



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



Paula Tamião Arantes

Expressão de fatores de virulência em Candida albicans: confiabilidade dos métodos microbiológicos e efeito do tratamento fotodinâmico

Araraquara

2015



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



Paula Tamião Arantes

Expressão de fatores de virulência em Candida albicans: confiabilidade dos métodos microbiológicos e efeito do tratamento fotodinâmico

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Área de Dentística Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção de título de Mestre em Ciências Odontológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Livia Nordi Dovigo

Araraquara

2015

Arantes, Paula Tamião

Expressão de fatores de virulência em *Candida albicans*: confiabilidade dos métodos microbiológicos e efeito do tratamento fotodinâmico / Paula Tamião Arantes .-- Araraquara: [s.n.], 2015.

99 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profª. Dra. Livia Nordi Dovigo

1. *Candida albicans* 2. Fotoquimioterapia 3. Curcumina 4. Fatores de Virulência. 5. Reprodutibilidade dos testes I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

PAULA TAMIÃO ARANTES

**EXPRESSÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM CANDIDA ALBICANS:
CONFIABILIDADE DOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS E EFEITO DO
TRATAMENTO FOTODINÂMICO**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Dentística

Comissão julgadora

Presidente e orientador Prof^ª. Dr^ª. Livia Nordi Dovigo

2º Examinador Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

3º Examinador Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Araraquara, 11 de setembro de 2015

Dados Curriculares

Paula Tamião Arantes

NASCIMENTO	11/10/1982 – Ribeirão Preto – São Paulo
FILIAÇÃO	José Francisco Barbosa Arantes Teresinha Maria Tamião Arantes
2001 a 2004	Curso de Graduação em Serviço Social pela Faculdade de Ciências Humanas e Sociais de Franca – Universidade Estadual Paulista – UNESP
2007 a 2012	Curso de Graduação em Odontologia pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista – UNESP
2010 a 2011	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Dentística, no Departamento de Odontologia Restauradora pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP
2011 a 2012	Monitoria na Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e no Projeto ONCO pela mesma Disciplina e Estágio no PET na Disciplina de Prótese Parcial Removível pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP
2012 a 2013	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Prótese Total e Extra-Muros na Disciplina de Saúde Coletiva pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

2013 a 2015	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de concentração em Dentística, nível de Mestrado pela Faculdade de Odontologia de Araraquara. Universidade Estadual Paulista – UNESP
2014 a 2015	Estágio Docência nas disciplinas de Pré-Clínica em Dentística e de Bioestatística e Metodologia Científica, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2014 a 2015	Curso de Extensão em Dentística, com ênfase em Estética – FAEPO – Fundação Araraquarense de ensino e Pesquisa em Odontologia

Dedicatória

A Deus, o Criador

Louvado seja o Senhor, Criador do Universo, de todos os seres, e de todo Amor!

Obrigada Senhor pelo meu presente mais preciso, minha vida! Obrigada pela minha família e por todas as bênçãos derramadas sobre nós. Obrigada por minha saúde, e por me conceder a graça de realizar TODOS os meus sonhos. Por ter concedido a mim tantos dons, e a sabedoria para que eu viesse a desenvolvê-los para a paz, para o bem, a serviço de meu próximo, Tua imagem e semelhança.

Minha felicidade vem da imensa gratidão por permanecer sempre ao meu lado, me amparando e enviando anjos que me auxiliaram na descoberta do real motivo de minha caminhada.

Minha carreira profissional-científica, e minhas habilidades humanitárias e artísticas são para a glória e honra de Teu nome.

Agradeço a Deus, sobretudo, pelo maior presente de minha vida, por ter sido abençoada com o dom de ser mãe. Obrigada por me enviar um anjinho, minha joia que irá me ensinar a amar imensuravelmente, cuidar, e ser minha razão de ser alguém ainda melhor!

As maneiras de sentir o amor são intocáveis, invisíveis aos olhos, mas, existem por que conseguimos sentir. Assim é Deus para mim, eu o sinto pela frequência em que estamos sintonizados.

*“Tu sei bem o que me dizes, ainda que nunca me fales
Tu sei bem o que tens sentido, ainda que nunca me reveles,
Tenho andado a teu lado, junto a ti permanecido
Tu te levo em meus braços, pois sou teu melhor amigo
Ninguém te ama como eu”
Martin Valverde (Ninguém te ama como Eu)*

Dedicatória

Ao meu *Bebê*,

Que de forma surpreendente e linda veio trazer-me imensa felicidade! Sinto-me abençoada por receber a dádiva de ser mãe. Meu anjinho, que você venha ao mundo com saúde, nos traga luz e sabedoria, e seja símbolo do amor pleno e de bênçãos dos céus! Vem, meu Amor, espero por você com todo amor do mundo, presente mais que precioso, joia rara, milagre da mamãe!

"Somewhere over the rainbow

Way up high

And the dreams that you dreamed of

Once in a lullaby ii ii ii

Somewhere over the rainbow

Blue birds fly

And the dreams that you dreamed of

Dreams really do come true

Well I see trees of green and

Red roses too

I'll watch them bloom for me and you

And I think to myself

What a wonderful world"

Israel Kamakawiwo 'ole (Over The Rainbow - 1939)

"I hear babies cry, I watch them grow

They'll learn much more, than I'll never know

And I think to myself

What a wonderful world"

Louis Armstrong (What a Wonderful World - 1967)

Dedicatória

A minha Mãe *Teresinha Maria Jamião*

Palavras são insuficientes para expressar como é imenso meu amor por você, minha Rainha,
meu tudo e muito além!

*“Quantos momentos bonitos
Que o dia-a-dia nos traz
Quanta alegria e razão pra viver
Eu, você, só nós duas, pra que mais
Inesgotáveis reservas de amor
De ternura, de sonho e de paz
Tanta paixão que não dá pra esconder
Eu, você, só nós duas, pra que mais*

*E quantas vezes eu me pego admirando
Certos detalhes que eu conheço muito bem
Coisa melhor que você
Nesse mundo não tem
Sinceramente eu não encontro nem palavras pra dizer
Porque esse amor é tão demais, é tão maior, tão mais além
Coisa melhor que você
Nesse mundo não tem”.*
Roberto Carlos (Quantos Momentos Bonitos - 1982)

Dedicatória

Ao meu Pai *José Francisco Barbosa Arantes*

Pai, já não sou a menininha que te esperava no portão gritando: “meu pai!”. Eu cresci, me tornei mulher, e você continua sendo meu primeiro amor. Amor de menina, de filha para pai.

Pai

Pode ser que daqui algum tempo

Haja tempo pra gente ser mais

Muito mais que dois grandes amigos

Pai e filha talvez

...

Pai

Eu não faço questão de ser tudo

Só não quero e não vou ficar muda

Pra falar de amor pra você

...

Pai

Eu cresci e não houve outro jeito

Quero só recostar no teu peito

Pra pedir pra você ir lá em casa

E brincar de vovô com meu filho/a

No tapete da sala de estar

Pai

Você foi meu herói, meu bandido

Hoje é mais muito mais que um amigo

Nem você, nem ninguém tá sozinho

Você faz parte desse caminho

Que hoje eu sigo em paz

Fábio Jr (Pai - 1977)

Dedicatória

Aos meus avós *Afonso Tamião e Requilde Borghi Tamião* “*in
memorian*”

Onde quer que estejam, sinto a luz e o amor que vem de suas essências. Aos meus Talismãs,
Eterno Amor! Saudades de vocês que me amaram sem limites, e com quem tive a honra de
conviver e aprender tantos valores.

*“Só você que me ilumina
Meu pequeno talismã...
...Nos momentos mais difíceis
Você é meu divã
Nosso amor não tem segredos
Sabe de tudo de nós dois
E joga fora nossos medos”
Leandro e Leonardo (Talismã - 1991)*

Minha Homenagem

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. *Livia, Nordi Davigo,*

Por tudo o que envolveu a realização deste trabalho em toda sua complexidade.

Obrigada pela oportunidade deste intenso aprendizado, o qual me permitiu crescer e amadurecer. Você extraiu meu máximo com competência, e me levou a ir além de todos os meus limites. Nesta etapa de minha vida, em que você foi o pilar em minha formação profissional, além de enraizar em mim a importância da ética e responsabilidade na ciência, eu pude ampliar os horizontes do conhecimento, aguçados pela curiosidade. Assim, pude ver a vida por um diferente ângulo, transcendental, e pude superar e dar um novo significado aos acontecimentos de minha vida.

Eu levarei de você os traços da busca constante pela perfeição, a entrega a um ideal, o desenvolvimento da polivalência, e acima de tudo, a fé, atributos de um grande Mestre!

Obrigada por me confiar este trabalho, pela paciência do começo ao fim e por não ter desistido de mim. Creio que dessa maneira você me mostrou sua fé, e minha admiração e respeito por você só aumentaram! Muito obrigada por tudo!

Desejo-te luz para que você continue acreditando que vale a pena!

*"I know they will still live on and on
But how do you thank someone
Who has taken you from crayons to perfume
It isn't easy, but I'll try*

*If you wanted the sky I'd write across the sky in letters
That would soar a thousand feet high
To Sir, with love"
Lulu (To Sir, with love, 1966)*

Agradecimentos Especiais

A todos os *Mestres* da disciplina de Dentística por todos os seus ensinamentos, pela agradável convivência durante meu estágio docência, e pela preciosa contribuição profissional.

A todos os *Mestres* da Pós-graduação pelo aporte em minha formação profissional.

Aos Mestres do curso de Extensão em Dentística, Prof. Dr. *Marcelo Ferrarezi* e Prof. Dr. *Edson Campos*, pela oportunidade de aprender, desenvolver minhas habilidades e aperfeiçoar meus conhecimentos. Em especial, agradeço ao Prof. *Edinho* pelo auxílio no estágio docência, pela paciência e por me passar confiança em seus ensinamentos no curso de extensão primando pela perfeição. Agradeço pela grande contribuição em minha banca de pré-qualificação e qualificação. Obrigada pelo apoio nos momentos mais difíceis de meu mestrado, influenciando-me de forma positiva, madura e sábia. Muito obrigada pelo carinho e amizade.

A Prof^a. *Patricia Petromilli Nordi Sasso Garcia*, pela oportunidade de aprendizado em Ergonomia, e pela chance de cursar a melhor disciplina da Pós-graduação sobre a Carreira Docente.

Obrigada por auxiliar-me através de sua experiência de vida e sabedoria nos momentos em que mais precisei.

A Prof^a. Dr^a. *Elaine Maria Igavioli Massucato*, obrigada pelo apoio, pela acolhida e pelo carinho que teve para comigo durante meu Mestrado. Teu exemplo de senso de justiça, humanidade, tua energia e alegria de viver me inspiraram a facejar com mais leveza os momentos difíceis, e a compreender tudo com mais serenidade.

Ao Coordenador do Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, Prof. Dr. *Osir Batista de Oliveira Junior*, pela oportunidade de cursar e concluir este curso. Jamais vou esquecer um de seus ensinamentos: “Crescer dói”! Doeu demais, mas meu crescimento foi exponencial!

A *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP*, pela oportunidade de mudar minha história de vida, por me acolher e me permitir chegar tão longe profissionalmente, e assim, mudar a realidade de tantas pessoas que serão beneficiadas com meus conhecimentos adquiridos ao longo dos 12 anos de estudos nesta Universidade que tanto AMO. Obrigada por me proporcionar a oportunidade de estar entre “Príncipes” através de meus Mestres, e dos grandes amigos que fiz nos três campi em que pude estudar: Franca, São José dos Campos e Araraquara. Sempre escolhi a UNESP por me identificar profundamente com sua missão, especialmente, por promover maior equidade social.

A *Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, na pessoa de sua diretora, Prof^a. Dr^a. *Andréia Affonso Barretto Montadon*.

A *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pela concessão da bolsa de estudos e auxílio à pesquisa, fundamentais para o desenvolvimento deste estudo. Processo Fapesp: 2013/16677-0.

*“Enquanto todo mundo espera a cura do mal
E a loucura finge que isso tudo é normal
Eu finjo ter paciência.
O mundo vai girando cada vez mais veloz
A gente espera do mundo e o mundo espera de nós
Um pouco mais de paciência.”
Lenine (Paciência, 2006)*

Agradecimentos

A bolsista de treinamento técnico *Sarah de Annunzio*, que sem sua eficiência e dedicação, tanto no preparo dos materiais, quanto a tudo o que esteve relacionado a ele, eu jamais conseguiria concretizar este trabalho. Agradeço também às demais colaboradoras deste estudo: *Barbara, Camila e Carolina*, e a todas as pessoas relacionadas direta ou indiretamente neste estudo. Obrigada!

Aos colegas da Pós-graduação pelo apoio, incentivo, pelo carinho, e por eu poder dividir com vocês momentos de alegria, de angústia, dúvidas e certezas, em especial:

Claudia Delgado, Daniele Wajnarten, Hércules Dias, Maciel Jr.

Aos colegas de laboratório de Microbiologia aplicada pela acolhida, pelos momentos de compartilhamento, incentivo e descontração, em especial: *Geisiane Bueno,*

Jeffersson Trigo, Camila de Foggi e

Rassia Dias, muito obrigada, por me abrir as portas não só de sua casa, mas de seu coração bondoso e generoso. Por ter dado a mim a oportunidade de iniciarmos uma amizade, e a partir dela, você ter me influenciado a alçar voos mais altos. Tenho certeza de que pessoas especiais entram em nossa vida para promover o impulso que faltava para a realização de nossos sonhos. E você foi enviada, com certeza, para fazer diferença em minha vida. Obrigada pela força sempre que precisei, pela torcida, pelo carinho, e pela alegria que você me passa. E que brindemos o futuro próximo!

Aos melhores amigos que a UNESP me deu de presente, e que os longos anos de amizade me conferem essa verdade. Aos meus anjos de luz:

Priscila Freitas, querida amiga, que a Unesp de Franca me deu de presente. É uma honra fazer parte de um momento tão importante de sua vida, sendo sua madrinha de casamento! Que Deus a abençoe e que você construa no amor, uma linda família. Eu sou feliz por ver você feliz! Irmandade, amizade, presente de Deus!

Elisangela Chetelat, você minha amiga que a Unesp de São José dos Campos me presenteou com a nossa maravilhosa convivência durante a realização de nosso sonho: nossa formação em Odontologia. Agradeço por ter me emprestado tantas vezes seus ouvidos, seus ombros, e seu colo. E por ter me aberto as portas de seu coração e de sua casa, junto a sua família com tamanho carinho.

Déborah Holleben e Priscila Holleben, duas irmãs que a Unesp de São José dos Campos me presenteou! Vocês são também como irmãs para mim. Eu só tenho a agradecer pela doçura com que sempre me trataram, sempre se preocupando comigo, e estando presentes em minha vida. Vocês representam toda pureza e bondade e é por isso que eu continuo acreditando no ser humano! Lindas almas!

Willian dos Reis Silva, você foi um dos melhores presentes que a Unesp de Araraquara poderia ter me dado. Você, pessoa simples e de valores firmes, um exemplar funcionário, passou a ter um lugar especial em meu coração no decorrer desses anos. Obrigada por me amparar em tantos momentos, por me ensinar como me impor frente às adversidades, e como ser mais forte. Você, tão mais jovem que eu, e tão mais sábio, me preparou com sua amizade pura e verdadeira para eu enfrentar a vida lá fora. Sinto-me abençoada por tua amizade de valor inestimável!

Aslurshann, obrigada por ter entrado em minha vida através do Willian, e por ter estabelecido de forma tão serena e forte um vínculo de tanto afeto. Obrigada por todos os teus ensinamentos e por ter conseguido enxergar minha aura e me guiar no caminho do bem, da verdade e da luz. Fui abençoada com tua energia, sabedoria e amizade! Você é tão especial que não importa a distância, eu sinto tua energia!

Primo querido, *Luiz Carmino Avaracci*, como não te agradecer por tua atenção, carinho, torcida, amizade? A distância física nunca nos afastou, pois sei que permaneço em seu coração, assim como você permanece no meu. Obrigada por fazer parte de minha vida! A minha tia e madrinha *Margarida Barbosa Arantes* pelo carinho de sempre, por ter acompanhado e incentivado minha jornada acadêmica, desde quando me supria a vontade de aprender a matemática que a escola não foi capaz de me oferecer. A minha tia *Maria Aparecida Barbosa Arantes* e a minha Avó *Aurea Barbosa Arantes*. Obrigada pelo carinho!

Aos *Meus Pacientes*, por me concederem a honra de atendê-los, e me aprimorar, ainda, com todas as minhas dificuldades, tentando driblar o tempo e o cansaço, e o que recebi foi afeto, amizade e um sorriso.

Aos Funcionários da Faculdade de Odontologia, em especial: *Glaucia, Renan, Tarcísio, Mara, Cristiano, José Alexandre*, por sempre me atenderem com prontidão e gentileza, e aos funcionários da portaria, que sempre me

abriram as portas da Universidade gentilmente e com um sorriso no rosto, em especial:

Fábio, Paulinho e Willian.

“When she was just a girl, she expected the world

But it flew away from her reach so

She ran away in her sleep and dreamed of

Para-para-paradise, ... every time she closed her eyes”

Coldplay (Paradise, 2011)

Eder Beraldo Junior, você que foi meu companheiro durante oito anos, meu incentivador, não posso deixar de agradecer por tua generosidade e por ser um grande amigo. A Unesp de Franca nos apresentou, nós construímos um relacionamento, e nós nos tornamos um grande exemplo de como tudo pode ser transformado, com respeito e admiração. Obrigada por me dar suporte para realizar meu sonho de infância, o de ser Cirurgiã-Dentista e por se importar com a minha felicidade, por me deixar livre para que eu a buscasse, e evoluísse como profissional, como ser humano e como mulher. Obrigada pelo carinho e pelo amparo que me deu durante meu Mestrado sempre que precisei. Sou grata pela evolução que tive enquanto estivemos juntos, e por tudo de bom que levaremos em nossos corações.

“Onde quer que você vá

Seja onde for, Me leva, me leva...

Seja como for seu mundo, se você me leva eu vou”

Rastapé (Preciso do teu sorriso, 2007)

Especialmente, agradeço a **Minha Família**, minha base, meus pilares, minha oportunidade de evoluir como ser humano. A vocês, **Meus Amores**, minha eterna gratidão pela oportunidade de estar entre vocês!

Perdoem minhas falhas e minha ausência, não só nesses dois anos e meio, mas todos os anos de estudo em que priorizei minha formação profissional e não lhes dei a atenção merecida.

Sinto hoje o quanto isso influenciou nossa distância emocional, e por tantas vezes física.

Agradeço de todo coração aos meus pais: *Teresinha* e *Francisco*, pelo dom da vida, do amor e do perdão! Espero poder retribuir-lhes da melhor forma possível o amor incondicional.

Mãe, obrigada por todo suporte, especialmente na reta final. Obrigada por não me deixar cair. Só faltou mastigar por mim. Você é meu maior exemplo de força, coragem e fé!

Pai, obrigada por sempre ter uma mensagem de reflexão, por sempre tentar me abrir os olhos e por todas as vezes que você me instigou um desafio. Foi assim que eu fui chegando longe. Perdoe-me por nem sempre ter conseguido reconhecer.

Ao Meu Irmão *Eder Tamião Arantes* e Meu Sobrinho *Eder Vinicius*, só me resta estampar meu amor e carinho.

*"Honey you are the sea
Upon which I float
And I came here to talk
I think you should know
The green eyes
You're the one that
I wanted to find
Anyone who
Tried to deny you
Must be out of their mind"
Coldplay (Green eyes, 2002)*

*“Each day I live
I want to be a day to give the best of me
I’m only one, but not alone
My finest day is yet unknown
I broke my heart for ev’ry gain
To taste the sweet, I face the pain
I rise and fall, yet through it all this much remains
I want*

*One moment in time
When I’m more than I thought I could be
When all of my dreams are a heartbeat away
And the answers are all up to me
Give me one moment in time
When I’m racing with destiny
And in that one moment of time
I will feel, I will feel eternity*

*I lived to be the very best
I want it all, no time for less
I’ve laid the plans
Now lay the chance here in my hands. Give me*

*You’re a winner for a lifetime
If you seize that one moment in time
Make it shine. Give me
I will be, I will be free”
Whitney Houston (One moment in time, 1988)*

“A arte de interrogar é bem mais a arte dos mestres do que as dos discípulos; é preciso ter já aprendido muitas coisas para saber perguntar aquilo que se não sabe”.

(Jean Jacques Rousseau)

Arantes PT. Expressão dos fatores de virulência em *Candida albicans*: confiabilidade dos métodos microbiológicos e efeito do tratamento fotodinâmico. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

RESUMO

Este estudo teve por finalidade: I. estabelecer um protocolo reprodutível utilizando a metodologia dos halos de precipitação em meio Ágar para avaliação da produção de fosfolipase e proteinase pela espécie *Candida albicans* (*C. albicans*); II. analisar a expressão dos fatores de virulência de *Ca* após inativação fotodinâmica (IF) mediada pela curcumina (CUR). No primeiro estudo utilizou-se 30 isolados clínicos e uma cepa de referência de *C. albicans* para obtenção de suspensões celulares (10^8 ufc/mL) que foram plaqueadas nos meios específicos. Três variáveis independentes (nº de replicatas, cor de fundo e instrumento de leitura) originaram oito protocolos de leitura. A reprodutibilidade intra e interexaminadores da medida de produção de enzima (Pz) foi avaliada por meio do Coeficiente de Correlação Intraclassa (CCI). A enzima proteinase apresentou dois protocolos com “Boa” reprodutibilidade intraexaminador ($CCI \geq 0,71$) para todos os examinadores e o protocolo que utilizou leituras em triplicata sobre as fotografias contra luz natural atribuiu maior reprodutibilidade interexaminador para os valores de Pz-proteinase. Três protocolos com “Boa” concordância intraexaminador de Pz-fosfolipase foram selecionados para a análise interexaminador. Tanto as leituras em paquímetro como as realizadas em computador, em triplicata, mostraram reprodutibilidade “Muito Boa”. No estudo II, a concentração de CUR a $0,1\mu\text{M}$ foi utilizada associada a iluminação LED para promover dose subletal de IF. O grupo tratamento (C+L+) teve suas células fotossensibilizadas com CUR e iluminadas. O grupo controle positivo consistiu de amostras que receberam apenas CUR (C+L-), e o controle negativo não recebeu nem CUR nem luz (C-L-). A capacidade de adesão foi avaliada por meio das unidades formadoras de colônias (ufc/mL) e do método XTT. A formação de biofilme foi analisada por meio das ufc/mL, XTT e cristal violeta (CV). A capacidade de secretar enzimas degradativas foi avaliada pelo método do halo e pelo método colorimétrico. Os resultados de ufc/mL, XTT, CV foram avaliados por meio de Análise de Variância Multivariada (MANOVA) a um fator (grupo) e quando foram detectados efeitos estatisticamente significativos, utilizou-se a ANOVA para cada variável dependente. O efeito dos diferentes tratamentos sobre a produção das

enzimas foi verificado por meio da ANOVA a um fator. Quando necessário, o teste de Games-Howell foi utilizado ($\alpha=0,05$). Os resultados mostraram redução na capacidade de adesão nos grupos expostos a IF e a CUR isoladamente ($p\leq 0,001$). A IF subletal não mostrou efeito significativo ($p=0,277$) na capacidade de formar biofilme. A produção de fosfolipase avaliada por meio do método em Agar mostrou aumento significativo ($p\leq 0,001$) após a IF. Para a enzima proteinase não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,939$) entre grupos tratados e controle. A análise proveniente do teste colorimétrico não mostrou efeito dos tratamentos sobre a produção das enzimas fosfolipase e proteinase ($p=0,935$ e $0,141$, respectivamente). Após a realização dos dois estudos, pôde-se concluir que a IF mediada pela CUR não foi capaz de aumentar a expressão de fatores de virulência de *C. albicans*, o que pode ser uma vantagem dessa modalidade terapêutica.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Fotoquimioterapia. Curcumina. Fatores de Virulência. Reprodutibilidade dos testes

Arantes PT. Expression of virulence factors in *Candida albicans*: reliability of microbiological methods and effect of photodynamic treatment [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

ABSTRACT

This study aimed to: I. to establish a reproducible protocol using the agar-Based methodology to evaluate the production of the phospholipase and proteinase by the species *Candida albicans* (*C. albicans*); II. to analyze the expression of virulence factors after photodynamic inactivation (PDI) mediated by curcumin (CUR). In the first study 30 clinical isolates and a reference strain of the *C. albicans* were used to obtain cell suspensions (10^8 CFU/mL) that were plated in specific media. Three independent variables (number of replicates, background color and reading instrument) originated eight reading protocols. The intra- and inter-examiner reproducibility of the enzyme production measure (Pz) was assessed using the intraclass correlation coefficient (ICC). The enzyme proteinase presented two protocols with "good" intra-rater reproducibility ($ICC \geq 0.71$) and the readings in triplicate against natural light showed the highest inter-examiner reproducibility for Pz-proteinase values. Three protocols with 'Good' intra-rater agreement for Pz-phospholipase were selected for inter-examiner analysis. Caliper and computer readings, performed in triplicate, showed 'Very Good' reproducibility. In Study II, CUR at $0,1\mu\text{M}$ was used with LED light to promote sublethal dose of the PDI. The treatment group (C+L+) had its cells photosensitized with CUR and illuminated. The control group consisted of the samples that received only CUR (C+L-), and another which received neither CUR or light (C-L-). The adhesion ability was evaluated by means of CFU/mL and the XTT method. Biofilm formation was analyzed by means of CFU/mL, XTT and Crystal Violet (CV). The ability to secrete degradative enzymes was evaluated by the agar-based method and a colorimetric method. The results CFU/mL, XTT, CV were evaluated using a one-way multivariate analysis of the variance (MANOVA) and when statistically significant effects were detected, One-Way ANOVA was used for each dependent variable. The effect of the different treatments on the production of the enzyme was verified by One-Way ANOVA. When necessary, Games-Howell test was used ($\alpha=0.05$). The results showed a reduction in adhesion capacity in the groups exposed to PDI and CUR alone ($p \leq 0,001$). The sublethal PDI showed no significant effect ($p=0.277$) in the ability to form biofilms. The production of

phospholipase evaluated by the method on agar showed a significant increase ($p \leq 0.001$) after the PDI. For the proteinase enzyme there was no statistically significant difference ($p = 0.939$) between treated and control groups. The analysis from the colorimetric test showed no effect of treatments on the production of phospholipase and proteinase enzymes ($p = 0.935$ and 0.141 , respectively). After completion of the two studies, it was concluded that the PDI mediated by CUR was not able to increase the expression of the virulence factors of the *C. albicans* which can be an advantage of this therapy.

Keywords: *Candida albicans*, Photochemotherapy, Curcumin, Virulence factors, Reproducibility of tests

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 PROPOSIÇÃO.....	32
3 CAPÍTULOS.....	33
3.1 Capítulo 1.....	33
3.2 Capítulo 2.....	57
4 DISCUSSÃO.....	77
5 CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO.....	96

1 Introdução

1.1 Candidose e *Candida albicans*

O gênero *Candida* é constituído por cerca de 200 espécies fúngicas heterogêneas e pode estar presente em diversos nichos do corpo humano, inclusive a boca¹. Dentre as espécies que possuem capacidade de atuar como patógenos oportunistas do ser humano¹¹⁵, *Candida albicans* (*C. albicans*) é a que apresenta maior relevância por ser altamente prevalente¹⁰³, tanto em condições de normalidade como de doença. Essa espécie encontra-se distribuída na natureza de forma ampla, conseguindo ocupar diversos habitats, como a corrente sanguínea na presença de infecções^{2, 10}. As complicações de infecções causadas por *Candida* spp. em grupos vulneráveis, como pacientes hospitalizados, são de grande relevância, e, apesar do desenvolvimento de novas formas de tratamento, a resistência às drogas antifúngicas ainda ocorre, aumentando as taxas de mortalidade^{10, 52}.

Na cavidade oral, as espécies de *Candida* podem aderir-se a mucosas e bases de próteses dentais, superfícies nas quais as células se multiplicam, organizando-se em uma estrutura complexa de diversas camadas celulares envolvidas por uma matriz extracelular, formando biofilmes microbianos¹⁷. A formação do biofilme e a produção da matriz extracelular dependem da espécie de *Candida*, da cepa e das condições locais como pH, composição nutricional e presença de oxigênio^{90, 111}. A atividade metabólica de um biofilme condiz com seu grau de patogenicidade, pois indica seu crescimento, reprodução celular, produção de substâncias tóxicas e maior tolerância antimicrobiana¹⁰⁹. Dessa forma, a adesão inicial das células de *Candida* aos tecidos da mucosa bucal e em superfícies dentárias e restauradoras, e sua posterior divisão, proliferação celular e subsequente formação de biofilme estão diretamente relacionadas à virulência das espécies de *Candida* e à sua capacidade de causar patologias. Quando presente em alta concentração no biofilme dental, *C. albicans* pode inclusive estar relacionada ao processo cariogênico, pois, de acordo com Carvalho et al.¹⁴, há evidências de que a dentina cariada pode possuir alta concentração de *C. albicans* devido ao seu potencial acidogênico.

Em mucosas e bases protéticas, quando altamente concentradas, as células de *C. albicans* podem desenvolver doenças como a Candidose bucal e a orofaríngea, consideradas as infecções fúngicas mais frequentes entre humanos¹. Na cavidade oral, a candidose se manifesta em pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica, candidíase mucocutânea e queilites angulares⁹⁵. Fatores etiológicos locais como redução do fluxo salivar e uso de próteses dentais podem estar associados ao desenvolvimento da Candidose ou predispor ao seu desenvolvimento através de alterações sistêmicas comprometedoras do sistema imunológico, diminuindo os mecanismos de defesa do hospedeiro⁸¹. É por esse motivo que essa infecção apresenta alta prevalência em pacientes diabéticos, nos que fazem uso de medicamentos imunossupressores, antibióticos de amplo espectro, terapias antineoplásicas e nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)^{33, 55, 120, 123}. Em pacientes HIV positivos, a candidose oral é uma infecção comum e recorrente, afetando cerca de 90% desses pacientes. Devido à alta prevalência de candidíase, observa-se um aumento na administração de agentes antifúngicos, e consequentemente, aumento no número de casos de resistência aos medicamentos, e da prevalência das espécies não-*albicans*⁹⁵.

Atualmente, os tratamentos antifúngicos para candidose bucal e orofaríngea se baseiam na administração de medicamentos tópicos e sistêmicos. Os medicamentos de uso tópico, como nistatina, miconazol e clorexidina, são normalmente aplicados nos primeiros episódios da infecção^{6, 7, 53}; porém, a remissão de seus sinais e sintomas clínicos é normalmente observada ainda que de forma temporária na maioria dos casos. A medicação sistêmica é usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecções recorrentes⁸¹, e entre os medicamentos mais utilizados estão o fluconazol, o itraconazol e a anfotericina B^{7, 53, 81}. No entanto, a administração medicamentosa sistêmica deve ser criteriosa em razão de possíveis efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos¹⁰⁸. Além disso, um aspecto importante a ser abordado é a resistência que os antifúngicos tópicos ou sistêmicos podem acarretar nas espécies de *Candida*^{37, 82, 102, 121, 126, 127}. Wang et al.¹²⁶, afirmam, inclusive, que infecções por outras espécies, como *Candida glabrata* e *Candida krusei*, tornaram-se predominantes após introdução de dose profilática primária de fluconazol em

pacientes com leucemia e que fazem quimioterapia, e, subsequentemente, observaram também um aumento do aparecimento de *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, provavelmente devido à introdução de equinocandinas na terapêutica. Outro fator associado à resistência é a presença dos biofilmes, os quais possuem matriz extracelular e a sua complexa estrutura de organização em camadas celulares, fatores estes limitantes da penetração das drogas e protetores das células da resposta imunológica do hospedeiro^{25, 91, 111}.

Por ainda ser elevada a ocorrência de infecções fúngicas, e por apresentarem deficiências nos tratamentos atualmente disponíveis, muitas pesquisas vêm direcionando seus objetivos para o desenvolvimento de estratégias alternativas para driblar ou até mesmo equacionar o problema da resistência microbiana e, dessa maneira, tratar infecções localizadas como a candidose bucal e orofaríngea¹²⁸.

1.2 Inativação Fotodinâmica

Umas das estratégias para solucionar o problema da resistência aos agentes antifúngicos é o emprego de um fotossensibilizador (FS) associado à luz com comprimento de onda específico, denominado Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy-PDT*)¹¹⁷.

Os fotossensibilizadores eram conhecidos como medicamentos aplicados na medicina por milhares de anos até antes de 1900⁶⁹. No entanto, a base científica para tal uso foi vaga ou inexistente antes dessa data. Foi nos primórdios do século XX, através dos estudos para o tratamento da malária, que Oscar Raab relacionou a morte de um micro-organismo unicelular, a Paramecia, na presença de ar e do corante acridina após exposição solar^{68, 74}. Em 1903, Tappenier e Jodlbauer¹²⁴ experimentaram a eosina como agente fotossensibilizador devido à necessidade de desenvolver técnicas menos invasivas no tratamento de tumores, fato este de grande importância para o tratamento de vários tipos de câncer na atualidade, ainda que, apenas em 1924, tenham retomado os estudos com porfirina em tumores malignos⁸⁴. Porém, somente ao final da década de 60, foi relatado o sucesso do tratamento contra tumor em seio por meio de derivados da hematoporfirina⁵⁶, com reconhecimento dessa modalidade de tratamento apenas ao final da década seguinte^{43, 86, 112}.

A literatura científica mostra que a PDT foi intensamente investigada como alternativa para tratamento de lesões de câncer⁴¹. Contudo, ainda na década de 60, a Inativação Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Inactivation* - PDI)³⁹ ou Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana¹²⁵ surgia como uma extensão da PDT para eliminar micro-organismos patogênicos e tratar infecções. Inicialmente foi descrita a utilização da porfirina como fotossensibilizador com resultado de sucesso; no entanto, a PDI ainda representa um recente campo de investigações científicas³⁹.

Denominam-se fotossensibilizadores os compostos químicos que podem ter origem orgânica ou sintética, com características químicas, físicas, que sejam biocompatíveis e possuam um pico máximo de absorção de luz. Um fotossensibilizador também necessita ser vantajoso em relação a: baixo custo, viabilidade comercial, foto-estabilidade, alta solubilidade em água ou em derivados do sangue, alta produção de oxigênio singleto e baixos níveis de efeitos colaterais ou baixa citotoxicidade³⁴.

O processo fotodinâmico requer, inicialmente, o tratamento da célula-alvo com um FS que tenha capacidade de absorver luz, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, a fonte de luz deve ser acionada, iluminando o alvo^{19, 39, 41, 59, 125}. Esse mecanismo deve envolver a absorção de fótons dos feixes de luz pelo FS, excitando os elétrons do FS, o que, na presença de oxigênio, promove uma reação com moléculas vizinhas por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de espécies reativas, tais como H_2O_2 e 1O_2 , que possuem reatividade não específica com moléculas orgânicas, ocasionando a morte das células alvo. Isso significa que qualquer macromolécula celular pode ser um alvo em potencial para PDI, e, por isso, essa terapia pode ser vantajosa em relação aos tratamentos antifúngicos convencionais^{19, 39}. Até o momento, não foram encontrados relatos sobre o desenvolvimento de resistência dos micro-organismos após exposição à PDI.

Inúmeras investigações vêm sendo publicadas com o intuito de avaliar os efeitos antimicrobianos da PDI, inclusive na área odontológica^{30, 37, 67, 96}. Um promissor fotossensibilizador tem sido estudado para inativar micro-organismos. Extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa* L., e conhecida como açafrão-da-

índia³², o pigmento natural denominado curcumina (CUR) parece ter efeito anti-inflamatório e antimicrobiano, mesmo em concentrações baixas e associadas a breve exposição à luz, como foi observado em estudos recentes^{9, 28, 29}. Foi registrada a redução na atividade metabólica de biofilmes formados de isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* após a exposição à PDI mediada pela CUR, além da redução significativa da biomassa de biofilmes, não tendo sido obtida sua eliminação total²⁹. A sobrevivência desses fungos pode estar relacionada à complexa estrutura em multicamadas dos biofilmes, o que dificulta a penetração do FS em camadas mais profundas²⁹. Apesar disso, o efeito antifúngico observado em animais foi superior em comparação a outros FSs utilizados até o momento, ocasionando reduções superiores a 4 logs no número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de *C. albicans*³¹. Assim, pode-se dizer que a PDI mediada pela CUR pode se tornar uma alternativa para viabilizar essa técnica para o tratamento clínico de infecções fúngicas. Dessa forma, a inativação fotodinâmica de espécies de *Candida*, mediada pela CUR poderia se tornar uma alternativa ou complemento aos tratamentos convencionais.

Diante dos resultados obtidos previamente, pode-se pensar que a organização do biofilme dificulta a penetração de FS e luz nas camadas mais profundas, e as camadas de células fúngicas mais profundas podem ter sido expostas a concentrações de CUR e doses de luz subletais, impedindo assim a eliminação completa dos fungos. Ainda, a exposição subletal poderia ocasionar alterações levando tanto a uma diminuição na patogenicidade dos micro-organismos expostos como elevando sua capacidade de invadir os tecidos⁶³. A literatura pouco dispõe, atualmente, de informações sobre um possível efeito da PDI mediada pela CUR, sobre a expressão de fatores de virulência de *C. albicans*, o que poderia ter grande relevância clínica pelo fato de esses fatores estarem relacionados à capacidade de desenvolver infecção^{40, 111}.

1.3 Análise dos Fatores de Virulência

Os principais fatores de virulência identificados nas espécies de *Candida* são a adesão e a formação de biofilme em tecidos humanos e superfícies protéticas^{16, 17, 27, 89, 90} e a produção de enzimas hidrolíticas. Após colonização e invasão, as células

fúngicas são capazes de interagir com as células do hospedeiro, danificar o tecido devido à secreção de enzimas hidrolíticas e, conseqüentemente, causar infecção^{12, 57, 71, 83, 111}. Estas enzimas relacionadas à virulência de *Candida* spp. são as aspártico-proteinases e fosfolipases^{12, 57, 111}.

As enzimas aspártico-proteinases são capazes de digerir as proteínas do hospedeiro⁵⁸ e invadir os tecidos através da degradação de imunoglobulinas e proteínas da matriz extracelular^{44, 70, 99}, destruindo assim as membranas mucosas bucais, ou seja, as principais barreiras de defesa do hospedeiro¹¹¹. Alguns estudos in vitro mostram que além da *C. albicans*, outras espécies como a *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*^{46, 50, 71, 72, 83, 87, 119, 122} conseguem sintetizar proteinases.

Adicionalmente, além de enzimas proteinases, outra enzima também está relacionada à patogenicidade de *Candida* spp.¹²², conhecida como fosfolipase. A fosfolipase consegue romper a membrana celular, invadindo o interior do citoplasma das células do hospedeiro⁸⁵. Diferentemente do que está relacionado à produção de proteinase, parece haver uma divergência entre os estudos com relação à síntese de fosfolipase por *Candida* spp. Alguns autores afirmam que apenas a *C. albicans* é capaz de produzir essa enzima^{83, 101}. No entanto, foi encontrado um gene que promove a produção de fosfolipase em outras espécies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*⁵. Outro aspecto interessante a ser abordado é a possível existência de associação entre a capacidade de sintetizar essas enzimas e os demais fatores de virulência, como a capacidade de adesão⁵⁷ e produção de biofilme⁸⁷.

A análise dos fatores de virulência tem sido realizada por meio de métodos empregados em recentes investigações, e seus resultados não tem abordado um aspecto de extrema relevância em metodologia científica^{72, 85, 100, 101, 110, 111}. Resultados baseados na confiabilidade da medida raramente têm sido revelados. A confiabilidade está envolvida na precisão das medidas, ou seja, está relacionada com o quão fidedignas, consistentes e precisas são as medidas efetuadas, fornecendo, assim, a estabilidade da variável. Para que os dados possuam essas características, aspectos acerca da reprodutibilidade intra e inter-examinadores, os procedimentos realizados para o cálculo do tamanho amostral, inclusive o cegamento para a realização das medidas e das análises estatísticas, possuem

papel de grande importância. E a ausência dessas informações nos estudos acaba colocando em dúvida a credibilidade das conclusões, principalmente quando elas são baseadas em análises estatísticas inferenciais. De acordo com a Teoria do Erro^{78, 113}, toda medida possui um componente referente ao valor real e um componente de erro. Estes podem ser aleatórios ou sistemáticos. Desse modo, o treinamento dos pesquisadores previamente à execução das medidas, assim como a padronização dos procedimentos e a calibração dos equipamentos são procedimentos indispensáveis para minimizar a ocorrência de erros¹³ e agregar adequada confiabilidade aos dados obtidos. Os recentes editoriais publicados pela revista *Nature*⁹⁴ têm abordado a problemática da ausência desses critérios de análise, como a falta de reprodutibilidade nos estudos publicados, bem como a falta de calibração dos pesquisadores envolvidos na realização das medidas, se houve cálculo do tamanho amostral, e dados sobre o poder dos testes estatísticos utilizados para embasar as conclusões dos estudos.

Para que se analisem os fatores de virulência relacionados à produção de enzimas, alguns métodos baseados na medida dos halos de degradação em placas de Ágar foram propostos^{85, 100} e têm sido empregados de forma ampla na literatura^{50, 57, 71, 72, 83, 87, 110, 111, 119, 122}. A forma de aferição pode assumir um aspecto fundamental no valor da medida, podendo dificultar, nesse caso, comparações entre diferentes resultados publicados de trabalhos que fazem uso desses métodos. Existem relatos sobre a medida dos halos ter sido realizada por meio de um paquímetro digital^{50, 57, 71, 72, 83, 87, 110, 111, 119, 122}, ou com a utilização de softwares¹²². Porém, a maioria dos estudos não possui informações metodológicas a respeito de como foram realizadas as aferições dos halos de degradação e se houve algum procedimento de padronização para a realização das leituras^{50, 57, 71, 72, 83, 87}. Tendo em vista que os erros de medição podem afetar seriamente a análise estatística e a interpretação dos dados¹¹³, torna-se imprescindível avaliar a magnitude desses erros, calculando um coeficiente de confiabilidade. Essa etapa tem sido negligenciada em estudos da área de microbiologia aplicada o que pode comprometer a qualidade das informações. Portanto, avaliar a precisão das medidas efetuadas em laboratório é fundamental para reduzir a introdução de vieses que podem influenciar na variabilidade dos resultados e consequentemente no cálculo do tamanho da amostra e poder dos testes estatísticos que foram empregados.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar a confiabilidade das medidas efetuadas para a análise dos fatores de virulência e, posteriormente, analisar a expressão dos fatores de virulência da espécie *C. albicans*, em amostras submetidas a PDI mediada pela CUR.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Estabelecer um protocolo reprodutível utilizando-se a metodologia da produção de halos de precipitação em meio Ágar específico para análise da produção das enzimas degradativas fosfolipase e proteinase;
- II. Analisar a expressão dos fatores de virulência (capacidade de adesão, capacidade de formação de biofilme e a expressão de enzimas degradativas específicas) da espécie *C. albicans*, em amostras submetidas a PDI mediada pela CUR.

3 CAPÍTULOS

3.1Capítulo 1

Reliability of the agar based method to assess the production of degradative enzymes in clinical isolates of *Candida albicans**

Short title: Reliability of a method for enzyme production in *Candida*

Paula Tamião Arantes, DDS, MSc^a

Paula Volpato Sanitá, DDS, MSc, PhD^b

Carolina Santezi, DDS, MSc^a

Camila de Oliveira Barbeiro^a

Bárbara Donadon Reina^a

Carlos Eduardo Vergani, DDS, MSc, PhD^b

Lívia Nordi Dovigo, DDS, MSc, PhD^{a*}

^aDepartment of Social Dentistry, Araraquara Dental School, UNESP- Univ Estadual Paulista. Humaitá Street, 1680, 14801-903, Araraquara, SP, Brazil

^bDepartment of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP- Univ Estadual Paulista. Humaitá Street, 1680, 14801-903, Araraquara, SP, Brazil.

***CORRESPONDING AUTHOR**

Lívia Nordi Dovigo (lidovigo@foar.unesp.br)

Humaitá Street, 1680, Postal Code:14801-903, Araraquara, SP, Brazil

Phone: 55 16 33016552 Fax 55 16 33016343

Key words: Virulence factors, Reproducibility of Results, *Candida albicans*

* Artigo submetido para publicação no periódico **Medical Mycology**
 ANEXO A – Comprovante de aprovação do Comitê de Ética
 ANEXO B – Comprovante de Submissão do Artigo 1.

ABSTRACT

The aim of this study was to establish a reproducible protocol using the methodology of hyaline zones around the colonies on specific agar plates for phospholipase and proteinase production. This was an *in vitro* double-blind experiment, in which the dependent variables were the enzymatic activity measurements (Pz) for the production of phospholipase (Pz-ph) and the production of secreted aspartyl proteinases (Pz-sap). Three independent variables give rise to different measurement protocols. All measurements were carried out at two different moments by four examiners (E1, E2, E3, and E4). The minimum sample size was 30 *Candida albicans* clinical isolates. Specific agar plates for phospholipase and SAPs production were prepared according the literature. The intra and inter-examiner reproducibility for each protocol was estimated using the Intraclass Correlation Coefficient (ICC) and its confidence interval (CI_{95%}). Based on the results obtained for both phospholipase and SAPs, there appears to be no consensus on the protocol chosen for each particular examiner. Measuring the colonies in triplicate may be the main factor associated with the increase in measurement accuracy and should therefore take precedence over measuring only one colony. When only one examiner is responsible for taking measurements, a standard protocol should be put in place and the statistical calibration of this researcher should be done prior to data collection. However, if two or more researchers are involved in the assessment of agar plates, our results suggest that the protocols using software to undertake plate reading is preferred.

INTRODUCTION

Among *Candida* species that are frequently isolated from the oral cavity in humans, *Candida albicans* is still the most frequently identified¹⁻⁴ The superficial infection of the oral cavity, associated with the presence of *Candida* spp., is called oral candidiasis and is considered the most common fungal infection in humans.⁵ Besides fungal colonization, there are other etiological factors, both local and systemic, which can predispose the development of candidiasis.^{1,2,4,6,7}

Moreover, several virulence factors, associated with *Candida* species, are also responsible for promoting the pathogenicity of these microorganisms and, consequently, can interfere with the establishment and persistence of the infection⁴. Some of these factors include the ability to adhere to buccal epithelial cells and abiotic surfaces as well as biofilm production.^{8,9} The ability of *Candida* spp. to synthesize extracellular hydrolytic enzymes such as secreted aspartyl proteinases (SAPs) and phospholipases, are also considered fundamental virulence factors for these microorganisms.^{4,10-13} The SAPs can degrade a variety of proteins in the host tissues, favoring fungal adhesion and invasion.¹⁴ In addition, this enzyme is essential for destroying the first lines of defense of the oral mucosa.¹⁵ Phospholipase, usually concentrated in the extremities of hyphae,¹⁶ is also actively implicated in the invasion of the host tissues, since it causes the rupture of cell membranes, allowing the fungal cell to penetrate into the cytoplasm.¹⁷

The measurement of hyaline halos of degradation around yeast colonies on specific agar plates^{18,19} has been used in recent studies to analyze enzymatic activity.^{12,20} However, data about the consistency of the measurements, including intra- and inter-examiner reliability, are rarely mentioned. Additionally, although some studies have reported that the halos were measured by direct assessment using a caliper¹²⁻²¹ or on digital images,²² this information is usually omitted in most studies.^{3,10,11,20,23,24} The

measurement method may directly interfere in the value obtained²⁵, as well as ambient and examiner conditions. Thus, the lack of a standardized methodology makes comparison between results from different studies difficult.

According to the Error Theory, every measurement taken has one component related to the actual value and another to the error, which can be either random or systematic²⁶. The latter can seriously affect the statistical analysis and interpretation of the data²⁷, so it is essential to assess the magnitude of these errors, by calculating a reliability coefficient²⁵. Highly prestigious journals have recently discussed measures to increase the consistency and quality of information in life-sciences papers and the improvement of data reproducibility is one of them.^{28,29}. Training researchers prior to data collection, the standardization of protocols, and the calibration of equipment are vital steps to improve data reliability. This stage has been neglected in several microbiologic-related papers, which may compromise the quality of the data. Accurately assessing the virulence factors is fundamental to reduce bias that would certainly influence the result variability and, consequently, the calculation of sample size and the statistical power. Thus, this study assessed the intra- and inter-examiner reproducibility of different readings protocols using the method based on halos of degradation around the colonies on specific agar plates for enzymatic activity of *C. albicans*.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

This was an *in vitro* double-blind experiment. The dependent variables include enzymatic activity measurements (Pz) for the production of phospholipase (Pz-ph) and the production of SAPs (Pz-sap). In order to analyze Pz-ph, two independent variables were considered: i. type of instrument (Digital Caliper – DC, and Computer Program -

CP); ii. number of colony replicates (Single colony for each isolate - 1C, and Triplicate colonies for each isolate -3C). Only a black background was used behind the plates. For Pz-sap, the same variables were considered but the background color was changed (Natural light background -NL, and White background -W). Thus, the independent variables give rise to four different protocols for Pz-ph (DC/1C; DC/3C; CP/1C; CP/3C) and eight protocols for PZ-sap (DC/W/1C; DC/W/3C; DC/NL/1C; DC/NL/3C; CP/W/1C; CP/W/3C; CP/NL/1C; CP/NL/3C).

All measurements were performed by four examiners (E1, E2, E3, and E4) at two different moments, with a one-day interval between them. The sample size of 30 *C. albicans* clinical isolates was defined according to the recommendations of Bland ³⁰ ($\alpha=0.05$; $\beta=0.20$; $\rho\geq 0.51$), and a possible loss of unit samples of 10%.

Clinical isolates of *C. albicans*

This study evaluated 30 clinical isolates of *C. albicans* obtained from the yeast culture collection of the Laboratory of Applied Microbiology– UNESP – São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil. These isolates were previously obtained from dentures surfaces of non-diabetics edentulous patients with oral candidiasis.¹³ A reference strain (*C. albicans* ATCC 90028) was also used. All isolates were maintained in yeast-peptone-glucose medium (YEPD: 1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% D-glucose, and 2% agar) and frozen at -70°C until use.

Culture conditions and standardization

The microorganisms were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA; Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, USA) plates supplemented with chloramphenicol (0.05 g/l) and incubated at 37°C for 48 h. To prepare the yeast inocula,

two loopfuls of the agar cultures were transferred to 5mL of RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) medium and incubated at 37°C overnight in an orbital shaker (75 rpm). Cells of the resultant cultures were harvested and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) at 4,000 $\times g$ for five minutes. Washed microorganisms were resuspended in PBS and spectrophotometrically standardized at an optical density of 520 nm (Biospectro, Equipar Ltd, Curitiba, PR, Brazil) to a final concentration of 10^8 CFU/ml (Colony forming units per ml).²⁰

Enzymatic activity

Phospholipase production testing was performed according to the methodology of Price *et al.*¹⁸ with a few modifications. A base medium was prepared following using 10 g of peptone, 30 g of glucose, 57.3 g of sodium chloride, 0.55 g of calcium chloride, and 20 g of agar in 1 l of distilled water¹². The solution was autoclaved and, after cooling down to 50°C, the base medium was mixed with 80 ml of an egg yolk emulsion with potassium tellurite 0.15% (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, PR, Brazil). Then, 5- μ l aliquots of each cell suspension at 10^8 CFU/ml were inoculated on the egg yolk medium and plates were incubated at 37°C for seven days.²⁰

SAPs production testing was performed according to the methodology of R  chel¹⁹ with a few modifications. The test medium consisted of agar plates containing bovine serum albumin (BSA). The agar medium was prepared using 20 g of dextrose, 1 g of potassium phosphate, 0.5 g of magnesium sulfate, and 15 g of agar in 1 l of distilled water. This solution was autoclaved and cooled down to 50°C. The BSA medium was prepared using 2 g of albumin, 0.2 g of riboflavin, 0.4 g of nicotinic acid, and 0.4 g of thiamine hydrochloride in 1 l of distilled water. This solution was sterilized by filtration in

a 0.22 μm membrane and mixed with the agar medium. Five-microliter aliquots of each cell suspension at 10^8 CFU/ml were then inoculated on the plates, which were incubated at 37°C for 5 d. The proteolysis activity in the plates was visualized 24–48 h after staining with amido black solution (amido black 0.5%, glacial acetic acid 49.5%, and distilled water 50%).²³

Pz was measured as the ratio of the diameter of the colony to the total diameter of the colony plus the hyaline zone. Readings using the digital caliper (Mitutoyo Corporation, Tokyo, Japan) were taken directly on the Petri dishes, after placing the plates on predefined background. Digital images were obtained using a digital camera (Canon PC1049, Canon Inc, Japan) placed at 30 cm from plates. The Adobe Photoshop Measurement Tool (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) was used to perform readings on digital images, after set the measurement scale (cm). Four blind examiners (two with an advanced level of experience in microbiology and two beginners) performed all readings twice, with a 24-h interval between them.

Data analysis

A descriptive analysis of the data was carried out and the difference (d) between the Pz values obtained on the first and second reading were calculated, followed by the mean of differences for each examiner ($\bar{d}$) and for each protocol. The intra and inter-examiner reproducibility of the measurements for each protocol was estimated using the Intraclass Correlation Coefficient (ICC; ρ) and its confidence interval (CI_{95%}), considering the absolute agreement and two-way analysis of variance (ANOVA) model, for single and average measurements (when Pz was calculated after counting one colony and triplicate, respectively).³¹ According to the ρ value obtained, the degree of correlation between measurements was classified according to Fermanian.³²

RESULTS AND DISCUSSION

3.1 SAPs

For almost all conditions tested, intra-examiner data showed that the difference calculated for Pz-sap values between the two measurements were numerically smaller when three colonies per sample were analyzed (data not shown). The criteria proposed by Fermanian ³² suggest that ICC values ≥ 0.71 can be considered as 'Good reproducibility'. Figure 1 shows that the majority of protocols with this level of reliability was performed with triplicate readings, especially for E1, E2, and E4. On the other hand, when the measurements were taken using a computer (CP), the $CI_{95\%}$ suggested that counting a single colony or triplicate may not interfere with the intra-examiner reproducibility. However, such findings should be interpreted carefully since the $CI_{95\%}$ for the measurement protocols on a single colony were extremely imprecise, which may have caused the overlapping in the $CI_{95\%}$ limits. To our knowledge, no study has compared the consistency of Pz readings according to the measurement protocol. Some authors also have used colonies in triplicate to analyze the production of SAPs in their samples, ^{12,21,24,33-41} but this decision seems to be done arbitrarily since that no mention of the reason was found. On the other hand, some studies were carried out using a single aliquot for SAP¹¹ assessment or no information regarding the number of replicates was given in the methodology, ⁴² which is of particular concern in cases where no statistical calibrations of the researchers were taken before measurements. Overall, readings performed on digital images seemed to increased intra-examiner reproducibility while the type of background resulted in similar consistency. Our literature review identified only one study ²² that mentioned using a computer and three ^{12, 21, 43} that mentioned using a caliper, whereas several articles ^{3,10,11,24,33-39,40-42,44-56} did not mention the method used.

The two protocols (DC/W/3C and CP/NL/3C) for which the intra-examiner reproducibility was classified as, at least, good ($ICC \geq 0.71$) for all examiners were selected for the inter-examiner analysis. Using a white background when taking measurements with a caliper resulted in an $ICC=0.894$ and using a natural light background on a computer resulted in an $ICC=0.899$, both classified as good reproducibility, with the lower $CI_{95\%}$ limits also included in this classification (0.753–0.953 and 0.754–0.956, respectively). This analysis was repeated without including the E4 data, since the results of this examiner presented the lowest intra-examiner reliability. By removing E4, it was possible to estimate the reproducibility of four protocols, those whose measurements were carried out in triplicate colonies. The results are presented in Table 1. Although the four protocols resulted in ICC values classified as good, only the protocol CP/NL/3C presented the lower limit of the $CI_{95\%}$ exceeding 0.71. Thus, the protocol used to measure Pz-sap values that presented the highest reliability was the protocol that used digital photographs and took measurements on a computer, on a natural light background, and with measurements being carried out in triplicate colonies. This result once again reinforces the importance of measuring the enzymatic activity of SAPs in triplicate. It also reveals the importance of assessing the statistical calibration between the different researchers when taking the same measurement, since only one of the eight protocols assessed showed data with sufficient reliability when four different examiners were involved in performing the analyses.

3.2 Phospholipase

The ICC values showed that the protocols tested by all examiners obtained an intra-examiner reproducibility classified as good, with the only exception of DC/1C for E3 measurements, where the lower $CI_{95\%}$ limit was less than 0.71 (Figure 2). It seems that

accurate measurements were more easily obtained in the analysis of phospholipase, which may be explained by the characteristics of the colony and halos formed. The methodology used promoted the formation of large colonies and halos with well-defined borders, which did not occur in the SAPs analysis (Figure 3). Moreover, the use of egg yolk with potassium tellurite allowed the formation of dark colonies contrasting with the yellow color of the surrounding halos, which possibly improved the visualization of the halos of degradation and the accuracy of measurements. For this reason, it seems that carrying out measurements in triplicate for phospholipase is not essential to obtain adequate intra-examiner reproducibility. In the literature, few studies stated to have measured only one colony.^{11,57} On the other hand, there were more studies carried out in triplicate,^{4,12,20,21,33-38,40,55,58,59} but there was no information about the calibration of the researchers, which makes it difficult to discuss the accuracy of the measurements taken in each case.

Data also suggested that the use of digital images did not increase intra-examiner reliability in an evident manner, but the estimated ICC values showed that the protocol that maximized the intra-examiner reproducibility for all examiners was the CP/3C. Thus, taking measurements using a computer in triplicate seems to be the best protocol, which allows accurate data from different examiners.

According to the intra-examiner reproducibility results, three protocols were selected to carry out the inter-examiner analysis (Table 2). When the Pz-ph values were obtained by averaging the triplicates, the inter-examiner reproducibility of the measurements taken using both a caliper and a computer were classified as very good. The protocol CP/1C showed an ICC significantly lower than that of protocol CP/3C and its IC_{95%} limits crossed with those of DC/3C protocol on the significance threshold. Therefore, it can be considered that two Pz-ph protocols showed a greater reliability with regard to

measurements taken by different examiners, both by taking measurements in triplicate for each sample. This suggests that, although the measurements taken in triplicate were not significant with regard to the intra-examiner reliability, when measurements in the same study were taken simultaneously by different researchers, the assessment of more colonies helped increase the accuracy.

Many investigations used the agar-based methodology to assess enzymatic profile of yeast, but the examiner calibration before the readings are rarely mentioned. So, it was very difficult to make comparisons of our results and even to discuss our findings based on the literature. In general, it was accepted that differences between repeated measurements of the same sample may result from the instrument/method itself and the circumstances in which the measurements are performed, such as luminosity and the calibration of the examiner/equipment.²⁵ Based on the results obtained for both phospholipase and SAPs, there appears to be no consensus on the protocol chosen for each particular examiner. Measuring the colonies in triplicate may be the main factor associated with the increase in measurement accuracy and should therefore take precedence over measuring only one colony. When only one examiner was responsible for taking measurements, a standard protocol should be put in place and the statistical calibration of this researcher should be done prior to data collection. However, if two or more researchers are involved in the assessment of agar plates, our results suggest that the protocols using digital images to undertake plate reading is preferred.

It is important to point out that the methodology for SAPs involve staining with amido black to help visualize the halo, but despite this, the halo limits were still not easily identifiable, which probably resulted in differences between repeated readings of the same sample. This measurement issue for SAPs may explain the fact that some authors opted to use the agar plate method only to determine phospholipase and use

alternative methods such as colorimetric and fluorimetry to further investigate SAPs activity^{23,59,60-62}. It is important to highlight the importance of standardization and verification of examiner calibration prior to taking the measurements to ensure that the results are reliable. Although there are more sensitive and modern tests to investigate enzyme activity^{52,55,56,63}, the halo method is scientifically accepted,^{18, 19} frequently used,^{32,33,34,35,36,42,44-47,58,59,60,61} and its advantages lie in its low-cost and ease-of-use, so it is worthwhile to conduct studies that help obtain reliable measurements from it.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grants 2012/21251-9, 2013/16677-0.

Conflict of Interest

All authors certify that there is no conflict of interest related to this project.

REFERENCES

1. Belazi M, Velegraki A, Fleva A et al. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. *Mycoses*. 2005; 48 (3): 192-196.
2. Dorocka-Bobkowska B, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wierusz-Wysocka B, Hedzelek W, Szumala-Kakol A, Budtz-Jørgensen E. *Candida*-associated denture stomatitis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pr*. 2010; 90 (1): 81–86.
3. Motta-Silva AC, Aleva NA, Chavasco JK, Armond MC, França JP, Pereira LJ. Erythematous oral candidiasis in patients with controlled type II diabetes mellitus and complete dentures. *Mycopathologia*. 2010; 169 (3): 215-223.

4. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62(Pt 1):10-24.
5. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78 (922): 455-459.
6. Farman AG, Nutt G. Oral candida, debilitating disease and atrophic lesion of the tongue. *J Biol Buc*. 1976; 4 (3): 203-226.
7. Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. *J Am Geriatr Soc*. 2002; 50 (3): 535-543.
8. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001; 183 (18): 5385-5394.
9. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005; 4 (4): 633-638.
10. Pinto E, Ribeiro IC, Ferreira NJ, Fortes CE, Fonseca PA, Figueiral MH. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37 (10): 587-592.
11. Rajendran R, Robertson DP, Hodge PJ, Lappin DF, Ramage G. Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type 1 diabetes. *Mycopathologia*. 2010; 170 (4): 229–235.
12. Sanitá PV, Zago CE, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Enzymatic activity profile of a Brazilian culture collection of *Candida albicans* isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. *Mycoses*. 2014; 57 (6): 351-357.

13. Sanitá PV, Zago CE, Mima EG, et al. In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of non-*albicans* *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014; 118 (1): 84-91.
14. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases. *Curr Top Med Mycol*. 1996; 7 (1): 55-69.
15. Naglik JR, Newport G, White TC, et al. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun*. 1999; 67 (5): 2482–2490.
16. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia*. 1984; 22 (3): 201-207.
17. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*, separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia*. 1985; 23 (1): 47-54.
18. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate methods for detection of phospholipase activity in *C. albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20 (1): 7-14.
19. Rüchel R. Proteinases of pathogenic fungi. *Mycoses*. 1999; 42 (1): 48-52.
20. Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TIE, Azeredo J, Oliveira R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia*. 2010; 169 (3): 175–182.
21. Thiele MC, Carvalho Ade P, Gursky LC, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. The role of candidal histolytic enzymes on denture-induced stomatitis in patients living in retirement homes. *Gerodontology*. 2008; 25 (4): 229-236.
22. Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol*. 2007; 56 (10):1393-1398.

23. Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102 (5): 632-638.
24. Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, de Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*. 2006; 161 (4): 219-223.
25. De Vet HC, Terwee CB, Knol DL, Bouter LM. When to use agreement versus reliability measures. *J Clin Epidemiol*. 2006; 59 (10): 1033-1039.
26. Hair JF, Tatham RL, Anderson RE, Black W. *Multivariate Data Analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall; 1998.
27. Shoukri MM, Asyali MH, Donner A. Sample Size Requirements for the Design of Reliability Study: Review and New Results. *Stat Methods Med Res*. 2004; 13 (4): 251-271.
28. Announcement: Reducing our irreproducibility. *Nature* 2013; 398.
29. McNutt M. Journals unite for reproducibility. *Science*. 2014; 346 (6210): 679.
30. Bland M. *An Introduction To Medical Statistics*, 3^a ed, Oxford University Press, Great Britain; 2000.
31. McGraw KO, Wong SP. Forming inferences about some intraclass correlation coefficients. *Psychol Methods*. 1996; 1 (1): 30-46.
32. Fermanian J. Measure of agreement between two judges: Quantitative case. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 1984; 32 (6): 408-413 [in French].
33. D'Eça Júnior A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, Figueiredo PMS, Monteiro CA. *In vitro* differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44 (3): 334-338.

34. De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabrò M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiologica*. 2012; 35 (4): 459-468.
35. Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002; 45 (5-6): 160–165.
36. Khan A, Ahmad A, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Ocimum sanctum essential oil inhibits virulence attributes in *Candida albicans*. *Phytomedicine*. 2014; 21 (4): 448–452.
37. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindós G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses*. 2009; 54 (4): 10–16.
38. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med*. 2011; 11 (119): 1-7.
39. Noumi E, Snoussi M, Hentati H, et al. Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains. *Mycopathologia*. 2010; 169 (4): 269–278.
40. Santos PO, Melo JO, Ponzzes CMPBS, et al. Multilocus enzyme electrophoresis analysis and exoenzymatic activity of *Candida albicans* strains isolated from women with vaginal candidiasis. *Mycoses*. 2012; 55 (1): 64–72.
41. Sardi JACO, Duque C, Fling JFHO, Gonçalves RB. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Med Mycol*. 2012; 50 (5): 467–475.
42. Mane A, Pawalle C, Gaikwad S, Bembalkar S, Risbud A. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. *Med Mycol*. 2011; 49 (5): 548–551.

43. Ramos LS, Barbedo LS, Braga-Silva LA et al. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol.* 2015; 32 (2):122-125.
44. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *Inter J Microbiol.* 2014; (2014): 1 – 6. id: 456878.
45. Boriollo MFG, Bassi RC, Nascimento CMGS, et al. Distribution and hydrolytic enzyme characteristics of *Candida albicans* strains isolated from diabetic patients and their non-diabetic consorts. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24 (6): 437–450.
46. Costa CR, Passos XS, Hasimoto e Souza LK, Lucena PA, Fernandes OFL, Silva MRR. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2010; 52 (3): 139-143.
47. Karaman M, Firinci F, Karaman O, Uzuner N, Bahar IH. Long-term oropharyngeal colonization by *C. albicans* in children with cystic fibrosis. *Yeast.* 2013; 30 (11): 429–436.
48. Martins JS, Junqueira JC, Faria RL, 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; 111 (1): 71-77.
49. Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Guazzelli LS, Oliveira FM, Severo LC. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013; 46 (3): 340-342.
50. Menezes TOA, Gillet LCS, Menezes SAF, et al. Virulence Factors of *Candida albicans* Isolates from the oral cavities of HIV-1-positive patients. *Curr HIV Res.* 2013; 11 (4): 304-308.

51. Pereira CA, Costa ACBP, Machado AKS, et al. Enzymatic activity, sensitivity to antifungal drugs and baccharis dracunculifolia essential oil by *Candida* strains Isolated from the oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mouths and nipples. *Mycopathologia*. 2011; 171 (2):103–109.
52. Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V, Hemapriya J, Kannan R. Virulence factors and anti-fungal sensitivity pattern of *Candida* ssp. isolated from HIV and TB patients. *Indian J Microbiol*. 2011; 51 (3): 273–278.
53. Riceto EBM, Menezes RP, Penattic MPA, Pedroso RS. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol*. 2015; 32 (2):79-82.
54. Ying S, Qing S, Chunyang L. The effect of gentian violet on virulent properties of *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2010; 169 (4): 279–285.
55. Zheng H, Yu Y-S. TOP2 gene is involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *Mol Cell Biochem*. 2012; 364 (1-2): 45–52.
56. Tay ST, Zainalabidin AI, Hassan H, Ng KP. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal of susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. *Med Mycol*. 2011; 49 (5): 556–560.
57. Pakshir K, Zomorodian K, Karamitalab M, Jafari M, Taraz H, Ebrahimi H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *J Mycol Med*. 2013; 23 (2): 113—118.
58. Calamari SE, Bojanich MA, Barembaum SR, Berdicevski N, Azcurra AI. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*. 2011; 16 (1): 23-28.
59. Kumar R, Shukla PK. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. *Fungal Biol*. 2010; 114 (2-3): 189 – 197.

60. Antony G, Saralaya V, Bhat KG, Shenoy MS, Shivananda PG. Effect of phenotypics witch in gon expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in diabetic patients. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26 (3): 202–205.
61. Cordeiro RA, Nogueira GC, Brilhante RSN, et al. Farnesol inhibits *in vitro* growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related exoenzymes. *Vet Microbiol.* 2012; 159 (3-4): 375–380.
62. Ramage G, Coco B, Sherry L, Bagg J, Lappin DF. *In vitro* *Candida albicans* biofilm induced proteinase activity and SAP8 expression correlates with *in vivo* denture stomatitis severity. *Mycopathologia.* 2012; 174 (1): 11–19.
63. Silva-Rocha WP, Lemos VLB, Svidiziski TIE, Milan EP, Chaves GM. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. *BMC Oral Health.* 2014; 14: 20.

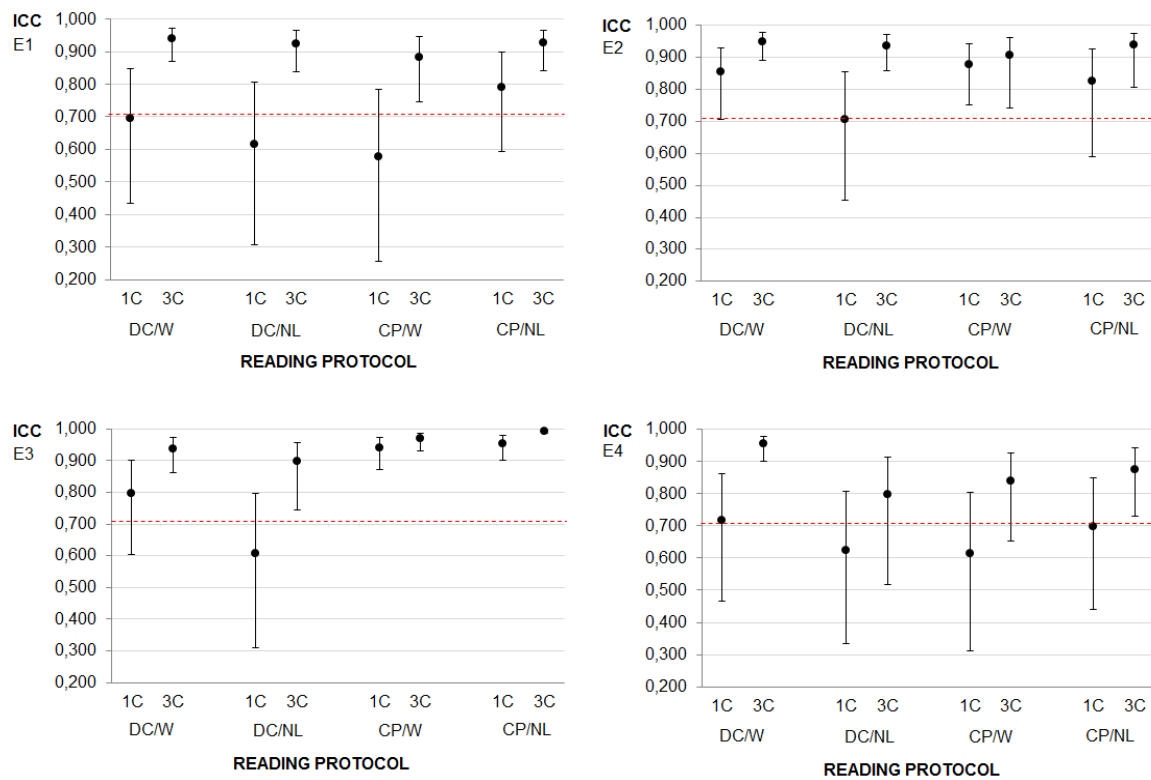


Figure 1: Values obtained for the intraclass correlation coefficient (ICC) and respective confidence interval (CI_{95%}) for the analysis of the intra-examiner reproducibility of Pz-sap values for each measurement protocol and for each examiner (E1, E2, E3, and E4). The dotted line indicates the value of 0.71, which was the criterion adopted as the minimum ICC value to be considered as 'good reproducibility' (according to Fermanian, 1984).²⁹

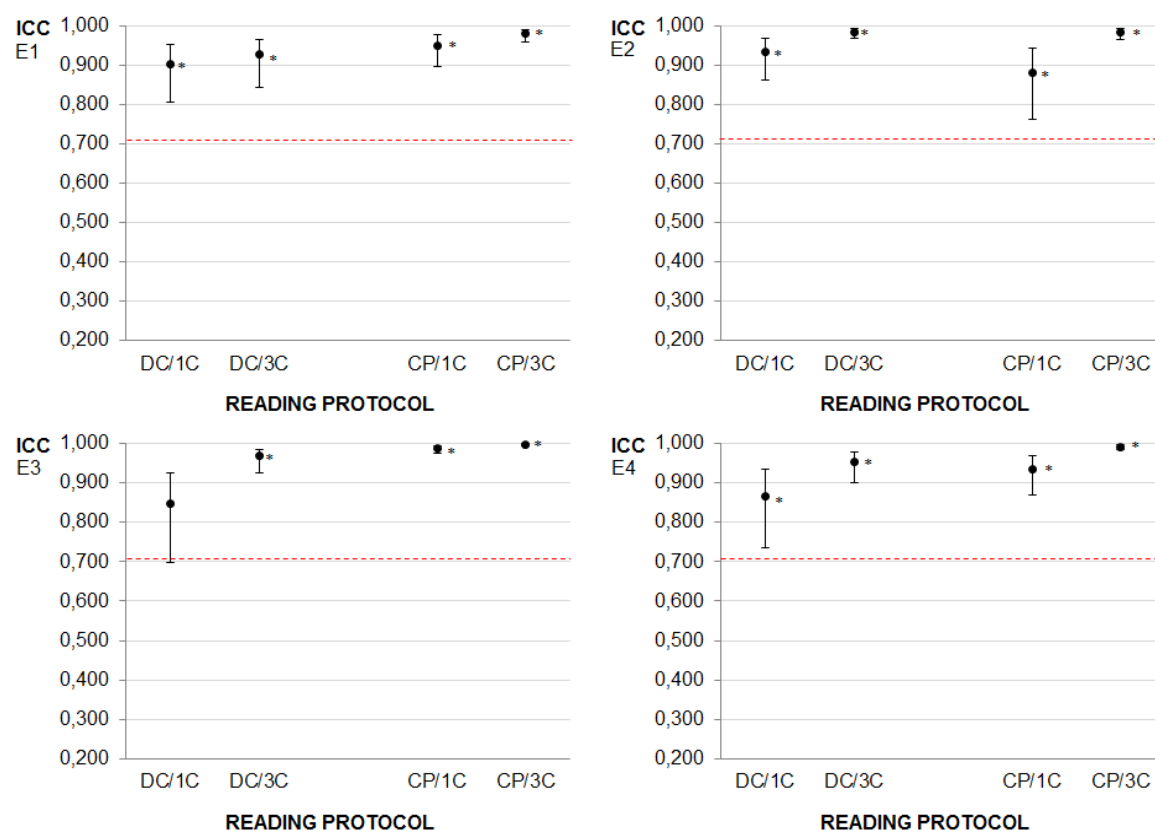


Figure 2: Values obtained for the intraclass correlation coefficient (ICC) and respective confidence interval (IC_{95%}) for the analysis of the intra-examiner reproducibility of Pz-ph values for each measurement protocol and for each examiner (E1, E2, E3, and E4). The dotted line indicates the value of 0.71, which was the criterion adopted as the minimum ICC value to be considered as 'good reproducibility' (according to Fermanian, 1984).²⁹

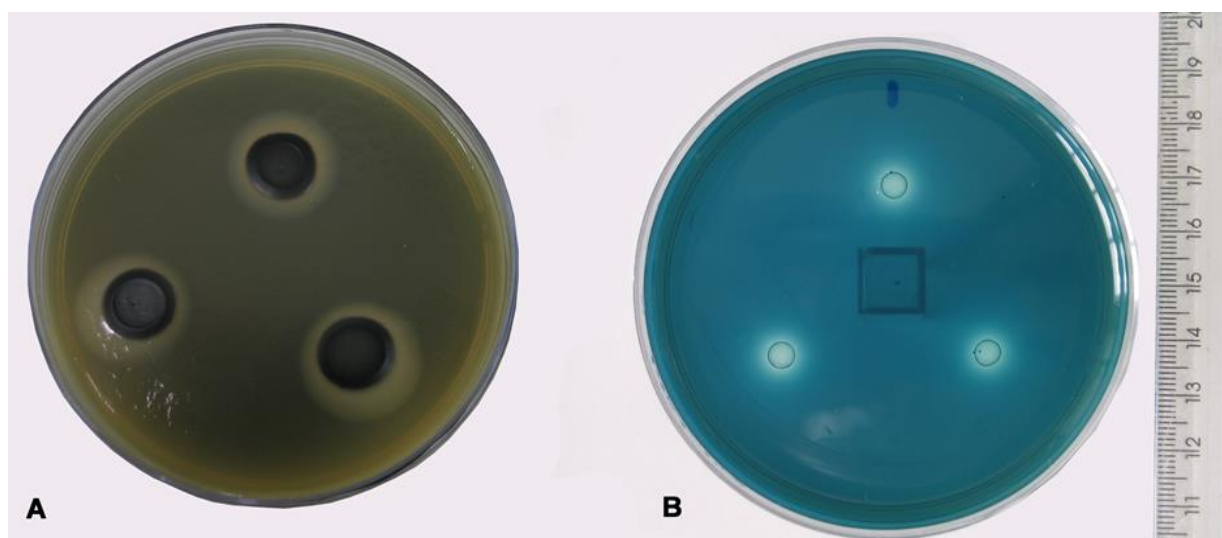


Figure3: Images of the samples assessed for the production of phospholipase (A) and SAPs (B)

Table 1: Values obtained for the intraclass correlation coefficient (ICC) for the analysis of inter-examiner reproducibility ($E1 \times E2 \times E3$) for four different protocols to measure the production of protease (Pz-sap) and their respective confidence interval ($CI_{95\%}$)

Protocol	ICC	$CI_{95\%}$
DC/W/3C	0.870	0.603–0.949
DC/NL/3C	0.786	0.560–0.899
CP/W/3C	0.776	0.217–0.920
CP/NL/3C	0.924	0.825–0.966

DC: digital caliper; CP: computer program; W: white background; NL: natural light background; 3C: Pz values by measuring three colonies of the same sample.

Table 2: Values obtained for the intraclass correlation coefficient (ICC) for the analysis of the inter-examiner reproducibility ($E1 \times E2 \times E3 \times E4$) for three different protocols to measure the production of phospholipase (Pz-ph) and its respective confidence interval ($CI_{95\%}$)

Protocol	ICC	$CI_{95\%}$
DC/3C	0.951	0.913 - 0.975
CP/1C	0.853	0.761 - 0.920
CP/3C	0.975	0.954 - 0.987

* DC: digital caliper; CP: computer; 1C: Pz-ph values obtained on one colony per sample; 3C: Pz-ph values obtained by counting three colonies from the same sample.

3.2 Capítulo 2

Virulence factors of Candida albicans after Curcumin-mediated photodynamic treatment.*

Paula Tamião Arantes, DDS¹

Carolina Santezi, DDS, MSc¹

Ana Cláudia Pavarina²

Vanderlei Salvador Bagnato³

Paula Volpato Sanitá Dantas, DDS, MSc, PhD²

Lívia Nordi Dovigo, DDS, MSc, PhD¹

¹Department of Social Dentistry, Araraquara Dental School, UNESP- Univ Estadual Paulista

²Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP- Univ Estadual Paulista

³Institute of Physics of São Carlos School, USP – Univ São Paulo.

CORRESPONDING AUTHOR

Lívia Nordi Dovigo (lidovigo@foar.unesp.br)

Assistant Professor - Biostatistics

Department of Social Dentistry, Araraquara Dental School, Univ Estadual Paulista - UNESP

Phone: 55 16 33016552 Fax 55 16 33016343

Humaitá Street, 1680, Postal Code:14801-903, Araraquara, SP, Brazil

ABSTRACT

Candida albicans use virulence factors such as the capacity for adhesion, biofilm formation and secretion of hydrolytic enzymes to cause oral and oropharyngeal candidiasis, among other diseases. Photodynamic inactivation (PDI) has been shown to be a promising alternative treatment for *Candida* infections, but the effects of sublethal applications on fungal cells are not fully understood. The aim of this study was to evaluate the expression of virulence factors in *Candida albicans* after photodynamic inactivation, using curcumin as a photosensitizer. The CFU/mL and XTT tests were used to analyze adhesion and biofilm formation, and the latter was also evaluated with crystal violet dye staining. Enzymatic activity was evaluated by calculating the ratio of colony diameter to halo diameter (Pz) and by the colorimetric method. Adhesion and biofilm formation data were analyzed using a single-factor MANOVA, followed by a single-factor ANOVA whenever necessary. Enzymatic production was analyzed using a single-factor ANOVA. When used, multiple comparisons were conducted using the Games-Howell test and all analyses considered $\alpha=0.05$. Compared to control cells, cells exposed to PDI and CUR had lower adhesion, while there were no significant differences between groups for biofilm formation. PDI did not significantly affect protease or phospholipase activity according to the colorimetric test. Therefore, curcumin-mediated PDI did not increase the expression of virulence factors in *Candida albicans*.

Keywords: Photodynamic inactivation, *Candida albicans*, curcumin, Virulence Factors.

INTRODUCTION

Although the first reports on photodynamic therapy (PDT)¹ emerged from studies on microbial inactivation,² this therapy was initially developed as an alternative treatment for cancer³. Only more recently researchers have investigated its potential for non-oncological diseases. In infection, PDT exerts antimicrobial effects, which are also known as photodynamic inactivation (PDI)⁴ or photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)⁵.

Photodynamic inactivation occurs through a physicochemical reaction that requires a photosensitizing (PS) agent and a light source with wavelength corresponding to the absorption band of the PS, as well as oxygen.²⁻⁶ Thus, the sensitized target cell is exposed to the PS (pre-illumination time, PIT) in a process known as photosensitization, and then immediately exposed to the light source.³⁻⁵ This mechanism causes the absorption of light photons through the PS, placing its electrons in a state of excitation. In the presence of oxygen, the excited PS can then react with neighboring molecules by either transferring electrons or hydrogen (type I reaction) or by transferring energy to oxygen (type II reaction). Both produce reactive species such as H_2O_2 and $^1\text{O}_2$,⁶ lysing the cell. The above reactive species have no specific reactivity with organic molecules, meaning that any cellular macromolecule is a potential target for PDI.⁶

Microorganisms of the genus *Candida* spp have been particularly interesting in dentistry, as they are opportunistic pathogens that cause diseases in the oral cavity; of these, *Candida albicans* is most prevalent in infections⁷. *Candida* cells are able to adhere to soft tissues such as mucosa as well as to hard surfaces such as dental prostheses, and can multiply and organize themselves into complex layers surrounded by an extracellular matrix, thus forming microbial biofilms and causing infections.^{8, 9} The ability to produce biofilm and extracellular matrix depends on the species of *Candida*, as well as on the strain, pH, nutrient composition and presence of oxygen, and it is precisely through biofilm metabolism (e.g., cell growth and reproduction)^{10, 11}, production of toxic substances and increased antimicrobial tolerance, that one can infer pathogenicity¹². The phases preceding biofilm formation (i.e., cell adhesion, division and proliferation) are associated with virulence and the ability to cause infections.^{10,13}

Another virulence factor of *C. albicans* is the capacity to produce specific degradative enzymes such as aspartic protease and phospholipase.^{11,14} Protease enzymes can digest host proteins¹⁵ and invade the tissues through the degradation of immunoglobulins and extracellular matrix proteins.¹⁶⁻¹⁷ Phospholipase can also break the cell membrane and invade the tissue, coming in direct contact with the cell cytoplasm.¹⁸ The production of these enzymes may also be associated with adhesion and biofilm production capacity.¹⁹

Candida infections such as oral and oropharyngeal candidiasis may initially be treated with topical medications²⁰. However, such medications are inefficient in immunocompromised patients.¹⁹ And while recurrence is often treated with systemic drugs,²¹ these can cause nephrotoxic and hepatotoxic effects in severely immunocompromised patients.²² Furthermore, such patients may develop resistance to conventional medications.¹¹

Therefore, a promising alternative treatment for candidal infections is photodynamic inactivation.²³ In fact, photodynamic inactivation has been studied as an alternative to combat fungal infections such as oral and oropharyngeal candidiasis. However, the formation of biofilm by the microorganisms can prevent the PS and light from coming in contact with the deepest cellular layers, resulting in the partial survival of fungal cells following photodynamic exposure. When this happens, the microorganisms may be exposed to a sublethal dose, and the effects of this on the virulence factors are as yet unknown, especially in the case of curcumin-mediated PDI.

Popularly known as turmeric, curcumin is extracted from the root of the *Curcuma longa* L. plant and has been shown to be an effective photosensitizing agent.²⁴ Recent studies show that low concentrations of this pigment, together with short amounts of light exposure, are enough for fungal photoinactivation.^{23, 25} However, the highly complex cellular organization appears to interfere with curcumin's penetration into the deeper layers of the biofilm and into the surface layers of the mucosa. This likely impairs the inactivation of all fungal cells, which possibly leads to a sublethal exposure to PDI.²³ In order for PDI to be safely prescribed to patients, it is critical to understand whether sublethal exposure may interfere in the expression of *Candida* virulence factors.²⁶ Few studies have investigated alterations in microorganism pathogenicity after PDI. Such studies are

critical because the ability to develop disease¹¹ is associated with virulence factors that may destroy the protective barriers and membranes of the oral mucosa.¹¹

If the application of sublethal PDI in *Candida* cells can reduce the expression of virulence factors or even leave them unaltered, this new therapeutic modality could be safely and effectively used with patients. The goal of this study was to analyze the capacity for adhesion, biofilm formation and production of hydrolytic enzymes in *C. albicans* after exposure to curcumin-mediated PDI. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the effect of CUR-mediated PDI on those virulence factors in *C. albicans*.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

The dependent variables were colony-forming units per milliliter (CFU/mL), cell metabolism (XTT), total biomass staining with crystal violet (CV), and phospholipase (Ph) and secreted aspartic proteinase (SAP) production, while the independent variable was treatment method. The sample size used (n = 30) was defined after a pilot study.

Microorganism and culture conditions

In this study, we used a *C. albicans* reference strain (ATCC 90028) obtained from Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) which was kept frozen at -80°C until ready to use.

The microorganism was reactivated in Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (SDA; Himedia, Mumbai, India) at 37°C for 48 hours. A loopful was then placed in RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 13 hours in an orbital incubator at 75rpm and 37°C. Cultures were centrifuged at 4000rpm for 5 minutes and the supernatant was discarded. Pelleted cells were washed twice with sterile saline and resuspended (also in sterile saline) after the last centrifugation. The cell concentration standardization was performed using a turbidimeter (MicroScan

Turbidity Meter - Siemens) to obtain approximately 10^6 CFU/mL in the cell suspensions.²⁵

Virulence factors

The sublethal protocol involving the application of $0.1\mu\text{M}$ of curcumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was selected based on previous results.²³ Illumination was performed with a prototype developed by the Institute of Physics of São Carlos - USP, that consists of LEDs with a predominantly 455nm wavelength. This equipment enabled the illumination of an entire plate well with power of $22\text{mW}/\text{cm}^2$ and a light dose of $5.28\text{J}/\text{cm}^2$ (4 minutes).

Aliquots of $650\mu\text{L}$ of the standardized *C. albicans* cell suspension together with $520\mu\text{L}$ of saline were transferred into the wells of a 24-well plate. The cells exposed to PDI (C+L+) received $65\mu\text{L}$ of the previously prepared curcumin solution as well as $65\mu\text{L}$ of DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The time of incubation in the dark (TPI) was 5 minutes.²⁵ After this period, the plate was exposed to LED light for 4 minutes.²³ $65\mu\text{L}$ of curcumin plus $65\mu\text{L}$ of DMSO solution were added to the positive control (C+L-) samples, which means they were photosensitized but not illuminated. The negative control, on the other hand, was not photosensitized, and did not receive illumination (C-L-) but was treated with $130\mu\text{L}$ of DMSO solution and left at room temperature for the same time as the TPI and illumination of the C+L+ samples (9 minutes).

After treatment, the samples were centrifuged (4000 rpm/5 min), washed twice with sterile PBS to remove CUR residues, and resuspended in $1300\mu\text{L}$ of PBS. Then, $100\mu\text{L}$ aliquots were distributed into 96-well plates in duplicate for the analysis of virulence factors. To evaluate the adhesion capacity, some samples were used to measure the CFU/mL by plating in agar medium and the other to analyze cellular metabolism by XTT assay. These plates were incubated on an orbital shaker for 1h30min at 37°C and 75rpm. This incubation period caused cells to adhere to the bottom of the wells.²⁵ After the adhesion period, the wells were washed twice thoroughly with $150\mu\text{L}$ of sterile PBS to remove the non-adhered cells, buffer the medium and remove metabolites.

To measure the CFU/mL, cells were removed from the 96-well plate using a sterile swab during 30 seconds of handling, and then serial dilutions were conducted (10^{-1} a 10^{-4}), as well as plating in SDA medium. After incubating the plates at 37°C for 48 hours in an oven, a trained researcher imaged the plates and counted the colonies using the Adobe Photoshop software (CCI = 0.99) and calculated the number of CFU/mL.

The cellular metabolic activity was assessed by the XTT assay, which is based on the ability of mitochondrial dehydrogenase enzymes of metabolically active microorganisms to convert tetrazolium salt XTT into a water-soluble product (*formazan*).²⁸ The XTT solution prepared in all experiments consisted of 158µL of PBS with 200mM of glucose, 40µL of XTT solution (1mg/mL) and 2µL of menadione. For the assay, 200µL of XTT solution were added to each well, and the plates were incubated at 37°C for 3 hours. Next, 100µL of the product were transferred into the well of a 96-well plate. The reaction was read with a spectrophotometer (Automated Microplate Reader TP (Thermo Plate)) with 492nm filter^{25, 29} that was calibrated to perform the reading (CCI = 0.78).

In addition to the distribution of the aliquots into plates for the CFU/mL and XTT analyses, as previously described, the analysis of biofilm formation capacity involved the use of one additional plate to assess the amount of biomass using the crystal violet method.³⁰ Thus, 100µL aliquots from each sample were transferred to the wells of a 96-well plate and after the adhesion period, they were washed twice with 150µL of sterile PBS. To form biofilms, 150µL of RPMI culture medium were added into the wells and the plates were kept for 48 hours in an orbital shaker (37°C; 75rpm). After the incubation period, biofilms were washed twice with 200µL of sterile PBS and subjected to CFU/mL quantification tests, an analysis of cell metabolic activity by XTT assay and total biomass quantification with crystal violet (CV) staining.

CV staining was used to determine the total biomass of the adhered cells and the formed biofilm.^{25, 30} To achieve this, the previously washed biofilms were fixed with 200µL of methanol for 15 minutes. After being removed, the plates were kept at 37°C for approximately 20 minutes for drying and 200µL of 1% crystal violet dye was added for 5 minutes. Each plate well was washed three times with PBS, and then 33% acetic acid was added to remove the dye. A 100µL aliquot of the resulting

product was transferred by a trained researcher to the well of a reader plate (ELISA, Thermoplate) to analyze the absorbance with a spectrophotometer at 570nm filter (CCI = 0.92).

The production of the specific degradative enzymes SAP and Ph was evaluated by two different methods: halo formation in agar medium and the colorimetric method. The halo formation in agar method was conducted according to the methodologies described by Rüchel et al.,¹⁷ and Price et al.,¹⁸ respectively, with certain protocol modifications determined after running a previous study. For both methods, after exposure of the samples to the PDI, the cells were washed twice to remove residual curcumin and were resuspended in PBS, and 5µL aliquots of the samples were inoculated at three equidistant agar plate points.³¹ The phospholipase plates were incubated at 37°C for 7 days, and the protease plates were incubated for 5 days (37°C), stained with amido black staining solution and developed to measure the enzymatic activity. The enzymatic activity (Pz-ph) and (Pz-sap) was verified in relation to the production of an opaque zone of precipitation around the colonies and was determined by the ratio of the diameter of the colony to the diameter of the colony plus the precipitation halo. The plates were photographed using natural light as the background for the protease samples and black background for the phospholipase samples, and the measurements were made on a computer by a trained researcher (CCI≥0.92).

For the colorimetric method, 300 µL of the cells previously resuspended in PBS were transferred to a falcon tube containing 5 ml of Yeast Nitrogen Base (YNB) medium and this solution was incubated for 20 h in orbital shaking. Next, the solutions were centrifuged at 4000rpm for 5 minutes at 21°C, and the supernatant was transferred into other sterile falcon tubes. We added 5 ml of PBS to the tubes containing the cells for resuspension. This was followed by serial dilution and plating for CFU/mL analysis. The supernatant was used to conduct the tests of protease and phospholipase production. For protease production, a 900 µL aliquot of the supernatant was transferred to Eppendorf tubes for each treatment group. Next, 100µL of azocasein substrate were added, and the solution was homogenized and left in the oven at 35°C for 60 minutes. Then, 500 µL of trichloroacetic acid were added to stop the degradation reaction of the proteinase and were left at room temperature for 10 minutes. The Eppendorf tubes were centrifuged and 1 mL of that

solution was transferred to new tubes. Then, 1 mL of sodium hydroxide (NaOH) solution was added, for a total of 2 mL that were left in the oven at 35°C for another 15 minutes. The spectrophotometer reading was performed at 440 nm a filter. For phospholipase production, the remaining supernatant was adjusted to a pH of 7.5 and 1.0 mL was transferred to a tube. Then, 1.0 mL solution of the phosphatidylcholine reagent was added and the solution was homogenized and left in the oven at 35°C for 60 minutes. The spectrophotometer reading was conducted at 630nm a filter.

Data Analysis

The effect of "Treatment Group" on 'adhesion capacity - AC' and 'biofilm-forming capacity - BFC' was assessed with a single-factor Multivariate Analysis of Variance (MANOVA). Normality was verified with the Shapiro-Wilk test, as well as skewness and kurtosis. The homogeneity of variances and covariances was assessed in each group using Box's M test (AC: $M = 49.4$; $F = 7.967$; $p \leq 0.001$ / BFC: $M = 52.411$; $F = 4.149$; $p \leq 0.001$) and since homogeneity was not confirmed, we used Pillai's trace to calculate the F statistic. Whenever the MANOVA detected statistically significant effects, we conducted an ANOVA for each dependent variable. The effect of the different treatments on the production of SAP and Ph was assessed by means of two single-factor analyses of variance (ANOVA). Normality was verified by the Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variances was assessed with the Levene test. Given heteroscedasticity, we chose to use Welch's correction to calculate F. When necessary, we used the Games-Howell post-hoc test. Significance was set at 0.05. Statistical analyses were done using IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp., 2012).

RESULTS

The "Treatment Group" variable had a medium-sized but highly significant effect on adhesion capacity (Pillai's trace = 0.314; $F = 8,096$; $p \leq 0.001$; $\eta^2p = 0.157$; power (π) = 0.998). The univariate ANOVA revealed a significant effect between groups only for $\log_{10}$ (CFU / ml) ($\log_{10}$ CFU / ml: $F = 19,823$; $p \leq 0.001$; $\eta^2p = 0.313$; Power (π) = 1.000; XTT: $F = 0.033$; $p = 0.967$; $\eta^2p = 0.001$; Power (π) = 0.055).

According to the multiple comparisons analysis, the number of adhered cells was reduced in the groups independently exposed to PDI and CUR (Figure 1). This reduction was approximately $1.0\log_{10}$ and $0.7\log_{10}$ for groups C+L+ and C+L-, respectively, compared with the control group C-L-. On the other hand, the different treatment groups showed no significant effect on biofilm-forming capacity (Figure 2) (Traço de Pillai=0,084; $F=1,263$; $p=0,277$; $\eta^2_p=0,042$; Potência (π)=0,488).

In the analysis of enzyme production capacity using the halo methodology, the only significant effect between groups was observed for phospholipase (Phospholipase: $F = 15,988$; $p \leq 0.001$; $\eta^2_p = 0.271$; power (π) = 0.999 / Protease: $F = 0.063$; $p = 0.939$; $\eta^2_p = 0.001$; power (π) = 0.059), which was significantly increased following the application of PDI (Table 1). On the other hand, the colorimetric method showed no effect of treatment on the production of either enzyme (Phospholipase $F = 0.067$; $p \leq 0.935$; $\eta^2_p = 0.002$; Power (π) = 0.059 / Protease: $F = 2.009$, $p = 0.141$; $\eta^2_p = 0.050$; Power (π) = 0.403) (Table 1).

DISCUSSION

In this study, we analyzed the capacity for adhesion, biofilm formation and production of hydrolytic enzymes in *C. albicans* after exposure to curcumin-mediated PDI.³²

The $\log_{10}(\text{CFU/mL})$ values revealed a small reduction in the adhesion of *C. albicans* cells following exposure to PDI. Similar results have been reported using erythrosine³³ and toluidine blue³⁴ to reduce the adhesion of *C. albicans* to buccal epithelial cells following PDI. The initial adherence of fungal cells to any type of surface seems to contribute to the development of oral infections caused by *Candida*.³³ The adhesion to the host's epithelial cells is the initial stage of infection, which appears to be promoted by certain components of fungal cell membranes, such as mannose, Cd3 receptors, mannoproteins and saccharins.^{35, 36} There are also well-known cases of adhesion to abiotic surfaces such as dental prostheses.¹³

In the present study, we observed that the use of CUR without light also reduced the adhesion of *C. albicans* cells. This is in agreement with Song et al. (2012),³⁷ who reported a reduction in *Streptococcus mutans* adhesion after exposure to CUR. It has been reported that some compounds derived from *Curcuma longa*

may have the ability to inhibit the adhesion of bacteria, fungi and algae to different substrates.³⁸⁻⁴⁰ This effect seems to be due to the inhibition of certain adhesins present on microorganism membranes,³⁸ as well as the expression of membrane proteins responsible for the adhesion of some bacteria to different surfaces.³⁷ Since the adhesion of *C. albicans* also appears to be mediated by fungal cell wall components and, given that the membrane has been identified as the main cellular structure affected by photodynamic action,⁴¹ we suggest that the decrease in adhesion is related both to the type of cell damage promoted by PDI as well as to the effect of CUR.

Similar results were also reported by Kato et al.,⁴² who applied a sublethal dose of PDI using methylene blue (MB) as the PS combined with GaAlAs laser diode, and by Munin et al.,⁴³ who also used MB as the PS. Both studies observed a reduction in cell viability after treatment application, which likely results from the damage to cell membranes that occurs when using MB, and the photodynamic effect promotes the increased permeability of the membrane,⁴¹ which allows the PS to come close to the DNA and interact with singlet oxygen due to MB's chemical affinity with DNA guanine bases. This reaction may promote genetic mutations in *C. albicans* cells, inhibiting their growth.⁴² Girollo et al.,⁴¹ suggest that photodynamic chemotherapy using MB can reduce *C. albicans* growth, which may be associated with the increased membrane permeability; the penetration of MB can damage the plasma membrane and cytoplasm. This suggests that CUR may have had a phototoxic effect at the membrane level, which would explain the reduction in cell adhesion we observed in both the C+L+ and C+L- groups compared to the control group.

It is interesting to note that in the current study, the reduction in cell adhesion was only evidenced by the CFU/mL values, while the XTT assay indicated statistically similar rates of metabolism among the different groups. The XTT assay⁴⁴ is a colorimetric method based on the conversion of a salt in the presence of cellular metabolic activity. The fact that its formazan product is water-soluble makes it easy to measure cell viability, compared to the traditional colony-count method. For that reason, this test has been used to study the development of fungal biofilm and its resistance to drugs or alternative therapies without changing biofilm structure.⁴⁴ However, this test does not directly assess viability, as is the case with colony counts. The latter method indicated a difference of only 1log₁₀ in the CFU/mL

between the C+L+/C+L- and C-L- groups, while the colorimetric method would probably not have captured such a small difference⁴⁵ in the metabolic rate of the adhered cells. For this reason, the XTT assay should be used to evaluate biofilms in which the number of cells is higher than that of a single layer of adhered cells.⁴⁶

Despite the observed decrease in the number of adhered cells, the results presented here show no significant reduction in biofilm-forming capacity. This behavior was revealed by all analytical methods used (CFU/mL, XTT and CV). It has been suggested that sublethal exposures to the photodynamic effect may reduce the growth rate of *C. albicans*, but this effect appears to be temporary, since the fungal cells reached the exponential growth phase after just a few hours.⁴² In the present study, the biofilm was grown in a favorable environment for a period of 48 hours, which probably allowed cells to multiply and form biofilm similar to that observed in the control group. Nevertheless, this result was positive on the use of curcumin-mediated PDI, since exposure to sublethal doses was not able to increase this virulence factor.

We also assessed the capacity to produce specific degradative enzymes. The results obtained with the agar plate method did not reveal any differences in SAP expression between treatment groups, but phospholipase production was significantly higher in the group exposed to PDI. This is in contrast to that reported by Martins et al. (2011)²⁶, who used methylene blue in the tongues of *C. albicans*-infected mice to assess the production of protease and phospholipase following PDI. Those authors found that there was a decrease in the activity of protease. Studies by Kömerik et al.,⁴⁷ on the other hand, described a significant reduction in protease production following the application of PDI by red light and toluidine blue PS on gram negative bacteria, as measured by azocasein hydrolysis.

We also studied enzyme production using colorimetric methods that are known to be more sensitive for detecting small amounts of enzyme.⁴⁸ These tests showed no change in SAP or phospholipase expression following PDI. Since the phospholipase analyses yielded contradictory results, we believe more studies are needed, possibly with fluorimetric methods or gene expression analyses in order to reach a more reliable conclusion. A recent report by Freire et al.,⁴⁹ analyzed the role of PDI in the expression of genes related to virulence (SAP5, LIP9, and PLB2). They

observed a non-significant reduction in the expression of hydrolytic enzymes after PDI mediated by methylene blue.

We conclude that photodynamic inactivation mediated by curcumin does not increase the expression of virulence factors in *Candida albicans*. This, associated with a PDI-mediated reduction in the adhesion capacity of *Candida* cells, represents a critical advantage of this therapeutic method and will possibly help the establishment of future clinical protocols.

ACKNOWLEDGMENTS

This work supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grants 2012/21251-9, 2013/16677-0

REFERENCES

- [1] Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.* 2003; 23(5A):3591–600.
- [2] Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55(1): 143-66.
- [3] Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992; 55(1): 145-57.
- [4] Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms. *G Ital Dermatol Venereol.* 2010; 145(4): 477-89.
- [5] Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42(1): 13-28.
- [6] Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(5): 468-81.
- [7] Sanguinetti, M, Posteraro, B, Lass-Flörl, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015; 58: (Supl 2): 2-13.

- [8] Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2011; 54(2): 123-30.
- [9] Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Mima EG, Machado AL, et al. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. Photodynamic disinfection of complete dentures. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(1): 161-8.
- [10] Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005; 4(4): 633-8.
- [11] Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2): 288-305.
- [12] Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr Microbiol*. 2010; 61(6): 534-40.
- [13] Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80(3): 903-8.
- [14] Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001; 9(7): 327-35.
- [15] Macdonald F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *Sabouraudia*. 1984; 22(1): 79-82.
- [16] Morschhäuser J, Virkola R, Korhonen TK, Hacker J. Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol*. 1997; 153(2): 349-55.
- [17] Rüchel R. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. *Microbiol Sci*. 1986; 3(10): 316-9.
- [18] Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20(1):7-14
- [19] Rajendran, R, Borghi, E, Falleni, M, Perdoni, F, Tosi, D, et al. Acetylcholine protects against *Candida albicans* infection by inhibiting biofilm formation and promoting hemocyte function in a *Galleria mellonella* infection model. *Eukaryotic Cell*. 2015;14(8):834-44.

- [20] Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994; 72(3): 283-8.
- [21] Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2005; 93(3): 288-93.
- [22] Lalla RV, Latortue MC, Hong CH, Ariyawardana A, D'Amato-Palumbo S, et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support Care Cancer*. 2010; 18(8): 985-92.
- [23] Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, et al. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87(4): 895-903.
- [24] Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr*. 2010; 103(11): 1545-57.
- [25] Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of Curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9): 927-34.
- [26] Martins JdaS, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, 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; 111(1): 71-7.
- [27] Melo AS, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3081-8.
- [28] Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J*. 2008; 19(4): 364-9.
- [29] Shoukri MM, Asyali MH, Donner A. Sample size requirements for the design of reliability study: review and new results. *Stat Methods Med Res*. 2004; 13(4): 251-71.
- [30] Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams A, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*. 47(7): 681-9.

- [31] Sanitá PV, Zago CE, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Enzymatic activity profile of a Brazilian culture collection of *Candida albicans* isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. *Mycoses*. 2014; 57(6): 351-7.
- [32] Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa, CA, Vergani CE, Brunetti IL, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med. Mycol*. 2013; 51(3): 243–51.
- [33] Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araújo CF, Pereira CA, et al. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012; 114(1): 67–74.
- [34] Soares BM, da Silva DL, Sousa GR, Amorim JC, de Resende MA, et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 94(1): 65–70.
- [35] Kanbe T, Li RK, Wadsworth E, Calderone RA, Cutler JE. Evidence for expression of the C3d receptor of *Candida albicans* in vitro and in vivo obtained by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Infect Immun* 1991; 59(5): 1832-8.
- [36] Brassart D, Woltz A, Golliard M, Neeser JR. In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc $\alpha 1 \rightarrow 2$ Gal β -bearing complex carbohydrates. *Infect Immun*. 1991;59(5): 1605-13.
- [37] Song J, Choid B, Jin EJ, Yoon Y, Choi KH. Curcumin suppresses *Streptococcus mutans* adherence to human tooth surfaces and extracellular matrix proteins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(7):1347-52.
- [38] Pattiyathanee P, Vilaichone R, Chaichanawongsaroj N. Effect of curcumin on *Helicobacter pylori* biofilm formation. *Afri J Biotech*. 2009; 8(19): 5106-15.
- [39] O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, et al. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2005;11(47):7499-507.

- [40] Barua S, Chattopadhyay P, Phukan MM, Konwar BK, Islam J, Karak N. Biocompatible hyperbranched epoxy/silver–reduced graphene oxide–curcumin nanocomposite as an advanced antimicrobial material. *RSC Adv.* 2014; 4(88): 47797-805.
- [41] Girolido LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(1):109–12.
- [42] Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegós GP, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2013;57(1) 445– 51.
- [43] Munin E, Girolido LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. of Photochem and Photobiol B.* 2007;88(1): 16–20.
- [44] Taff HT, Nett JE, Andres DR. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Med Mycol.* 2012;50(2): 214-8.
- [45] Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* 2008; 72(2): 157-65.
- [46] Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Ross KM, Andes DR. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryot Cell.* 2011; 10(12): 1660–9.
- [47] Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000; 72(5): 676–80.
- [48] Sanitá PV, Zago CE, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, et. al. In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of non-*albicans* *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014; 118(1):84-91.
- [49] 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; 30(5): 1511-8.

1. Appendices

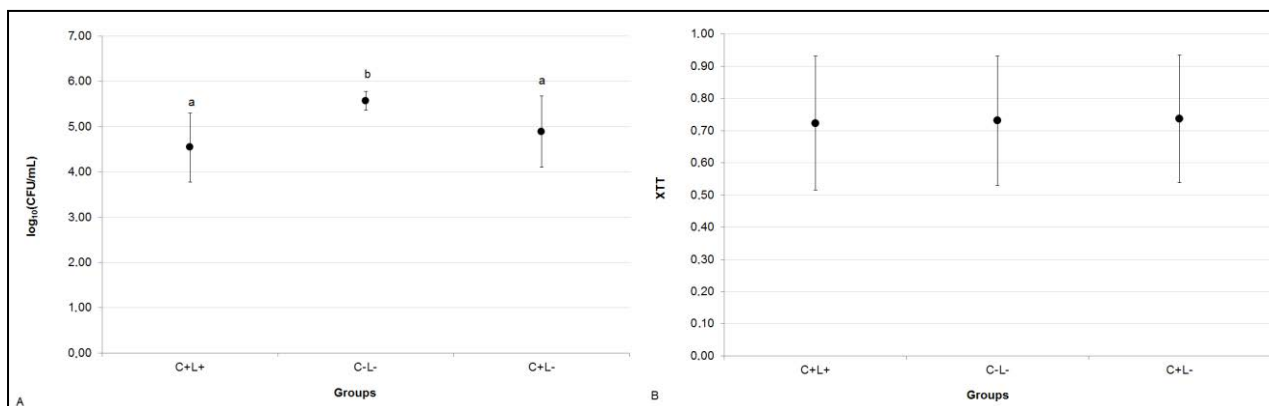


Figure 1. Adhesion capacity of *C. albicans* according to the treatment group. A: Average and standard deviation of $\log_{10}(\text{CFU/mL})$; different lowercase letters indicate significant statistical differences according to Games-Howell post-hoc test ($p < 0.001$). B: Average and standard deviation of cell metabolism (XTT); Differences were non-significant according to ANOVA ($p = 0.967$).

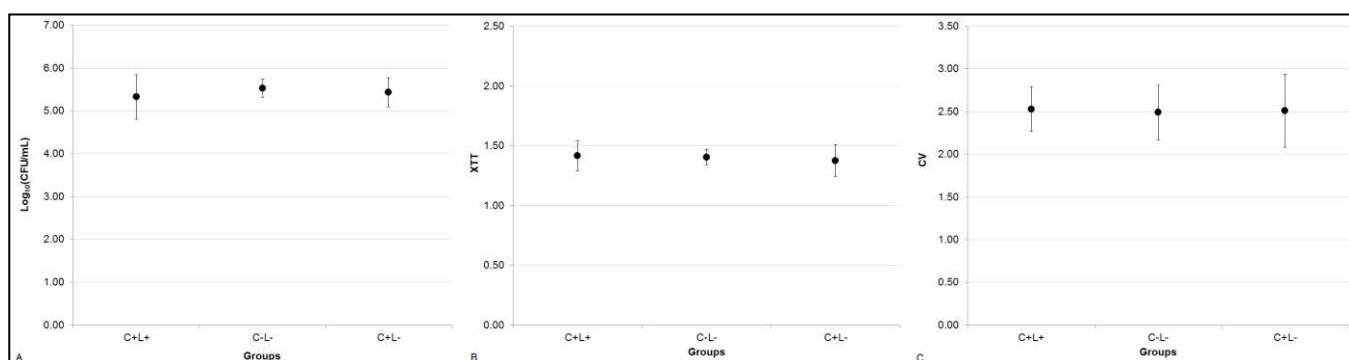


Figure 2. Biofilm formation capacity of *C. albicans* according to the treatment group. A: Average and standard deviation of $\log_{10}$ (CFU/mL); B: Average and standard deviation of cell metabolism (XTT); C: Average and standard deviation of biofilm biomass (CV). Differences were non-significant according to MANOVA ($p=0,277$).

Table 1. Mean values and standard deviations for protease and phospholipase production using the agar-based and colorimetric tests.

Enzymatic activity		C+L+	C-L-	C+L-
Agar-Based tests	Pz-Sap	0.749 (0.042)	0.743 (0.067)	0.744 (0.071)
	Pz-Ph	0.413 (0.018)*	0.582 (0.173)	0.618 (0.186)
Colorimetric tests	Sap	7.728 (0.559)	7.848 (0.465)	7.553 (0.611)
	Phospholipase	6.948 (0.364)	6.920 (0.373)	6.902 (0.623)

* Statistically significant difference between the mean of group C+L+ and those of C-L- and C+L- (Games-Howell, $p < 0.001$).

4 DISCUSSÃO

Vários são os fatores de virulência associados à capacidade das espécies de *Candida* de desenvolver infecções^{16, 17, 89, 90}. A habilidade de aderir e posteriormente formar biofilmes sobre superfícies mucosas ou reabilitadoras é um desses fatores, os quais estão diretamente relacionados à expressão de enzimas degradativas específicas, como proteinase e fosfolipase, ambas consideradas fatores de virulência fundamentais desses micro-organismos^{12, 42, 57, 71, 83, 87, 104, 105}. O presente estudo teve como objetivo principal analisar o efeito que a aplicação subletal de inativação fotodinâmica, mediada pela curcumina, poderia promover sobre a expressão de alguns fatores de virulência em *C. albicans*. No momento da elaboração do projeto de pesquisa e definição dos protocolos experimentais, foi observado que os métodos utilizados para analisar a capacidade de secretar enzimas hidrolíticas com base na medição dos halos de precipitação em placas de ágar^{85, 99} vêm sendo amplamente utilizados nos estudos^{72, 104, 105, 110, 111, 119}. No entanto, há ausência ou omissão de dados sobre a confiabilidade dessas medidas, como a reprodutibilidade intra e interexaminador^{57, 71, 72, 83, 87, 110}, o que coloca em dúvida a precisão do valor obtido^{78,122}. Além disso, a inexistência de uma metodologia padronizada impossibilita comparações entre os diferentes estudos. De acordo com a teoria do erro, cada medida efetuada tem um componente de valor real e outro para o erro, podendo ser aleatórios ou sistemáticos. Para minimizar o erro sistemático, a calibração de pesquisadores e equipamentos previamente a coleta dos dados, além da padronização dos processos, são passos vitais⁹⁴.

Assim, para que a produção de enzimas fosse avaliada de forma reprodutível, foi necessário padronizar a maneira de efetuar as medidas. Em estudo prévio, foi possível perceber que alguns fatores poderiam ter influência das medidas obtidas. O tipo de fundo de leitura poderia influenciar na visualização tanto do halo como da colônia, como também a forma de mensurar seus diâmetros de acordo com o equipamento (paquímetro digital ou software). Além disso, outros aspectos foram levantados, como o número de replicatas de uma mesma amostra e a adequação de diferentes examinadores a um mesmo protocolo. Essa foi a motivação para a realização do estudo descrito no Capítulo I dessa dissertação de mestrado, cujo objetivo foi avaliar a metodologia empregada para aferição dos halos de degradação

de proteinase e fosfolipase formados por *C. albicans* com relação à reprodutibilidade das medidas efetuadas intra e interexaminadores e aos diferentes protocolos de execução.

De forma geral, os resultados da avaliação intraexaminador de proteinase indicaram melhor concordância quando a triplicata foi utilizada. No entanto, quando as leituras foram realizadas no computador (CP), o cruzamento dos IC_{95%} sugeriu que a leitura de uma única colônia ou triplicata não interferiu na reprodutibilidade intraexaminador. Além disso, o tipo de fundo e a forma de leitura resultaram em reprodutibilidade intraexaminador semelhante e, portanto, ao que parece, não interferiu na precisão das medidas de proteinase para cada examinador. Com relação à reprodutibilidade interexaminador, considerou-se que o protocolo para a leitura dos valores de Pz-sap que atribuiu maior confiabilidade dos dados foi aquele que utilizou as fotografias digitalizadas para leitura em computador em fundo contra luz natural e por meio da realização de leituras em triplicata para cada amostra. Esse resultado veio reforçar a importância da triplicata na leitura da atividade enzimática de proteinase. Além disso, também mostrou a importância de se investigar a calibração estatística entre diferentes pesquisadores para realização de uma mesma medida, uma vez que, de oito protocolos avaliados, apenas um deles apresentou dados com adequada confiabilidade quando diferentes examinadores estiveram envolvidos na realização das análises.

Apesar de não se encontrar estudos que tenham comparado a precisão das medidas de Pz em função do protocolo de leitura, alguns autores^{11, 22, 23, 46, 49, 50, 54, 61, 62, 72, 73, 104, 106, 107, 119, 130} relatam a utilização de colônias em triplicata para a leitura de suas amostras na análise de produção de proteinase. Por outro lado, também foi encontrado um estudo realizado com única alíquota para proteinase⁸⁷, e em muitos estudos este dado foi omitido na metodologia^{50, 57, 71, 72, 83, 87}, o que é preocupante especialmente nos casos em que a calibração estatística dos pesquisadores que fizeram as medidas não é mencionada. Além disso, verificou-se que não é comum a metodologia dos artigos deixar explícito qual a forma de leitura utilizada. O levantamento bibliográfico identificou apenas um trabalho relatando a utilização do computador¹²² e 3 que citaram o uso do paquímetro,^{105,119} enquanto cerca de 28 artigos^{11, 22, 24, 46, 47, 49, 50, 60-65, 71-73, 76, 80, 83, 87, 92, 93, 96, 104, 106, 109, 117, 128, 129} não relataram o método.

Na avaliação da reprodutibilidade intraexaminador para fosfolipase, as estimativas pontuais do CCI mostraram que o protocolo que maximizou a reprodutibilidade foi o que utilizou leituras no computador em triplicata, mas, ao considerar os IC_{95%}, verificou-se que a melhora da confiabilidade quando da utilização de triplicatas foi menos evidente em comparação com as leituras de proteinase. Os demais protocolos mostraram ter a capacidade de influenciar na reprodutibilidade das medidas, mas de formas distintas para os diferentes examinadores. Já a análise da reprodutibilidade interexaminador indicou que tanto a leitura com paquímetro digital como a medida nas fotografias atribuíram maior confiabilidade às medidas quando realizadas em triplicata para cada amostra. Esse resultado mostra que, embora a leitura de triplicatas não tenha mostrado importância na confiabilidade intraexaminador, quando as medidas de um mesmo estudo forem efetuadas por diferentes pesquisadores, a avaliação de mais colônias de uma mesma amostra auxilia na precisão. Na literatura foi possível encontrar poucos trabalhos relatando a leitura de apenas uma colônia^{76, 87} Por outro lado, observamos um número maior de estudos realizados em triplicatas^{11, 22, 23, 46, 49, 54, 61, 62, 72, 105-107, 119, 130}, e que nenhuma informação sobre a calibração dos pesquisadores é relatada, o que impossibilita uma discussão sobre a precisão das medidas efetuadas em cada caso.

Com base nos resultados obtidos tanto para fosfolipase quanto para proteinase, sugere-se que não houve unanimidade na escolha de um protocolo para cada examinador. A leitura de colônias em triplicata parece ser o principal fator associado ao aumento na precisão das medidas e, portanto, deve ser preferido em relação à leitura de apenas uma colônia. Quando apenas um examinador for responsável pela realização das medidas, deve-se padronizar um protocolo e avaliar a calibração estatística desse pesquisador previamente à coleta dos dados. No entanto, se dois ou mais pesquisadores estiverem envolvidos na leitura das placas, os resultados deste estudo sugerem que os protocolos com a utilização de software para leituras das placas sejam preferidos.

Com base nos resultados obtidos nesse primeiro estudo, foi possível definir o protocolo de medidas dos métodos para avaliação da expressão das enzimas e, então, o segundo estudo pôde ser iniciado, tendo como objetivo analisar a capacidade de adesão, formação de biofilme e de expressão de enzimas hidrolíticas

da espécie *C. albicans* em amostras submetidas a PDI mediada pela curcumina. De acordo com os resultados, foi observada pequena redução na capacidade de adesão das células de *C. albicans* após exposição a PDI, resultado esse apontado pelos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$. Acredita-se que este estudo seja o primeiro a investigar o efeito da PDI mediada pela CUR sobre a capacidade de adesão de *C. albicans*. Resultados semelhantes também foram relatados utilizando-se eritrosina²⁰ e azul de toluidina¹¹³ para reduzir a capacidade de adesão de *C. albicans* às células buco-epiteliais após PDI. A adesão às células epiteliais do hospedeiro é a etapa inicial da infecção, que parece ser promovida por certos componentes da parede celular dos fungos⁹⁸, como manose, receptores Cd3, mano proteínas e sacarinas^{1, 8, 18, 26, 45}. Por outro lado, a adesão fúngica a superfícies abióticas tem sido amplamente aceita como o principal fator etiológico da candidose associada ao uso de próteses dentais¹.

No presente estudo, foi observado que a utilização da CUR sem luz também reduziu a capacidade de adesão das células de *C. albicans*. Esse resultado está de acordo com os reportados por Song et al., em 2012¹¹⁶, os quais mostraram redução na capacidade de adesão de *Streptococcus mutans* após exposição à 0,1 μ M de CUR. Já vem sendo relatado que alguns compostos derivados da *Curcuma longa* podem possuir capacidade de inibir adesão de bactérias, fungos e algas a diferentes substratos^{4, 75, 79}. Esse efeito parece estar relacionado com a inibição de certas adesinas presentes na membrana dos micro-organismos⁷¹, bem como a expressão de proteínas de membrana responsáveis pela adesão de algumas bactérias a diferentes superfícies^{77, 116}. Como a adesão de *C. albicans* também parece ser mediada por componentes da parede e membrana celular dos fungos e, tendo que vista que a membrana tem sido apontada como a principal estrutura celular atingida pela ação fotodinâmica³⁶, pode ser sugerido que a diminuição na capacidade de adesão esteja relacionada tanto com o tipo de dano celular promovido pela PDI como pela própria ação isolada da CUR.

Diferentemente do resultado de capacidade de adesão, os resultados da capacidade de formação de biofilme não mostraram redução significativa. Esse comportamento foi sugerido por todos os métodos de análise empregados (UFC/mL, XTT e CV). Já foi mencionado que exposições subletais do efeito fotodinâmico podem reduzir a taxa de crescimento de *C. albicans*, mas esse efeito parece ser

apenas temporário, já que as células fúngicas acabaram atingindo a fase exponencial de crescimento após algumas horas⁴⁸. Nesse estudo, o biofilme foi cultivado em ambiente propício ao seu desenvolvimento por um período de 48 horas, o que provavelmente conferiu condições para que as células se multiplicassem e formassem biofilme semelhante ao observado no grupo controle. Ainda assim, esse resultado pode ser considerado vantajoso à aplicação da PDI mediada pela curcumina, uma vez que a exposição a doses subletais não foi capaz de aumentar esse fator de virulência. Em contrapartida, um estudo realizado sem efeito subletal com biofilmes de *C. albicans* e *C. dublinienses*, analisados através de UFC/mL após tratamento fotodinâmico mediado pela eritrosina, detectou diminuição estatisticamente significativa na quantidade de biofilme²¹.

Os resultados obtidos por meio do método baseado nas placas de Ágar para verificação da produção de enzimas mostraram não haver diferença na expressão das SAPs entre os grupos de tratamento, enquanto a produção de fosfolipase foi significativamente maior no grupo exposto a PDI. Resultado contrário foi relatado por Martins et al.⁶³, que avaliaram, através da medida de Pz, a produção de enzimas proteinase e fosfolipase após aplicação de PDI mediada por FS azul de metileno em línguas de ratos infectados por *C. albicans*. Os autores verificaram que houve diminuição da atividade enzimática de ambas as enzimas, embora a diminuição significativa tenha sido observada apenas para a produção de proteinase comparada à fosfolipase⁶³. Nos estudos de Kömerik et al.⁵¹, foi descrita a atividade de enzimas, após aplicação de PDI por luz vermelha e FS azul de toluidina, sobre bactérias gram negativas, quando foi obtida a redução significativa de enzimas proteases quantificada por hidrólise de azocaseína. Embora este estudo não tenha sido realizado com doses subletais, seus resultados são importantes sob o ponto de vista do efeito da inativação fotodinâmica sobre fatores de virulência agindo sobre outros micro-organismos.

Devido à dificuldade na obtenção da formação de halos pelo método da placa para a enzima proteinase, após PDI, foi utilizado também o método colorimétrico, reconhecidamente mais sensível para detecção de baixa quantidade de enzimas^{3, 15, 54, 57, 88, 104}. É importante ressaltar que, na metodologia em Agar para proteinase, foi realizada a coloração com negro amido para facilitar a visualização do halo, e que, mesmo assim, as bordas não são facilmente identificadas, o que provavelmente

resulta em maiores diferenças entre leituras repetidas na mesma amostra. Essa dificuldade de leitura das placas de proteinase possivelmente explica o fato de alguns autores optarem pela utilização do método das placas de Agar somente para avaliação da fosfolipase e utilizarem metodologias alternativas, como as colorimétricas e fluorimétricas, para investigação de proteinase. No entanto, também são encontrados estudos que utilizaram teste colorimétrico para fosfolipase.

Os resultados dos métodos colorimétricos não apontaram alteração na expressão de SAPs e fosfolipase após PDI. Assim, pode-se sugerir que a PDI mediada pela curcumina não tenha influência negativa na expressão da enzima SAPs. Como comportamentos contraditórios foram encontrados durante a análise da fosfolipase, acredita-se que seja necessária a condução de mais estudos, possivelmente com metodologias fluorimétricas ou análises de expressão genética, para uma conclusão definitiva. Em recente estudo, Freire et al.³⁵, avaliou a ação da PDI na expressão de três genes de *C. albicans* relacionados à virulência (SAP5, LIP9 e PLB2). Foi observada redução não significativa na expressão de enzimas hidrolíticas.

5 CONCLUSÃO

Segundo as condições experimentais deste estudo e estimando suas limitações, presume-se que:

1. Na análise de produção da enzima degradativa proteinase, dois protocolos (DC/W/3C e CP/NL/3C) apresentaram reprodutibilidade intraexaminador classificada no mínimo como Ba para todos os examinadores. Ambos os protocolos também mostraram Boa reprodutibilidade interexaminador ao considerar os quatro examinadores.
2. Para a enzima fosfolipase, três protocolos (DC/3C, CP/1C, CP/3C) mostraram Ba concordância intraexaminador para todos os examinadores sugerindo, portanto, que a leitura em triplicata não é imprescindível para obtenção de reprodutibilidade intraexaminador adequada.
3. A reprodutibilidade interexaminador das medidas de fosfolipase foi classificada como Muito Boa tanto para as leituras efetuadas com paquímetro digital como as realizadas em computador, quando em triplicata.
4. O número de células de *Candida albicans* aderidas em superfície abiótica foi reduzido após ação fotodinâmica subletal e após aplicação de curcumina, porém, o metabolismo celular não sofreu alteração significativa.
5. A utilização de curcumina ou PDI não promoveu alteração significativa no número de células viáveis, no metabolismo celular e na quantidade de biomassa do biofilme.
6. Não houve diferença estatisticamente significativa na secreção de enzima proteinase, tanto segundo valores de Pz-SAP quanto segundo método colorimétrico.
7. Não houve diferença significativa na secreção da enzima fosfolipase de acordo com o teste colorimétrico; porém, de acordo com o teste de Pz, a PDI aumentou a produção da enzima fosfolipase.

Referências *

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002; 78(922): 455-9.
2. Álvares, CA, Svidzinski, TIE, Consolaro, MEL. Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43(5): 319-27.
3. Antony G, Saralaya V, Bhat KG, Shenoy MS, Shivananda PG. Effect of phenotypics witch in gon expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in diabetic patients. Rev Iberoam Micol. 2009; 26(3): 202–5.
4. Barua S, Chattopadhyay P, Phukan MM, Konwar BK, Islam J, Karak N. Biocompatible hyperbranched epoxy/silver-reduced grapheme oxide-curcumin nanocomposite as an advanced antimicrobial material. RSC Adv. 2014; 4(88) 4797-805.
5. Bennett DE, McCreary CE, Coleman DC. Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. Microbiology. 1998; 144(Pt1): 55-72.
6. Bergendal T, Isacson G. Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis. Scand J Dent Res. 1980; 88(5): 446-54.
7. Blomgren J, Berggren U, Jontell M. Fluconazole versus nystatin in the treatment of oral candidosis. Acta Odontol Scand. 1998; 56(4): 202-5.
8. Brassart D, Woltz A, Golliard M, Neeser JR. In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc $\alpha 1 \rightarrow 2$ Gal β -bearing complex carbohydrates. Infect Immun. 1991;59(5): 1605-13.
9. Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. Photochem Photobiol Sci. 2005; 4(7): 523-30.
10. Caggiano G, Coretti C, Bartolomeo N, Lovero G, De Giglio O, Montagna MT. *Candida* bloodstream infections in Italy: changing epidemiology during 16 years of surveillance. BioMed Res Int. 2015, 2015: 256580.

* De acordo com o guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>

11. Calamari SE, Bojanich MA, Barembaum SR, Berdicevski N, Azcurra AI. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. Med Oral Pathol Oral Cir Bucal. 2011; 16(1): 23-8.
12. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9(7): 327-35.
13. Campos JADB. Confiabilidade de informações na área da saúde [Monografia de Especialização]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2008.
14. Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio, DMP. Presence of *Mutans Streptococci* and *Candida* Spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Arch Oral Biol. 2006; 51(11): 1024–8.
15. Cassone A, De Bernadis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. J Infect Dis. 1987; 156(5): 777-83.
16. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, et al. Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2011; 80(3): 903-8.
17. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001; 183(18): 5385-94.
18. Channoum MA, Burns GR, Elteen A, et al. Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp to human buccal epithelial cells. Infect Immun. 1986;54(1):189-93.
19. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. Rev Assoc Med Bras. 1996; 42(4): 229-36.
20. Costa AC, Rasteiro VMC, Hashimoto ESS, Araújo CF, Pereira CA, et al. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidosis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012; 114(1): 67–74.
21. Costa, AC, Rasteiro VMC, Pereira CA, Hashimoto, ES, Junior MB, Junqueira JC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine and LED mediated photodynamic therapy. Arch Oral Biol. 2011; 56(11): 1299-305.

22. De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabrò M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol.* 2012; 35(4): 459-68.
23. D'Eça Júnior A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, Figueiredo PMS, Monteiro CA. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(3): 334-8.
24. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *Int J Microbiol.* 2014; 2014: 456878.
25. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-93.
26. Douglas LJ. Surface composition and adhesion of *Candida albicans*. *Bio Soc Trans.* 1985; 13(6): 982-4.
27. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; 11(1): 30-6.
28. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(4): 895-903.
29. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of Curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(9): 927-34.
30. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses.* 2011;54(2): 123-30.
31. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013; 51(3): 243-51.
32. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 2010; 103(1): 1545-57.
33. Epstein JB, Polsky B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. *Clin Ther.* 1998; 20(1): 40-57.

34. Florez, FLE. Terapia fotodinâmica em micro-organismos cariogênicos-Estudo in vitro. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.
35. Freire F, de Barros PP, Ávila DS, Brito GNB, Junqueira JC, Jorge AOC. Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(5): 1511-8.
36. Giroldo LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(1):109–12.
37. Giusti JS, Fontana CR, Guimarães OC, Pinchemel LC, Bagnato VS. Single equipment combines simultaneous application of mechanical ultrasound and photodynamic action for microbial control. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010; 7(2): 137-8.
38. Goldman GH, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50(1): 25-32.
39. Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010; 145(4): 477-89.
40. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2001; 9(12): 591-6.
41. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 1992; 55(1): 145-57.
42. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases. *Curr Top Med Mycol*. 1996; 7(1): 55-69.
43. Ivanov AV, Reshetnicov AV, Ponomarev GV. One more PDT application of Chlorin e6. *SPIE*. 2000; 3909: 131-7.
44. Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, et al. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun*. 1995; 63(3): 984-8.

45. Kanbe T, Li RK, Wadsworth E, Calderone RA, Cutler JE. Evidence for expression of the C3d receptor of *Candida albicans* in vitro and in vivo obtained by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Infect Immun*. 1991; 59(5):1832-8.
46. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002; 45(5-6): 160-5.
47. Karaman M, Firinci F, Karaman O, Uzuner N, Bahar IH. Long-term oropharyngeal colonization by *C. albicans* in children with cystic fibrosis. *Yeast*. 2013; 30(11): 429–36.
48. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1) 445–51.
49. Khan A, Ahmad A, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Ocimum sanctum essential oil inhibits virulence attributes in *Candida albicans*. *Phytomedicine*. 2014; 21(4): 448–52.
50. Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, de Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*. 2006; 161(4): 219-23.
51. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol*. 2000; 72(5): 676–80.
52. Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*. 2002; 50(4): 243-60.
53. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994; 72(3): 283-8.
54. Kumar R, Shukla PK. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. *Fungal Biol*. 2010; 114(2-3): 189-97.
55. Lalla RV, Latortue MC, Hong CH, Ariyawardana A, D'Amato-Palumbo S, Fischer DJ, et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support Care Cancer*. 2010; 18(8): 985-92.

56. Lennon AM, Buschalla W, Switalski L, Stookey GK. Residual caries detection using visible fluorescence. *Caries Res.* 2002; 36(5): 315-9.
57. Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(5): 632-8.
58. Macdonald F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *Sabouraudia.* 1984; 22(1): 79-82.
59. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova.* 2000; 23(2): 237-43.
60. Mane A, Pawalle C, Gaikwad S, Bembalkar S, Risbud A. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. *Med Mycol.* 2011; 49(5): 548–51.
61. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindós G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses.* 2009; 54(4): 10–6.
62. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med.* 2011; 11: 119.
63. Martins Jda S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, 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; 111(1): 71-7.
64. Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Guazzelli LS, Oliveira FM, Severo LC. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013; 46(3): 340-2.
65. Menezes TOA, Gillet LCS, Menezes SAF, et al. Virulence factors of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-1-positive patients. *Curr HIV Res.* 2013; 11(4): 304-8.
66. Mima EG, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(3): 392-401.

67. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(12): 827-33.
68. Mjör IA. Microscopic changes in dentin. *Ala Dent Rev.* 1960; 8: 16-21.
69. Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.* 2003; 23(5A): 3591-600.
70. Morschhäuser J, Virkola R, Korhonen TK, Hacker J. Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1997; 153(2): 349-55.
71. Motta-Silva AC, Aleva NA, Chavasco JK, Armond MC, França JP, Pereira LJ. Erythematous oral candidiasis in patients with controlled type II diabetes mellitus and complete dentures. *Mycopathologia.* 2010; 169(3): 215-23.
72. Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TI, Azeredo J, Oliveira R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia.* 2010; 169(3): 175-82.
73. Noumi E, Snoussi M, Hentati H, et al. Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains. *Mycopathologia.* 2010; 169(4): 269-78.
74. Ohgushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res.* 1975; 54(5): 1019-26.
75. O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, et al. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2005; 11(47): 7499-507.
76. Pakshir K, Zomorodian K, Karamitalab M, Jafari M, Taraz H, Ebrahimi H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *J Mycol Med.* 2013; 23(2): 113-8.
77. Park B, Kim J, Kim M, Lee S, Takeoka GR, Oh K, et al. Curcuma longa L. constituents inhibit sortase A and *Staphylococcus aureus* cell adhesion to fibronectin. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(23): 9005–9.
78. Pasquali L. Psicometria. *Rev Esc Enferm USP.* 2009; 43(esp): 992-9.
79. Pattiyathanee P, Vilaichone R, Chaichanawongsaroj N. Effect of curcumin on *Helicobacter pylori* biofilm formation. *African J Biotechnol.* 2009; 8 (19): 5106-15.

80. Pereira CA, da Costa AC, Machado AK, Beltrame Júnior M, Zöllner MS, Junqueira JC, et al. Enzymatic activity, sensitivity to antifungal drugs and *Baccharis dracunculifolia* essential oil by *Candida* strains isolated from the oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mouths and nipples. *Mycopathologia*. 2011; 171(2):103–9.
81. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2005; 93(3): 288-93.
82. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(10): 3185-90.
83. Pinto E, Ribeiro IC, Ferreira NJ, Fortes CE, Fonseca PA, Figueiral MH. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37(10): 587-92.
84. Policard. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumikre de Wood. *C R Soc Bid*. 1924; 91: 1423-8.
85. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate methods for detection of phospholipase activity in *C. albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20(1): 7-14.
86. Pulga FG. Estudo clínico comparativo entre o uso dos lasers e métodos convencionais de diagnóstico e tratamento em dentes decíduos na presença de lesão cariosa [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2001.
87. Rajendran R, Robertson DP, Hodge PJ, Lappin DF, Ramage G. Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type 1 diabetes. *Mycopathologia*. 2010; 170(4): 229-35.
88. Ramage G, Coco B, Sherry L, Bagg J, Lappin DF. In vitro *Candida albicans* biofilm induced proteinase activity and SAP8 expression correlates with in vivo denture stomatitis severity. *Mycopathologia*. 2012; 174(1): 11–9.
89. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 98(1): 53-9.

90. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005; 4(4): 633-8.
91. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6(7): 979-86.
92. Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V, Hemapriya J, Kannan R. Virulence factors and anti-fungal sensitivity pattern of *Candida* spp. isolated from HIV and TB patients. *Indian J Microbiol*. 2011; 51(3): 273–8.
93. Ramos L de S, Barbedo LS, Braga-Silva LA, dos Santos AL, Pinto MR, Sgarbi DB. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol*. 2015; 32(2):122-5.
94. Reducing our irreproducibility. [editorial] *Nature* 2013; 496(7446): 398.
95. Ribeiro AL, de Alencar Menezes TO, de Melo Alves-Junior S, de Menezes SA, Marques-da-Silva SH, Rosário Vallinoto AC. Oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy (HAART) in Belém, Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015; 120(1): 29-33.
96. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Mima EG, Machado AL, Bagnato VS, Vergani CE. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. Photodynamic disinfection of complete dentures. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(1): 161-8.
97. Riceto EBM, Menezes RP, Penattic MPA, Pedroso RS. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol*. 2015; 32(2):79-82.
98. Rossoni RD, Barbosa JO, de Oliveira FE, de Oliveira LD, Jorge AC. Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(5): 1679-84.
99. Rüchel R. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. *Microbiol Sci*. 1986;3(10): 316-9.
100. Rüchel R. Proteinases of pathogenic fungi. *Mycoses*. 1999; 42(suppl 1): 48-52.
101. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia*. 1984; 22(3): 201-7.

102. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(2): 668-79.
103. Sanguinetti, M, Posteraro, B, Lass-Flörl, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses* 2015; 58 (2): 2-13.
104. Sanitá PV, Zago CE, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AI, et al. In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of non-*albicans* *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014; 118(1): 84-91.
105. Sanitá PV, Zago CE, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Enzymatic activity profile of a Brazilian culture collection of *Candida albicans* isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. *Mycoses*. 2014; 57(6): 351-7.
106. Santos PO, Melo JO, Ponzzes CM, Alves JÁ, de Melo DL, Botelho N de S, et al. Multilocus enzyme electrophoresis analysis and exoenzymatic activity of *Candida albicans* strains isolated from women with vaginal candidiasis. *Mycoses*. 2012; 55(1): 64–72.
107. Sardi JC, Duque C, Höfling JF, Gonçalves RB. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Med Mycol*. 2012; 50(5): 467–75.
108. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5(2): 125-57.
109. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr Microbiol*. 2010; 61(6): 534-40.
110. Silva S, Hooper SJ, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(2): 264-72.
111. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2): 288-305.
112. Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Manson B. Comparison of QLF and DIAGNOdent® for quantification of smooth surface caries: an in vitro study. *Caries Res*. 2001; 35(1): 21-6.

113. Shoukri MM, Asyali MH, Donner A. Sample size requirements for the design of reliability study: review and new results. *Stat Methods Med Res.* 2004; 13(4): 251-71.
114. Soares BM, da Silva DL, Sousa GR, Amorim JC, de Resende MA, Pinotti M, et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 94(1): 65–70.
115. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop.* 2002; 81(2): 101-10.
116. Song, J, Choid, B, Jin, EJ, Yoon, Y, Choi KH. Curcumin suppresses *Streptococcus mutans* adherence to human tooth surfaces and extracellular matrix proteins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(7):1347-52.
117. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011; 55(1): 143-66.
118. Tay ST, Abidin IA, Hassan H, Ng KP. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal of susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. *Med Mycol.* 2011; 49(5): 556–60.
119. Thiele MC, Carvalho Ade P, Gursky LC, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. The role of candidal histolytic enzymes on denture-induced stomatitis in patients living in retirement homes. *Gerodontology.* 2008; 25(4): 229-36.
120. Thompson GR 3rd, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(4): 488-95.
121. Tsai HF, Sammons LR, Zhang X, Suffis SD, Su Q, Myers TG, et al. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(8): 3308-17.
122. Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 10): 1393-8.
123. Vasconcelos BC, Novaes M, Sandrini FA, Maranhão Filho AW, Coimbra LS. Prevalence of oral mucosa lesions in diabetic patients: a preliminary study. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008; 74(3): 423-8.

124. Von Tappeiner H, Jodlbauer A. Ueber die wirkung der photodynamischen (fluorescierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. Arch Klin Med. 1904; 80: 427-87.
125. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Antimicrob Chemother. 1998; 42(1): 13-28.
126. Wang E, Farmakiotis D, Yang D, McCue DA, Kantarjian HM, Kontoyiannis DP, et al. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. J Antimicrob Chemother. 2015; 70(8): 2362-8.
127. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(2): 382-402.
128. Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. Periodontol 2000. 2011; 55(1): 250-65.
129. Ying S, Qing S, Chunyang L. The effect of gentian violet on virulent properties of *Candida albicans*. Mycopathologia. 2010; 169(4): 279–85.
130. Zheng H, Yu YS. TOP2 gene is involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. Mol Cell Biochem. 2012; 364(1-2): 45–52.

Anexo A – Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Confiabilidade do método baseado em Agar para avaliação da produção de enzimas degradativas em isolados clínicos de *Candida albicans*

Pesquisador: Livia Nordi Dovigo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 33014714.0.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 747.940

Data da Relatoria: 12/08/2014

Apresentação do Projeto:

O Projeto de Pesquisa foi apresentado de forma completa, com o delineamento da pesquisa e demonstração da relevância do mesmo para a área odontológica.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é estabelecer um protocolo reprodutível utilizando-se a metodologia da produção de halos de precipitação em meio Agar específico para análise da produção das enzimas fosfolipase e proteinase em *Candida albicans* por meio da análise de confiabilidade das medidas efetuadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os pesquisadores, como não haverá contato com os sujeitos da pesquisa anterior, no qual as cepas foram isoladas, e a identificação das cepas não está vinculada ao seu doador, esta pesquisa não oferecerá nenhum risco aos sujeitos da pesquisa anterior. No entanto, há riscos relacionados aos pesquisadores durante a execução das etapas microbiológicas, como a contaminação do pesquisador ao manipular as cepas e isolados clínicos. Para prevenção desses riscos, os pesquisadores serão treinados para utilização de todos os métodos e barreiras que mantêm o trabalho no laboratório asséptico, como por exemplo, o trabalho próximo a chama de bico de Bunsen, uso de câmara de fluxo e a utilização de EPI's (Equipamentos de Proteção

Endereço: HUMAITÁ 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0184

Fax: 1633-0184

E-mail: cep@fow.unesp.br; mnagle@fow.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 747.940

individual). Além disso, afirmaram que todos os materiais utilizados serão autoclavados previamente a realização de seu descarte.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Pesquisador apresentou embasamento científico adequado, demonstração da relevância e justificativa para a realização do estudo, assim como descreveu a forma de obtenção da amostra e a metodologia que será realizada. Todos os documentos obrigatórios foram entregues adequadamente. Por meio dos resultados deste estudo, os pesquisadores contribuirão de forma relevante para a ciência com a divulgação de um protocolo reprodutível para a análise da produção de enzimas degradativas de *Candida albicans*, auxiliando outros pesquisadores na obtenção de resultados mais confiáveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram incluídos e apresentados de forma adequada.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O estudo apresenta importância científica, sendo um tema atual e com contribuição para a área Odontológica. Ausência de pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 12 de agosto de 2014.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-003

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br, mmele@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 747.940

ARARAQUARA, 12 de Agosto de 2014

Assinado por:
Maurício Melrelles Nagle
(Coordenador)

Endereço: HUMAITÁ 1880
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164 Fax: 1633-0164 E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

24/07/2015

ScholarOne Manuscripts

PDF



Medical Mycology

ANEXO B – Comprovante de Submissão do Artigo 1

1

Submission
ConfirmationThank you for submitting your manuscript to *Medical Mycology*.

Manuscript ID: MM-2015-0192

Title: Reliability of the Agar based method to assess the production of degradative enzymes in clinical isolates of *Candida albicans*

Arentes, Paula

Santá, Paula

Santá, Carolina

Authors: Barbeiro, Camila

Reina, Bárbara

Vergani, Carlos Eduardo

Dovigo, Livia

Date Submitted: 24-Jul-2015

Print
 Return to Dashboard

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2015. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

@ScholarOneNews |
 System Requirements |
 Privacy Statement |
 Terms of Use

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 11 de setembro de 2017

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 11 de setembro de 2015.

PAULA TAMIÃO ARANTES