



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

FERNANDA FREIRE

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA EXPRESSÃO
DOS GENES *SAP5*, *LIP9* E *PLB2* EM *Candida albicans***

2013

FERNANDA FREIRE

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA EXPRESSÃO DOS
GENES *SAP5*, *LIP9* E *PLB2* EM *Candida albicans***

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

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Aguinaldo Silva Garcez Segundo

Faculdade de Odontologia e Medicina
São Leopoldo Mandic

São José dos Campos, 12 de Dezembro de 2013.

DEDICATÓRIA

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge pela confiança, dedicação e transmissão de seu conhecimento para todos os alunos. Agradeço por ter o privilégio de ser sua orientada e de fazer parte dessa sua carreira brilhante. Aprendi muito com toda sua experiência de vida profissional. Muito obrigada por tudo.

À Profa. Adjunta Juliana Campos Junqueira que está sempre pronta a nos ajudar. Te admiro muito como pessoa, mãe, esposa, professora e coordenadora. Você é uma mulher completa. É impressionante como você consegue fazer tudo o que precisa tão bem e com tanta dedicação. Meus agradecimentos por sua ajuda sempre que precisei.

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

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

À aluna de doutorado Patrícia Pimentel de Barros por toda sua paciência e dedicação em me ensinar tudo o que sabe sobre biologia molecular para que eu desse continuidade aos meus experimentos.

À aluna de iniciação científica Damara da Silva Ávila que me ajudou em meus experimentos. Muito obrigada por estar no laboratório comigo e se tornar mais que uma aluna, uma amiga.

À Polyana das Graças Figueiredo Vilela que me ajudou a interpretar os dados finais da minha dissertação. Obrigada pela atenção e paciência.

Ao aluno de mestrado Rodnei Dennis Rossoni que tirou minhas dúvidas quanto às coletas feitas no Hospital Emílio Ribas. Muito obrigada pela ajuda.

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

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

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

À FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de estudo concedida (nº 2012/09188-0).

*“A humildade é para as virtudes o que o fio
é para os rosários: tire-se o fio e todas as contas
se perdem; tire-se a humildade e todas as
virtudes desaparecem”*

Santo Cura de Ars

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODO	21
4.1 Comitê de Ética	21
4.2 Amostras	21
4.3 Formação de biofilme <i>in vitro</i>	22
4.4 Fotossensibilizador e laser	24
4.5 Avaliação da Expressão dos genes <i>SAP5</i>, <i>LIP9</i> e <i>PLB2</i> ..	24
4.5.1 Extração e dosagem de RNA	25
4.5.2 PCR em Tempo Real	26
4.5.2.1 Tratamento do RNA com DNase	26
4.5.2.2 Reação de Transcrição Reversa (RT – PCR)	27
4.5.2.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real	27
5 RESULTADOS	30
5.1 Eficiência de amplificação da qPCR	30
5.2 Quantificação relativa	33
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	46
8 REFERÊNCIAS	47
ANEXO	55

Freire F. Efeitos da terapia fotodinâmica na expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* em *Candida albicans* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

Com o crescente aumento de cepas de *Candida* spp. resistentes a antifúngicos, torna-se importante e necessário a realização de pesquisas que avaliem os efeitos de novos métodos terapêuticos, como a Terapia Fotodinâmica (TFD), sobre fatores de virulência desse gênero. A produção das enzimas hidrolíticas aspartil-proteinase (*SAP*), lipase (*LIP*) e fosfolipase (*PL*) é considerado um importante fator de virulência de *C. albicans*. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre biofilmes de *Candida albicans*, avaliando seus efeitos sobre a expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* pelas leveduras. Foram utilizadas cepas clínicas de *Candida albicans* (n=9) que foram isoladas de pacientes portadores do vírus HIV e a cepa padrão ATCC 18804. A quantificação da expressão dos genes foi relacionada à produção de enzimas hidrolíticas (*SAP5*, *LIP9* e *PLB2*) nas amostras clínicas e na cepa de referência utilizando-se o ensaio de PCR em tempo real. Para a terapia fotodinâmica foi utilizado laser de gálio-alumínio-arseneto de baixa potência (vermelho visível, 660 nm) como fonte de luz e o corante azul de metileno a 300 µM, como fotossensibilizador. Foram avaliados quatro grupos experimentais, para cada cepa: a) F+L+: sensibilização com azul de metileno e irradiação com laser; b) F+L-: somente tratamento com azul de metileno; c) F-L+: somente irradiação com laser e d) F-L-: grupo controle, sem sensibilização com azul de metileno e ausência de luz. Os resultados obtidos foram analisados pelo Software do equipamento de real-time. A TFD diminuiu a expressão dos genes em 60% das amostras para o gene *SAP5* e em 50% das amostras diminuiu a expressão de *LIP9* e *PLB2*. Pode-se concluir que a TFD teve um efeito sobre os genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* de *C. albicans*, considerados fatores de virulência.

Palavras – chave: Biofilme. *Candida albicans*. Genes das enzimas hidrolíticas. Terapia Fotodinâmica. PCR em Tempo Real.

Freire F. Effects of photodynamic therapy in gene expression SAP5, LIP9 and PLB2 in *Candida albicans* [dissertation] São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

With the increasing number of strains of *Candida* ssp. resistant to antifungal agents, becomes important and necessary the accomplishment of researches that evaluate the effects of new therapeutic methods, like Photodynamic therapy (PDT) in virulence factors of that gender, as the production of the hydrolytic enzymes aspartyl-proteinase (SAP), lipase (LIP) and phospholipase (PL). Thus, the objective of this study was to verify the effects of the photodynamic therapy on biofilms of *Candida albicans*, evaluating their effects on the expression of the genes SAP5, LIP9 and PLB2 for the yeast. Clinical strains of *Candida albicans* (n=9) isolated from patients bearers of the virus HIV and a pattern strain ATCC 18804 were used. The quantification of gene expression was related to the production of hydrolytic enzymes (SAP5, LIP9 and PLB2) in clinical samples and the reference strain using the PCR assay in real time. For photodynamic therapy were used laser-aluminum-gallium arsenide low power (red visible, 660 nm) as light source and the methylene blue to 300 µM, as a photosensitizer. We were assessed four experimental groups for each strain: a) F+L+: sensitization with methylene blue and laser irradiation; b) F+L-: only treatment with methylene blue; c) F-L+: only laser irradiation and d) F-L-: control group, without sensitization with methylene blue and light absence. The results were analyzed by the software of the real-time equipment. The PDT decreased gene expression in 60% of samples for gene SAP5 and 50% of the samples decreased expression of LIP9 and PLB2. It can be concluded that PDT had an effect on the genes SAP5, LIP9 and PLB2 of *C. albicans*.

Keywords: Biofilm. *Candida albicans*. Genes of hydrolytic enzymes. Photodynamic Therapy. Real Time PCR.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* apresenta leveduras comensais da cavidade bucal sendo a espécie *C. albicans* considerada a mais virulenta. Alterações no ambiente do hospedeiro podem resultar em transição da fase comensal para a patogênica, provocando infecções superficiais e ou sistêmicas (Samaranayake et al., 2009; Wilson et al., 2009).

Nos últimos 30 anos ocorreu grande aumento na incidência das infecções fúngicas em seres humanos (Lass-Flörl, 2009). Tais infecções podem ser tanto superficiais, afetando pele, cabelo, unhas e mucosas, ou sistêmicas, envolvendo os principais órgãos do organismo (Ruping et al., 2008).

O gênero *Candida* pode ser encontrado em aproximadamente 25 a 50% dos indivíduos saudáveis como um micro-organismo comensal, não causando danos aparentes nem induzindo inflamação nos tecidos adjacentes. Contudo, sob certas condições predisponentes, pode multiplicar-se, tornando-se patogênico, e penetrar nos tecidos do hospedeiro causando inflamação e destruição tecidual (Hube, 2004; Koziol-Montewka et al., 2006).

As infecções fúngicas na cavidade bucal são causadas principalmente pela espécie *Candida albicans* (Cate et al., 2009; Souza et al., 2010), que constitui cerca de 70% dos fungos isolados da boca (Souza et al., 2010; Jorge, 2012).

Em pacientes portadores de próteses totais, é comum o surgimento de uma condição conhecida como *denture sore mouth* dentre outras denominações e, entre os dentistas, conhecida como estomatite protética (EP), frequentemente associada à presença de candidose eritematosa (Shadomy et al., 1985).

A candidose bucal é a manifestação fúngica mais comum ocorrida em pacientes com AIDS (Coogan et al., 2006). O tratamento da candidose bucal em pacientes HIV positivo é dificultado em virtude de episódios recorrentes e exposição intermitente e contínua a terapia antifúngica que favorece a seleção de cepas resistentes.

Outro dado importante revela que os micro-organismos são encontrados na natureza na forma de biofilme, ou seja, os micro-organismos ficam arranjados em comunidades inseridas em matriz de substâncias polissacarídicas extracelulares (PEC) mostrando características fenotípicas que se diferenciam das planctônicas (Seneviratne et al., 2008). Estas características são responsáveis pela resistência a antifúngicos, relacionadas com limitações difusionais à passagem do agente através da PEC ou alterações fenotípicas e genotípicas. Sabe-se que a virulência de *C. albicans* está ligada a seus fatores intrínsecos, que contribuem para o desenvolvimento de candidoses. Os principais são a formação de hifas, o dimorfismo, as alterações fenotípicas, a aderência, o sinergismo com as bactérias, seus mecanismos de interferência com o sistema de defesa do hospedeiro e a produção de enzimas hidrolíticas (Hube, 2004, Wilson et al., 2009).

Dentre as enzimas hidrolíticas produzidas por *C. albicans*, a proteinase aspartil secretada (*SAP*) é um dos principais fatores de virulência envolvido na patogenia da candidose orofaríngea. Esta enzima tem a capacidade de degradar proteínas humanas como os anticorpos presentes na saliva, mucina e colágeno e ativar a produção de outros fatores de virulência por *Candida* (Naglik et al., 2008); além de atuar diretamente sobre o sistema imune inato, degradando componentes do sistema complemento como C3b, C4b e C5 (Gropp et al., 2009). Além da *SAP*, *C. albicans* também produz outras enzimas hidrolíticas, como a lipase (*LIP*) e a fosfolipase (*PL*), que contribuem para a colonização e infecção através da degradação de componentes da membrana das células hospedeiras (Barros et al., 2008).

Com o aumento das infecções oportunistas causadas pelo gênero *Candida* em pacientes imunodeprimidos e consequente surgimento de cepas emergentes resistentes aos antifúngicos convencionais, são requeridas novas opções de tratamento para candidose bucal com finalidade de melhorar o arsenal terapêutico. Desta forma, a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido relatada como uma nova opção para redução de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal (Souza et al., 2006; Souza et al., 2010).

A busca por mecanismos de ação diferentes contra leveduras do gênero *Candida*, que possibilitem sua utilização em tratamento das diversas formas de candidose, assim como da estomatite protética, direciona para a TFD mediada por novos corantes e fontes de luz acessíveis e de baixo custo, que além de ser de fácil acesso para aplicação na cavidade bucal, contribui para a diminuição do tempo de tratamento e não compromete a microbiota local (Wainwright, 1998).

Este estudo, teve como proposta investigar os efeitos da TFD utilizando azul de metileno e laser de baixa potência em biofilmes de *C. albicans*, verificando-se a expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O interesse em pesquisas com biofilmes microbianos em doenças humanas provém da observação de que os micro-organismos dentro dos biofilmes exibem características fenotípicas únicas que aumentam a resistência a mecanismos imunológicos e à terapia antimicrobiana (Kuhn, Ghannoum, 2004; Martinez, Casadevall, 2006a; Martinez, Casadevall, 2006b; Mowat et al., 2007). Muito do nosso conhecimento sobre a formação de biofilme de fungos, foi adquirida por meio de estudos de biofilmes formados por espécies de *Candida* em superfícies naturais ou artificiais (Kumaroto, 2002; Lopez-Ribot, 2005; Ramage et al., 2005).

Procedimentos médicos invasivos, utilização de antibióticos de largo espectro e corticosteroides e a epidemia da AIDS estão associados com uma incidência significativamente maior de doenças fúngicas invasivas, que são inerentemente difíceis de tratar (Kojik, Darouiche, 2004). Além disso, a parede espessa da célula fúngica e a formação de hifas aderentes podem aumentar a resistência aos antifúngicos e, portanto, contribuir para a resistência de biofilmes fúngicos (Martinez, Fries, 2010).

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

Junqueira et al. (2012), coletaram amostras da cavidade bucal de 60 pacientes HIV positivos e através da identificação das espécies pelo

sistema API20C, as espécies mais comumente isoladas foram *C. albicans* (51,56%), seguida por *Candida não-albicans* (43,73%). Além disso, comprovaram que muitos desses isolados eram resistentes ao fluconazol e anfotericina B, antifúngicos importantes no tratamento de candidoses.

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

Estudos demonstraram que *C. albicans* e cepas *não-albicans* estão desenvolvendo resistência aos antifúngicos indicados para tratamento de candidose bucal, como fluconazol e anfotericina B (Winteger et al., 2007). O fluconazol é o antifúngico de escolha para tratamento de candidose bucal em indivíduos com HIV, entretanto Sant´Ana et al. (2002) observaram perfis de 50% e 6,15% de dose-dependência e resistência aos azóis (fluconazol, itraconazol e cetoconazol) para cepas *não-albicans* e *C. albicans*, respectivamente, de 142 isolados da cavidade bucal de pacientes com AIDS.

Foram relatados perfis de resistência de biofilme de *Candida* de 30 a 2000 vezes maiores do que células planctônicas para os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol, constituindo um importante fator de virulência (Hawser, Douglas, 1995; Dunne, 2003).

Como infecção oportunista mais comum, a incidência de candidose oral aumentou rapidamente durante várias décadas, devido ao crescente número de hospedeiros comprometidos, tais como pacientes com transplantes de órgãos, infecção pelo HIV, aqueles submetidos à quimioterapia ou à utilização incorreta de antibióticos (Chandra et al., 2001; El-Azizi et al., 2004). Além disso, espécies de *Candida* são consideradas as principais causadoras da estomatite protética (Casaroto, Lara, 2010; Zomorodian et al., 2011; Yan et al., 2012).

Candida albicans, que é um comensal de superfícies mucosas humanas e patógeno oportunista em indivíduos imunossuprimidos, é geralmente associado com a formação de biofilme (Santos et al., 2008). *Candida albicans* continua a ser a espécie mais comum causadora de candidemia, mas a proporção causada por espécies de *Candida* não-*albicans* está aumentando (Uludamar et al., 2010). Os principais fatores de risco para candidemia incluem presença de cateteres, alimentação parenteral e antibióticos de largo espectro (Ramage et al., 2006). Este fungo pode colonizar dispositivos protéticos endo ou exogenamente. As células de levedura podem separar-se de biofilmes aderidos nos dispositivos e causar fungemia e infecção sistêmica. O tratamento geralmente requer a remoção do dispositivo e um curso prolongado de terapia antimicrobiana (Crump, Collignon, 2000).

Com a incidência cada vez maior de infecções fúngicas, o número de antifúngicos efetivos continua limitado (Cowen et al., 2002). Além disso, a resistência aos antifúngicos está aumentando (Jain et al., 2010). Como resultado, há uma necessidade premente para o desenvolvimento de novas modalidades de tratamentos antifúngicos (Dai et al., 2011).

Recentemente, a terapia fotodinâmica (TFD) emergiu como uma alternativa para o tratamento convencional de infecções causadas por *C. albicans* (Munin et al., 2007; Peloi et al., 2008). Na TFD, os corantes fotossensibilizantes podem processar o tipo I e tipo II de fototoxicidade na presença de comprimentos de onda específicos de luz (MacDonald, Dougherty, 2001). Irradiação de fotossensibilizadores com comprimentos de onda de luz adequados, na presença de oxigênio molecular produz espécies reativas de oxigênio altamente citotóxicas, tais como os radicais livres hidroxila (tipo I de fototoxicidade) e oxigênio singleto (tipo II de fototoxicidade) (Castano et al., 2004). Corantes fenotiazínicos tais como azul de metileno (AM), azul de toluidina O (ATO), e fitalocianina foram mostrados como fototóxicos contra biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e *Porphyromonas gingivalis* (Bhatti et al., 1998; Wood et al., 1999; Soukos et

al., 2000). Recentemente, tem sido relatado que AM também tem efeitos fungicidas contra *C. albicans* (Munin et al., 2007; Peloi et al., 2008; Pereira et al., 2011).

O fotossensibilizador azul de metileno é um corante tricíclico (Malik et al, 2010) que atua como indicador redox que é azul em um ambiente oxidante e torna-se incolor após redução. Este combinado com luz foi relatado como sendo benéfico na supressão do vírus influenza, *Helicobacter pylori*, e *C. albicans* (Lambrecht et al., 1991; Millson et al., 1996).

A terapia fotodinâmica é baseada no conceito de que um corante não tóxico, conhecido como fotossensibilizador, pode ser localizado preferencialmente em determinados tecidos ou células e subsequentemente ativado pela luz visível inofensiva para produzir espécies reativas de oxigênio que podem matar as células que se ligaram ao fotossensibilizador. Numerosos estudos publicados demonstraram que a TFD é altamente eficaz na inativação *in vitro* de fungos (Lambrechts et al., 2005; Lam et al., 2011; Smijs, Pavel, 2011; Freire et al., 2013). Adicionalmente, considera-se que o desenvolvimento da resistência a TFD por micro-organismos é um evento improvável, pois esta é considerada como um processo tipicamente multi-alvo, que é uma diferença entre TFD e a maioria dos antifúngicos (Lyon et al., 2011).

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

A TFD requer uma fonte de luz para ativar o fotossensibilizador por exposição à luz de baixa potência visível no comprimento de onda específico. A dose de luz total, taxas de dosagem e a profundidade da destruição variam de acordo com cada tecido tratado e fotossensibilizador utilizado (Conceder et al., 1997; Biel, 2002). Atualmente, a fonte de luz aplicada na terapia fotodinâmica são aquelas de hélio (633 nm), gálio - alumínio - arsênio (630-690, 830 ou 906 nm), e de árgon (488-514 nm) (Juzeniene et al., 2004).

Pereira et al. (2011), avaliaram o efeito da TFD *in vitro* usando azul de metileno (0,1 mg/mL – 300 µM) como fotossensibilizador e laser de baixa potência (InGaAIP – 660 nm – 98 s) como fonte de luz, em biofilmes individuais e mistos de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Após a aplicação da TFD e desprendimento do biofilme, foi realizada a contagem de UFC. Reduções (\log_{10}) de biofilme das espécies individuais foram melhores (2.32-3.29) do que as de biofilme com espécies associadas (1.00-2.44). Seus resultados comprovam que a TFD mediada por azul de metileno pode ser um novo recurso para o controle de biofilmes orais.

Testes *in vivo* também foram realizados utilizando-se corantes azuis e luz vermelha em infecções por *C. albicans*. Dai et al. (2011), realizaram TFD usando os corantes azul de toluidina (ATO), azul de metileno (AM) e novo azul de metileno (NAM) e luz vermelha visível (400nm a 800nm) em infecções por *C. albicans* causadas através de abrasões na pele de ratos. A TFD foi iniciada desde 30 min até 24 h após a inoculação de *C. albicans* nos ratos. A TFD iniciada a 30 min ou a 24 h pós infecção reduziu significativamente *C. albicans* em peso na abrasão de pele de ratos infectada.

O Real-time, transcrição reversa com base em fluorescência em reação de cadeia da polimerase (PCR), é uma das tecnologias da era genômica e tem se tornado o método de escolha para a detecção de mRNA (Bustin, 2000). Isto tem resultado na sua extensa aplicação nos estudos

genômicos funcionais, na medicina molecular, em ciência forense, virologia, microbiologia e biotecnologia.

Estudos tem mostrado a expressão de enzimas hidrolíticas em biofilme, como Nailis et al. (2010), que avaliaram a expressão destas enzimas na formação de biofilme de *Candida albicans* em silicone em placas de microtitulação, em reatores CDC, em cateter subcutâneo de poliuretano de ratos, e em superfícies mucosas no modelo RHE (epitélio humano reconstituído). Foi relatado que os níveis de expressão de *SAP1* eram mais pronunciadas nos modelos *in vitro*, enquanto que *SAP2*, *SAP4* e *SAP6* foram mais elevados nos modelo *in vivo*. Além disso, *SAP5* foi expressa positivamente em modelos *in vivo* e RHE. Para *SAP9*, *SAP10* os níveis de expressão foram semelhantes em todos os modelos. *PLBs* não foram significativamente expressas em biofilmes, enquanto *LIP1-3*, *LIP5-7* e *LIP9-10* foram altamente expressas nos modelos *in vitro*.

Em estudos de Naglik et al. (2008), foi utilizado RT-PCR para identificar quais *SAPs* eram altamente expressas e potencialmente capazes de contribuir com uma infecção por *C. albicans* no epitélio humano *in vitro* e *in vivo*. Foi observado que *SAP5* era o único gene expresso positivamente de forma significativa em modelos RHE e também foi altamente expresso em amostras de doentes.

Pesquisas também tem relacionado a expressão gênica de células cancerígenas após a aplicação da terapia fotodinâmica. Segundo Dolmans et al. (2003), a TFD é um tratamento citotóxico, predominantemente utilizado em abordagens anticâncer, que depende da retenção de fotossensibilizadores no tumor e sua ativação subsequente pela luz.

Bhuvaneswari et al. (2008), desenvolveram estudo para analisar a resposta angiogênica através de curto (0,5 h) e longo (6 h) intervalos de luz, utilizando hipericina como fotossensibilizador após 24 h e 30 dias do tratamento de um xenoinxerto de carcinoma de bexiga de humano em ratos. O estudo concluiu que ambos intervalos de luz induzem o dano

celular e que o longo intervalo de luz mais o corante hipericina induzem um aumento na expressão de proteínas angiogênicas.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório, demonstraram que a terapia fotodinâmica atuou, inibindo a produção das enzimas hidrolíticas por cepas clínicas de *C. albicans*, utilizando, porém metodologia de Price, que envolve cultivo das cepas após aplicação da terapia fotodinâmica. No presente estudo, avaliar a expressão dos genes logo após a terapia fotodinâmica, sem necessidade de cultivo revelou dados mais precisos da atuação do tratamento nas células de *C. albicans*. A diminuição na produção das enzimas hidrolíticas deve diminuir a virulência das leveduras, atuando em sua penetração e invasibilidade nos tecidos. A proteinase (*SAP*) possui a capacidade de degradar proteínas humanas como anticorpos, mucina e colágeno, ativar a produção de outros fatores de virulência pelas leveduras e atuar diretamente no sistema imune inato do hospedeiro. As lipases (*LIP*) e fosfolipases (*PL*) atuam na colonização das leveduras nos tecidos atuando em componentes das membranas celulares.

Não foram encontrados estudos na literatura que associem a expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* de *C. albicans* após realização da terapia fotodinâmica, a qual apresenta aplicação como uma opção terapêutica para o tratamento de doenças infecciosas, incluindo a candidose bucal. A TFD pode ser uma opção ou um tratamento coadjuvante à quimioterapia antimicrobiana, melhorando o tratamento de infecções orais, aumentando a eficácia e reduzindo seu custo.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre biofilmes de *Candida albicans*, avaliando seus efeitos sobre a expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* pelas leveduras.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Comitê de Ética

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista através da Plataforma Brasil (04569812.5.0000.0077). (Anexo)

4.2 Amostras

Foram utilizadas 9 amostras clínicas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores de HIV do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e uma cepa padrão ATCC 18804. A amostra 1 é a cepa ATCC 18804, as amostras clínicas denominadas de 2 a 8 são procedentes de lesão de candidose bucal, as amostras denominadas 9 e 10 são procedentes de saliva e cada amostra clínica pertence a um indivíduo diferente. No quadro 1 estão as informações acima junto com o código de cada amostra. O projeto de pesquisa para coleta dos isolados clínicos foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista e estes estão armazenados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista.

Quadro 1 – Código das amostras utilizadas neste estudo

Amostra	Procedência	Código da amostra
Amostra 1	ATCC 18804	ATCC
Amostra 2	Paciente 1 – lesão de candidose bucal	1
Amostra 3	Paciente 2 – lesão de candidose bucal	14
Amostra 4	Paciente 3 – lesão de candidose bucal	21
Amostra 5	Paciente 4 – lesão de candidose bucal	31
Amostra 6	Paciente 5 – lesão de candidose bucal	40
Amostra 7	Paciente 6 – lesão de candidose bucal	60
Amostra 8	Paciente 7 – lesão de candidose bucal	70
Amostra 9	Paciente 8 – saliva	76S
Amostra 10	Paciente 9 – saliva	228S

4.3 Formação de biofilme *in vitro*

O biofilme foi formado em fundo de placas de 24 poços de fundo plano (Costar Corning). A ativação das cepas que estavam congeladas a -75°C foi feita em placas de Petri contendo àgar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories PVT. LTD, Índia) com Clofanfenicol (Alamar Tecnocientífica Ltda) e mantidas em estufa a 37°C por 24 h. Após, foi preparado um inóculo de *C. albicans* em caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB – Himedia) suplementado com 100 mM de glicose, diluído 10 vezes em água destilada estéril (10X) e incubado em estufa a 37°C por 16 h. Depois desse período, o inóculo foi lavado duas vezes com solução de NaCl 0,9% estéril e foram feitas suspensões padronizadas em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) contendo 10^7 células/mL em caldo YNB (10X). Foi colocado 1 mL da suspensão de leveduras nos poços das placas, com exceção dos dois últimos que foram deixados como controle negativo. A placa foi incubada por 1 h e 30 min em estufa a 37°C sob agitação de 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, Brasil) para aderência inicial. Após, as placas

foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% estéril e foi colocado 1 mL de caldo YNB diluído 2 vezes em água destilada estéril. A seguir, a placa foi mantida em agitação de 75 rpm a 37°C por 48 h. O caldo foi trocado após 24 h.

Foram avaliados quatro grupos experimentais para cada cepa:

- a) F+L+: sensibilização com azul de metileno e irradiação com laser;
- b) F+L-: somente tratamento com azul de metileno;
- c) F-L+: somente irradiação com laser;
- d) F-L-: grupo controle, sem sensibilização com azul de metileno e ausência de luz.

Foi feita uma placa para cada grupo experimental, sendo 22 poços com formação de biofilme e 2 poços como controle negativo tendo somente caldo YNB diluído 2 vezes em água destilada estéril.

Posteriormente, os grupos F+L+ e F+L- receberam 1 mL da solução de azul de metileno e os grupos F-L+ e F-L- receberam 1 mL de solução de NaCl 0,9% estéril. As placas foram, então agitadas por 5 min (tempo de pré irradiação) em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). A seguir, os grupos F+L+ e F-L+ foram irradiados de acordo com o protocolo descrito no item 4.4.

Após a irradiação dos biofilmes, foi retirada a solução de NaCl 0,9% estéril ou o corante e foi colocado 1 mL de Trizol (para cada 11 poços) no primeiro poço, o qual foi transferido para os seguintes até a remoção total de biofilme. A ponta da ponteira ajudou no desprendimento do biofilme ao passá-la com resistência no fundo dos poços. O Trizol contendo as células do biofilme formado foi transferido para microtubos de 2 mL, já identificados, e armazenados em freezer a -75°C para posterior extração do RNA.

4.4 Fotossensibilizador e laser

Para a sensibilização da levedura foi utilizado o corante azul de metileno, a uma concentração de 300 μM . A solução do corante foi preparada todas as vezes antes de usar, por dissolução do pó (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) em água destilada estéril e filtrada através de uma membrana filtro de 0,22 μm (Millipore, São Paulo, Brasil). Após a filtração, a solução do corante foi armazenada no escuro.

Como fonte de luz foi utilizado laser arseneto de gálio-alumínio (Laser Fácil, Clean Line, Taubaté, Brasil), emitindo luz a 660 nm (vermelho visível), comprimento de onda correspondente à absorção máxima do corante azul de metileno. Os parâmetros utilizados foram como se segue: potência de 35 mW, energia de 10 J, tempo de 285 s, taxa de fluência de 92 mW / cm^2 , e fluência de 5,23 J / cm^2 .

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

4.5 Avaliação da Expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2*

Os isolados clínicos e a cepa ATCC 18804 foram submetidos à avaliação da expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* em relação ao gene endógeno (housekeeping gene) de escolha, *ACT1*, *EFG1* ou *RPP2B*. Essa avaliação foi realizada com e sem a realização da TFD. Os iniciadores para os genes *SAP5*, *LIP9*, *PLB2*, *ACT1* e *RPP2B* foram descritos por Nailis et al. (2010) e para *EFG1* por Hnisz et al. (2012) de acordo com o quadro 2.

As sequências dos iniciadores foram confirmadas no site do Ncbi/ Gene Bank, e são específicas para a espécie *C.albicans*.

Quadro 2 – Iniciadores utilizados de acordo com os respectivos autores

Gene	Sequência dos Primers (5´ - 3´)	Referência
<i>ACT1</i>	FW - TTTTCATCTTCTGTATCAGAGGAACCTTATTT RV – ATGGGATGAATCATCAAACCAGAG	Nailis et al., 2010
<i>RPP2B</i>	FW - TGCTTACTTATTGTTAGTTCAAGGTGGTA RV - CAACACCAACGGATTCCAATAAA	Nailis et al., 2010
<i>EFG1</i>	FW - CATCACAACCAGGTTCTACAACCAAT RV - CTACTATTAGCAGCACCACCC	Hnisz et al., 2012
<i>SAP5</i>	FW – CCAGCATCTTCCCGCACTT RV – GCGTAAGAACCGTCACCATATTTAA	Nailis et al., 2010
<i>PLB2</i>	FW – TGAACCTTTGGGCGACAACCT RV – GCCGCGCTCGTTGTTAA	Nailis et al., 2010
<i>LIP9</i>	FW – CGCAAGTTTGAAGTCAGGAAAA RV – CCCACATTACAACCTTTGGCATCT	Nailis et al., 2010

4.5.1 Extração e dosagem de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o Kit Trizol (Ambion, Inc, AM1926), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Este reagente é composto por uma solução monofásica contendo fenol, isotiocianato de guanidina e outros componentes que permitem o isolamento de um a vasta variedade de RNA.

Os tubos armazenados no freezer a -75°C contendo Trizol e as leveduras coletadas no fundo da placa de 24 poços foram incubados à temperatura ambiente (T.A.) por 10 min. Após este procedimento, 200 µL de clorofórmio (Sigma- Aldrich) foram adicionados e novamente incubados à T.A. por mais 3 min. Transcorrido o tempo, os tubos contendo a solução foram centrifugados a 4°C em rotação de 12.000 x *g* por 15 min em

microcentrífuga refrigerada (MPW Med. Instruments – MPW – 350R). Nesta etapa ocorreu a separação entre a fase aquosa translúcida e a fase orgânica vermelha. Então, a fase aquosa foi, cuidadosamente, transferida para outro microtubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 500 μ L de isopropanol puro (Sigma-Aldrich) para a precipitação do RNA e o microtubo foi incubado por 10 min a T.A. Posteriormente, os tubos foram submetidos a centrifugação de 12.000 x g por 10 min, a 4 °C, para a visualização do sedimento (pellet) de RNA. O sedimento obtido foi lavado com etanol (Sigma-Aldrich) 75% (diluído em água DEPC) para remoção completa de isopropanol. Novamente, o tubo foi centrifugado a 7.500 x g por 5 min, a 4°C. Para a eluição, foi utilizado 25 μ L da solução RNA Storage buffer (Invitrogen) e a solução de RNA foi quantificada em ng/ μ L pelo aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a leitura os tubos foram armazenados em freezer a -75°C.

4.5.2 PCR em Tempo Real

4.5.2.1 Tratamento do RNA com DNase

O RNA total extraído foi tratado com DNase I (Kit - Turbo DNase Treatment and Removal Reagents - AM 1907- Invitrogen), para remover o DNA contaminante. Para o tratamento do RNA extraído foi utilizado 1 μ L de Turbo DNase, acrescido de 2,5 μ L de tampão Turbo DNase (10X), e água DEPC para um volume final da solução de 25 μ L. Esta mistura foi incubada em um termociclador (Mastercycler-Eppendorf) a 37°C por 20 min para completa digestão enzimática. Transcorrido este tempo, foram adicionados 2,5 μ L de DNase Inactivation Reagent (10X) para a inativação completa da reação, sendo que, a solução de inativação foi removida por centrifugação

à 10.000 x g por 1,5 min, à temperatura ambiente (T. A.). O sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo de 200 µL.

4.5.2.2 Reação de Transcrição Reversa (RT – PCR)

Após o tratamento com DNase, o RNA foi transcrito para cDNA utilizando-se o Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para a transcrição reversa foi adicionado em um microtubo de 200 µL os seguintes reagentes: Enzima mix (RNase Out e Superscript III RT), Reaction mix (oligo (dT)₂₀ (2,5 µM), *random hexamers* (2,5 ng/µL), 10 mM MgCl₂ e dNTPs), solução de RNA e água DEPC para um volume final de 20 µL. Posteriormente, os microtubos foram colocados no termociclador (Mastercycler-Eppendorf) com as temperaturas de 25°C por 10 min, 50°C por 30 min e 85°C por 5 min. Para o procedimento final, foi adicionado 1 µL de RNase H em cada tubo e estes foram incubados a 37°C por 20 min para completa remoção do RNA remanescente não transcrito. O novo cDNA obtido foi armazenado a -20 °C.

4.5.2.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

Os produtos da RT- PCR foram amplificados para a quantificação relativa da expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2*. As reações de quantificação foram realizadas de acordo com as condições e parâmetros previamente descritos para cada um dos genes alvo. A expressão genética é apresentada como o *ratio* da concentração dos genes alvo, descritos acima, em relação à concentração do gene endógeno (*ACT1*, *EFG1* ou

RPP2B) e representam a expressão média obtida de reações distintas de PCR em Tempo Real.

Neste trabalho foram testados três genes endógenos, sendo que, o gene endógeno escolhido foi o que apresentou Ct (Threshold Cycle) similar aos genes alvos analisados. O Ct é o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo avaliado. As médias dos valores de Ct, medidas em triplicata, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvo com normalização a um controle interno. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica com base na fórmula:

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

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

A eficiência (E) da amplificação deve variar idealmente entre os 90% e 100% ($-3.6 > \text{slope} > -3.1$) e foi determinada pela equação:

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

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

O método qPCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR[®] Green (Kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG - Invitrogen) que consiste na seguinte reação: em um microtubo de 200 µL, foi colocado 12,5 µL de Super mix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (10X) (corante de referência), 10 µM de primer senso, 10 µM de primer anti-senso, solução de cDNA alvo e água DEPC para o

volume final de 25 μ L. Os microtubos foram incubados em um termociclador (LineGene K- Bioer Technology) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 min, seguido de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 1 ciclo de 60°C por 30 s. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de cada ciclo da PCR, permitiu a monitora o da quantidade crescente de cDNA amplificado, sendo os dados obtidos analisados no Software do equipamento de real-time.

5 RESULTADOS

5.1 Eficiência de amplificação da qPCR

Primeiramente, foi testada a eficiência de amplificação das amostras 1, 2 e 3 para análise dos seguintes dados: determinar o desempenho do ensaio de PCR em tempo real, escolher o melhor gene endógeno (*ACT1*, *EFG1* ou *RPP2B*) que foi posteriormente utilizado como referência ativa com os genes alvos (*SAP5*, *LIP9* e *PLB2*), determinar qual a melhor concentração de cDNA para utilizar na qPCR e verificar se os genes alvos foram expressos pelas amostras testadas.

Foram utilizadas triplicatas de amostras em 3 diluições seriadas de base 10 (1:1, 1:10 e 1:100), sendo que os três pontos de diluição foram considerados na confecção da curva de eficiência. Procurou-se observar em todas as curvas *Slope* ~ -3,32, coeficiente de correlação ~ 1,000, eficiência ~100% e *Ct* ≤ 32. Esses dados estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 – Valores de *Slope*, correlação, eficiência e *Ct* médio na concentração 1:1 da amostra 1

	<i>ACT1</i>	<i>RPP2B</i>	<i>EFG1</i>	<i>SAP5</i>	<i>LIP9</i>	<i>PLB2</i>
<i>Slope</i>	-3,31	-3,47	-3,52	-3,39	-3,32	-2,98
Correlação	-0,998	-0,997	-1,000	-1,000	-0,999	-0,967
Eficiência	100,5	94,17	92,34	97,23	100,08	116,55
<i>Ct</i> médio na concentração 1:1	27,01	20,58	24,46	27,14	27,65	28,73

Tabela 2 – Valores de *Slope*, correlação, eficiência e Ct médio na concentração 1:1 da amostra 2

	ACT1	RPP2B	EFG1	SAP5	LIP9	PLB2
<i>Slope</i>	-3,47	-3,24	-3,55	-3,47	-3,47	-3,47
Correlação	-0,995	-0,994	-0,999	-0,999	-0,996	-0,997
Eficiência	94,17	103,53	91,28	94,17	94,17	94,17
Ct médio na concentração 1:1	21,43	16,31	18,01	24,16	26,84	24,21

Tabela 3 – Valores de *Slope*, correlação, eficiência e Ct médio na concentração 1:1 da amostra 3

	ACT1	RPP2B	EFG1	SAP5	LIP9	PLB2
<i>Slope</i>	-3,39	-3,34	-3,60	-3,29	-3,34	-3,28
Correlação	-0,990	-0,995	-0,997	-0,997	-0,996	-0,996
Eficiência	97,23	99,25	90,00	101,34	99,25	101,78
Ct médio na concentração 1:1	22,24	14,39	17,73	22,55	26,09	23,13

Analisando as tabelas 1, 2 e 3 foi possível verificar que o melhor gene endógeno para se utilizar foi *ACT1* pois este apresentou eficiência e Ct mais próximos aos dos genes alvos do que o genes *RPP2B* e *EFG1*. Podemos verificar também que a melhor concentração a ser utilizada foi 1:1, pois nesta o Ct já se apresentou no seu limiar de aceitação.

O gene *PLB2* não foi expresso na cepa ATCC 18804 (amostra1) pois sua eficiência apresentou-se muito além do aceitável (116,55) conforme mostra a tabela 1. No intuito de se evitar uma análise com valores inconsistentes, este gene não participou da comparação relativa da cepa ATCC 18804.

Outro parâmetro para a escolha do gene endógeno foi a ausência de variação de Ct nas amostras de estudo, uma vez que o controle endógeno deve ser expresso uniformemente em todas as amostras.

Foi feita a amplificação dos genes endógenos nos quatro grupos do presente estudo (F-L-, F-L+, F+L- e F+L+) para as amostras 1 e 2. Os valores de Ct dos três genes endógenos nos diferentes tratamentos estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Valores de Ct dos genes endógenos *ACT1*, *RPP2B* e *EFG1* nos quatro grupos da amostra 1

Amostra 1	F-L-	F-L+	F+L-	F+L+
<i>ACT1</i>	26,21	23,94	25,72	24,67
<i>RPP2B</i>	21,41	18,83	20,62	20,61
<i>EFG1</i>	25,38	22,39	24,40	24,07

Tabela 5 – Valores de Ct dos genes endógenos *ACT1*, *RPP2B* e *EFG1* nos quatro grupos da amostra 2

Amostra 2	F-L-	F-L+	F+L-	F+L+
<i>ACT1</i>	21,81	24,52	21,74	21,85
<i>RPP2B</i>	18,17	21,54	19,90	16,50
<i>EFG1</i>	15,52	17,58	20,66	15,69

Para todos os controles endógenos ocorreu variação muito grande entre os grupos F-L- e F-L+. A menor variação foi de 2,06 para *EFG1* e de 3,37 para *RPP2B*, ambas da amostra 2. A variação aceitável seria de 0,3, sendo assim, no intuito de se evitar uma análise com valores inconsistentes, o grupo F-L+ não participou da comparação relativa em todas as amostras clínicas e para a cepa ATCC 18804.

A cepa ATCC 18804 mostrou maior variação que o aceitável em todos os casos, porém ao avaliar as variações de Ct na amostra 2 podemos verificar que a *ACT1* continuou sendo o melhor gene endógeno pois sua variação foi de 0,07 entre os grupos F-L- e F+L- e de 0,04 entre os grupos F-L- e F+L+. Os genes *RPP2B* e *EGF1* obtiveram uma variação maior que a *ACT1* e não foram considerados na quantificação relativa.

5.2 Quantificação relativa

O resultado da quantificação relativa representou a variação no nível de expressão dos genes de interesse (*SAP5*, *LIP9* e *PLB2*) entre as amostras sensibilizadas pela TFD e a amostra do controle não tratado (calibrador, normalizado em 1).

Em cada reação, o bloco de PCR em Tempo Real foi preenchido com triplicata de amostras sensibilizadas contendo *primers* específicos para cada um dos genes-alvo e com triplicatas de amostras sensibilizadas contendo *primers* do controle endógeno, com o controle não tratado, o qual serviu de “calibrador”. Os resultados foram obtidos pelo método de comparação da variação do Ct dos genes de interesse nas amostras sensibilizadas e na amostra controle e estão apresentados a seguir na tabela 6.

Tabela 6 – Número de vezes que cada gene foi expresso em relação ao controle (gene endógeno ou calibrador) normalizado em 1 nas amostras 1 a 10 (ATCC, 1, 14, 21, 31, 40, 60, 70, 76S e 228S), com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Calibrador: controle antes do tratamento normalizado em 1

(continua)

Cepas <i>C. albicans</i>	Genes	Tratamento		
		F-L-	F+L-	F+L+
Amostra 1 (ATCC)	<i>SAP5</i>	1,00	0,98	1,08
	<i>LIP9</i>	1,00	0,86	1,23
	<i>PLB2</i>	---	---	---
Amostra 2 (1)	<i>SAP5</i>	1,00	0,43	0,79
	<i>LIP9</i>	1,00	0,28	0,72
	<i>PLB2</i>	1,00	0,14	0,58
Amostra 3 (14)	<i>SAP5</i>	1,00	0,78	0,73
	<i>LIP9</i>	1,00	0,52	0,35
	<i>PLB2</i>	1,00	0,29	0,29
Amostra 4 (21)	<i>SAP5</i>	1,00	0,59	0,98
	<i>LIP9</i>	1,00	0,57	0,61
	<i>PLB2</i>	1,00	0,73	0,93
Amostra 5 (31)	<i>SAP5</i>	1,00	0,85	0,46
	<i>LIP9</i>	1,00	1,50	2,41
	<i>PLB2</i>	1,00	1,00	1,54
Amostra 6 (40)	<i>SAP5</i>	1,00	1,21	0,76
	<i>LIP9</i>	1,00	3,15	1,56
	<i>PLB2</i>	1,00	3,14	1,47

Tabela 6 – Número de vezes que cada gene foi expresso em relação ao controle (gene endógeno ou calibrador) normalizado em 1 nas amostras 1 a 10 (ATCC, 1, 14, 21, 31, 40, 60, 70, 76S e 228S), com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Calibrador: controle antes do tratamento normalizado em 1

Cepas <i>C. albicans</i>	Genes	Tratamento		
		F-L-	F+L-	F+L+
Amostra 7 (60)	<i>SAP5</i>	1,00	0,79	0,46
	<i>LIP9</i>	1,00	0,56	0,45
	<i>PLB2</i>	1,00	0,88	0,98
Amostra 8 (70)	<i>SAP5</i>	1,00	1,98	1,77
	<i>LIP9</i>	1,00	2,87	2,52
	<i>PLB2</i>	1,00	2,28	1,11
Amostra 9 (76S)	<i>SAP5</i>	1,00	1,52	1,15
	<i>LIP9</i>	1,00	3,30	3,70
	<i>PLB2</i>	1,00	4,23	1,29
Amostra 10 (228S)	<i>SAP5</i>	1,00	2,16	1,35
	<i>LIP9</i>	1,00	1,03	0,31
	<i>PLB2</i>	1,00	0,75	0,87

(conclusão)

As figuras abaixo apresentam a variação no nível de expressão dos genes de interesse (*SAP5*, *LIP9* e *PLB2*) entre as amostras sensibilizadas pelo grupo F+L+ e a amostra do controle não tratado (calibrador, normalizado em 1).

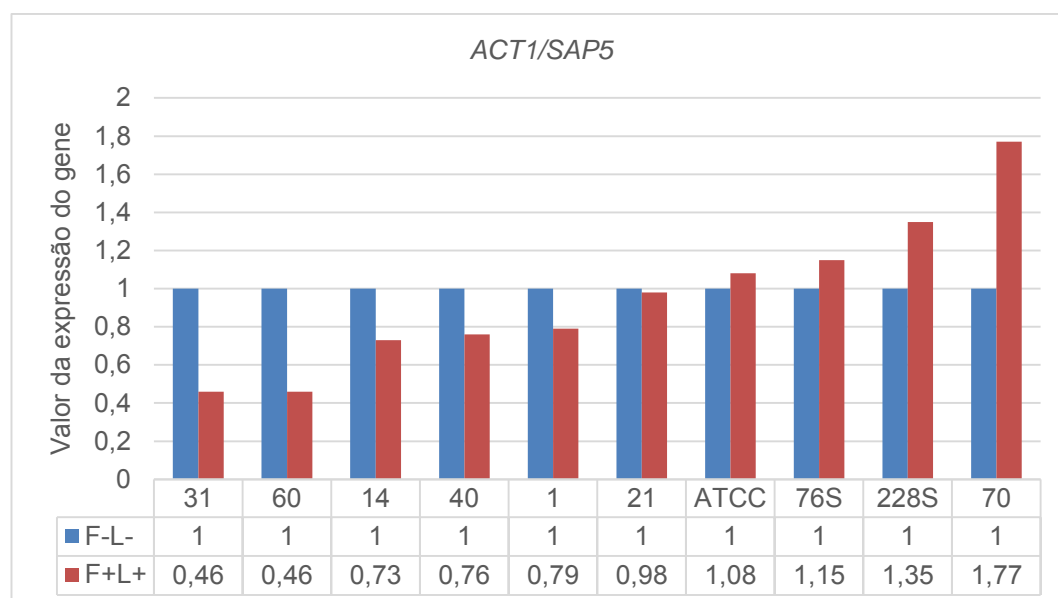


Figura 1 – Gráfico da expressão do gene *SAP5* na condição F+L+ em relação à condição F-L-, normalizado em 1, das amostras ATCC, 1, 14, 21, 31, 40, 60, 70, 76S e 228S.

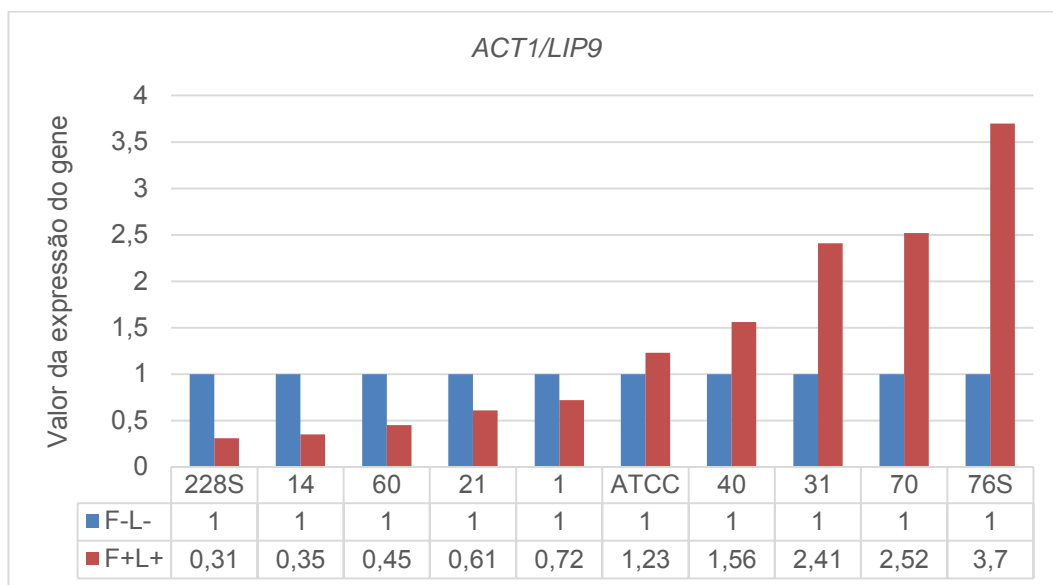


Figura 2 – Gráfico da expressão do gene *LIP9* na condição F+L+ em relação à condição F-L-, normalizado em 1, das amostras ATCC, 1, 14, 21, 31, 40, 60, 70, 76S e 228S.

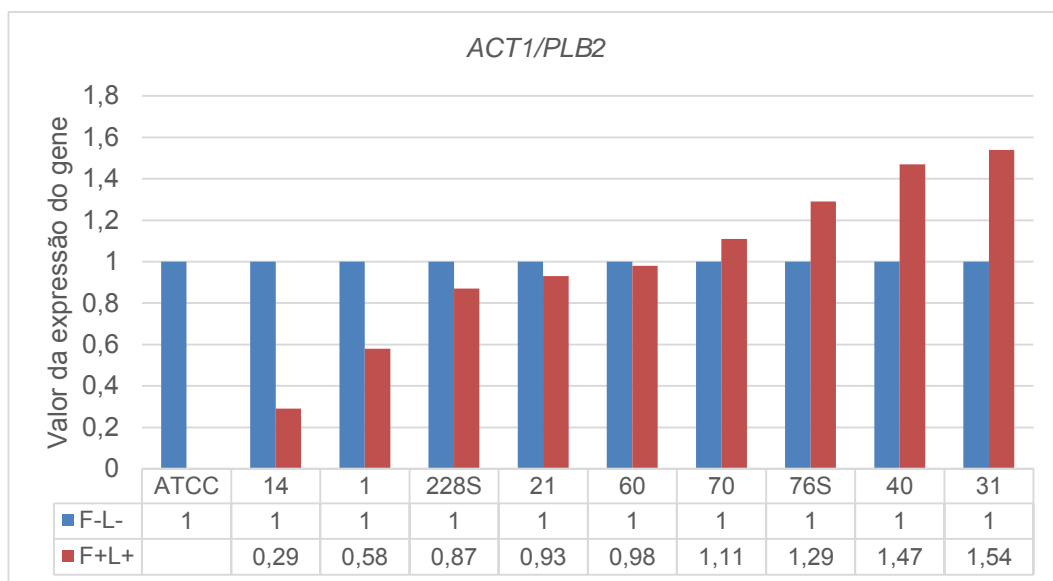


Figura 3 – Gráfico da expressão do gene *PLB2* na condição F+L+ em relação à condição F-L-, normalizado em 1, das amostras ATCC, 1, 14, 21, 31, 40, 60, 70, 76S e 228S. O gene *PLB2* não foi expresso na cepa ATCC 18804 pois sua eficiência apresentou-se muito além do aceitável (116,55) conforme a tabela 1. No intuito de se evitar uma análise com valores inconsistentes, este gene não participou da comparação relativa da cepa ATCC 18804.

Pode-se observar que as amostras testadas apresentaram perfis diferentes ao expressarem seus genes nas diferentes condições. A TFD

diminuiu a expressão dos genes em 60% das amostras para o gene *SAP5* e em 50% das amostras diminuiu a expressão de *LIP9* e *PLB2*. Em uma parte dos casos em que houve a supressão dos genes, a condição F+L- diminuiu mais a expressão do que na condição F+L+, porém nas amostras 3, 5, 6, 7 e 10 ocorreu o contrário.

6 DISCUSSÃO

A estimativa precisa da eficiência da PCR em tempo real depende de uma série de fatores tais como os reagentes, montagem do experimento, qualidade da amostra e métodos de análise.

A eficiência de amplificação da qPCR é a taxa na qual um *amplicon* de qPCR é gerado, geralmente expressa em porcentagem. Se um *amplicon* dobrar em quantidade durante a fase geométrica da amplificação da qPCR, significa que a mesma apresentou 100% de eficiência.

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

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

Para o método Ct comparativo de quantificação ser validado, a eficiência da amplificação do alvo e a eficiência da amplificação da referência ativa (controle endógeno) devem ser aproximadamente iguais. Por isso o gene *ACT1* foi escolhido nos resultados do presente estudo como controle endógeno para a comparação relativa. A tabela 1 mostra que

o gene *ACT1* apresentou eficiência mais próxima com os genes alvos (*SAP5* e *LIP9*): 100,5, 97,23 e 100,08, respectivamente, quando comparada aos outros controles endógenos testados (*RPP2B* e *EFG1*), apresentaram eficiência de 94,17 e 92,34, respectivamente.

A tabela 2 mostra que a eficiência da *ACT1* foi a mesma dos genes alvos, 94,17 e a tabela 3 apresenta a eficiência da *ACT1* próxima a 100%, assim como a dos genes alvos.

Para a escolha do gene endógeno verificou-se também o valor de Ct (Threshold Cycle), o qual deve ser próximo ao dos genes alvos para que ocorra uma análise com valores consistentes na qPCR. O Ct é o primeiro ciclo no qual houve aumento significativo na quantidade de amplificado e foi o parâmetro usado para a quantificação. De acordo com a tabela 1, a cepa ATCC 18804 (amostra1) apresentou valor de Ct de aproximadamente 27 para a *ACT1*, *SAP5* e *LIP9*, enquanto os genes *RPP2B* e *EFG1* apresentam um valor de Ct de 20,58 e 24,46, respectivamente, demonstrando que a melhor escolha foi o gene *ACT1*. Nas tabelas 2 e 3 pode-se observar que os genes *RPP2B* e *EFG1* apresentaram diferença de aproximadamente 7 graus no valor de Ct quando comparados aos dos genes alvos, comprovando, mais uma vez, que a *ACT1* foi o melhor gene endógeno para a realização da quantificação relativa.

Um outro critério para a escolha do gene endógeno seria a ausência de variação de Ct nas amostras de estudo, uma vez que o gene endógeno deve ser expresso da mesma forma em todas as células em todos os tratamentos.

De acordo com as tabelas 4 e 5, para todos os controles endógenos houve variação grande entre os grupos F-L- e F-L+. A menor variação foi de 2,06 para *EFG1* e de 3,37 para *RPP2B*, ambas da amostra 2. A variação mais aceitável seria de 0,3, sendo assim, no intuito de evitar-se uma análise com valores inconsistentes, o grupo F-L+ não participou da comparação relativa em todas as amostras clínicas e para a cepa ATCC 18804.

Observando-se ainda as tabelas 4 e 5 verifica-se que a cepa ATCC 18804 demonstrou maior variação que o aceitável em todos os casos, porém ao avaliar as variações de Ct na amostra 2, podemos verificar que a *ACT1* continua sendo o melhor gene endógeno pois sua variação foi de 0,07 entre os grupos F-L- e F+L- e de 0,04 entre os grupos F-L- e F+L+. Os genes *RPP2B* e *EGF1* obtiveram uma variação maior que a *ACT1* excluindo-os da quantificação relativa.

Nailis et al. (2006) investigaram a estabilidade da expressão de oito genes endógenos (*ACT1*, *PMA1*, *RIP*, *RPP2B*, *LSC2*, *IMH3*, *CPA1* e *GAPDH*) potencialmente utilizados como genes de referência para estudos de expressão gênica em biofilmes de *C. albicans* e verificaram que o gene *ACT1* foi o mais estável entre eles.

Para justificar uma possível diferença no comportamento de cepas clínicas de *C. albicans* e cepas padrão, como relatado acima, temos o estudo de Rahman et al. (2007), que verificaram que a inoculação por via oral da cepa padrão de *C. albicans* SC5314 em ratos imunocomprometidos, induziu, na maioria dos casos, colonização transitória da orofaringe sem desenvolvimento de doença. Porém, uma cepa de *C. albicans* isolada a partir de um paciente com candidose orofaríngea colonizou a orofaringe de ratos que não receberam imunossupressão adicional. Esse estudo demonstrou que uma cepa clínica pode ser mais virulenta que uma cepa padrão, podendo assim oferecer dados mais precisos do que realmente ocorre com a expressão de genes, como ocorreu no presente estudo.

Para o desenvolvimento da PCR em Tempo Real, buscou-se a obtenção de amostras que apresentassem valores de $A_{260/280} \sim 2,0$, de modo que o grau de pureza necessário para o bom desempenho das reações subsequentes fosse atingido. Se o valor de $A_{260/280} \geq 2,0$; a amostra de RNA é considerada como relativamente livre de proteína. Além disso, o RNA foi purificado com a utilização de DNase I (Kit - Turbo DNase Treatment and Removal Reagents - AM 1907- Invitrogen).

As enzimas hidrolíticas *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* são importantes fatores de virulência de *C. albicans*. A enzima *SAP5* tem a capacidade de degradar proteínas humanas como os anticorpos presentes na saliva, mucina e colágeno, ativar a produção de outros fatores de virulência por *Candida* (Naglik et al., 2008), além de atuar diretamente sobre o sistema imune inato, degradando componentes do sistema complemento como C3b, C4b e C5 (Gropp et al., 2009). A lipase (*LIP*) e a fosfolipase (*PL*), contribuem para a colonização e infecção através da degradação de componentes da membrana das células hospedeiras (Barros et al., 2008). A TFD pode atuar como um coadjuvante no tratamento de candidoses, uma vez que estudos comprovam que esta pode reduzir o crescimento *in vitro* desses microorganismos (Munin et al., 2007, Peloi et al., 2008, Pereira et al., 2011; Freire et al., 2013).

Pereira et al. (2011), avaliaram o efeito da TFD *in vitro* usando azul de metileno (0,1 mg/mL – 300 µM) como fotossensibilizador e laser de baixa potência (InGaAlP – 660 nm – 98 s) como fonte de luz, em biofilmes individuais e mistos de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Após a aplicação da TFD e desprendimento do biofilme, foi realizada a contagem de UFC. Reduções (\log_{10}) de biofilme das espécies individuais foram melhores (2.32-3.29) do que as de biofilme com espécies associadas (1.00- 2.44). Seus resultados comprovam que a TFD mediada por azul de metileno pode ser um novo recurso para o controle de biofilmes orais. Por este motivo decidimos realizar a TFD em biofilmes de *C. albicans*, utilizando azul de metileno e laser de baixa potência no intuito de verificar se este tratamento além de reduzir as UFC também atuaria na expressão de enzimas hidrolíticas.

O presente estudo mostrou comportamentos diferentes na expressão dos genes avaliados para cada amostra testada. Isso pode ter ocorrido devido a sensibilidade da qPCR, uma vez que qualquer pequena alteração pode afetar seu resultado final. O que se esperava era que a TFD diminuísse a expressão dos genes alvos e que os grupos F-L+ e F+L- não

a alterasse. Porém como já foi exposto, o grupo em que foi aplicado apenas o laser alterou a expressão dos genes endógenos e por isso este grupo não foi considerado na quantificação relativa. O grupo F+L- não alterou os genes endógenos mas mostrou a supressão de alguns genes em algumas amostras e a super expressão em outras. E o grupo F+L+ apresentou um comportamento semelhante ao grupo F+L-.

Nos últimos anos, tem havido um aumento na aplicação da laser terapia de baixa intensidade no tratamento de várias desordens e injúrias neurológicas, odontológicas, oftalmológicas, em doenças dermatológicas e outras lesões (Posten et al., 2005, Stonecipher, Kezirian, 2008). O mecanismo de ação do laser sobre a cicatrização de feridas, por exemplo, é através da modulação da inflamação por redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, e aumento dos níveis de fator de crescimento anti-inflamatório (Pinto et al., 2009). Shen et al. (2013) utilizaram a laser terapia para a reparação de nervos periféricos danificados em ratos. Dois pontos de gatilho foram irradiadas transcutâneamente usando laser fosfato arseneto de gálio-alumínio (GaAlAsP) a 660 nm, 2 min por dia, durante 10 dias consecutivos. O tratamento mostrou uma melhora significativa no índice funcional do nervo ciático e melhora acentuada na capacidade de espalhamento dos dedos das partes traseiras. Medidas eletrofisiológicas (pico de amplitude e área) demonstraram que o laser melhorou significativamente a função do nervo e reduziu a atrofia muscular. Avaliações histomorfométricas revelaram que a estimulação do laser acelerou a regeneração do nervo ao longo de uma área maior de tecido neural, resultando em axônios de maior diâmetro e bainhas de mielina de espessura maior do que o observado em ratos sem o tratamento. Assim sendo, o laser tem um papel muito importante na atuação em diversas células e esse pode ter sido o motivo pelo qual ele alterou a expressão dos genes endógenos testados no presente estudo.

O resultado esperado em relação ao grupo F+L- foi o que aconteceu com a amostra 5, a qual obteve um valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ igual a 1,00, valor do

grupo F-L- que é normalizado em 1,00 para que os grupos que exibam alguma alteração gênica seja calibrado em relação a ele. Porém em nosso estudo a hipótese era de que apenas o grupo F+L+ obtivesse o valor diferente de 1,00.

Como o gene *PLB2* não apresentou uma boa eficiência, ele não participou da comparação relativa da cepa ATCC 18804, conforme explicado anteriormente.

Em relação ao gene *SAP5*, 60% das amostras diminuíram sua expressão tanto no grupo F+L- quanto F+L+. Para os genes *LIP9* e *PLB2* 50% das amostras diminuíram a expressão nos grupos F+L- e F+L+.

Em 5 amostras o grupo F+L+ diminuiu mais a expressão dos genes do que o grupo F+L-. Nas amostras 3 e 7, isso aconteceu para os genes *SAP5* e *LIP9* e na amostra 5 para *SAP5*. Nas amostras 6 e 10 a TFD diminuiu a expressão dos genes *SAP5* e *LIP9*, respectivamente, enquanto o grupo com o corante aumentou essa expressão. Isso demonstra que a TFD pode ser mais inibitória do que apenas a aplicação de fotossensibilizador.

As amostras clínicas escolhidas para este estudo foram de pacientes diferentes, e a diferença entre a super expressão dos genes em algumas amostras e a supressão em outras pode ser devido ao estado imunológico de cada indivíduo. Plerce e Kumamoto (2012), verificaram que a expressão gênica de *EFG1* em camundongos infectados por *C. albicans* era diferente dependendo do estado imunológico do hospedeiro. A demonstração de que a expressão e a atividade de *EFG1* em *C. albicans* difere durante a colonização de um camundongo saudável ou imunocomprometido mostra que o micro-organismo ajusta a sua fisiologia quando coloniza diferentes hospedeiros. Além disso, os efeitos em um hospedeiro saudável em uma população heterogênea de *C. albicans* contendo células com diferentes níveis de atividade de *EFG1* mostram que a pressão seletiva no hospedeiro pode alterar a composição da população, permitindo que a população responda ao estado imunológico. O estado do hospedeiro pode ser a chave

para a capacidade de *C. albicans* colonizar como comensais inofensivos em alguns hospedeiros mas tornarem-se um mortal patógeno em outros.

Estudos tem relatado o tratamento de doenças com a utilização do fotossensibilizador azul de metileno. Ramamoorthy et al. (2013), publicaram um relato de caso no qual utilizaram este corante no tratamento de choque séptico grave em um paciente imunodeprimido após o transplante de fígado e verificaram que após a administração do azul de metileno, a estabilidade hemodinâmica foi rapidamente restabelecida, concluindo que na sepse grave em um paciente imunodeprimido, o corante deve ser considerado no início como uma opção terapêutica para o tratamento de vasoplegia refratária.

Davis et al. (2013) também sugerem a viabilidade do reaproveitamento de drogas não-oncológicas, como o azul de metileno, como uma resposta antagonista ao choque térmico terapêutico para a quimiossensibilização de células cancerosas. Esses dados demonstram que o grupo F+L- pode ter alterado a expressão dos genes devido ao seu efeito isolado sobre certas células eucarióticas.

Não foram encontrados estudos na literatura que associem a expressão dos genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* de *C. albicans* após a realização da terapia fotodinâmica. Porém, estudos tem mostrado a expressão de enzimas hidrolíticas em biofilme, como Nailis et al. (2010), que avaliaram a expressão destas enzimas na formação de biofilme de *Candida albicans* em silicone em placas de microtitulação, em reatores CDC, em cateter subcutâneo de poliuretano de ratos, e em superfícies mucosas no modelo RHE (epitélio humano reconstituído). Foi relatado que os níveis de expressão de *SAP1* eram mais pronunciadas nos modelos *in vitro*, enquanto que *SAP2*, *SAP4* e *SAP6* foram mais elevados nos modelo *in vivo*. Além disso, *SAP5* foi expressa positivamente em modelos *in vivo* e RHE. Para *SAP9*, *SAP10* os níveis de expressão foram semelhantes em todos os modelos. *PLBs* não foram significativamente expressas em biofilmes, enquanto *LIP1-3*, *LIP5-7* e *LIP9-10* foram altamente expressas

nos modelos *in vitro*. Em nosso estudo não trabalhamos com modelo *in vivo*, porém utilizamos amostras clínicas de pacientes com HIV.

No estudo de Naglik et al. (2008), foi utilizado RT-PCR para identificar quais SAPs eram altamente expressas e potencialmente capazes de contribuir com uma infecção por *C. albicans* no epitélio humano reconstituído (RHE) *in vitro* e *in vivo*. Foi observado que SAP5 foi o único gene expresso positivamente de forma significativa em modelos RHE e também foi altamente expresso em amostras de pacientes. Este foi um dos motivos pelos quais utilizamos a enzima SAP5 no presente estudo.

Samaranayake et al. (2013), cultivaram duas cepas de *C. albicans*, SC5314 (cepa do tipo selvagem, WT) e sua derivada (HLC54), durante 48 horas em várias condições, incluindo na presença ou ausência de discos de silicone e soro humano. O crescimento de células de ambas as cepas, em culturas planctônicas e em biofilme foi monitorada em três momentos (90 min, 24 h e 48 h) por um ensaio de redução de sal de tetrazólio e por microscopia eletrônica de varredura. Também foram analisadas por RT-PCR a expressão dos genes de virulência *ALS3*, *HWP1*, *EAP1*, *ECE1*, *SAP1 - SAP10*, *PLB1*, *PLB2*, *PLC* e *PLD*. Em células planctônicas, a expressão dos dez genes SAP foi inicialmente maior na cepa WT, mas estas foram altamente expressas na cepa HLC54 por 48 h. Foi observado uma super expressão de *ALS3*, *HWP1*, *EAP1*, *ECE1*, *SAP1*, *SAP4*, *SAP6 - SAP10*, *PLB1*, *PLB2* e *PLC* para os biofilmes WT cultivadas em discos de silicone soro tratados em pelo menos um ponto de tempo, em comparação aos biofilmes em discos sem o soro. Assim, os autores concluíram que o soro humano estimula o crescimento de biofilme de *C. albicans* sobre os discos de silicone e regula positivamente a expressão de genes de virulência, em particular os genes de adesão *ALS3* e *HWP1* e genes codificadores de hidrolase SAPs, *PLB1* e *PLB2*. Esta resposta pode comprovar a susceptibilidade à colonização de *C. albicans* no hospedeiro humano e como este estudo demonstra a super-expressão de genes considerados fatores de virulência em biofilmes de *C. albicans*, nosso

estudo se torna importante ao verificarmos como os genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* se comportam frente à terapia fotodinâmica.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a terapia fotodinâmica (TFD), representada neste estudo pela fotossensibilização com azul de metileno seguida pela irradiação com laser de baixa potência AlGaAs, apresentou efeitos sobre os genes *SAP5*, *LIP9* e *PLB2* de *C. albicans*, consideradas fatores de virulência.

7 REFERÊNCIAS*

Barros LM, Boriollo MF, Alves AC, Klein MI, Gonçalves RB, Höfling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. Arch Oral Biol. 2008;53(12):1172-8.

Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. J Photochem Photobiol. 1998;68(3):370-6.

Bhuvanewari R, Gan YY, Lucky SS, Chin WW, Ali SM, Soo KC, et al. Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. Molecular Cancer. 2008;7:56.

Biel MA. Photodynamic therapy in head and neck cancer. Curr Oncol Rep. 2002;4(1):87-96.

Bustin AS. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Mol End. 2000;25:169-93.

Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. Fitoterapia. 2010;81(5):323-8.

Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004;1:279-93.

Cate JM, Klis FM, PereiraTC, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 2009; 88(2):105-15.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001;80(3):903–8.

Conceder WE, Hopper C, Speight PM, Bown SG. Photodynamic therapy: an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity. *Int J Câncer*. 1997;71(6):937-42.

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

Cowen LE, Anderson JB, Kohn LM. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:139–65.

Crump JA, Collignon PJ. Intravascular catheter-associated infections. *Eur J Clin Mic Infect Dis*. 2000;19(1):1–8.

Dai T, Arce V.J.B, Tegos G.P., Hamblin M.R. Blue Dye and Red Light, a Dynamic Combination for Prophylaxis and Treatment of Cutaneous *Candida albicans* Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011; Dec. 2011, 55(12):5710–5717.

Davis AL, Cabello CM, Qiao S, Azimian S, Wondrak GT. Phenotypic identification of the redox dye methylene blue as an antagonista of heat shock response gene expression. In metastatic melanoma cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(2):4185-202.

Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):380-7.

Dunne WN. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2003;15:155-66.

El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol*. 2004;96(5):1067–73.

Freire F, Costa ACBP, Pereira CA, Junior MB, Junqueira JC, Jorge AOC. Comparison of the effect of rose bengal- and eosin Y-mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2013;28(5).

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

Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, Skerka C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol*. 2009;47(2-3):465-75.

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

Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in-vitro*. *Ant Ag Chem*. 1995;39(9):2128-31.

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

Jain A, Jain S, Rawat S. Emerging fungal infections among children: a review on its clinical manifestations, diagnosis, and prevention. *J Pharm Bioallied Sci*. 2010;2(4):314–20.

Jorge AOC. *Microbiologia e Imunologia Oral*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

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

Juzeniene A, Juzenas P, Ma LW, Iani V, Moan J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2004;19(3):139-49.

Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(12):255–67.

Koziol-Montewka M, Magrys A, Paluch-Oles J, Bogut A, Bucznski K, Jablonka S. MPO and cytokines in the serum of cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection. *Immunol Invest*. 2006;35(2):167-79.

Kuhn DM, Ghannoum MA. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr Opin Investig Drugs*. 2004;5(2):186–97.

Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5(6):608–11.

Lam M, Jou PC, Lattif AA, Lee Y, Malbasa CL, Mukherjee PK, et al. Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011;87(4):904–9.

Lambrecht B, Mohr H, Knuver - Hopf J, Schmitt. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang*. 1991;60(4):207-13.

Lambrechts SA, Aalders MC, J, Marle JV. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005;49(5):2026–34.

Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*. 2009;52(3):197–205.

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

Lopez-Ribot JL. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Curr Biol*. 2005;15(12):453–5.

Lyon JP, Moreira LM, Moraes PC, Santos FV, Resende MA. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses*. 2011;54(5):265–71.

MacDonald I, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyr Phthalocyanines*. 2001;5:105–29.

Malik R, Manocha A, Suresh DK. Photodynamic therapy – a strategic review. *Indian J Dent Res*. 2010;21(2):285-91.

Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect Immun*. 2006a;74(11):6118–23.

Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006b;50(3):1021–33.

Martinez LR, Fries BC. Fungal Biofilms: Relevance in the setting of human Disease. *Curr Fungal Infect Rep*. 2010;4:266–75.

Millson CE, Wilson M, MacRobert AJ, Bedwell J, Brown SG. The killing of *Helicobacter pylori* by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Med Microbiol*. 1996;44(4):245-52.

Mowat E, Butcher J, Lang S, Williams C, Ramage G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 2007;56(9):1205–12.

Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B*. 2007;88(1):16–20.

Naglik J, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*. 2008;154(11):3266–80.

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

Nailis H, Kucharíková S, Řičicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H and Coenye T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiology*. 2010;10:114-25.

Peloi LS, Soares RR, Biondo CE, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci*. 2008;33(2):231–7.

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

Pinto NC, Pereira MH, Stolf NA, Chavantes MC. Low level laser therapy in acute dehiscence saphenectomy: Therapeutic proposal. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009;24(1):88–91.

Plerce JV, Kumamoto CA. Variation in *Candida albicans* *EFG1* expression enables host- dependent changes in colonizing fungal populations. *MBio*. 2012;3(4):117-12.

Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg*. 2005;31(3):334–40.

Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, Challacombe SJ, Naglik JR. Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial hostpathogen interactions. *Microbes Infect*. 2007;9(5):615–22.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005;4(4):633–8.

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006;6(7):979–86.

Ramamoorthy S, Patel S, Bradburn E, Kadry Z, Uemura T, Janicki KP, et al. Use of methylene blue for treatment of severe sepsis in an immunosuppressed patient after liver transplantation. *Case Rep Transplant*. 2013;2013:203791.

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

Ruping MJ, Vehreschild JJ, Cornely OA. Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. *Drugs*. 2008;68(14):1941–62.

Samaranayake LP, Leung WK, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontology*. 2009;49:39-59.

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

Samaranayake YH, Cheung BPK, Yau JYY, Yeung SKW, Samaranayake LP. Human Serum Promotes *Candida albicans* Biofilm Growth and Virulence Gene Expression on Silicone Biomaterial. *PLoS One*. 2013;8(5):e62902.

Sant’Ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcântara AP, et al. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(2):253-7.

Santos VR, Gomes RT, de Mesquita RA, de Moura MD, França EC, de Aguiar EG, et al. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: A pilot study. *Phytother Res*. 2008;22(11):1544–7.

Shadomy S, Espinel-Ingroff A, Cartwright R. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility test and bioassay In: Lennette E, Ballows A, Hauslers JR V, Shadomy HJ (Eds). *Manual of clinical microbiology*. 4 ed. Washington: American Society of Microbiology; 1985. p. 991-9.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis*. 2008;14(7):582-90.

Shen CC, Yang YC, Huang TB, Chan SC, Liu BS. Low-level laser-accelerated peripheral nerve regeneration within a reinforced nerve conduit across a large gap of the transected sciatic nerve in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:175629.

Smijs TG, Pavel S. The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. *Photochem. Photobiol.* 2011;87(1):2–13.

Soukos NS, Socransky SS, Mulholland SE, Lee S, Doukas AG. Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. *Pharm Res.* 2000;17(4):405–9.

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

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

Stonecipher KG, Kezirian GM. Wavefront-optimized versus wavefront-guided LASIK for myopic astigmatism with the ALLEGRETTO WAVE: three-month result of a prospective FDA trial. *J Refract Surg.* 2008;24(4):424–30.

Uludamar A, Ozkan YK, Kadir T, Ceyhan I. *In vivo* efficacy of alkaline peroxide tablets and mouthwashes on *Candida albicans* in patients with denture stomatitis. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(3):291–6.

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

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

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

Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, et al. An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J Photochem Photobiol B.* 1999;50(1):1–7.

Yan Z, Hua H, Xu Y, Samaranayake LP. Potent antifungal activity of pure compounds from traditional chinese medicine extracts against six oral *Candida* species and the synergy with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:106583.

Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N *et al*. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol*. 2011;49(2):208–11.

ANEXO – Certificado do Comitê de ética em pesquisa

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeitos da terapia fotodinâmica na expressão dos genes SAP5, PLB1 e LIP9 em *Candida albicans*.
Pesquisador: Fernanda Freire
Versão: 4
CAAE: 04569812.5.0000.0077
Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 028657/2013
Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br