eficiência da PCR uma série de fatores, tais como, os reagentes, montagem do experimento, qualidade da amostra e análise foram previamente avaliados no presente estudo. A eficiência de amplificação da PCR é a taxa na qual um *amplicon* de PCR é gerado, geralmente expressa como porcentagem. Se um *amplicon* de PCR dobrar em quantidade durante a fase geométrica da amplificação da PCR, então a PCR apresentou 100% de eficiência.

O *slope* de uma curva padrão é comumente usado para estimar a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real. Uma curva padrão de PCR em tempo real é graficamente representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor CT em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucléico. Um *slope* da curva padrão de -3,32 indica uma reação de PCR com 100% de eficiência. Os *slopes* mais negativos que -3,32 indicam reações com menos de 100% de eficiência. Os *slopes* mais positivos que -3,32 podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem.

Uma reação 100% eficiente produzirá um aumento de 10 vezes no *amplicon* da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ( $\log_2 10 = 3,3219$ ). Baixas eficiências da PCR podem resultar em baixa precisão da réplica da amostra e, como consequência, podem resultar em uma quantificação deficiente.

Neste trabalho, foram testados 4 genes de referência, sendo que, o gene de referência escolhido teve que apresentar mínima variação de Ct (Threshold Cycle) nos grupos analisados (F-L-, F-L+, F+L- e F+L+). O Ct é o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. As médias dos valores de Ct, medidas em triplicata, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvo com normalização a um controle interno. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica com base na fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resulta em valor 1.

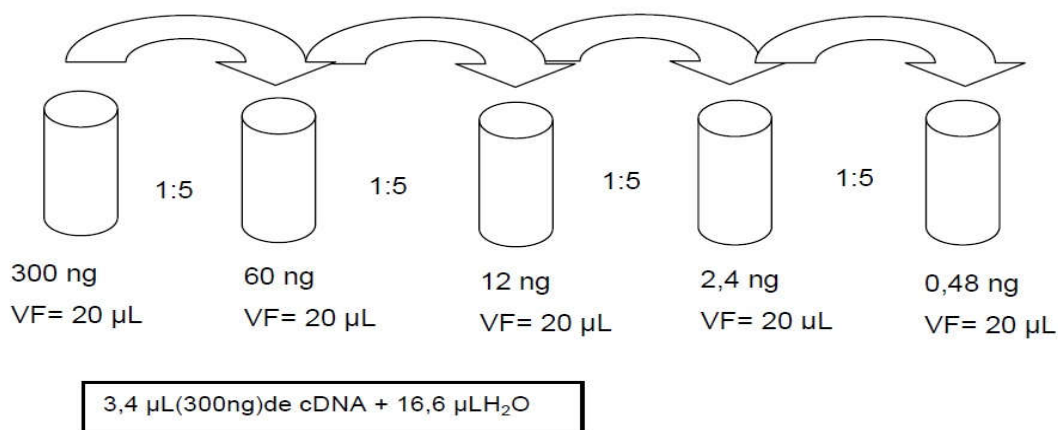
A eficiência (E) da amplificação deve variar idealmente próximo a 100% ( $-3.6 > \text{slope} > -3.1$ ), e foi determinada baseando-se na equação:

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

Para cada iniciador (*primer*) testado, foi feita uma curva padrão absoluta a fim de calcular a sua eficiência de amplificação.

Para a realização da curva padrão, foram preparadas diluições seriadas do cDNA (1:5) da cepa padrão de *C. albicans* ATCC 18804, com a massa inicial de 300 ng (Figura 1). Cada diluição foi feita em triplicata para cada iniciador testado.

Figura 1 – Esquema representativo do preparo das diluições do cDNA



Fonte: Elaborado pelo autor.

O método qPCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG - Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) que consiste na seguinte reação: em cada poço da placa de 96 poços (MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plate), foi colocado 10 µL de Super mix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (10X) (corante de referência), 0,5 µL de primer senso, 0,5 µL de primer anti-senso, solução de cDNA alvo e 4,0 µL de água DEPC para o volume final de 20 µL. A placa foi, então, lida em aparelho de Real Time (StepOnePlus Real-Time PCR System – Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 min, seguido de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 1 ciclo de 60°C por 30 s. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de cada ciclo da PCR, permitiu a monitoração da quantidade crescente de cDNA amplificado.

### 3.6 Análise dos resultados

Para os testes de quantificação de células viáveis, a resposta variável foi a contagem de UFC/mL dos micro-organismos, transformadas em log<sub>10</sub>. Na análise do

peso seco, a variável foi o peso do biofilme formado no disco; e para a filamentação, a variável considerada foi a quantificação de hifas formadas por amostra testada. A análise dos resultados das variáveis obtidas e a construção dos gráficos foram realizadas com auxílio do *software* do programa *Graph Pad Prism 6* (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

O método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  foi utilizado para analisar as mudanças relativas na expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 nos experimentos da qRT-PCR (Livak, Schmittgen, 2001), através do programa *Graph Pad Prism 6*, *t-test* (grupos F+L+, F+L- e F-L+ comparados ao grupo F-L-), com o nível de significância de 5%.

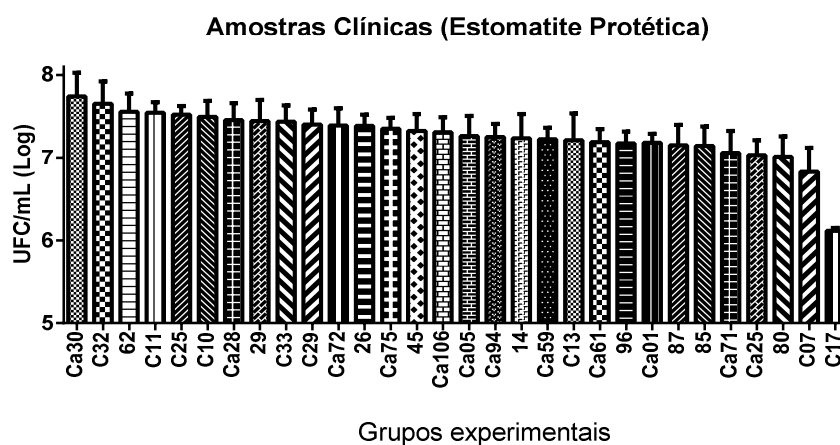
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estudo e quantificação dos biofilmes

#### 4.1.1 Formação de biofilme *in vitro* para quantificação de células viáveis

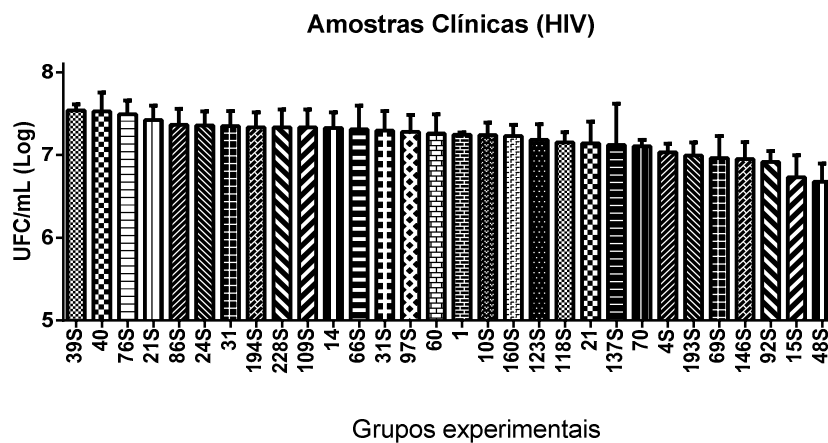
As figuras 2 e 3 mostram a média de UFC/mL e o desvio padrão da formação de biofilme *in vitro* em ordem decrescente das amostras de estomatite protética (EP) e portadores de HIV, respectivamente, para quantificação de células viáveis.

Figura 2 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL ( $\text{Log}_{10}$ ) para contagem de *C. albicans* em biofilme em ordem decrescente das 30 amostras testadas provenientes de pacientes com EP



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL ( $\text{Log}_{10}$ ) para contagem de *C. albicans* em biofilme em ordem decrescente das 30 amostras testadas provenientes de pacientes portadores de HIV

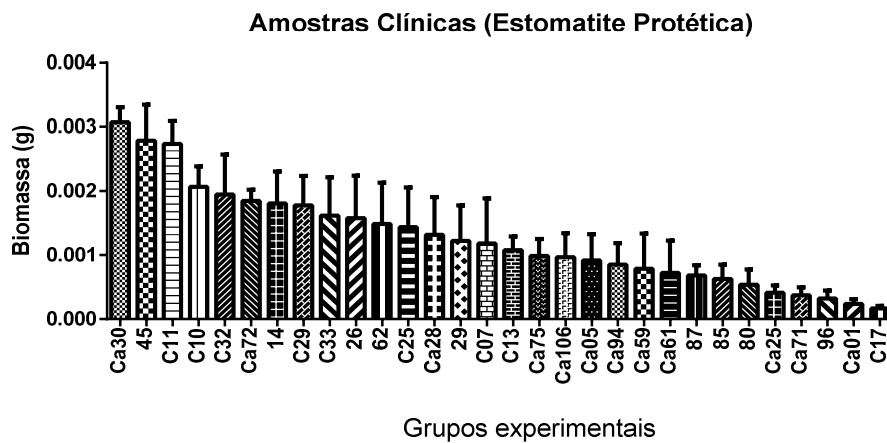


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.1.2 Análise da biomassa (peso seco)

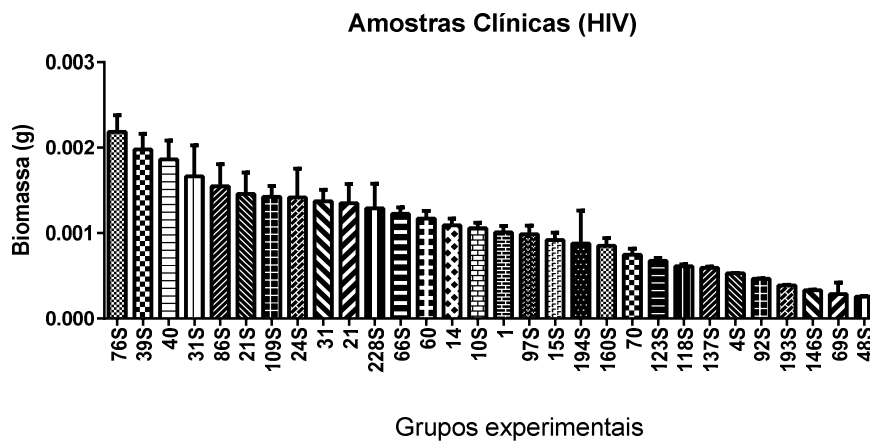
As figuras 4 e 5 mostram a média da biomassa (g) e o desvio padrão do peso seco em ordem decrescente das amostras de estomatite protética e portadores de HIV, respectivamente.

Figura 4 - Média e desvio padrão dos dados de biomassa (g) para a análise do peso seco de *C. albicans*, em ordem decrescente das 30 amostras testadas provenientes de pacientes com EP



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 - Média e desvio padrão dos dados de biomassa (g) para a análise do peso seco de *C. albicans*, em ordem decrescente das 30 amostras testadas provenientes de pacientes portadores de HIV

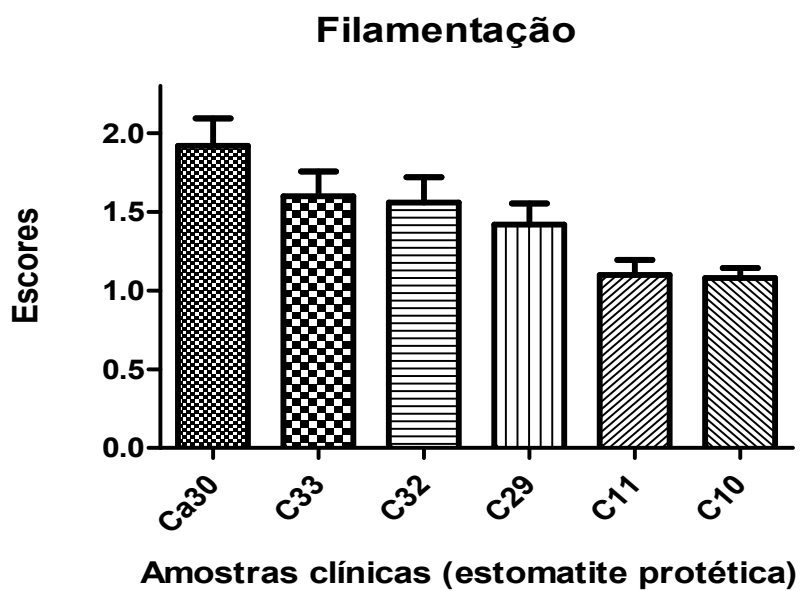


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.1.3 Estudo da filamentação

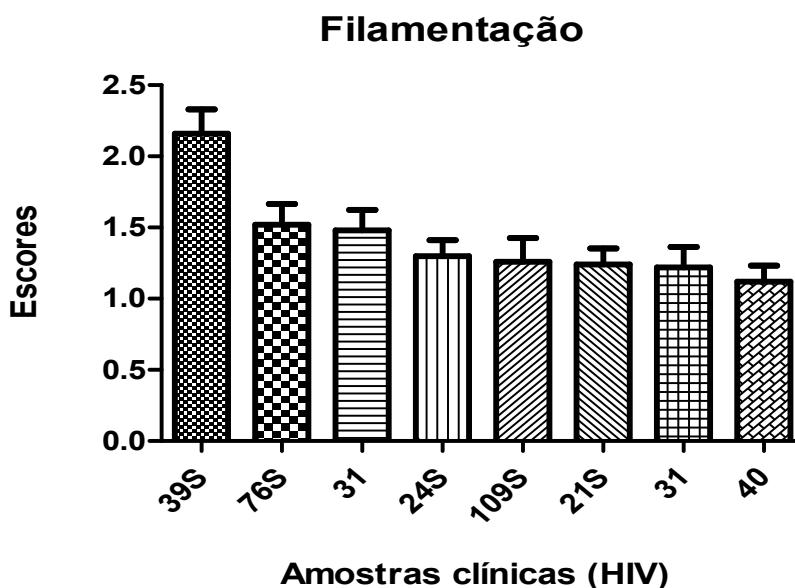
As figuras 6 e 7 mostram a média dos escores e o desvio padrão da contagem de hifas em ordem decrescente das amostras de estomatite protética e portadores de HIV, respectivamente.

Figura 6 - Média e desvio padrão dos escores para a análise da filamentação de *C. albicans*, através da contagem de hifas, em ordem decrescente das 6 amostras testadas provenientes de pacientes com EP



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 - Média e desvio padrão dos escores para a análise da filamentação de *C. albicans*, através da contagem de hifas, em ordem decrescente das 8 amostras testadas provenientes de pacientes portadores de HIV



Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras Ca30, C32, C11, C10, C33 e C29 provenientes de pacientes com EP, tiveram valores mais altos nos dois primeiros testes (Figuras 2 e 4) dentre as 10 primeiras amostras e foram as 6 amostras de EP escolhidas para o estudo da filamentação.

As amostras 39S, 40, 76S, 21S, 86S, 24S, 31 e 109S provenientes de pacientes portadores do vírus HIV, tiveram valores mais altos nos dois primeiros testes (Figuras 3 e 5) dentre as 10 primeiras amostras e foram as 8 amostras escolhidas para o estudo da filamentação.

Após a análise das figuras de 2 a 7 foram escolhidas as amostras que receberam o tratamento com a inativação fotodinâmica antimicrobiana (aPDI). Como pode-se perceber, a amostra Ca30 (proveniente de paciente com EP), obteve o primeiro lugar nos três testes realizados, considerada então, a mais virulenta e mais propícia para a realização dos futuros experimentos. A amostra 39S (proveniente de paciente portador do vírus HIV), obteve o primeiro ou segundo lugar nos testes

realizados e foi considerada também a mais virulenta para a posterior realização da aPDI e avaliação dos genes.

#### 4.2 Avaliação da eficiência dos iniciadores (*primers*) utilizados no estudo

Todos os iniciadores utilizados neste estudo apresentaram uma eficiência próxima ou igual a 100%, confirmando a validação dos *primers* e a precisão dos experimentos. Procurou-se observar em todas as curvas, eficiência ~100%, Slope ~- 3,32, coeficiente de correlação  $\geq 0,99$ . Esses dados estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Valores de Slope, correlação e eficiência da cepa de *C. albicans* ATCC 18804

<b>Iniciador</b>	<b>Slope</b>	<b>Correlação (R<sup>2</sup>)</b>	<b>Eficiência</b>
<i>ACT1</i>	-3,32	0,991	100%
<i>LSC2</i>	-3,45	0,995	92,3%
<i>RIP1</i>	-3,32	0,998	100%
<i>PMA1</i>	-3,25	0,998	103%
<i>TEC1</i>	-3,23	0,992	103,94%
<i>HWP1</i>	-3,42	0,992	96%
<i>EFG1</i>	-3,44	0,993	95,4%
<i>BCR1</i>	-3,25	0,998	102,7%
<i>ALS3</i>	-3,33	0,999	99,64%
<i>CPH1</i>	-3,34	0,997	100%

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 Concentração do RNA extraído de todas as amostras

Para o desenvolvimento da PCR em Tempo Real, buscou-se a obtenção do RNA extraído de todas as amostras (padrão e clínicas) com valores de  $A_{260/280} \sim 2,0$ , de modo que o grau de pureza necessário para o bom desempenho das reações subsequentes fosse atingido. Se o valor de  $A_{260/280} \geq 2$ , a amostra de RNA é considerada como relativamente livre de proteína. Além disso, o RNA foi purificado com a utilização de DNase I e a quantidade obtida de RNA em ng/ $\mu$ L foi suficiente ( $\geq 200$  ng/ $\mu$ L) para o processo de transcrição reversa. Esses dados podem ser observados no quadro 3.

Quadro 3 – Dosagens do RNA extraído em ng/ $\mu$ L e sua relação 260/280

(continua)

Amostra	Grupo	Dosagem (ng/ $\mu$ L)	Pureza (260/280)
ATCC18804	AM-LSR-	600,6	1,90
	AM+LSR-	1033,0	2,03
	AM-LSR+	781,6	1,99
	AM+LSR+	1013,2	2,08
	ER-LED-	539,5	1,80
	ER+LED-	1109,9	2,00
	ER-LED+	1070,9	2,01
	ER+LED+	1174,6	2,05
ATCC18804	AM-LSR-	1313,1	2,09
	AM+LSR-	521,5	1,99
	AM-LSR+	810,3	1,96
	AM+LSR+	1426,9	2,06
	ER-LED-	1709,2	2,08
	ER+LED-	1742,0	2,10
	ER-LED+	1846,5	2,06
	ER+LED+	1992,0	2,08
ATCC18804	AM-LSR-	1527,5	2,07
	AM+LSR-	1428,7	2,07
	AM-LSR+	1309,5	2,07
	AM+LSR+	1671,5	2,07
	ER-LED-	323,8	1,82
	ER+LED-	871,6	1,80
	ER-LED+	220,0	1,80
	ER+LED+	492,1	1,89

Quadro 3 – Dosagens do RNA extraído em ng/μL e sua relação 260/280

(continua)

<b>Amostra</b>	<b>Grupo</b>	<b>Dosagem (ng/μl)</b>	<b>Pureza (260/280)</b>
39S	AM-LSR-	672,0	1,80
	AM+LSR-	945,7	2,00
	AM-LSR+	251,1	1,83
	AM+LSR+	1108,0	2,01
	ER-LED-	336,6	1,88
	ER+LED-	788,0	2,04
	ER-LED+	493,6	1,99
	ER+LED+	724,7	1,95
39S	AM-LSR-	1205,9	1,98
	AM+LSR-	279,1	1,93
	AM-LSR+	767,3	1,95
	AM+LSR+	1291,1	2,03
	ER-LED-	668,9	2,06
	ER+LED-	252,7	1,92
	ER-LED+	498,3	1,99
	ER+LED+	826,0	2,02
39S	AM-LSR-	718,8	1,96
	AM+LSR-	288,4	1,95
	AM-LSR+	248,8	1,85
	AM+LSR+	958,1	1,99
	ER-LED-	694,8	1,95
	ER+LED-	554,4	2,04
	ER-LED+	875,9	1,98
	ER+LED+	895,4	2,02
Ca30	AM-LSR-	743,8	1,95
	AM+LSR-	513,0	1,96
	AM-LSR+	383,4	1,91
	AM+LSR+	610,7	1,94
	ER-LED-	259,4	2,02
	ER+LED-	691,0	2,04
	ER-LED+	687,3	2,02
	ER+LED+	342,3	2,01
Ca30	AM-LSR-	302,9	1,88
	AM+LSR-	521,3	2,05
	AM-LSR+	607,1	2,00
	AM+LSR+	852,4	1,99
	ER-LED-	1623,2	2,11
	ER+LED-	1277,7	2,09
	ER-LED+	932,7	2,13
	ER+LED+	1588,5	2,11

Quadro 3 – Dosagens do RNA extraído em ng/μL e sua relação 260/280

(conclusão)

Amostra	Grupo	Dosagem (ng/μl)	Pureza (260/280)
Ca30	AM-LSR-	267,2	1,80
	AM+LSR-	213,6	1,80
	AM-LSR+	944,6	1,92
	AM+LSR+	530,8	1,99
	ER-LED-	494,8	1,98
	ER+LED-	236,1	1,93
	ER-LED+	329,7	1,86
	ER+LED+	738,2	2,04

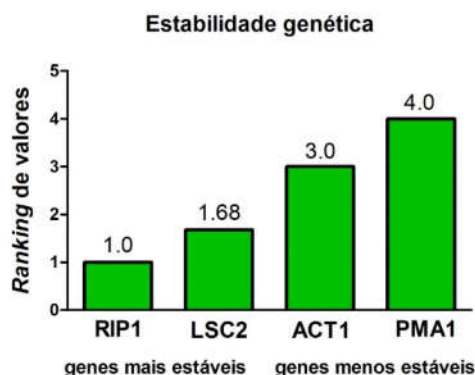
Legenda: (AM-): sem uso do azul de metileno; (AM+): utilização do azul de metileno; (ER-): sem uso da eritrosina; (ER+): utilização da eritrosina; (LSR-): sem uso do laser; (LSR+): utilização do laser; (LED-): Sem uso do LED; (LED+): utilização do LED.

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4 Seleção do gene de referência para utilização na inativação fotodinâmica utilizando-se laser com azul de metileno e LED com eritrosina

O gene de referência foi utilizado para normalizar diferenças na quantidade de cDNA que é colocado nos poços de reação da PCR e os níveis de expressão do gene normalizador devem ser semelhantes em todas as 3 amostras diferentes (ATCC 18804 e amostras clínicas 39S e Ca30), nos 4 grupos experimentais (F-L-, F+L-, F-L+, F+L+) testados. Através do site <http://www.leonxie.com/referencegene.php> e métodos Delta CT, BestKeeper, NormFinder e Genorm foi escolhido o melhor gene de referência, para o estudo da inativação fotodinâmica utilizando-se laser com azul de metileno e LED com eritrosina, conforme descrito por Silver et al. (2006), Pfaffl et al. (2004), Andersen et al. (2004) e Vandesompele et al. (2002), respectivamente. Os genes que apresentaram o menor score e variação entre as amostras para cada tratamento como descritos nas figuras 8 e 9, foram RIP1 e LSC2 para laser vermelho e LED verde, respectivamente.

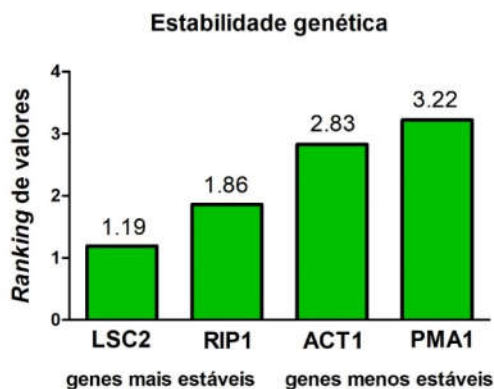
Figura 8 - Análise do gene de referência para o tratamento com laser e azul de metileno nas diferentes amostras do estudo (ATCC 18804 e amostras clínicas 39S e Ca30) e nos 4 grupos experimentais (F-L-, F+L-, F-L+, F+L+)



Legenda: Através do site <http://www.leonxie.com/referencegene.php> e métodos *Delta CT*, *BestKeeper*, *NormFinder* e *Genorm*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Análise do gene de referência para o tratamento com LED e eritrosina nas diferentes amostras do estudo (ATCC 18804 e amostras clínicas 39S e Ca30) e nos 4 grupos experimentais (F-L-, F+L-, F-L+, F+L+)



Legenda: Através do site <http://www.leonxie.com/referencegene.php> e métodos *Delta CT*, *BestKeeper*, *NormFinder* e *Genorm*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.5 Ação da inativação fotodinâmica utilizando-se laser com azul de metileno e LED com eritrosina atuando nos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1

Para elucidar os mecanismos envolvidos no tratamento com aPDI, foi avaliada a quantificação de genes de *C. albicans* relacionados à adesão, formação de biofilmes e morfogênese por qPCR (Figuras 10 a 15).

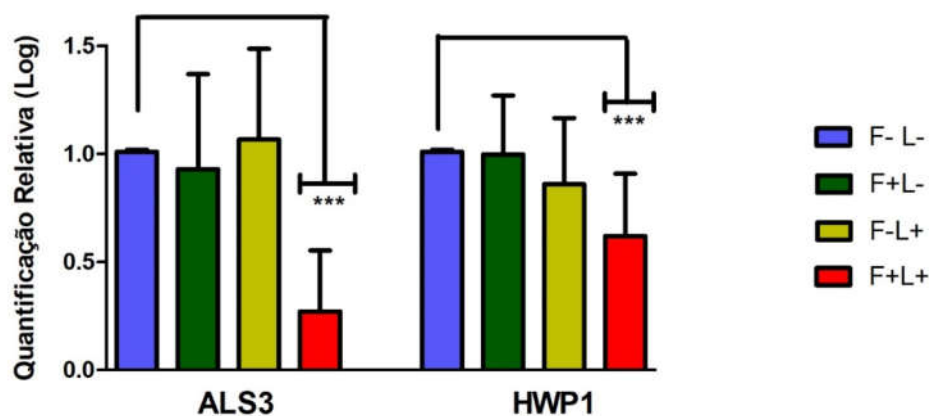
Todos os genes analisados foram sub expressos após a aPDI (grupo F+L+) e os grupos F-L+ e F+L- não demonstraram diferença significativa da expressão dos genes quando comparados com o grupo F-L-. O *fold-decrease* e os valores de *p* para os genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 estão descritos no quadro 4.

Quadro 3 – *Fold-decrease* e valores de *p* para os genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1 após o tratamento com aPDI. O *t-test* foi utilizado para comparar a expressão dos genes ( $p \leq 0,05$ )

<b>Genes</b>	<b><i>Fold-decrease</i> e valores de <i>p</i> para laser</b>	<b><i>Fold-decrease</i> e valores de <i>p</i> para LED</b>
ALS3	0,73 - P<0,0001	0,66 - P<0,0001
HWP1	0,39 - P=0,0005	0,61 - P=0,0001
BCR1	0,77 - P<0,0001	0,50 - P=0,0002
TEC1	0,71 - P<0,0001	0,43 - P=0,0182
CPH1	0,67 - P<0,0001	0,54 - P=0,0031
EFG1	0,60 - P<0,0001	0,66 - P<0,0001

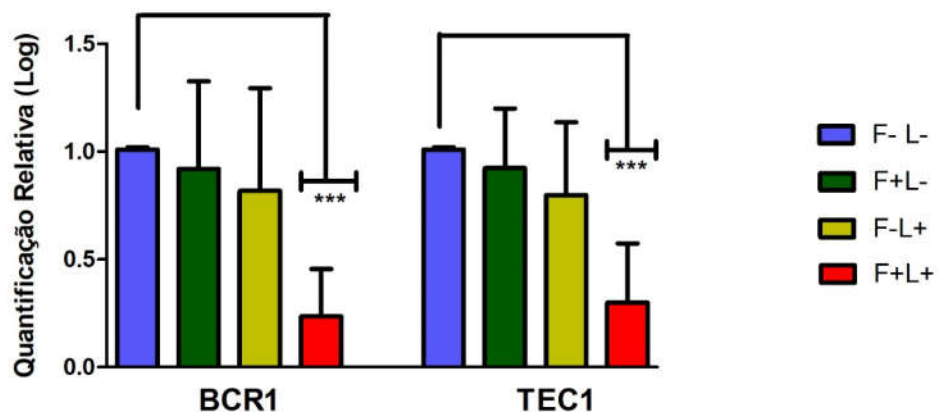
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10- Quantificação relativa (Log) da expressão dos genes de aderência (ALS3 e HWP1) do grupo controle (F-L-) através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) em relação aos grupos F+L-, F-L+ e F+L+, usando laser e azul de metileno para a aPDI. Os valores são expressos pelas médias e desvio padrão. A presença de asteriscos indica diferença estatística entre os grupos analisados ( $p \leq 0,05$ )



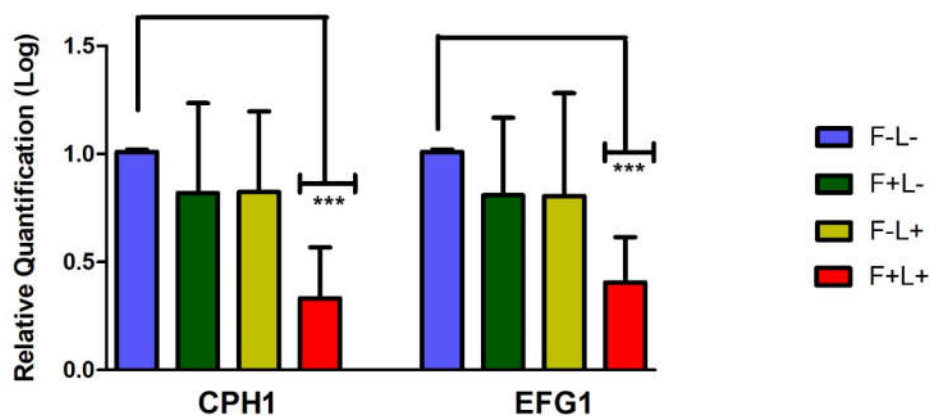
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11- Quantificação relativa (Log) da expressão dos genes de formação de biofilme (BCR1 e TEC1) do grupo controle (F-L-) através de qPCR em relação aos grupos F+L-, F-L+ e F+L+, usando laser e azul de metileno para a aPDI. Os valores são expressos pelas médias e desvio padrão. A presença de asteriscos indica diferença estatística entre os grupos analisados ( $p \leq 0,05$ )



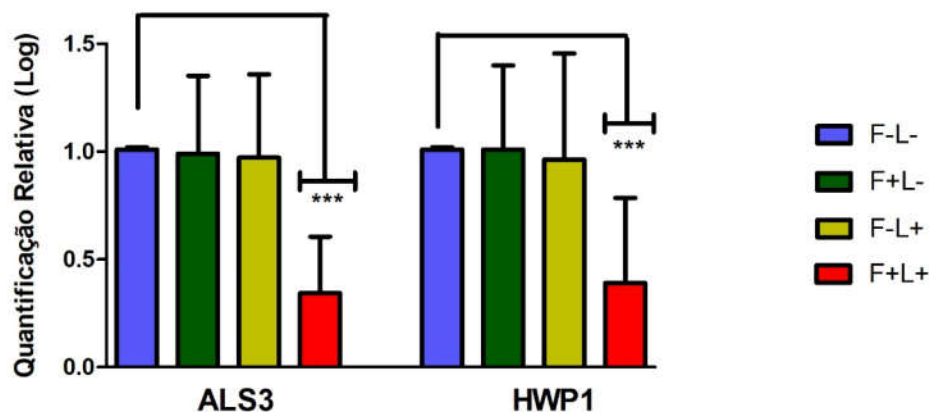
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12- Quantificação relativa (Log) da expressão dos genes relacionados à morfogênese (CPH1 e EFG1) do grupo controle (F-L-) através de qPCR em relação aos grupos F+L-, F-L+ e F+L+, usando laser e azul de metileno para a aPDI. Os valores são expressos pelas médias e desvio padrão. A presença de asteriscos indica diferença estatística entre os grupos analisados ( $p \leq 0,05$ )



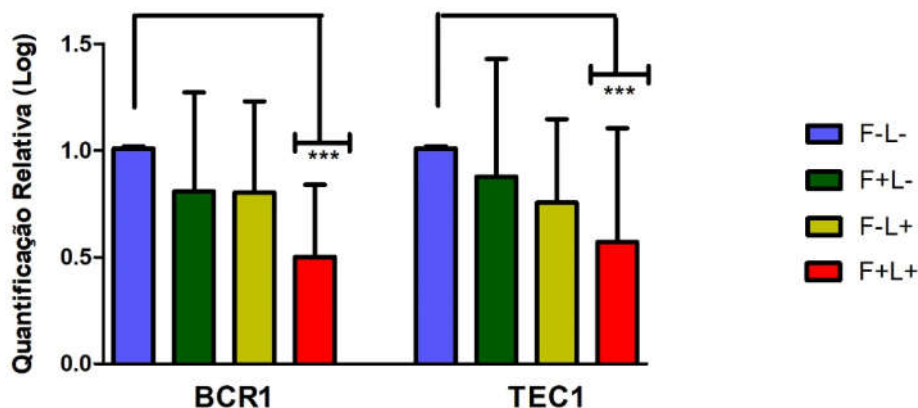
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13: Quantificação relativa (Log) da expressão dos genes de aderência (ALS3 e HWP1) do grupo controle (F-L-) através de qPCR em relação aos grupos F+L-, F-L+ e F+L+, usando LED e eritrosina para a aPDI. Os valores são expressos pelas médias e desvio padrão. A presença de asteriscos indica diferença estatística entre os grupos analisados ( $p \leq 0,05$ )



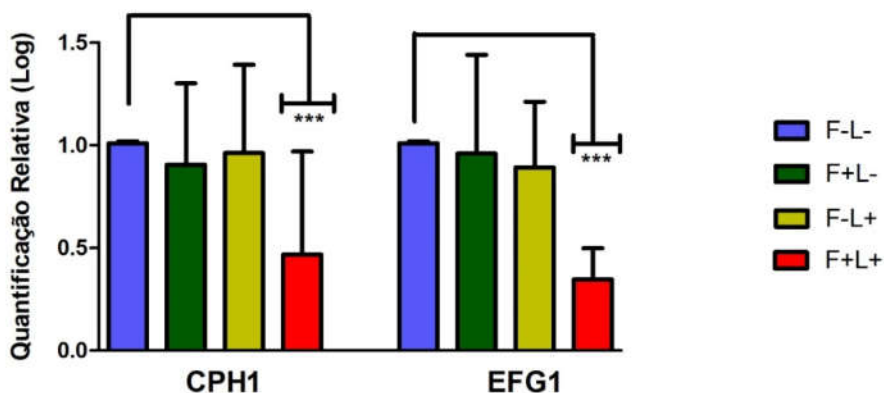
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14- Quantificação relativa (Log) da expressão dos genes de formação de biofilme (BCR1 e TEC1) do grupo controle (F-L-) através de qPCR em relação aos grupos F+L-, F-L+ e F+L+, usando LED e eritrosina para a aPDI. Os valores são expressos pelas médias e desvio padrão. A presença de asteriscos indica diferença estatística entre os grupos analisados ( $p \leq 0,05$ )



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15- Quantificação relativa (Log) da expressão dos genes relacionados à morfogênese (CPH1 e EFG1) do grupo controle (F-L-) através de qPCR em relação aos grupos F+L-, F-L+ e F+L+, usando LED e eritrosina para a aPDI. Os valores são expressos pelas médias e desvio padrão. A presença de asteriscos indica diferença estatística entre os grupos analisados ( $p \leq 0,05$ )



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5 DISCUSSÃO

*C. albicans* apresenta mecanismos específicos para o desenvolvimento de doença que superam as defesas do hospedeiro e permitem a colonização do tecido mucoso. A expressão de seus fatores de virulência pode variar dependendo do tipo de infecção (local ou sistêmica), do estágio da doença e da resposta ao hospedeiro (Naglik et al., 2003). Sabe-se que a virulência de *C. albicans* está ligada a seus fatores intrínsecos, que contribuem para o desenvolvimento de candidose. Os principais fatores de virulência incluem a expressão de adesinas na superfície da célula, a capacidade de transformação morfológica de leveduras para hifas, tigmotropismo (isto é, crescimento em relação a estímulo mecânico), formação de biofilmes, alterações fenotípicas em relação ao sítio colonizado, mecanismos de interferência com o sistema de defesa do hospedeiro e a secreção de enzimas hidrolíticas (Hube, 2004; Mayer et al., 2013).

Nesse estudo, avaliamos a ação da aPDI em amostras clínicas provenientes de pacientes com estomatite protética e de pacientes HIV positivos. A importância de analisar isolados clínicos é porque eles podem diferir em fatores de virulência. Portanto, uma caracterização detalhada de fatores de virulência de *C. albicans* é necessária não só para uma melhor compreensão do processo da infecção, mas também para a geração de compostos antifúngicos novos e mais eficazes (Luo et al., 2015). Então, foi analisada primeiramente a capacidade de 60 amostras (30 provenientes de pacientes com EP e 30 provenientes de pacientes portadores do vírus HIV) quanto a quantificação de células viáveis e produção de biomassa. Após esses dois testes, 14 amostras foram selecionadas para o teste da filamentação conforme o item 3.2.3, em material e métodos.

O objetivo da realização desses testes foi escolher as amostras mais virulentas, isoladas de EP e de pacientes portadores de HIV, para posterior aplicação de aPDI. No entanto, as amostras ficaram em posições diferentes no *ranking* dos testes e a escolha foi feita da seguinte maneira: foram escolhidas as melhores amostras de cada grupo (EP e HIV) que obtiveram os 10 maiores valores de quantificação de células viáveis e produção de biomassa nos dois primeiros testes, para o estudo da filamentação. Assim, as amostras de EP Ca30, C32, C11, C10, C33 e C29 e as

amostras de HIV 39S, 40, 76S, 21S, 86S, 24S, 31 e 109S foram as selecionadas para serem submetidas ao teste de filamentação. Destas, as amostras Ca30 e 39S foram consideradas as mais virulentas pois obtiveram a primeira ou segunda posições nos três testes realizados e foram então as escolhidas para serem submetidas à aPDI e a seguir, analisar a expressão dos genes envolvidos na adesão, formação de biofilme, e filamentação por PCR em tempo real (ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1). Como dado adicional, em um estudo realizado pelo nosso grupo utilizando algumas dessas amostras de pacientes HIV positivo, Junqueira et al. (2012) verificaram que a amostra 39S foi resistente ao antifúngico fluconazol, o que a torna ainda mais interessante de analisar qual o efeito da aPDI sobre ela.

Para o desenvolvimento da PCR em Tempo Real, buscou-se a obtenção do RNA extraído de todas as amostras (padrão e clínicas) com valores de  $A_{260/280} \sim 2,0$ , de modo que o grau de pureza necessário para o bom desempenho das reações subsequentes fosse atingido. Se o valor de  $A_{260/280} \geq 2$ , a amostra de RNA é considerada como relativamente livre de proteína. Além disso, o RNA foi purificado com a utilização de DNase I (Turbo DNase Treatment and Removal Reagents - Ambion Inc., Carlsbad, CA, USA) e a quantidade obtida de RNA em ng/ $\mu$ L foi satisfatória para o processo de transcrição reversa e suficiente ( $\geq 200$  ng/ $\mu$ L) para todo o experimento.

A normalização é um componente essencial para um confiável ensaio de PCR porque este processo controla as variações no rendimento de extração, transcrição reversa e eficiência de amplificação, permitindo assim, comparações entre concentração de mRNA em diferentes amostras. A utilização de genes de referência, como controles internos é o método mais comum para normalizar reações de PCR (Bustin et al., 2009). No entanto, embora a utilização de genes de referência seja aceita como a normalização mais adequada (Huggett et al., 2005), é impossível encontrar um gene normalizador "universal" sob todas as condições diferentes a que as células ou tecidos podem ser submetidos em diversos tipos de experimentos (Haberhausen et al., 1998; Thellin et al., 1999). Por isso, o presente estudo investigou qual é o melhor gene de referência para este experimento em particular.

Vandesompele et al. (2002), recomendam o uso de pelo menos 3 genes de referência para cada experimento. Neste trabalho foram avaliados quatro (ACT1, LSC2, RIP1 e PMA1) e os genes RIP1 e LSC2 foram os que apresentaram a menor

variação entre as amostras testadas nos tratamentos com laser vermelho e LED verde, respectivamente, e, portanto, os escolhidos para normalizar a expressão dos genes alvos.

Nailis et al. (2006), recomendam o uso da progressão geométrica para os valores obtidos com 5 genes de referência para análise de expressão gênica em *C. albicans*, normalizando eficientemente os valores obtidos na expressão relativa. Porém, investigaram a estabilidade da expressão de oito genes (ACT1, PMA1, RIP, RPP2B, LSC2, IMH3, CPA1 e GAPDH) potencialmente utilizados para estudos de expressão gênica em biofilmes de *C. albicans* e verificaram que o gene ACT1 foi o mais estável entre eles.

Em um estudo realizado pelo nosso grupo, Freire et al. (2015), investigaram o nível de expressão dos genes SAP5, LIP9 e PLB2 por PCR em tempo real, utilizando-se laser arseneto de gálio alumínio de baixa potência e azul de metileno em amostras clínicas de *C. albicans* de pacientes HIV positivos e uma cepa padrão ATCC 18804. Neste estudo foram testados os genes normalizadores ACT1, EFG1 e RPP2B, e o gene ACT1 foi, também, o mais estável nesse caso.

No presente estudo, para a verificação do gene normalizador mais estável, foi utilizado o site <http://www.leonxie.com/referencegene.php> que compilou 4 *softwares* diferentes, Delta CT, BestKeeper, NormFinder e Genorm de acordo com os seguintes autores, respectivamente: Silver et al. (2006), Pfaffl et al. (2004), Andersen et al. (2004) e Vandesompele et al. (2002) e diferentemente de Nailis et al. (2006) e Freire et al. (2015), os genes de referência mais estáveis foram RIP1 e LSC2 para os tratamentos com laser vermelho e LED verde, respectivamente.

Com o aumento do uso excessivo e inadequado de agentes antifúngicos, cepas resistentes de *C. albicans* e não-*albicans* podem ser selecionadas (Mushi et al., 2017). Esses autores realizaram uma revisão e meta-análise sobre a contribuição de *C. albicans* e de espécies não-*albicans* em causar candidose oral em pacientes portadores do vírus HIV na África Subsaariana entre 2005 e 2015. Após a análise de 13 estudos, *C. albicans* foi o isolado mais comumente encontrado (74,5%). Além disso, os autores verificaram a resistência dessas espécies ao Fluconazol e Voriconazol e *C. albicans* foi significativamente mais resistente do que as espécies não-*albicans* (44,7% vs 21,9%;  $p < 0,001$  e 104/252 vs 4/115;  $p < 0,001$ , respectivamente).

Bhattacharjee (2016), isolaram a partir de hemoculturas *Candida* spp. de 70 pacientes em um hospital em Calcutá, Índia. Das 70 amostras, 34 (48,57%) foram de *C. albicans* e dessas, 28 foram resistentes a antifúngicos, 100% ao Fluconazol, 52,94% à Flucitosina, 44,12% à Anfotericina B, 17,65% ao Itraconazol e 8,82% ao Voriconazol. Devido a esse aumento de cepas de *C. albicans* resistentes às drogas antifúngicas, a Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana vem surgido como uma opção terapêutica na redução de infecções fúngicas para melhorar o arsenal terapêutico. Adicionalmente, considera-se que o desenvolvimento da resistência a aPDI por microorganismos é um evento improvável, pois esta é considerada como um processo tipicamente multi-alvo, que é uma diferença entre aPDI e a maioria dos antifúngicos (Lyon et al., 2011).

Uma droga multi-alvo (*multitarget drug*) é um medicamento que interage com uma afinidade mais baixa do que um fármaco com um único alvo, pois é pouco provável que uma molécula que se ligará a diferentes alvos tenha uma afinidade igualmente elevada. No entanto, a baixa afinidade de ligação de medicamentos não é, aparentemente, uma desvantagem. Por exemplo, a memantina, medicamento usado para tratar a doença de Alzheimer, e outras drogas multi-alvo do receptor de NMDA não competitivo antagonista, mostram que a baixa afinidade reduz a gama de efeitos colaterais quando comparada aos medicamentos de alta afinidade (Rogawski, 2000; Lipton, 2004).

Por esses motivos, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a ação da aPDI em genes de *C. albicans* relacionados a fatores de virulência utilizando laser vermelho atuando sobre o corante azul de metileno e LED verde atuando em eritrosina. Em um de nossos trabalhos (Freire et al., 2016), foi avaliado os efeitos da aPDI sobre candidose oral em camundongos imunossuprimidos por imagem de bioluminescência. Foram utilizados como FS, azul de metileno (AM), e novo azul de metileno (NAM) combinados ou não com iodeto de potássio (KI) e laser vermelho (660 nm) com 4 doses diferentes de luz (10J, 20J, 40J e 60J). As melhores reduções de biofilme *in vitro* em UFC/ml foram: AM mais KI com 40J (2,31 logs;  $p < 0,001$ ); e NAM sem KI com 60J (1,77 log;  $p < 0,001$ ). Essas condições foram escolhidas para o tratamento *in vivo* em modelo experimental de candidose oral em camundongos. Depois de 5 dias de tratamento, a levedura foi praticamente erradicada, especialmente utilizando AM mais KI com 40J.

Pereira et al. (2015) avaliaram a ação da aPDI em culturas planctônicas e biofilmes de 48 isolados clínicos de *C. albicans* provenientes de indivíduos usuários de prótese total superior com estomatite protética. Para esse estudo, foi utilizado LED verde e eritrosina a 200  $\mu\text{M}$  e 400  $\mu\text{M}$  para culturas planctônicas e biofilmes, respectivamente. A aPDI promoveu uma redução de  $4.62 \pm 1.06 \log_{10}$  e  $1.01 \pm 0.44 \log_{10}$ , para culturas planctônicas e biofilmes, respectivamente. Além disso, os ensaios de aPDI realizados nesse estudo mostraram uma diminuição significativa na atividade enzimática e hemolítica das amostras de *C. albicans*.

Apenas um estudo foi encontrado na literatura que correlaciona a expressão de genes de *C. albicans* com aPDI (Freire et al., 2015). Este estudo foi conduzido pelo nosso laboratório e demonstrou que a inativação fotodinâmica, utilizando-se laser de gálio-alumínio-arseneto de baixa potência e azul de metileno, atuou na expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* de amostras clínicas de *C. albicans* provenientes de pacientes HIV-positivo. A diminuição na produção dessas enzimas hidrolíticas deve diminuir a virulência das leveduras, atuando em sua penetração e invasibilidade nos tecidos. No presente estudo foram avaliados os genes *ALS3*, *HWP1*, *BCR1*, *TEC1*, *CPH1* e *EFG1*, relacionados à aderência, formação de biofilme e hifas, utilizando-se duas fontes de luz e dois corantes diferentes, o que possibilitou a observação da eficiência e comparação de ambos os protocolos atuando em genes diferentes do estudo de Freire et al. (2015).

Como pode-se observar nas figuras de 10 a 15, ambos os protocolos de aPDI foram eficientes na diminuição da expressão dos genes *ALS3*, *HWP1*, *BCR1*, *TEC1*, *CPH1* e *EFG1*, sendo que a utilização de laser com azul de metileno pareceu ainda mais eficiente (todos os valores de  $p < 0,0001$ , com exceção do gene *HWP1*) do que a utilização de LED com eritrosina. Porém, em todos os casos foi obtido diferença estatística ( $p < 0,05$ ), e *Fold-decrease*  $< 2$ , indicando a eficiência dos tratamentos. Outro ponto importante a ser observado é que apenas o grupo F+L+ obteve diferença estatística quando comparado ao grupo F-L-, indicando que o corante sozinho (grupo F+L-) ou apenas a irradiação de luz (grupo F-L+) não foram capazes de sub ou super expressar os genes avaliados.

Dos genes avaliados nesse estudo, as proteínas ALS (*agglutinin-like sequence*), particularmente *ALS3*, contribuem para a formação de biofilme, mediando a invasão e dano epitelial (Liu, Filler, 2011). *ALS3* tem sido foco de investigação pois

é produzida em abundância nas superfícies de tubos germinativos e hifas (Coleman et al., 2009) promovendo uma ligação entre a função adesiva e a formação de hifas, fator de virulência importante para a patogenicidade em mucosas (Naglik et al., 2006; Zakikhany et al., 2007; Naglik et al., 2008).

O gene HWP1 (*hyphal wall protein*), codifica a principal proteína relacionada à adesão, comumente expressa no tubo germinativo e superfícies de hifas de espécies de *Candida*, ajudando na fixação às células mucosas epiteliais (Chaffin, 2008; Romeo, Criseo, 2008). Além disso, em modelo *in vivo* para formação de biofilme, propõe-se que a adesina HWP1 retém *Candida* no biofilme (Mirhendi et al., 2011).

O gene BCR1 (*biotin carboxylase*) tem papel importante e é necessário na formação de biofilme de *C. albicans*. Como um regulador positivo da adesão, BCR1 é requerido para a expressão de proteínas da superfície celular como ALS1, ALS3 e HWP1 (Nobile et al., 2006; Fanning et al., 2012). A acumulação de RNA de BCR1 é dependente do fator de transcrição TEC1 (Nobile, Mitchell, 2005), gene que atua juntamente com BCR1 para a aquisição das propriedades de aderência das hifas, uma vez que BCR1 não é requerido sozinho na morfogênese (Nobile et al., 2006). O gene TEC1 também mostrou-se necessário para a formação adequada de hifas em *C. albicans in vitro* (Schweizer et al., 2000).

A formação de biofilme é controlada por uma rede transcricional composta por seis reguladores transcricionais, incluindo EFG1, TEC1 e BCR1 (Nobile et al., 2012). EFG1 é um dos principais reguladores transcricionais que controlam a morfogênese juntamente com outros fatores de virulência não envolvidos diretamente na filamentação, como adesinas e enzimas degradativas, que também contribuem para a patogênese de *C. albicans* (Lo et al., 1997; Park et al., 2005).

Em um estudo conduzido por Chen e Lan (2015), foi demonstrado que a deleção dos genes EFG1 ou BCR1 reduziram a expressão dos genes de adesão ALS1, ALS3 e HWP1, reduzindo a formação de biofilme. Os autores afirmam, dessa maneira, que os fatores transcricionais EFG1 e BCR1 são críticos para a formação de biofilme e que EFG1 é requerido para o crescimento de hifas. Assim, a aPDI ao diminuir a expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1 e EFG1, como visto nos resultados do presente estudo, prejudica a adesão, formação de biofilme e morfogênese de *C. albicans*.

Yano et al. (2016), induzindo estomatite protética (EP) por *Candida albicans* em ratos, mostraram que os ratos inoculados com mutantes de *C. albicans* defeituosos na formação de biofilmes por exclusão de EFG1 ou BCR1, reduziram o dano ao tecido bucal, indicando diminuição da virulência. Assim, também podemos inferir que a aPDI ao diminuir a expressão desses genes contribui para que *C. albicans* se torne menos patogênica na formação e progressão de EP.

Sohn et al. (2003) constataram que, em contraste com CPH1, o gene EFG1 desempenha um papel importante por si só na transcrição de vários genes da parede celular, como HWP1, durante a morfogênese. A morfogênese desempenha um papel importante na formação de biofilme e na patogenicidade de *C. albicans*, e a deleção de CPH1 reduz o crescimento de hifas (Tsai et al., 2013). Os genes EFG1 e CPH1, como reguladores transcricionais, foram identificados como tendo papéis fundamentais e principais no controle do crescimento das hifas (Braun, Johnson, 2000; Dieterich et al., 2002) e regulação da expressão de vários genes com a função de invasão de células hospedeiras ou formação de biofilmes (Moazeni et al., 2012; Staniszewska et al., 2013).

A escolha dos genes avaliados nesse estudo foi devido a todos os fatores relatados acima considerados de suma importância na patogenicidade de *C. albicans*. Assim, uma vez que a aPDI, utilizando-se laser com azul de metileno e LED com eritrosina, promoveu a redução da expressão dos genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1 e EFG1, podemos inferir que houve a diminuição da virulência de *C. albicans*, e sugerir a melhora no quadro clínico dos pacientes HIV positivos ou com estomatite protética acometidos por candidose, se tratados com esses protocolos.

## 6 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados obtidos nesse estudo, tanto o laser atuando sobre o azul de metileno, como a eritrosina utilizada com LED, representam duas estratégias antifúngicas potenciais para o tratamento de candidose oral, uma vez que reduziram a expressão de genes relacionados a adesão (ALS3 e HWP1), formação de biofilmes (BCR1, TEC1) e morfogênese (CPH1 e EFG1) por *C. albicans*, sugerindo a diminuição de sua virulência.

## REFERÊNCIAS\*

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5245-50.

Bassetti M, Merelli M, Ansaldi F, de Florentiis D, Sartor A, Scarparo C, et al. Clinical and therapeutic aspects of candidemia: a five year single centre study. *PLoS One.* 2015 May 26;10(5):e0127534. doi: 10.1371/journal.pone.0127534.

Bhattacharjee P. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species in a tertiary care hospital, Kolkata, India. *Curr Med Mycol.* 2016 Jun;2(2):20-7. doi: 10.18869/acadpub.cmm.2.2.5.

Braun BR, Johnson AD. TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics.* 2000 May;155(1):57-67.

Broekgaarden M, Weijer R, van Gulik TM, Hamblin MR, Heger M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Rev.* 2015 Dec;34(4):643-90. doi: 10.1007/s10555-015-9588-7.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008 Sep;72(3):495-544. doi: 10.1128/MMBR.00032-07.

Chen HF, Lan CY. Role of SFP1 in the Regulation of *Candida albicans* Biofilm Formation. *PLoS One.* 2015 Jun 18;10(6):e0129903. doi: 10.1371/journal.pone.0129903.

Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Oct;23(5):377-83. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00439.x.

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

Coleman DA, Oh SH, Zhao X, Zhao H, Hutchins JT, Vernachio JH, et al. Monoclonal antibodies specific for *Candida albicans* Als3 that immunolabel fungal cells *in vitro* and *in vivo* and block adhesion to host surfaces. *J Microbiol Methods*. 2009 Jul;78(1):71-8. doi: 10.1016/j.mimet.2009.05.002.

Coogan MM, Fidel Jr PL, Komesu MC, Maeda N, Samaranayake LP. *Candida* and mycotic infections. *Adv Dent Res*. 2006 Apr 1;19(1):130-8.

Costa AC, Rasteiro VM, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. The effects of rose bengal and erythrosine mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*. 2012 Jan;55(1):56-63. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02042.x.

Costa AC, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AO. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed *in vitro*. *Mycoses*. 2013 Nov;56(6):614-22. doi: 10.1111/myc.12092.

Darwazeh AM, Al-Dwairi ZN, Al-Zwairi AA. The relationship between tobacco smoking and oral colonization with *Candida* species. *J Contemp Dent Pract*. 2010 May 1;11(3):17-24.

Das I, Nightingale P, Patel M, Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int J Infect Dis*. 2011 Nov;15(11):e759-63. doi: 10.1016/j.ijid.2011.06.006.

Dieterich C, Schandar M, Noll M, Johannes FJ, Brunner H, Graeve T, et al. *In vitro* reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. *Microbiology*. 2002 Feb;148(Pt 2):497-506.

Fanning S, Xu W, Solis N, Woolford CA, Filler SG, Mitchell AP. Divergent targets of *Candida albicans* biofilm regulator Bcr1 *in vitro* and *in vivo*. *Eukaryot Cell*. 2012 Jul;11(7):896-904. doi: 10.1128/EC.00103-12.

Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Feb;9(2):109-18. doi: 10.1038/nrmicro2475.

Finkel JS, Xu W, Huang D, Hill EM, Desai JV, Woolford CA, et al. Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. *PLoS Pathog*. 2012 Feb;8(2):e1002525. doi: 10.1371/journal.ppat.1002525.

Freire F, Costa ACBP, Pereira CA, Junior MB, Junqueira JC, Jorge AOC. Comparison of the effect of rose bengal- and eosin Y-mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2014 May;29(3):949-55. doi: 10.1007/s10103-013-1435-x.

Freire F, de Barros PP, da Silva Ávila D, Brito GN, Junqueira JC, Jorge AO. Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. *Lasers Med Sci*. 2015 Jul;30(5):1511-8. doi: 10.1007/s10103-015-1747-0.

Freire F, Ferraresi C, Jorge AO, Hamblin MR. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Jun;159:161-8. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.049.

Gaitán-Cepeda LA, Martínez-González M, Ceballos-Salobreña A. Oral candidosis as a clinical marker of immune failure in patients with HIV/AIDS on HAART. *AIDS Patient Care STDS*. 2005 Feb;19(2):70-7.

Gasparoto TH, Dionísio TJ, de Oliveira CE, Porto VC, Gelani V, Santos CF, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. *J Med Microbiol*. 2009 Jul;58(Pt 7):959-62. doi: 10.1099/jmm.0.008391-0.

Gleiznys A, Zdanavičienė E, Žilinskas J. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015;17(2):54-66.

Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun;20 Suppl 6:5-10. doi: 10.1111/1469-0691.12539.

Haberhausen G, Pinski J, Kuhn CC, Markert-Hahn C. Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. *J Clin Microbiol*. 1998 Mar;36(3):628-33.

Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016 Jul 12;33:67-73. doi: 10.1016/j.mib.2016.06.008.

Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, Schöck U, et al. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS Genet*. 2012;8(12):e1003118. doi: 10.1371/journal.pgen.1003118.

Hube B. From comensal to pathogen: stage-and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Aug;7(4):336-41.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. 2005 Jun;6(4):279-84.

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

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

Lazarin AA, Zamperini CA, Vergani CE, Wady AF, Giampaolo ET, Machado AL. *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental

photopolymerised coatings: an *in vitro* study. Gerodontology. 2014 Mar;31(1):25-33. doi: 10.1111/j.1741-2358.2012.00688.x.

Lipton AS. Turning down, but not off. Neuroprotection requires a paradigm shift in drug development. Nature. 2004;428:73.

Liu Y, Filler SG. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. Eukaryot Cell. 2011 Feb;10(2):168-73. doi: 10.1128/EC.00279-10. Epub 2010 Nov 29.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. Cell. 1997 Sep 5;90(5):939-49.

Luo S, Hipler UC, Münzberg C, Skerka C, Zipfel PF. Sequence variations and protein expression levels of the two immune evasion proteins Gpm1 and Pra1 influence virulence of clinical *Candida albicans* isolates. PLoS One. 2015 Feb 18;10(2):e0113192. doi: 10.1371/journal.pone.0113192.

Lyon JP, Moreira LM, Moraes PC, Santos FV, Resende MA. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. Mycoses. 2011 Sep;54(5):e265-71. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01966.x.

Maheshwari M, Kaur R, Chadha S. *Candida* Species Prevalence Profile in HIV Seropositive Patients from a Major Tertiary Care Hospital in New Delhi, India. J Pathog. 2016;2016:6204804. doi: 10.1155/2016/6204804.

Maiti P, Ghorai P, Ghosh S, Kamthan M, Tyagi RK, Datta A. Mapping of functional domains and characterization of the transcription factor Cph1 that mediate morphogenesis in *Candida albicans*. Fungal Genet Biol. 2015 Oct;83:45-57. doi: 10.1016/j.fgb.2015.08.004.

Malik R, Manocha A, Suresh DK. Photodynamic therapy – a strategic review. Indian J Dent Res. 2010 Apr-Jun;21(2):285-91. doi: 10.4103/0970-9290.66659.

Martins Jda S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Jan;111(1):71-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.08.012..

Martins CH, Pires RH, Cunha AO, Pereira CA, Singulani Jde L, Abrao F, et al. *Candida/Candida* biofilms. First description of dual-species *Candida albicans/C. rugosa* biofilm. Fungal Biol. 2016 Apr;120(4):530-7. doi: 10.1016/j.funbio.2016.01.013.

Mayer LF, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013 Feb 15;4(2):119-28. doi: 10.4161/viru.22913.

Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jul;58(1):190-2.

Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, et al. Differentiation of *Candida glabrata*, *C. nivariensis* and *C. braccarensis* based on fragment length polymorphism of ITS1 and ITS2 and restriction fragment length polymorphism of ITS and D1/D2 regions in rDNA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 Nov;30(11):1409-16. doi: 10.1007/s10096-011-1235-9.

Moazeni M, Khoramizadeh MR, Kordbacheh P, Sepehrizadeh Z, Zeraati H, Noorbakhsh F, et al. RNA-mediated gene silencing in *Candida albicans*: inhibition of hyphae formation by use of RNAi technology. *Mycopathologia.* 2012 Sep;174(3):177-85. doi: 10.1007/s11046-012-9539-6.

Mulu A, Kassu A, Anagaw B, Moges B, Gelaw A, Alemayehu M. Frequent detection of "azole" resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2013 Feb 12;13:82. doi: 10.1186/1471-2334-13-82.

Mushi MF, Bader O, Taverne-Ghadwal L, Bii C, Groß U, Mshana SE. Oral candidiasis among African human immunodeficiency virus-infected individuals: 10 years of systematic review and meta-analysis from sub-Saharan Africa. *J Oral Microbiol.* 2017 Jun 21;9(1):1317579. doi: 10.1080/20002297.2017.1317579.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Sep;67(3):400-28.

Naglik JR, Fostira F, Ruprai J, Staab JF, Challacombe SJ, Sundstrom P. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *J Med Microbiol.* 2006 Oct;55(Pt 10):1323-7.

Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology.* 2008 Nov;154(Pt 11):3266-80. doi: 10.1099/mic.0.2008/022293-0.

Nailis H, Coenye T, Nieuwerburgh FV, Deforce D, Nelis HJ. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2006 Aug 4;7:25.

Nailis H, Kucharíková S, Ricicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol.* 2010 Apr 16;10:114. doi: 10.1186/1471-2180-10-114.

Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol.* 2005 Jun 21;15(12):1150-5.

Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan QT, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS Pathog*. 2006 Jul;2(7):e63.

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. doi: 10.1016/j.cub.2008.06.034.

Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1-2):126-38. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.048.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373. doi: 10.1371/journal.pone.0059373.

Park H, Myers CL, Sheppard DC, Phan QT, Sanchez AA, E Edwards J, et al. Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol*. 2005 Apr;7(4):499-510. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00476.x.

Pereira CA, Costa AC, Carreira, CM, Junqueira JC, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms *in vitro*. *Lasers Med Sci*. 2013a May;28(3):859-64. doi: 10.1007/s10103-012-1175-3.

Pereira CA, Domingues N, Silva MP, Costa AC, Junqueira JC, Jorge AO. Photodynamic inactivation of virulence factors of *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis. *J Photochem Photobiol B*. 2015 Dec;153:82-9. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.029.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa ACBP, Machado AKS, Junqueira JC, Jorge AOC. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an *in vitro* study. *Lasers Med Sci*. 2011 May;26(3):341-8. doi: 10.1007/s10103-010-0852-3.

Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Pereira Costa AC, Back-Brito GN, Kaminagakura E, et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013b Aug;76(4):419-24. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.001.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004 Mar;26(6):509-15.

Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004-2008. *Diagn*

Microbiol Infect Dis. 2012 Dec;74(4):323-31. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.003.

Pierce CG, Lopez-Ribot JL. Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. Expert Opin Drug Discov. 2013 Sep;8(9):1117-26. doi: 10.1517/17460441.2013.807245.

Ribeiro FC, de Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors *in vitro* and modulates immune system in *Galleria mellonella*. J Appl Microbiol. 2017 Jan;122(1):201-11. doi: 10.1111/jam.13324.

Rogawski MA. Low affinity channel blocking (uncompetitive) NMDA receptor antagonists as therapeutic agents – towards an understanding of their favorable tolerability. Amino Acids. 2000;19(1):133-49.

Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Oct;62(2):230-3. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.014.

Samaranayake LP, Leung WK, Jin L. Oral mucosal fungal infections. Periodontol 2000. 2009 Feb;49:39-59. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00291.x.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):398-429.

Schweizer A, Rupp S, Taylor BN, Röllinghoff M, Schröppel K. The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. Mol Microbiol. 2000 Nov;38(3):435-45.

Seddiki SM, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Kunkel D. Fungal infectivities of implanted catheters due to *Candida* sp. Biofilms formation and resistance. J Mycol Med. 2015 Jun;25(2):130-5. doi: 10.1016/j.mycmed.2015.03.003.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Dis. 2008 Oct;14(7):582-90. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x.

Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. BMC Mol Biol. 2006 Oct 6;7:33.

Sohn K, Urban C, Brunner H, Rupp S. EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. Mol Microbiol. 2003 Jan;47(1):89-102.

Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Ito-Koga CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. J Photochem Photobiol B. 2006 Apr 3;83(1):34-8.

Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2010 May;25(3):385-9. doi: 10.1007/s10103-009-0706-z.

Staniszewska M, Bondaryk M, Swoboda-Kopec E, Siennicka K, Sygitowicz G, Kurzatkowski W. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz J Microbiol*. 2013 Dec 10;44(3):813-21. doi: 10.1590/S1517-83822013005000056.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. 1999 Oct 8;75(2-3):291-5.

Tsai PW, Chen YT, Hsu PC, Lan CY. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *Bio-Medicine*. 2013;3:51–64.

Underhill DM, Iliev ID. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jun;14(6):405-16. doi: 10.1038/nri3684.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun;18;3(7):RESEARCH0034.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998 Jul;42(1):13-28.

Wilson D, Thewes S, Zakikhany K, Fradin C, Albrecht A, Almeida R. et al. Identifying infection associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. *FEMS Yeast Res*. 2009 Aug;9(5):688-700. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00524.x.

Winteger MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidizinski TIE. Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007 May-Jun;40(3):272-6.

Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Jan;43(1):78-81. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.09.005.

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Apr;57(4):680-4.

Yano J, Yu A, Fidel PL Jr, Noverr MC. Transcription Factors Efg1 and Bcr1 Regulate Biofilm Formation and Virulence during *Candida albicans*-Associated Denture

Stomatitis. PLoS One. 2016 Jul 25;11(7):e0159692. doi:  
10.1371/journal.pone.0159692.

Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-Westhausen A, Holland G, Schaller M, Hube B. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. Cell Microbiol. 2007 Dec;9(12):2938-54.

**ANEXO A** – Artigo publicado: Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model

Artigo disponível em texto completo na folha seguinte:

Freire F, Ferraresi C, Jorge AO, Hamblin MR. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. J Photochem Photobiol B. 2016 Jun;159:161-8. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.049.

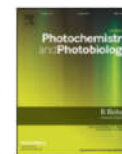
Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1016%2Fj.jphotobiol.2016.03.049>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry &amp; Photobiology, B: Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jphotobiol](http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol)Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse modelFernanda Freire<sup>a,b</sup>, Cleber Ferraresi<sup>a</sup>, Antonio Olavo C. Jorge<sup>b</sup>, Michael R. Hamblin<sup>a,c,d,\*</sup><sup>a</sup> Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA<sup>b</sup> Department of Biosciences and Oral Diagnosis, Institute of Science and Technology, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José dos Campos, São Paulo, Brazil<sup>c</sup> Department of Dermatology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA<sup>d</sup> Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology, Cambridge, MA, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 March 2016

Accepted 30 March 2016

Available online 1 April 2016

## Keywords:

Bioluminescence imaging

Luciferase

Photodynamic therapy

Oral candidiasis

*Candida albicans*

Biofilm

## ABSTRACT

Species of the fungal genus *Candida*, can cause oral candidiasis especially in immunosuppressed patients. Many studies have investigated the use of photodynamic therapy (PDT) to kill fungi *in vitro*, but this approach has seldom been reported in animal models of infection. This study investigated the effects of PDT on *Candida albicans* as biofilms grown *in vitro* and also in an immunosuppressed mouse model of oral candidiasis infection. We used a luciferase-expressing strain that allowed non-invasive monitoring of the infection by bioluminescence imaging. The phenothiazinium salts, methylene blue (MB) and new methylene blue (NMB) were used as photosensitizers (PS), combined or not with potassium iodide (KI), and red laser (660 nm) at four different light doses (10 J, 20 J, 40 J and 60 J). The best *in vitro* log reduction of CFU/ml on biofilm grown cells was: MB plus KI with 40 J (2.31 log;  $p < 0.001$ ); and NMB without KI with 60 J (1.77 log;  $p < 0.001$ ). These conditions were chosen for treating the *in vivo* model of oral *Candida* infection. After 5 days of treatment the disease was practically eradicated, especially using MB plus KI with 40 J. This study suggests that KI can potentiate PDT of fungal infection using MB (but not NMB) and could be a promising new approach for the treatment of oral candidiasis.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

A leading cause of opportunistic infections are fungal species belonging to the *Candida* genus, with *Candida albicans* ranking as the most prevalent causative agent of candidiasis and candidemia around the world [1–6]. This trend has been observed over the past decade and is still the case, even in developed countries such as the United States, Denmark, Norway, and Finland [3]. *C. albicans* is a human commensal organism, and can colonize the skin, mucosal surfaces, gastrointestinal tract and the female genitourinary tract [7]. One important factor that contributes to the pathogenesis of candidiasis is biofilm formation, as *C. albicans* has the ability to form biofilms on both inert and biological surfaces [8]. These biofilms are typically surrounded by an extracellular polymeric substance [9] which effectively shelters the fungal cells against adverse environmental conditions, including host defense mechanisms and the action of antifungal drugs [10]. Research and development of new antifungal agents is complicated by the paucity of selective microbial targets, since fungi are also eukaryotic cells [11]. In addition, drug resistance of *C. albicans* against antifungals such as azoles and echinocandins represents an increasing problem [12].

Therefore, novel antifungal and antibiofilm drugs against these unmanageable infections are urgently needed [10,11]. Photodynamic therapy (PDT) has emerged as a promising modality due to its effectiveness against a broad range of species of microorganisms regardless of drug resistance [13]. In this approach, a photosensitizing agent or dye, which is activated by a light source at a specific wavelength in the presence of oxygen, resulting in the production of reactive oxygen species (ROS) and free radicals, is administered into the infected area. These photogenerated ROS disrupt the *Candida* cytoplasmic membrane and cause an increase in cellular permeability and subsequent damage to intracellular targets. It has been suggested that this oxidative stress might compromise virulence factors of the microorganism, such as the capacity to adhere to host epithelial cells, production of proteinases, reduction of biofilms and formation of germ tubes [14–20].

Mice have been used as models to study oral *C. albicans* infections and offer some advantages over a rat model in that mice do not harbor *Candida* spp. in their buccal cavity and therefore do not elicit an adaptive immune response against this yeast [21,22]. Optimally, the detection of light from small animals containing bioluminescent cells can be achieved using a charge-coupled device (CCD) based imaging system [23] allowing real-time non-invasive monitoring of the infection.

We have found no studies in the literature that monitored oral *C. albicans* infections in mice by bioluminescence imaging after use of photodynamic therapy, which could be a therapeutic option for the treatment of oral candidiasis. PDT could be a sole treatment option, or could be used as a coadjuvant to antifungal chemotherapy, improving

Abbreviations: PDT, photodynamic therapy; MB, methylene blue; NMB, new methylene blue; PS, photosensitizers; KI, potassium iodide.

\* Corresponding author at: BAR-414, 40 Blossom St., Boston, MA 02114, USA.

E-mail address: [hamblin@helix.mgh.harvard.edu](mailto:hamblin@helix.mgh.harvard.edu) (M.R. Hamblin).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.049>  
1011-1344/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.